

# Metabolomski pristup u funkciji otkrivanja metabolita crijevne mikrobiote koji utječu na zdravlje ljudi

---

**Simonelli, Matteo**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2023**

*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:184:271977>

*Rights / Prava:* [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-21**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Mattea Simonelli

METABOLOMSKI PRISTUP U FUNKCIJI OTKRIVANJA  
METABOLITA CRIJEVNE MIKROBIOTE KOJI UTJEČU NA  
ZDRAVLJE LJUDI

Završni rad

Rijeka, rujan, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Mattea Simonelli

METABOLOMSKI PRISTUP U FUNKCIJI OTKRIVANJA  
METABOLITA CRIJEVNE MIKROBIOTE KOJI UTJEČU NA  
ZDRAVLJE LJUDI

Završni rad

Rijeka, rujan, 2023.

Mentor rada: Jelena Marinić, dipl.ing.preh.teh. doc.dr.sc.

Završni rad obranjen je dana 19.9.2023. u/na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Gordana Čanadi Jurešić, dipl.ing.preh.teh. (predsjednik Povjerenstva)
2. doc. dr. sc. Jelena Marinić, dipl. ing. preh. teh. (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Lara Batičić, dipl. sanit. ing.

Rad sadrži 83 stranice, 12 slika, 3 tablice, 262 literaturna navoda.

# Sadržaj

Sažetak .....	6
Summary .....	7
<b>1. Uvod i pregled područja .....</b>	<b>8</b>
<b>2. Svrha rada .....</b>	<b>11</b>
<b>3. Pregled literature .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1. Pregled ljudskog mikrobioma i distribucija mikroorganizama po GI traktu.....</b>	<b>12</b>
3.1.1. Usna šupljina.....	13
3.1.2. Jednjak .....	13
3.1.3. Želudac.....	13
3.1.4. Tanko crijevo .....	14
3.1.5. Debelo crijevo .....	14
<b>3.2. Razvoj crijevne mikrobiote kroz život pojedinca .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3. Mikrobiom povezan s dobrim zdravljem i disbioza.....</b>	<b>17</b>
<b>3.4. Funkcije crijevne mikrobiote.....</b>	<b>20</b>
3.4.1. Metaboličke funkcije crijevne mikrobiote .....	21
<b>3.5. Metode –„omike“ u istraživanju crijevne mikrobiote.....</b>	<b>27</b>
3.5.1. Metabolomika i njezine metode .....	28
3.5.2. Uzorci u metabolomskoj analizi .....	32
3.5.3. Metabolomski pristup u otkrivanju funkcija crijevne mikrobiote u usporedbi s ostalim –„omikama“ .....	33
<b>3.6. Metabolomski pristup u otkrivanju utjecaja prehrambenih navika na crijevnu mikrobiotu i njezine metabolite te njihov utjecaj na zdravlje .....</b>	<b>34</b>
<b>3.7. Metabolomski pristup u otkrivanju uloge crijevne mikrobiote i njezinih metabolita u razvoju različitih bolesti .....</b>	<b>36</b>
3.7.1. Cistična fibroza .....	37
3.7.2. Upalna bolest crijeva.....	38
3.7.3. Celijakija .....	40
3.7.4. Metabolički poremećaji (inzulinska rezistencija, dijabetes tipa 2, pretilost i bolesti masne jetre povezane s metaboličkom disfunkcijom) .....	41
3.7.5. Kardiovaskularne bolesti.....	44
3.7.6. Neurodegenerativne bolesti.....	46
<b>4. Rasprava .....</b>	<b>48</b>
<b>5. Zaključak.....</b>	<b>62</b>
<b>6. Literatura.....</b>	<b>63</b>

<b>7. Popis skraćenica i akronima .....</b>	<b>79</b>
<b>8. Životopis.....</b>	<b>81</b>
<b>9. Prilog .....</b>	<b>82</b>

## **Sažetak**

Crijevna mikrobiota velika je i raznolika zajednica mikroorganizama koji nastanjuju ljudski gastrointestinalni trakt. Čine ju mikroorganizmi iz svih domena života, među kojima su najzastupljenije bakterije. Mikroorganizmi crijevne mikrobiote proizvode velik broj različitih metabolita, koji različitim mehanizmima sudjeluju u oblikovanju cijelokupnog zdravstvenog stanja čovjeka. Ciljanom i neciljanom karakterizacijom širokog spektra metabolita u biološkim uzorcima, metabolomika pruža uvid u mikrobnu metaboličku aktivnost, interakcije crijevne mikrobiote s prehranom domaćina te promjene metaboloma povezane s bolešću. Identifikacija i kvantifikacija mnoštva različitih mikrobnih produkata postiže se korištenjem analitičkih metoda kao što su to spektrometrija masa i nuklearna magnetska rezonancija. Metabolomski pristup pruža saznanja o funkcionalnim učincima crijevne mikrobiote čije razumijevanje može pomoći u razvoju personalizirane medicine kao novog pristupa u dijagnostici, spriječavanju i liječenju niza bolesti te promoviranju općeg zdravlja.

Ključne riječi: crijevna mikrobiota, metaboliti, metabolomika, zdravlje, bolest

## **Summary**

The intestinal microbiota is a large and diverse community of microorganisms that inhabit the human gastrointestinal tract. It consists of microorganisms from all domains of life, among which bacteria are the most abundant. Microorganisms of the intestinal microbiota produce a large number of different metabolites, which through different mechanisms participate in shaping the overall health condition of a person. By targeted and non-targeted characterization of a wide range of metabolites in biological samples, metabolomics provides insight into microbial metabolic activity, interactions of gut microbiota with hosts nutrition, and disease-related metabolome changes. Identification and quantification of many different microbial products is achieved using analytical methods such as mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. The metabolomic approach provides knowledge about the functional effects of the intestinal microbiota, the understanding of which can help in the development of personalized medicine as a new approach in the diagnosis, prevention and treatment of a number of diseases and the promotion of general health.

Key words: gut microbiota, metabolites, metabolomics, health, disease



## 1. Uvod i pregled područja

Za razliku od azijskog razumijevanja crijeva kao „časne sredine” koja je središte duhovne i tjelesne snage (1), u zapadnoj kulturi „*niti jedan organ nije toliko pogrešno shvaćen, oklevetan i zlostavljan kao debelo crijevo*“ (2). Unatoč tome što su pitanja crijeva dugo vremena smatrana tabuom, a njihova uloga u zdravlju i bolesti kroz povijest zanemarivana i uglavnom pripisana probavi i apsorpciji hranjivih sastojaka, zdravlje crijeva sada se i u zapadnom svijetu sve više prepoznaje kao poželjan cilj i važno fiziološko stanje potrebno za ukupno dobro zdravlje.

Premda pojam „zdravlje crijeva“ još uvijek nije dobro definiran, povezan je sa značajkama kao što su učinkovita probava i apsorpcija hrane, odsutnost gastrointestinalnih tegoba ili bolesti, stabilan i učinkovit imunološki sustav, normalna funkcija enteričkog živčanog sustava povezana s mentalnim blagostanjem te uravnotežena crijevna mikrobiota (1).

Crijevna mikrobiota složena je i dinamična zajednica mikroorganizama koji koloniziraju različite regije gastrointestinalnog trakta (GIT) ljudi a broji bilijun ( $1 \times 10^{14}$ ) stanica, što je za red veličine veći broj od svih tjelesnih stanica domaćina (3, 4).

Iako se mikrobiota crijeva u pravilu odnosi na mikroorganizme u cijelom probavnom traktu, ovaj pojam obično označava mikrobiotu u debelom crijevu budući da je generalno znanje o crijevnoj mikrobioti stečeno analizom fecesa koji daje informacije samo o mikroorganizmima koji nastanjuju donja područja GIT-a (5). Štoviše, u odnosu na ostale regije GIT-a, debelo crijevo se odlikuje najvećom gustoćom kolonizacije te nosi 70 % svih mikroorganizama pronađenih na/u tijelu. Crijevne mikrobne zajednice udruženje su različitih vrsta mikroorganizama i obuhvaćaju predstavnike tzv. stabla života, ali su među njima prevladavajući mikroorganizmi fakultativno i obligatorno anaerobne bakterije koljena Firmicutes i Bacteroidetes, koje čine do 90 % svih crijevnih bakterija, te bakterije koljena Verrucomicrobia, Proteobacteria i Actinobacteria čija je zastupljenost nešto manja (6, 7, 8). Uslijed zajedničke evolucije, ljudi i njihovi partnerski crijevni mikroorganizmi utječu jedan na drugog i uspostavljaju simbiotski odnos koji većinom obuhvaća komenzalne interakcije, korisne za jednog partnera u simbiozi, te one mutualističke prirode, koje uključuje korisne ishode za oba organizma u simbiotskoj zajednici (5).

Jedan od načina na koji crijevna mikrobiota ljudi ulazi u interakciju sa svojim domaćinom je preko ogromne lepeze kemijski različitih metabolita koje proizvodi (9), a ta komunikacija je cjeloživotna i započinje rođenjem (10).

Sa 3,3 milijuna gena, crijevna mikrobiota nadmašuje za više od 100 puta genomski sadržaj ljudi (11). Taj genetski sadržaj mikrobiote, poznat kao mikrobiom, prepoznat je kao

drugi genom ljudi (12) i kodira širok raspon metaboličkih funkcija koje su ekvivalentne „virtualnom organu unutar organa“ (13), a mnoge od njih domaćin inače ne bi mogao obavljati sam (14). Neke od tih vitalnih metaboličkih funkcija jesu sinteza kratkolančanih masnih kiselina (engl. *Short Chain Fatty Acids*; SCFA), vitamina i aminokiselina, hidroliza i fermentacija neprobavljivih ugljikohidrata te biotransformacija žučnih kiselina i ksenobiotika (15). Mikrobni metaboliti mogu biti štetni ili korisni za domaćina, i stapaju se s metabolitima domaćina, izravno mijenjajući metabolom, odnosno kvalitativan i kvantitativan skup svih molekula male molekulske mase (metabolita) u organizmu. Svi metaboliti u metabolomu tvore veliku mrežu metaboličkih reakcija, gdje produkti jedne enzimske reakcije ulaze u druge reakcije. Iz tog razloga, metabolom je vremenski osjetljiv i neprestano se mijenja, te je mnogo dinamičniji od proteoma i genoma (16). Crijevna mikrobiota stvara svoje metabolite (1) transformacijom sastojaka podrijetlom iz prehrane domaćina, (2) modifikacijom sastojaka koje proizvodi domaćin, te (3) biosintezom *de novo* (17). Nastali mikrobni metabolički produkti utječu na crijevne funkcije, kao što su visceralni senzor, motilitet, probava, izlučivanje, propusnost, prikupljanje energije, imunitet sluznice i učinak barijere (18). Neki od tih crijevnih produkata mogu signalizirati i udaljenim organima u tijelu, što crijevnoj mikrobioti omogućuje utjecaj na brojne druge funkcije domaćina, kao što su imunost, neurobiologija i metabolizam (19).

Za razliku od genoma, mikrobiom je puno plastičniji i podložan vrlo brzim promjenama pod utjecajem endogenih procesa koji se odvijaju u organizmu, načina života i okolišnih čimbenika, kao što su promjene u prehrani, dobi i zdravstvenom stanju domaćina, terapija lijekovima ili neka druga medicinska intervencija (20). Obzirom da su metaboliti konačni produkti translacije proteina i ekspresije gena, takve promjene u mikrobiomu rezultiraju razlikama u mikrobnim metaboličkim profilima (prisutnosti i koncentracijama mikrobnih produkata) koje se uočavaju među pojedincima (21). Zapravo, mikrobiom svakog pojedinca jedinstven je poput otiska prsta (22), pri čemu svaka osoba dijeli samo 1 % iste vrste (23).

Isto tako, promjene u funkcionalnoj sposobnosti mikrobiote i mikrobnim metaboličkim profilima obilježje su disbioze (24), koja se povezuje s brojnim patološkim stanjima, uključujući i ona koja se manifestiraju izvan GIT-a, kao što su upalne bolesti crijeva (engl. *Inflammatory Bowel Disease*; IBD), sindromom iritabilnog crijeva (engl. *Irritable Bowel Syndrome*; IBS), dijabetes, pretilost, rak, kardiovaskularne bolesti, autoimmune bolesti, alergije i druge atopijske bolesti te poremećaji ponašanja, poput poremećaja iz spektra autizma i šizofrenije (25). Trenutačni dokazi stoga čine Hipokratovu (o. 460. pr. Kr. – 370. pr. Kr.)

izjavu „*Sve bolesti počinju u crijevima*““, i riječi Elie Metchnikoffa (1845. – 1916.) „*Smrt sjedi u crijevima*“ uvjerljivijima danas nego ikad prije.

Budući da metaboliti koje stvara crijevna mikrobiota oblikuju fiziološke funkcije domaćina od normalne fiziologije do različitih patofiziologija, crijevni mikrobiom prepoznat je kao dodatan faktor koji pored genoma domaćina, životnih navika i faktora okoliša određuje biološki metabolički fenotip (metabotip) (26).

Metabolomika ili metabolička fenotipizacija omogućuje kvantifikaciju svih molekula male molekulske mase (<1 kDa) u biološkim tekućinama (krv, urin), crijevnom sadržaju ili tkivima (27, 28). Rezultirajući metabolom uzorka, odnosno koncentracije metabolita u određenom trenutku, može se smatrati metaboličkim „otiskom prsta“ koji predstavlja stanje organizma u dano vrijeme (29), pa metabolomika omogućuje praćenje razvoja odgovora na genetsku modifikaciju ili fiziološki/okolišni podražaj. Budući da su određene kombinacije i omjeri metabolita u biološkom uzorku specifični za pojedinačna stanja i tkiva, metabolomika može ukazati na organ zahvaćen promjenama, i omogućuje mehanističko razumijevanje uzročne povezanosti strukture i funkcionalnog kapaciteta mikrobnih zajednica s određenim fenotipom, što je ključno za otkrivanje uloge crijevne mikrobiote u predviđanju rizika za razvoj bolesti, etiologiji, napredovanju i liječenju bolesti te identifikaciji metabolita koji se mogu uzeti kao biljezi bolesti i odgovora na terapiju (30).

## **2. Svrha rada**

Cilj je ovoga rada opisati primjenu metabolomskih tehnika temeljenih na spektrometriji masa (MS) i nuklearnoj magnetskoj rezonanciji (NMR) za opisivanje metaboloma crijevne mikrobiote i dati prikaz pretpostavljenih funkcija uobičajenih klasa mikrobnih metaboličkih produkata otkrivenih ciljanim ili neciljanim metabolomskim pristupom koji bi se mogli uzeti kao mogući mikrobnii medijatori zdravlja čovjeka.

### 3. Pregled literature

Ljudsko tijelo nastanjeno je s više od jednog trilijuna mikroorganizama koji pronalaze dom u različitim anatomskim regijama, poput kože, usne i nosne šupljine te urogenitalnog i gastrointestinalnog trakta (Prilog, Slika 1.) (31, 32, 33). Takve ekološke zajednice mikroorganizama koje dijele prostor tijela s domaćinom i s njime uspostavljaju mutualistički, komenzalni ili parazitski odnos poznate su kao mikrobiote, dok se kolektivni genom svih mikroorganizama koji nastanjuju okoliš uvriježeno naziva mikrobiomom (31, 34, 35). Interakcije između domaćina tj. čovjeka i mikrobnih stanica vrlo su kompleksne, pa zbog toga čovjekova i njegova mikrobiota čine jedinstven entitet koji se često slikovito opisuje kao „superorganizam“ (11, 36).

Najzastupljeniji mikroorganizmi u mikrobiotama koje se nalaze na i u čovjekovu tijelu jesu bakterije, ali te zajednice čine i ostali mikroorganizmi poput virusa, gljivica, arheja i protozoa (38). Najveći broj bakterija pripadnici su crijevne mikrobiote koja obitava u GIT-u, u prvom redu u debelom crijevu (Prilog, Slika 1.). Crijevna mikrobiota složen je ekosustav mikroorganizama koji nastanjuje i održava homeostazu gastrointestinalnog trakta, u kojem mikroorganizmi međusobno komuniciraju, hrane se, rekombiniraju i koevoluiraju (32, 39). Takva zajednica mikroorganizama uključuje otprilike  $3,8 \times 10^{13}$  individualnih mikroorganizama, odnosno oko 1000 različitih vrsta koje iskorištavaju hranjive tvari, sintetiziraju vitamine te proizvode mnoštvo različitih metabolita koje domaćinu pomažu u održavanju osnovnih bioloških funkcija (40). Koljena bakterija koja brojčano dominiraju u crijevnoj mikrobioti jesu Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria i Verrucomicrobia, no zdravom ljudskom mikrobiomu pridonosi i raznolikost nižih taksonomskih jedinica. Neki od najznačajnijih rodova koje crijevna mikrobiota uključuje jesu *Bacteroides spp.* te anaerobni gram-pozitivni koki, kao što su *Peptostreptococcus spp.*, *Eubacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, i *Clostridium spp.* (11).

#### 3.1. Pregled ljudskog mikrobioma i distribucija mikroorganizama po GI traktu

Brojni faktori u pojedinim anatomskim regijama GIT-a utječu na brojnost i sastav mikrobne populacije, kao što su pH vrijednost, prisustvo žučnih soli, enzimi gušterače i drugi probavni enzimi te peristaltika. Provedena su brojna istraživanja i analize mikrobioma crijevnih mikrobnih zajednica od usne šupljine do analnog otvora te je dokazano da postoje bakterijske vrste karakteristične za cijeli gastrointestinalni trakt, no u njegovim različitim dijelovima nalaze se u različitim omjerima (41). Preferencija kolonizacije crijevnih bakterija duž crijeva je regiospecifična, te je vrlo vjerojatno i rezultat promjene već spomenutih fizikalno-kemijskih

parametara duž duljine lumena crijeva, a na brojnost i sastav mikrobnog populacije utječu i ostali čimbenici poput načina rođenja djeteta, načina hranjenja novorođenčeta, načina života, prehrane, uzimanja lijekova, ali i sama genetika pojedinca (Prilog, Slika 2.) (11, 19, 39, 42).

### 3.1.1. Usna šupljina

Ljudska oralna mikrobiota sadrži oko 700 vrsta, druga je po veličini i raznovrsnosti, odmah nakon crijevne mikrobiote, te je ključna u održavanju oralnog i sustavnog zdravlja (34, 36). U usnoj šupljini zdravih osoba mogu se naći različite zajednice bakterija koje obitavaju u različitim staništima kao što su to gingivalni sulcus (prostor između zubnog mesa), zubi i desni, jezik, obrazi, tvrdo i meko nepce te krajnici (36, 42). U oralnoj mikrobioti zdravih osoba prisutne su bakterije iz vanjskog okoliša kao i one patogene. Sva oralna područja dom su bakterijama iz porodica Porphyromonadaceae, Veillonellaceae i Lachnospiraceae, iako distribucija rodova tih porodica varira ovisno o dijelu usne šupljine u kojem su pronađene. Slina je ključna komponenta koja pomaže u rastu biofilma i održava oralnu mikrobiotu u stanju eubioze (36). Proteini iz sline i gingivalna krevikularna tekućina služe kao hranjive tvari za rast određenih mikroorganizama. Dok vodikov peroksid, te ostale antimikrobne komponente sline poput laktoferina, salivarne laktoperoksidaze, lizozima i tiocijanata negativno utječu na mikrobnog rast (42).

### 3.1.2. Jednjak

Mikrobiota jednjaka potječe od progutane orofaringealne mikrobiote i/ili od sadržaja refluksiranog iz želuca (43). Jednjak posjeduje složenu mikrobiotu koja se sastoji pretežit od gram-pozitivnih bakterija, odnosno od šest glavnih koljena (Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria i Fusobacteria) te dominantnog roda *Streptococcus* (44). Ostale taksonomske jedinice koje čine egzofagealnu mikrobiotu jesu *Prevotella spp.* i *Veillonella spp.*, a dokazano je da je bakterijski sastav jednjaka slična onoj u usnoj šupljini (42).

### 3.1.3. Želudac

Donedavno se smatralo da je mikrobiom želuca lišen života, kao i mikrobiom jednjaka. Temeljno opravdanje za takvo vjerovanje bilo je mišljenje da će mikroorganizmi teško preživjeti u izrazito kiselom okruženju lumena želuca. Dodatni čimbenici za koje se smatralo da su štetni za bakterijski rast i razmnožavanje jesu retrogradni duodenalni refluks žuči kao i toksični metaboliti koje proizvode bakterije oralne šupljine (45). Ovo vjerovanje dugo je vladalo među znanstvenicima ne samo zbog navedenih čimbenika, već i zbog praktičnih izazova poput prikupljanja uzoraka i nedostatka valjanih dijagnostičkih postupaka (42, 46).

Otkićem spiralne, ureaza-pozitivne te gram-negativne bakterije *Helicobacter pylori* došlo se do zaključka da ipak postoje određene bakterije, koje unatoč izrazito niskoj pH vrijednosti, imaju sposobnost kolonizirati lumen želuca (41). *H. pylori* konstantan je kolonizator želuca koji je prisutan u jednoj do dvije trećine globalne populacije (46), a proizvodi enzim ureazu koji pretvara ureu u amonijak, neutralizirajući želučanu kiselinu i stvarajući alkalnu mikrosredinu koja ovoj bakteriji omogućava preživljavanje u kiseloj sredini želuca. Nadalje, *H. pylori* može prodrijeti kroz sluznicu te kolonizirati površinu želučanog epitela i izazvati upalni odgovor, koji se manifestira kao peptični ulkus, rak želuca te bolest jednjaka (41).

Osim *H. pylori*, želučanu mikrobiotu čine i bakterije koljena Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes i Fusobacteria što je dokaz da je ona dinamičan sustav koji u svakom trenutku može sadržavati brojne prolazne bakterijske vrste najvjerojatnije kao rezultat gutanja hrane (45, 47).

#### 3.1.4. Tanko crijevo

Tanko crijevo je organ u kojem se zbiva razgradnja i apsorpcija hranjivih tvari, a njegova mikrobiota igra važnu ulogu u održavanju zdravlja (42). Okolina tankog crijeva razlikuje se od okoline debelog crijeva jer je izložena želučanoj kiselini i enzimima gušterače te bržem kretanju probavnog sadržaja. Ti čimbenici stvaraju nepovoljnije okruženje za mikrobnu kolonizaciju u usporedbi s debelim crijevom. Međutim, tanko crijevo je stanište određenim mikroorganizmima, ponajprije rodovima *Streptococcus* i *Veillonella*, te rodovima *Clostridium*, *Escherichia* i *Turicibacter* koji su nešto manje zastupljeni (48). Mikrobiota tankoga crijeva sadrži iste rodove bakterija kao i mikrobiota usne šupljine, no njihova  $\alpha$ -raznolikost opada u smjeru usta-debelo crijevo zbog nepovoljnih uvjeta sredine (pH vrijednost želučane kiseline, enzimi gušterače i peristaltika) (49). Istraživanja mikrobiote tankoga crijeva još uvijek su oskudna u usporedbi s istraživanjima mikrobiote debelog crijeva zbog otežanog prikupljanja uzoraka. Invazivne metode uzorkovanja sadržaja tankog crijeva predstavljaju prepreku u karakterizaciji mikrobiote koja nastanjuje različite dijelove tankoga crijeva (48, 49).

#### 3.1.5. Debelo crijevo

Za razliku od tankoga crijeva, debelo je crijevo puno kraći cjevasti organ koji obavlja funkcije kao što su resorpcija vode i vitamina nastalih mikrobnim metabolizmom te fermentacija crijevnog sadržaja. Debelo crijevo posjeduje najsloženiju i najraznolikiju populaciju mikroorganizama u cijelome tijelu koja je dosada najdetaljnije istražena (42). Dobra opskrba hranjivim tvarima i relativno dugo vrijeme tranzita crijevnog sadržaja olakšavaju rast i razvoj složenih mikronih zajednica, pa ukupna masa mikroorganizama u debelom crijevu iznosi

približno 90 g. Stoga je debelo crijevo oaza za rast mikroorganizama u kojoj se postižu razine od  $10^{10}$  do  $10^{12}$  bakterijskih stanica po gramu crijevnog sadržaja, što je najviša zabilježena gustoća mikroorganizama u bilo kojem poznatom mikrobnom staništu na Zemlji. Dosada su identificirane tisuće različitih vrsta bakterija, a prevladavajuća koljena bakterija uključuju Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria i Proteobacteria (11). Međutim, okoliš gastrointestinalnoga trakta varira po duljini, pa je zbog relativno visoke dostupnosti supstrata, u prvom redu fermentabilnih ugljikohidrata, cekum i ulazno debelo crijevo mjesto najintenzivnije mikrobne aktivnosti. Tom fermentacijom nastaju SCFA uslijed čega dolazi do pada pH vrijednosti u odnosu na onaj u ileumu. Vrijednost pH ostaje niska u uzlaznom i poprečnom debelom crijevu, ali se povećava u silaznom i sigmoidnom debelom crijevu uslijed fermentacije proteina kojom nastaju bazični produkti, apsorpcije SCFA i izlučivanja bikarbonata iz sluznice. Zbog takvih promjena, gustoća bakterijske populacije povećava se distalno kroz debelo crijevo. Osim po duljini, okoliš debelog crijeva varira i aksijalno, pa stoga jedan dio mikrobiote debelog crijeva čini mikrobiota sluznice koja je u doticaju sa stijenkom crijeva te obiluje aerobnim bakterijama, dok drugi dio čini fekalna mikrobiota koju čine anaerobni mikroorganizmi (41, 50). Sastav mikrobiote debelog crijeva svake osobe jedinstven je i na njega utječe niz različitih čimbenika kao što su prehrana, fizička aktivnost, zdravstveno stanje, konzumacija alkohola i duhanskih proizvoda te korištenje antimikrobne terapije.

### **3.2. Razvoj crijevne mikrobiote kroz život pojedinca**

Nekad se smatralo da je intrauterini okoliš zdrave trudnice sterilan, a da početna kolonizacija novorođenčeta nastupa tek pri porodu. Tvrdnja da je posteljica u potpunosti sterilna polako biva opovrgnuta zbog toga što su brojna nova istraživanja dokazala prisutnost bakterijske DNA u ovojnicama posteljice i fetusa, amnionskoj tekućini i krvi iz pupkovine (42, 51). Nepatogena komezalna mikrobiota koljena Firmicutes, Tenericutes, Proteobacteria, Bacteroidetes i Fusobacteria čini većinu placentnog mikrobioma, a vrlo je slična majčinom oralnom mikrobiomu u regijama supragingivalnog plaka. Sam mehanizam kojim mikroorganizmi prolaze kroz placentarnu barijeru još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, međutim, pretpostavlja se da su izravan kontakt između majčine decidue i fetalnih membrana, migracija imunoloških stanica i cirkulacija krvi majke i fetusa neki od mogućih načina kolonizacije fetusa (51).

Kolonizacija mikroorganizmima te razvoj mikrobiote nastavlja se pri samom rođenju djeteta te ovisi o načinu na koji je dijete rođeno. Vaginalno rođena djeca bivaju kolonizirana mikroorganizmima iz majčine vagine i crijeva pri prolasku kroz porodni kanal, a bakterijski



rodovi koji dominiraju jesu fakultativni anaerobi (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp* i *Enterobacter spp.*) koji su rani kolonizatori te striktni anaerobi rodova *Bifidobacterium spp.*, *Bacteroides spp.* i *Clostridium spp.* koji se ubrajaju u kasne kolonizatore (42, 39). S druge strane, novorođenčad rođena carskim rezom kolonizirana je mikroorganizmima koji se nalaze pretežito na koži i u okolišu, pa je u odnosu na novorođenčad rođenu vaginalno njihova crijevna mikrobiota manje raznolika, a osobito je karakterizirana niskom raznolikosti i zastupljenost koljena Bacteroidetes. Ukupna raznolikost crijevnih mikroba djece rođene carskim rezom niža je u prve dvije godine života u odnosu na djecu rođenu prirodnim putem. Osim toga, porod carskim rezom rezultira i odgođenom kolonizacijom bakterijama roda *Bifidobacterium* i *Bacteroides* pa je potreban duži vremenski period do uspostave crijevnih mikroorganizama najčešće povezanih s crijevima odraslih. Razlike u mikrobioti vezane uz način rođenja prisutne su samo u ranoj životnoj dobi, ali se smatra da su u vezi s potencijalnim zdravstvenim rizicima u kasnijem životu. Osim načina poroda, rani učinak na crijevnu mikrobiotu ima prehrena novorođenčeta. Majčino mlijeko kroz probiotičke i prebiotičke mehanizme oblikuje mikrobiotu novorođenčeta. Izvorom je oligosaharida (engl. *Human Milk Oligosaccharides*; HMO) koji djeluju kao početni prebiotici, pa mikrobiotom dojene djece dominiraju bakterije roda *Bifidobacterium* među kojima su neki sojevi prilagođeni rastu na HMO, a prisutne su i bakterije roda *Lactobacillus*. S druge strane, mikrobiota dojenčadi hranjene adaptiranim mlijekom razvija raznovrsniju mikrobiotu, s manje bifidobakterija i više potencijalnih patogena, poput *Clostridium coccoides*, *Staphylococcus spp.* te onih iz porodice Enterobacteriaceae. U takvoj mikrobioti više je taksona koji su povezani s mikrobiotom odraslih, pa takav mikrobiom brže sazrijeva. Iako u mikrobioti djece hranjene majčinim mlijekom prevladava jedna vrsta bakterija, tj. bifidobakterije, takav mikrobiom ima veću funkcionalnu sposobnost, s većim brojem gena povezanih s imunološkim i metaboličkim funkcijama. Pokazalo se da što je mikrobiota novorođenčadi sličnija mikrobioti dojene djece, manji su zdravstveni rizici u ranoj dobi i kasnijem životu, zbog čega se adaptirane mliječne formule obogaćuju frukto- i galaktooligosaharidima koji oponašaju prebiotičke učinke HMO. Od ostalih faktora koji utječu na oblikovanje mikrobiote novorođenčadi treba izdvojiti termin poroda, liječenje djeteta i majke antibioticima, majčino zdravstveno stanju i njezine životne navike (39, 41, 52).

Dok neki znanstvenici tvrde da se pedijatrijski mikrobiom razvija u uglavnom stabilnu konfiguraciju sličnu odraslima unutar prve dvije do tri godine života, druga su istraživanja pokazala da se mikrobiom nastavlja razvijati kroz razdoblje djetinjstva i u adolescenciji. Iako su na razini koljena prevladavajuće bakterijske skupine (Firmicutes, Bacteroidetes i

Actinobacteria) u djece i adolescenata slične onima u odraslih, filogenetske skupine na razini roda značajno se razlikuju. Razlog tomu jest to što su procesi u mladom tijelu usmjereni na rast i razvoj, dok su tjelesni i biokemijski procesi u odraslih ljudi usmjereni na upalne procese (42, 53).

U usporedbi s prethodnim životnim stadijima, crijevna mikrobiota u odrasloj dobi uglavnom je stabilna te dominiraju koljena Firmicutes i Bacteroidetes te u manjoj mjeri Actinobacteria, Proteobacteria i Verrucomicrobia (42). Disbioza crijevne mikrobiote uvelike je povezana sa zdravljem, a pretilost, metabolički poremećaji, upalne bolesti crijeva neke su od najčešćih bolesti s kojima se odrasli pojedinci susreću. Unatoč jedinstvenosti crijevne mikrobiote među pojedincima, ukupni sastav i učinkovitost crijevne mikrobiote kod zdravih ljudi imaju tendenciju da ostanu stabilni tijekom vremena (42, 54, 55).

Poznato je da raznolikost mikrobnih vrsta u crijevima opada sa starenjem, a nastaje kao posljedica uzimanja većeg broja medicinskih pripravaka. Drugi razlog gubitka mikrobnosti povezan je s različitim zdravstvenim stanjima karakterističnima za ovu životnu dob, od kojih su najčešći gastrointestinalni i metabolički poremećaji, upalna stanja te kognitivni pad. Relativna brojnost specifičnih bakterijskih taksona mijenja se s godinama, relativni broj bakterija koljena Bacteroidetes i Proteobacteria se povećava, dok se broj korisnih bakterijskih rodova, poput *Bifidobacterium* i *Faecalibacterium* smanjuje, a isto tako zamijećen je i porast potencijalno štetnih bakterijskih rodova *Fusobacterium*, *Bacillus*, *Staphylococcus* i *Corynebacterium* (42, 54, 55).

### **3.3. Mikrobiom povezan s dobrim zdravljem i disbioza**

Relativna distribucija crijevnih bakterija i arheja je jedinstvena za svakog pojedinca zbog raznolikosti na razini sojeva i razlika u mikrobnim stopama rasta te u strukturnim varijantama unutar mikrobnih gena (31, 19). Te varijacije u sastavu crijevne mikrobiote među pojedincima djelomično su i rezultat utjecaja okolišnih čimbenika te genetike domaćina (11). Iz tog razloga, „zdrava“ ljudska crijevna mikrobiota, odnosno mikrobiota u stanju eubioze nije definirana ni u kojoj dubljoj taksonomskoj rezoluciji. Umjesto toga, može se izdvojiti nekoliko važnih značajki crijevne mikrobiote koje su izravno povezane s eubiozom, i obuhvaćaju veliku raznolikost taksona, veliko bogatstvo mikrobnih gena te stabilne funkcionalne jezgre mikrobioma. Ipak, velika raznolikost i bogatstvo crijevnih bakterija sami po sebi nisu izravni pokazatelji zdrave mikrobiote budući da ta značajka ne vrijedi za sva tjelesna staništa, kao što je vaginalni mikrobiom, gdje velika raznolikost može biti povezana s bakterijskom vaginozom, abnormalnim rastom na grliću maternice, prijevremenim porodom i upalom (19). Mikrobiom

povezan sa zdravljem, osim visokog stupnja raznolikosti, karakterizira i ravnoteža u broju i sastavu bakterijskih taksona i prisustvo korisnih vrsta koje sudjeluju u sintezi različitih produkata koji povoljno utječu na čovjekovo zdravlje, te sposobnost crijevnog mikrobioma da se odupre promjenama koje bi mogle narušiti sastav mikrobne zajednice te sposobnost oporavka nakon izlaganja takvim smetanjama (56, 57).

S obzirom da ne postoji jedinstvena definicija „zdrave“ crijevne mikrobiote, razvijen je koncept koji definira sržni i varijabilni mikrobiom (Prilog, Slika 3.). Sržni crijevni mikrobiom odnosi se na skup mikroorganizama koji su stalno prisutni u određenom okolišu ili staništu, u ovom slučaju u debelom crijevu. U kontekstu crijevnog mikrobioma, sržni mikrobiom uključuje one mikroorganizme koji su obično pronađeni u crijevima većine zdravih pojedinaca, bez obzira na individualne razlike ili geografski položaj (58, 59, 60). Postoji više definicija sržnog mikrobioma, pa tako razlikujemo osnovni, dinamični, ekološki, funkcionalni i domaćinu prilagođen sržni mikrobiom, od kojih svaki pruža različite perspektive u definiranju pojma „sržni mikrobiom“ na osnovu njegove vremenske stabilnosti (61), ekološkog utjecaja na mikrobne zajednice (62) i funkcionalnih svojstava (58, 63). Varijabilni mikrobiom, s druge strane, podrazumijeva mikroorganizme koji pokazuju značajne varijacije u svojoj prisutnosti ili brojnosti među pojedincima ili populacijama te je odgovoran za individualne razlike u mikrobnom sastavu. Varijabilni mikrobiom snažno ovisi o čimbenicima kao što su genetika, prehrana, stil života, geografski položaj, dob i izloženost okolišnim uvjetima (58).

Svaka promjena u ravnoteži crijevne mikrobiote dovodi do disbioze, a najčešće su to stresori poput promjena u prehrani, konzumacija alkohola i duhanskih proizvoda, uporaba antibiotika, povećana razina stresa te poremećaji cirkadijalnog ritma (64), a na promjene mikrobnog sastava u crijevima utječu i brojne bolesti, uključujući metaboličke, imunološke i neurološke poremećaje. Niža bakterijska raznolikost opetovano je uočena kod osoba koje boluju od upalne bolesti crijeva, dijabetesa tipa 1 i 2, celijakije, pretilosti i drugih bolesti (11, 19, 31). Povezanost između smanjene raznolikosti crijevne mikrobiote i bolesti dokaz je da je crijevni ekosustav bogatiji vrstama otporniji na utjecaje okoliša zbog toga što funkcionalno srodni mikrobi mogu nadoknaditi funkcija nestalih vrsta (31, 57). Crijevna disbioza uvelike je povezana i s procesom starenja. (65). Smanjena raznolikost crijevnih mikroorganizama, promjene u sastavu različitih taksona te promjene u sastavu mikrobnih gena i njihovih funkcionalnih značajki, općenite su karakteristike sržnog mikrobioma starijih osoba. Ipak postoje razlike u  $\alpha$ -raznolikosti i  $\beta$ -raznolikosti te metabolomskom profilu između zdravih i oboljelih starijih pojedinaca, odnosno kod hospitaliziranih ili oboljelih starijih pojedinaca češće je primijećena smanjena raznolikost nego u zdravih starijih ljudi (65).

Usporedna istraživanja mikrobioma urbanih, industrijaliziranih populacijskih skupina te kultura na koje ne utječe suvremeni način života, kao što su postojeće lovačko-sakupljačke zajednice i društva koja se tradicionalno oslanjaju na poljoprivredu, dala su predodžbu o funkcionalnim promjenama crijevnog mikrobioma koje su se dogodile tijekom evolucije hominida i njegove povezanosti sa zdravljem i bolesti.

Jedna od najvećih poluizoliranih skupina koja održava tradicionalne prakse preživljavanja temeljene na lovu, ribolovu i sakupljanju je pleme Yanomami. Nastanjuju amazonsko područje koje obuhvaća granicu Brazila i Venezuele, živeći u naseljima smještenim na razini mora kao i na visokim planinama u području u Amazoniji. Njihova je prehrana ovisna o sezonskim varijacijama u dostupnosti hrane te je siromašna mastima i solju, a bogata voćem, vlaknima i prašumskim životinjama. Uobičajene kronične bolesti u modernim društvima, kao što su ateroskleroza i pretilost, gotovo su nepoznate među pripadnicima Yanomami plemena, a njihova crijevna mikrobiota pokazuje iznimno visoke razine bakterijske i funkcionalne raznolikosti. Rodovi bakterija dominantni u fekalnoj mikrobioti Yanomami plemena jesu *Prevotella*, *Phascolarctobacterium*, *Oxalobacter*, *Desulfovibrio*, *Helicobacter* i *Spirochaeta*, dok je rod *Bacteroides* vrlo oskudan. Kod crijevne mikrobiote ispitanika porijeklom iz Sjedinjenih Američkih Država primijećena je suprotnost u odnosu na crijevnu mikrobiotu Yanomami plemena. Dakle, rod *Bacteroides* je dominirao dok su rodovi *Oxalobacter* i *Desulfovibrio* bili prisutni u znatno manjem broju, a rod *Helicobacter* bio je u potpunosti odsutan (66).

Slična istraživanja također su potvrdila da pojedinci koji žive u ruralnim i/ili lovačko-sakupljačkim društvima imaju raznolikiji mikrobiom s višim razinama i jedinstvenim taksonima bakterija koje razgrađuju vlakna, a kojima je crijevni mikrobiom ljudi u urbanim industrijaliziranim populacijama osiromašen, kao što su bakterija roda *Prevotella* i *Treponema* (67). Suprotno tome, zajednice crijevnih mikroba u industrijaliziranim društvima, prilagođenim urbanom načinu života i prehrani bogatoj mastima i proteinima animalnog podrijetla, jednostavnim šećerima i prerađenom hranom, obogaćene su bakterijama roda *Bacteroides*, koje se povezuju s visokom konzumacijom masti (68) te taksonima koji razgrađuju endogenu sluz i otporne su na antibiotike (69).

Smatra se da su pomaci u prehrambenim navikama, s prehrane bogate prehrambenim vlaknima, a siromašne jednostavnim šećerima i mastima prema prehrani zapadnjačkog tipa, poboljšanje higijenskih i sanitacijskih mjera, porod carskih rezom, hranjenje adaptiranim mliječnim formulama, uporaba antibiotika i izloženost okolišnim zagađivačima neki od vodećih čimbenika odgovornih za uočene razlike u oblikovanju mikrobne strukture crijeva u

industrijaliziranim društvima, i vjerojatan uzrok izumiranja crijevnih mikroorganizama kroz generacije s posljedicama koje se ogledaju u narušavanju ravnoteže između domaćina i njegovih crijevnih mikroorganizama što na kraju može dovesti do pojave autoimunih poremećaja, pretilosti, dijabetesa tipa 2 i drugih kroničnih nezaraznih bolesti. Pretpostavlja se da bi se tradicionalnom prehranom i načinom života (kao što je suživot ljudi, cirkadijani ritam i higijenska praksa) mogla preoblikovati mikrobiota pojedinaca iz urbanih sredina, čineći je raznolikijom i sličnijom mikrobioti „tradicionalnih seljana kišnih šuma“ (70, 66).

### **3.4. Funkcije crijevne mikrobiote**

Crijevna mikrobiota ima značajan utjecaj na ljudsko zdravlje te obavlja brojne funkcije koje doprinose i poboljšavaju opću dobrobit. (9, 39).

Jedna od njih je zaštitna funkcija tj. sprječavanje kolonizacije crijeva patogenim mikroorganizmima ograničavanjem prostora i hranjivih tvari te stvaranjem antimikrobnih spojeva (31, 39, 71).

Također, crijevna mikrobiota ima i strukturnu funkciju obzirom da pomaže u održavanju integriteta i nepropusnosti crijevne barijere tako što regulira diferencijaciju i proliferaciju epitelnih stanica te spojeve među njima, kao i proizvodnji sluzi u Goblettovim stanicama (3, 11, 39, 40, 71, 72).

Nadalje, crijevna mikrobiota obavlja metaboličke funkcije, budući da sintetizira vitamine (uključujući vitamin K i nekoliko vitamina iz skupine B kompleksa), neke aminokiseline, kao što je lizin, regulira apsorpciju vitamina, minerala i vode, kontrolira sastav i količinu plinova u crijevima, utječe na toksičnost ksenobiotika i djelotvornost lijekova a fermentacijom neprobavljivih sastojaka hrane i endogene sluzi doprinosi opskrbi energijom i supstratima (39, 40, 71). Metabolički učinci crijevne mikrobiote unutar gastrointestinalnog trakta utječu na sposobnost probave, ekstrakcije energije, apsorpcije hranjivih tvari i izlučivanja nusprodukata iz unesene hrane (38, 39, 40, 71). Osim lokalnih učinaka u crijevima, brojne molekule koje proizvode crijevni mikrobi mogu utjecati na fiziologiju domaćina i u drugim organima (39). Istraživanja tvrde da osim probave, crijevni mikroorganizmi utječu na druge elemente zdravlja poput metabolizma, kontrole tjelesne težine, mentalnog zdravlja (26, 71).

Crijevna mikrobiota ima važnu ulogu u kontroli imunološkog odgovora i zaštiti od neadekvatnih imunoloških reakcija uključujući alergije i autoimune bolesti. Sazrijevanje imunoloških tkiva te fino podešavanje imunoloških odgovora samo su neki od korisnih blagotvornih učinaka crijevne mikrobiote na imunološki sustav čovjeka. Crijevna mikrobiota

pomaže u razvoju imunološkog sustava sluznice tako što educira imunološki sustav dojenčadi, ali i održava njezine funkcije kasnije tijekom života. Neki članovi crijevne mikrobiote sposobni su regulirati razvoj humoralnih komponenti tj. protutijela (sekretorni IgA) i T-stanični odgovor što omogućuje uklanjanje bakterija koje potiču upalni odgovor, ali i supresiju upalnih reakcija na komenzalnu mikrobiotu (40, 73). *Bacterioides fragilis* i neke vrste *Clostridia* pospješuju protuupalni odgovor, dok neke segmentirane filamentozne bakterije uzrokuju proizvodnju upalnih citokina (11, 40).

Još jedna od iznimno važnih funkcija crijevne mikrobiote jest utjecaj na crijevno mozgovnu os, odnosno na dvosmjernu komunikaciju između središnjeg i perifernog crijevnog živčanog sustava. Ova tjelesna funkcija omogućava komunikaciju emocionalne i kognitivne regije mozga s perifernim aktivnostima crijeva (74). Rute komunikacije uključuju neuralne, endokrine i imunološke mehanizme, omogućujući mikrobima da izravno signaliziraju mozgu (75). Prisutnost peptidoglikanskih fragmenata (engl. *Peptidoglycan Fragments*; PGN) komenzalnih mikroorganizama u cirkulacijskom sustavu domaćina (tj. serumu i cerebrospinalnoj tekućini) igra važnu ulogu u normalnom razvoju mozga i kroničnih moždanih upala kod bolesti kao što je multipla skleroza putem regulacije urođenih imunoloških puteva u mozgu (39, 40). Nekoliko metabolita koje proizvodi mikrobiota također stimulira neuroendokrine stanice u GIT-u i zato ona igra važnu ulogu u endokrinoj regulaciji gastrointestinalne funkcionalnosti i komunikaciji između crijeva i mozga (38).

Dakle, crijevna mikrobiota doprinosi optimalnoj probavi i apsorpciji, regulaciji energetskog metabolizma, održavanju netaknute barijere crijeva koja je, čini se, usko povezana s raznim upalnim i alergijskim bolestima i vjerojatno ublažava preosjetljivost imunološkog sustava te može utjecati na metabolički status (39, 40, 39, 71). Važno je napomenuti da su gastrointestinalni mikrobiom i domaćin u međusobnoj ovisnosti. Svako oštećenje crijevnog mikrobioma utjecati će na funkcionalnost lokalnih obrambenih mehanizama domaćina, a suprotno tome, svako će oštećenje epitela, imunoloških stanica ili utjecati na raznolikost i funkcionalnost mikrobioma (Prilog, Slika 4.) (40, 71).

#### 3.4.1. Metaboličke funkcije crijevne mikrobiote

Zajednice mikroorganizama koje nastanjuju crijeva ljudi obavljaju mnoštvo funkcija, zbog čega se nazivaju „zaboravljenim organom“, a među njima je možda najvažnija i klinički najrelevantnija metabolička funkcija. Mikroorganizmi crijevne mikrobiote ulaze u reakciju sa sastojcima unesenim putem hrane i endogenim tvarima stvarajući raznoliku lepezu metabolita koji izravno utječu na okolinu unutar probavnog trakta, na fiziologiju domaćina, opći

metabolizam, zdravlje crijeva i ukupno zdravlje (Prilog, Tablica 1., Slika 4.) (31, 32, 41, 42). Nakon apsorpcije u crijevima, nastali metaboliti dopijevaju u cirkulaciju gdje su prisutni često u koncentracijama jednakim ili višim od onih koje postižu tipični farmaceutski agensi. Ovi mikrobnji spojevi povezuju se s poželjnim zdravstvenim ishodima, ali mogu bit i toksični, ovisno o vrsti i metaboličkom statusu tkiva, kontekstu prehrane i razini metabolita u cirkulaciji. Osim toga, proizvodnja mikrobnjih metabolita podliježe interindividualnoj varijabilnosti, kako unutar populacije tako i među geografskim ili etničkim skupinama, te ovisi o dostupnosti prehrambenih supstrata. Promjena u dostupnosti supstrata može dovesti do promjena u strukturi i funkciji mikrobnje zajednice jer utječe na mikrobnju fermentaciju i stvaranje SCFA, što zauzvrat mijenja na luminalni pH koji, kao bitna odrednica okoliša, određuje sastav mikrobnjih zajednica (38).

Glavni i dosad najviše proučavan lokalni metabolički učinak crijevne mikrobiote jest fermentacija prehrambenih vlakana, kao što su različiti tipovi rezistentnog škroba, celuloza, hemiceluloza, pektini, neki oligosaharidi, gume i sluzi. Ljudi i maju mali metabolički kapacitet za razgradnju ovih složenih ugljikohidrata, pa se ne mogu razgraditi niti apsorbirati u tankom crijevu, već neprobavljeni dopijevaju u debelo crijevo. S druge strane, crijevne bakterije posjeduju obiman repertoar enzima kojih nema u ljudskome tijelu, pa na taj način osiguravaju vitalne biokemijske putove za njihov metabolizam. Pored prehrambenih vlakana, crijevnoj mikrobioti dostupni su i ugljikohidrati endogeno prisutni u domaćinu, kao što su mucini. Mucini su glikoproteini koje stvaraju vrčaste stanice i glavni su sastojak sluzi koja prekriva epitel debelog (i tankog) crijeva. Unutarnj sloj sluzi čvrsto prijanja uz epitel i slabo je koloniziran mikroorganizmima, dok je vanjski sloj rahlji i podupire gušću i metabolički raznovrsniju zajednicu te ga mogu koristiti bakterije kao izvor energije i proteina, osobito u uvjetima lišenosti ugljikohidrat dostupnih mikrobioti u prehrani (38, 72).

Fermentacija neprobavljivih ugljikohidrata glavni je izvor energije u debelom crijevu, a produkti koji nastaju pospješuju rast i razmnožavanje crijevnih mikroba te se mogu iskoristiti u organizmu ljudi i općenito se smatraju korisnima (38). Glavni produkti te fermentacije su kratkolančane masne kiseline (SCFA), a uključuju acetat, propionat i butirat, (Prilog, Slika 5.) (40, 71, 77). Približan omjer acetata, butirata i propionata iznosi 60:20:20, a ovisi o količini vlakana unesenih prehranom, njihovoj vrsti, saastavu crijevne mikrobiote i vremenu tranzita crijevnog sadržaja (78). Glavni saharolitički rodovi u GIT-u ljudi jesu *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* i *Ruminococcus* (71, 77), a konkretno, članovi koljena Bacteroidetes glavni su u proizvodnji acetata i propionata, dok su članovi koljena Firmicutes zaslužni za proizvodnju butirata (79, 80). Iako je anaerobna

fermentacija vlakana glavni izvor SCFA, acetat, butirat i propionat mogu se proizvesti i metabolizmom aminokiselina, ali vrlo mali postotak bakterija debelog crijeva koristi ove metaboličke putove za njihovu proizvodnju (81, 82, 83).

Acetat, najzastupljenija masna kiselina kratkoga lanca, esencijalni je metabolit za rast bakterija. Proizvode ga bakterije *Akkermansia muciniphila* i *Blautia hydrogenotrophica* te bakterije rodova *Bacteroides spp.*, *Bifidobacteria spp.*, *Prevotella spp.*, *Ruminococcus spp.*, *Clostridium spp.* i *Streptococcus spp.* iz piruvata preko acetila-CoA i Wood-Ljungdahl puta (84, 85). Acetat proizveden iz acetila-CoA dobivenog glikolizom također se može prevesti u butirat u reakciji izmjene s butiril-CoA koju katalizira butiril-CoA: acetyl-CoA transferaza. Članovi crijevne mikrobiote zaslužni za proizvodnju butirata pripadaju koljenu Firmicutes, posebice su to *Faecalibacterium prausnitzii* i *Clostridium leptum* iz porodice Ruminococcaceae, te *Eubacterium rectale* i *Roseburia spp.* iz porodice Lachnospiraceae (79). Dalje, butirat se uglavnom sintetizira iz butiril-fosfata pomoću fosfotransbutirilaza/butirat kinaze (*Coprococcus eutactus*) (78, 85) ili iz laktata i acetata (*Eubacterium hallii* i *Anaerostipes spp.*) (79). Proizvodnja propionata zbiva se preko akrilatnog i sukcinatnog puta iz fosfoenolpiruvata (*Megasphaera elsdenii*, *Coprococcus catus*, *Bacteroides spp.*, *Phascolarctobacterium succinatutens*, *Dialister spp.* i *Veillonella spp.*) (85, 86) te razgradnjom mucina, čime uz propionat nastaje i acetat (*Akkermansia muciniphila*) (80, 87).

Većinu nastalih SCFA apsorbiraju kolonociti, uglavnom putem monokarboksilatnih prijenosnika ovisnih o vodiku ili natriju, te tamo služe kao izvor energije, dok se ostatak apsorbira u portalni krvotok, a manje od 5-10 % SCFA izlučuje se fecesom (88, 89, 90). U kolonocitima, sve se tri SCFA aktiviraju koenzimom A te se oksidiraju u ciklusu limunske kiseline (CLK) u cilju dobivanja energije. Butiril-CoA se  $\beta$ -oksidacijom razgrađuje do acetila-CoA, a propionat se prevodi u sukcinil-CoA. Svaka molekula acetata, propionata i butirata proizvodi 10, 18 odnosno 27 molekula adenzin-3-fosfata (ATP), dok, poredbe radi, molekula glukoze generira 32 molekule ATP-a (86). Većina nastalog butirata (95 %) apsorbira se u debelom crijevu te osigurava 60-70 % energetske potrebe sluznice debelog crijeva, što rezultira trofičkim efektom i niskom sistemskom apsorpcijom butirata (90, 91). Iako enterociti tankoga crijeva također mogu apsorbirati butirat, te stanice energiju prvenstveno dobivaju iz glukoze i glutamata (92). Acetyl-CoA se, osim oksidacije u CLK, može prevesti u citrat te koristiti kao izvor acetilnih skupina u reakcijama acetilacije kojima se epigenetski regulira aktivnost histonskih i nehistskih proteina (92). Dio SCFA koji se nije iskoristio u kolonocitima apsorbira se u krvotok te se većina metabolizira tijekom prvog prolaska kroz jetru. Acetat i butirat prevode se u acetyl-CoA, oksidiraju u CLK u energetske svrhe te se koriste



u sintezi masnih kiselina, ketonskih tijela i različitih lipida, ovisno o metaboličkim potrebama tijela. Dio propionata prevodi se u propionil-CoA te se također oksidira u CLK, dok se ostatak koristi u sintezi glukoze procesom glukoneogeneze (86). Propionat također sudjeluje u regulaciji signaliziranja sitosti u interakciji s receptorima masnih kiselina u crijevima te doprinosi održavanju inzulinske osjetljivosti perifernih tkiva (71, 93). U odnosu na ostale SCFA, acetat u najvećoj mjeri prelazi u perifernu cirkulaciju te se metabolizira u ekstrahepatičkim tkivima kao izvor energije, prvenstveno u skeletnom i srčanom mišiću, a u manjem opsegu i u masnom tkivu i bubregu. Acetat u jetri sudjeluje u metabolizmu kolesterola i lipogenezi, a smatra se i da ima važnu ulogu u regulaciji apetita (11, 39, 71).

Zbog iskorištavanja SCFA u energetske svhe, neprobavljivi ugljikohidrati osiguravaju 0-2,5 kcal energije, ovisno o stupnju njihove fermentabilnosti. Stoga se tipičnom zapdnjačkom prehranom može podmiriti 6-10 % energetske potrebe iz SCFA, a u afričkoj populaciji koja konzumira sedam puta više prehrambenih vlakana nego populacije u industrijaliziranim zemljama taj udio može biti i značajno viši. Kod niskog unosa neprobavljivih fermentabilnih ugljikohidrata mikrobiota se pomiče prema iskorištavanju proteina, kako onih iz prehrane domaćina, tako i onih endogenog podrijetla. Fermentacijom proteina smanjuje se razina SCFA, a ujedno se povećava sinteza potencijalno štetnih metabolita, kao što su amonijak, *N*-nitrozo spojevi, fenolni spojevi i sulfidi. S druge strane, fermentacija mucina dovodi do iscrpljivanja sloja sluzi što može uzrokovati upalu u gastrointestinalnom traktu i povećati osjetljivost domaćina prema invaziji patogenima (38). Iako se fermentacija prehrambenih vlakana smatra korisnom, u pretilih osoba prekomjerna produkcija SCFA dovodi do povećane ekstrakcije energije i pogoršava već postojeću prekomjernu uhranjenost (11, 72).

Osim što se koriste kao izvor energije i prekursori u sintezi biološki važnih molekula, SCFA imaju i brojne druge lokalne učinke u debelom crijevu kao što je to održavanje integriteta crijevnih barijera, proizvodnja sluzi, protuupalno i antikancerogeno djelovanje, ali pokazuju i sistemske učinke u organizmu kao na primjer imunoregulacija, kontrola apetita, regulacija homeostaze glukoze, lipida i energije u tijelu domaćina (11, 39, 71).

Osnovna funkcija SCFA jest utjecaj na metabolizam i migraciju imunoloških stanica, odnosno u crijevima ove molekule služe kao izvor energije za imunološke stanice. Kada su pravilno aktivirani i podržani ovim izvorom energije, makrofagi i dendritične stanice mogu uspješno obavljati svoje funkcije imunološkog nadzora i imunološkog odgovora (40). SCFA doprinose cjelovitosti crijevnih barijera tako što stimuliraju proizvodnju mucina, zaštitnog sloja koji oblaže crijevni epitel, te jačaju veze između crijevnih epitelnih stanica, poboljšavajući sposobnost barijere da spriječi translokaciju štetnih bakterija i njihovih toksina u krvotok (94).

Specifični mehanizmi kojima SCFA pozitivno utječu na imunološki sustav jesu modulacija i diferencijaciju T stanica te inhibicija produkcije prouplanih citokina. Butirat potiče stvaranje regulatornih T stanica, koje su odgovorne za suzbijanje imunološkog odgovora i održavanje imunološke tolerancije, a također igraju ključnu ulogu u sprječavanju imunološki posredovanog oštećenja tkiva i autoimunih poremećaja. K tome, butirat posjeduje snažna protuupalna svojstva zbog toga što inhibira proizvodnju faktora nekroze tumora-alfa (engl. *Tumor Necrosis Factor*; TNF- $\alpha$ ) i interleukin-6 (IL-6), dok s druge strane potiče izlučivanje protuupalnih citokina, kao što je interleukin-10 (IL-10). Ova ravnoteža pomaže prigušiti prejake imunološke reakcije te smanjuje upalu unutar crijeva (40, 95).

SCFA također imaju utjecaj na način na koji se neurotransmiteri stvaraju i otpuštaju u crijevima i mozgu. Na primjer, dokazano je da butirat potiče sintezu serotonina, neurotransmitera važnog za kontrolu raspoloženja. Serotonin se oslobađa u želucu i utječe na crijevni živčani sustav koji poput lančane reakcije, ima efekt na središnji živčani sustav (96). Nadalje, SCFA reguliraju sintezu neurotrofičnog faktora koji potiče iz mozga (engl. *Brain-Derived Neurotrophic Factor*; BDNF), proteina koji podržava rast, razvoj i preživljavanje neurona u mozgu. Znanstveno je dokazano da butirat povećava proizvodnju moždanog neurotrofičnog faktora koji pozitivno djeluje na zdravlje mozga, neuroplastičnost i kognitivnu funkciju (96). Također, modulacija crijevnih hormona još je jedna od važnih uloga koje obavljaju SCFA. Ove molekule mogu utjecati na proizvodnju i otpuštanje peptida YY (PYY), glukagonu sličan peptid-1 (engl. *Glucagon-Like Peptide-1*; GLP-1), koji igraju vrlo bitnu ulogu u regulaciji apetita, sitosti i metabolizmu glukoze. Modulirajući razine crijevnih hormona, SCFA diktiraju ponašanje pri hranjenju i energetske homeostazu, što može neizravno utjecati na sam rad mozga (Prilog, Slika 11.) (97, 98, 99).

Crijevna mikrobiota odlikuje se i značajnom proteolitičkom aktivnošću. Za razliku od fermentacije neprobavljivih ugljikohidrata, koja se odvija pretežito u proksimalnom kolonu, razgradnja proteina i fermentacija aminokiselina vezana je uz distalni kolon, a povećava se kod male zastupljenosti ugljikohidrata, pri niskom pH te u slučaju dugog vremena tranzita crijevnog sadržaja u debelom crijevu. Iako fermentacijom proteina u manjoj mjeri nastaju SCFA, glavni su produkti razgradnje proteina u debelom crijevu masne kiseline razgranatoga lanca (engl. *Branched Chain Fatty Acids*; BCFA): izobutirat, izovalerat i 2-metilbutirat. Fermentacija proteina manje je povoljna nego fermentacija ugljikohidrata budući da stvara metabolite koji mogu imati neželjen toksiološke implikacije za domaćina, kako je već gore spomenuto (38). Primjer su neki metaboliti triptofana, cisteina, metionina i histidina (Prilog, Slika 6.).

Osim sinteze SCFA, crijevna mikrobiota ima ulogu u proizvodnji mnogih drugih specifičnih produkata koji su izravno uključeni u zdravstvene ishode, a neki od njih su trimetilamin-*N*-oksid (TMAO), indolpropionska kiselina (engl. *Indole propionic acid*; IPA), sekundarne žučne kiseline, peptidoglikanski fragmenti (PGN) i vitamini (31, 40, 71).

Bakterije crijevne mikrobiote imaju sposobnost producirati TMAO iz prekursora poput kolina, fosfatidilkolina i karnitina koji potječu iz namirnica životinjskog podrijetla. Povišene koncentracije TMAO u krvnoj plazmi povezuju se s kardiovaskularnim bolestima kao što su ateroskleroza, infarkt miokarda, moždani udar te zatajenje srca, ali i drugim zdravstvenim stanjima poput renalne insuficijencije, dijabetesa tipa 2, inzulinskom rezistencijom i bolesti masne jetre povezane s metaboličkom disfunkcijom (engl. *Metabolic (Dysfunction) Associated Fatty Liver Disease*; MAFLD) (Prilog, Slika 7.) (40, 100, 101).

IPA nastaje isključivo bakterijskim metabolizmom iz aminokiseline triptofan. Njezina prisutnost u serumu rezultat je povećanog unosa prehrambenih vlakana, a njezine koncentracije mogu varirati ovisno o vrsti prehrane. Dokazano je da IPA posjeduje antioksidativna i protuupalna svojstva, štiti od razvoja dijabetesa tipa 2 te posjeduje potencijalna antionkogeni svojstva (41, 102, 103).

Peptidoglikanski fragmenti, poznati i kao muramil-peptidi, tvari su koje potječu iz staničnih stijenci gram pozitivnih, kao i gram negativnih bakterija. Igraju važnu ulogu u urođenim i stečenom imunološkom odgovoru, promicanju antimikrobne obrane domaćina te služe kao važni posrednici u interakciji između domaćina i bakterije (40, 104, 105).

Manji dio primarnih žučnih kiselina, nastalih u jetri iz kolesterola, crijevna mikrobiota pretvara u sekundarne žučne kiseline – iznimno moćne signalne molekule. Sekundarne žučne kiseline imaju ulogu u komunikaciji između domaćina i crijevnih bakterija, povezujući se s receptorima humanih stanica, kao što su nuklearni farnezoidni X-receptor (engl. *Farnesoid X Receptor*; FXR) i receptor žučnih kiselina 1 spregnut G-proteinom (engl. *G Protein-Coupled Bile Acid Receptor 1*; GPBAR1 ili TGR5), te na taj način reguliraju nekoliko fizioloških procesa, uključujući metabolizam, upalne procese i homeostazu glukoze. Sekundarne žučne kiseline negativno utječu na strukturu i funkciju epitela debelog crijeva, a dokazano je i da potencijalno djeluju kao promotori tumora (Prilog, Slika 8., Tablica 2.) (39, 40, 100, 106).

Vitamine, esencijalne mikronutrijente važne za odvijanje biokemijskih reakcija, ljudski organizam ne može sam sintetizirati. Neke od njih moguće je unijeti putem hrane, dok neke sintetiziraju bakterije crijevne mikrobiote. Dok ljudski genom ne posjeduje kompletan skup gena potrebnih za sintezu vitamina, crijevna mikrobiota može doprinijeti proizvodnji istih. U nedavno istraživanju dokazano je da osam vitamina iz skupine B kompleksa (biotin, folna

kiselina, kobalamin, niacin, pantotenska kiselina, riboflavin, piridoksin i tiamin) zapravo produkt metabolizma bakterija crijevne mikrobiote (Prilog, Tablica 1.) (39, 71, 107).

Lijekovi, sastojci hrane i toksini iz okoliša samo su neki od primjera mnogih ksenobiotika s kojima crijevna mikrobiota dolazi u doticaj i razgrađuje ih. Te se tvari mogu metabolizirati mikrobnim enzimima, što mijenja njihovu toksičnost, bioraspoloživost i apsorpciju u probavnom traktu (108).

### **3.5. Metode –„omike“ u istraživanju crijevne mikrobiote**

Sekvencioniranje genoma tehnologijama visoke propusnosti te spektrometrija masa, doveli su do ideje o –„omici“ i metodološkom napretku u istraživanju crijevne mikrobiote. Grčka riječ „om“ i pojam –„omika“ potječu od sufiksa *-omics*, što znači „cjelovito“, „sve“ ili „potpuno“. Molekule prikupljene iz bioloških uzoraka, tkiva ili tjelesnih izlučevina uključuju gene, RNA transkripte, proteine i metabolite, koji se mogu detektirati i dalje istraživati pomoću različitih metoda –„omike“ (109, 110). Metode –„omike“ definirane su kao istraživanje i analiza značajne količine podataka koji predstavljaju strukturu i funkciju cjelokupnog sastava specifičnog biološkog sustava na određenoj razini. Integracija više različitih –„omika“ neophodan je postupak za razumijevanje uzročno-posljedičnog odnosa između molekulskih mehanizama i fenotipskih manifestacija zbog toga što promjene u ekspresiji gena dovode do promjena u sintezi proteina te konačno i do promjena u bakterijskom metabolizmu (Prilog, Slika 9., Slika 10.) (111, 112).

Metagenomika, metatranskriptomika, metaproteomika i metabolomika četiri su glavne metode –„omike“ kojima se mogu pridružiti odgovarajuće „epiomike“ (epigenomika, epitranskriptomika i epiproteomika), ali mogu se i međusobno kombinirati što se naziva „interaktomikom“ u koju spadaju DNA-RNA interaktomika, RNA-RNA interaktomika, DNA(RNA)-protein interaktomika, protein-metabolit interaktomika itd (112, 113).

Metagenomika podrazumijeva proučavanje cijelog genoma nekog organizma, u ovom slučaju mikroorganizma u danom uzorku, što podrazumijeva sekvenciranje njegove cjelokupne DNA. Uobičajeno se koriste dva pristupa, tj. analiza gena markera, koja služi za identifikaciju samih mikroorganizama i otkrivanje njihovih relativnih udjela, te nasumično sekvencioniranje koje se koristi u otkrivanju potencijalnih funkcija cijele mikrobne zajednice na razini gena na temelju baza podataka već sekvenciranih genoma (113, 114).

Metatranskriptomika istražuje cijeli set RNA transkripta u danom trenutku te pruža uvid u obrasce transkripcije i njezinu regulaciju u živih mikroorganizama. Ekspresija gena govori o metaboličkim aktivnostima i odgovoru na okolišne čimbenike članova crijevne mikrobiote.

RNA može se podijeliti u dvije skupine: (1) kodirajuća RNA (mRNA), ona koja se prevodi u protein, te (2) nekodirajuća RNA koja sudjeluje u regulaciji ekspresije gena (113, 114).

Metaproteomika koristi spektrometriju masa visoke rezolucije za identifikaciju i kvantifikaciju razina eksprimiranih proteina (115) koji potencijalno imaju utjecaj na zdravlje čovjeka, a njezina je primjena neophodna zbog toga što se cjelokupna mRNA ne prevodi u proteinski produkt (113, 114).

Metabolomika se bavi analizom malih molekula (manjih od 1500 Da) zvanih metaboliti koji nastaju kao produkti i nusprodukti metaboličke aktivnosti mikroorganizama crijevne mikrobiote. Budući da je metabolom konačni produkt, promjene u ekspresiji gena, ekspresiji proteina i mikrobnog odgovora na okoliš izravno se odražavaju na metabolite (113, 114, 116).

Pristup koji podrazumijeva kombinirano korištenje metoda –„*omika*“ obećavajuća je strategija u prikupljanju informacija o ranim metaboličkim promjena koje bi mogle pridonijeti klasifikaciji, stratifikaciji te napretku u prevenciji i liječenju bolesti koje nastaju kao posljedica crijevne disbioze ili onih čije stanje biva pogoršano u stanju crijevne disbioze (117). S obzirom da isključivo jedan pristup ne može dati kompletnu sliku o funkcionalnim svojstvima crijevne mikrobiote, kombinacija više –„*omika*“ daje nam uvid u složene interakcije između kolektivnog mikrobnog genoma i krajnjih produkata njihova metabolizam te (pato)fizioloških mehanizama u bolesnih i zdravih pojedinaca (111, 117).

### 3.5.1. Metabolomika i njezine metode

Pojam metabolomika označava sveobuhvatnu kvalitativnu i kvantitativnu analizu malih molekula, među ostalim i analizu metabolita koje proizvodi crijevna mikrobiota. Karakterizacijom i kvantifikacijom produkata crijevne mikrobiote, metabolomika nam daje uvid u to kako crijevna mikrobiota funkcionira, kako komunicira s domaćinom te na koji način sudjeluje u oblikovanju njegova zdravlja (4, 119, 120), ali otkriva i utjecaj čovjekove prehrane i okoliša na sam crijevni mikrobiom i njegov metabolizam (4). Analiza metabolita izoliranih iz bioloških uzoraka, kao što su tkiva, tjelesne tekućine ili crijevni sadržaj, omogućuje otkrivanje promjena u sastavu i količinama metabolita povezanih s normalni biokemijskim procesima, ali isto tako i mnogim patogenetskim promjenama (Prilog, Slika 10.). Pritom, metabolomika koristi različite analitičke metode kao što su to spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*; NMR), spektrometrija masa (engl. *Mass Spectrometry*; MS), tekućinska (engl. *Liquid Chromatography*; LC) i plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*; GC) te kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary Electrophoresis*; CE) za prepoznavanje i mjerenje količina različitih metabolita. Ciljana analiza i ne ciljane

analiza dvije su različite podskupine metabolomike. Ciljana analiza se posebno usredotočuje na analizu različitih klasa molekula (kao na primjer ugljikohidrati, lipidi i aminokiseline), dok s druge strane, neciljana analiza brzo hvata cjelokupan metabolički profil uzoraka koristeći tehnologije koje mogu identificirati različite metabolite. (71, 118).

Metodom spektrometrije masa vrši se analiza molekula na temelju njihove mase i naboja. Ionizacija molekula u ionizatoru početna je faza u ovakvoj vrsti ispitivanja kemijskih spojeva. Generirani ioni zatim prolaze kroz analizator, koji ih dijeli u vremenu i/ili prostoru, te se zatim kreću od analizatora do detektora, gdje stvaraju električni signal koji se očitava pomoću osciloskopa, pisaača, računala ili nekog drugog uređaja. Na temelju informacija o specijaliziranim metabolitima i peptidima moguća je kemotipizacija pojedinačnih sojeva mikroorganizama (121, 122). Zbog svoje visoke osjetljivosti i sposobnosti da otkrije strukturne informacije o metabolitima, MS je široko korištena tehnologija u metabolomskim analizama. Pogodna je metoda za otkrivanje velikog broja metabolita. Ovisno o fizikalno-kemijskim karakteristikama metabolita koji se proučavaju, MS spreže se s drugim tehnikama, kao što su plinska kromatografija i tekućinska kromatografija (71, 118, 121).

Plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (engl. *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*; GC–MS) je analitička metoda koja omogućuje odvajanje i identifikaciju metabolita u biološkom uzorku (71, 118). Prvi korak je ekstrakcija molekula od interesa iz biološkog matriksa. Nakon ubrizgavanja u plinski kromatograf, ekstrahirani metaboliti se isparavaju i transportiraju inertnim plinom (kao što je helij) preko kolone za odvajanje. Stacionarna faza koja oblaže kolnu za odvajanje ulazi u interakciju s metabolitima u skladu s njihovim fizikalno-kemijskim karakteristikama, kao što su hlapljivost i polaritet. Dok se kreću kroz kolonu, različiti se metaboliti dijele na temelju različitih vremena zadržavanja u koloni. Sljedeći korak jest ulaz razdijeljenih metabolita u maseni spektrometar te detekcija njihove zastupljenosti i stvaranje masenog spektra. Konačno, pomoću specijaliziranog softvera, slijedi obrada dobivenih masenih spektara. Na temelju fragmentacije i karakterističnih spektra mase metabolita, spektri mase se uspoređuju s bazama podataka i referentnim bibliotekama kako bi se identificirali metaboliti. Usporedbom područja pikova ili intenziteta iona specifičnih za metabolite s kalibracijskim standardima ili internim standardima, postiže se kvantifikacija. (71, 118). GC-MS tehnika ima brojne prednosti, kao što su visoka osjetljivost, učinkovitost te ponovljivost, no zahtjeva isključivo hlapljive i termički stabilne spojeve ili spojeve koji se derivatizacijom mogu učiniti hlapljivima, pa je pogodna za analizu kratkolančanih masnih kiselina, aminokiselina, organskih kiselina, alkohola, estera i ketona (118, 122, 123). Iznimnu korisnost ove metode dokazuju brojna istraživanja.

Istraživanje provedeno na miševima koristilo je upravo GC-MS metodu u otkrivanju utjecaja crijevne mikrobiote na učinkovitost imunoterapije bazirane na anti-PD-1 nakon dodatka pektina (124). Zatim, utjecaj promjena u fekalnim metabolitima kod pacijenata koji boluju od Parkinsonove bolesti (125) te istraživanje promjena u metabolomu krvi pacijenata koji boluju od preddijabetesa i dijabetesa tipa 2 (126) također su primjeri široke primjene metabolomike u medicini.

Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (engl. *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*; LC-MS) također je često korištena analitička metoda u metabolomici, a kombinira MS s LC tehnikom kako bi pružila informacije o strukturi i sastavu složenih smjesa tvari (71, 118). Nakon pripreme uzoraka slijedi otapanje ekstrahiranih metabolita u odgovarajućem otapalu. Propuštanjem metabolita kroz kromatografsku kolonu, oni se odvajaju u tekućinskom kromatografu prema njihovim fizikalno-kemijskim karakteristikama. Slijedi MS gdje se molekule ioniziraju te zatim razdvajaju na temelju razlika u omjeru mase naspram naboja. Kao i u prethodnoj metodi, dobiveni se podatci analiziraju, kvantificiraju i uspoređuju sa standardima (122). Prednosti ove metode jesu što omogućuje analizu polarnih, kao i nepolarnih spojeva koji ne moraju nužno biti hlapljivi. Uz to, prethodna derivatizacija uzorka često nije potrebna, iako može pomoći u stvaranju skupine koja se može ionizirati. LC-MS koristi i puno nižu radnu temperaturu te je sama priprema uzorka puno jednostavnija u odnosu na GC-MS metodu (118, 127, 128). Ova metoda korištena je u brojnim istraživanjima, od kojih se ističu: (1) istraživanje o metabolitima koje proizvodi *Lactobacillus gallinarum*, a posjeduju antionkogeno svojstvo (129), (2) istraživanje o ulozi crijevne mikrobiote u transformaciji žučnih kiselina u sisavaca (130), (3) istraživanje poremećaja metabolizma crijevnih aminokiselina tijekom progresije kronične bolesti bubrega (131) te (4) istraživanje o utjecaju niskih koncentracija dikloroacetonitrila u vodi za piće na zdravlje ljudi (132).

Kapilarna elektroforeza spregnuta sa spektrometrijom masa (engl. *Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry*; CE-MS) tehnika je koju karakterizira visoka učinkovitost odvajanja, osjetljivost i kompatibilnost s različitim vrstama uzoraka. Funkcionira na principu kojim se metaboliti s različitim molekulskim masama i nabojima mogu razdvojiti u kapilari na osnovu njihove različite mobilnosti (118, 133). Prije same kapilarne elektroforeze, molekule od interesa potrebno je izolirati i koncentrirati, nakon čega slijedi njihovo razdvajanje na temelju omjera naboj/veličina i elektroforetske pokretljivosti. Ovaj proces se zbiva u kapilarnoj cjevčici ispunjenoj elektrolitskim puferom i priključenoj na električno polje. Nakon toga slijedi već spomenut proces MS i analiza rezultata (133). Ograničenje ove metode jest to što analit

koji se ispituje mora biti električki nabijena čestica, kao što su to peptidi i nukleinske kiseline. Pozitivne strane ove metode jesu njezina pouzdanost, ponovljivost i dugoročnu stabilnost, kao i mali volumen uzorka koji je potreban za samu analizu (133). CE-MS metoda koristi se u mnogim područjima znanosti kao što su to proteomika, u farmaceutske i kliničke svrhe te analiza hrane i okoliša (133).

Nuklearna magnetska rezonancija (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*; NMR) još je jedna od često korištenih metoda u metabolomici, a omogućava pristup korisnim strukturnim informacijama o molekulima, njezinoj dinamici te kemijskom okruženju. Uglavnom se koristi za određivanje metaboličkog otiska u biološkim uzorcima (134). Spektrometar nuklearne magnetske rezonancije koristi jako magnetsko polje i radiofrekvencijske (RF) zavojnice. Uzorak se izlaže jakom magnetskom polju, usklađujući nuklearne spinove metabolita. Primjenom specifičnog RF impulsa, pobuđuju se spinovi te se prati njihova relaksacija. Rezultirajuće signale detektiraju RF zavojnice i dobiva se NMR signal u vremenskoj domeni (135). NMR posjeduje brojne korisne karakteristike zbog kojih je često izabran kao analitička metoda u metabolomici. Zahtjeva minimalnu pripremu uzorka, reproducibilna je i nedestruktivna metoda, što znači da materijal ostaje netaknut nakon analize i može se koristiti u budućim NMR analizama. Također, važno je napomenuti da omogućuje identifikaciju dosad neidentificiranih metabolita, što je ključno u otkrivanju sve većeg broja metaboličkih produkata crijevne mikrobiote (136, 137). S druge strane, ograničenja u korištenju NMR spektrometrije uključuju njezinu slabu osjetljivost, odnosno nemogućnost detekcije niske koncentracije tvari (138). U metabolomici, NMR spektrometrija može se koristiti u detekciji fekalnih metabolita kao što su to kratkolančane masne kiseline, aminokiseline, primarne i sekundarne žučne kiseline, te oligosaharidi, a promjene u količinama i sastavu ovih tvari ukazuje na promjene u crijevnoj mikrobioti uslijed antibiotske terapije ili određenih patoloških stanja (139).

Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*; FT-IR) analitička je tehnika koja se najčešće rabi u analizi lipida i masnih kiselina, proteina, peptida, saharida i nukleinskih kiselina, a glavna karakteristika joj je to što detektira različite funkcionalne skupine molekula (140, 141). Ova tehnika temelji se na apsorpciji infracrvenih zraka pri različitim valnim duljinama. Mjeri se koliko je svjetlosti uzorak apsorbirao pri svakoj valnoj duljini (142). Prednosti ove metode jesu njezina brzina izvođenja, visoka sposobnost razlučivosti malih razlika u masi između velikog broja kemijskih spojeva te mogućnost kombinacije s tekućinskom kromatografijom, dok senzibilnost i selektivnost nisu njezine jače strane (143, 144, 145).



### 3.5.2. Uzorci u metabolomskoj analizi

U metabolomskim se analizama koriste uzorci tkiva određenih organa, krvi i krvne plazme, cerebrospinalne tekućine, ali i uzorci tjelesnih izlučevina poput urina, fecesa, znoja i sline te izdahnutog zraka. Istraživačko pitanje, dostupnost uzoraka, izbor analitičkih metoda i precizni ciljevi same analize utječu na izbor uzorka i njegovu pripremu. Tijekom procesa uzorkovanja važno je uzeti u obzir vrijeme uzorkovanja te njegovo adekvatno pohranjivanje do trenutka analize (118).

Crijevni sadržaj (feces) jedan je od najčešće korištenih uzoraka zbog jednostavnosti i neinvazivnosti uzorkovanja, a uz to pruža uvid u metabolizam crijevne mikrobiote, posebice mikroorganizama debelog crijeva. Nadalje, daje korisne informacije o interakcijama između crijevnih bakterija i domaćina, a često se koristi i u identifikaciji biomarkera određenih bolesti, određivanju utjecaja prehrane na funkcije crijevne mikrobiote, te praćenju metabolizma lijekova i ksenobiotika (146, 147).

Urin, kao i feces također je čest uzorak u metabolomici zbog neinvazivnosti uzorkovanja, ali za razliku od crijevnog sadržaja koji je bogat mikroorganizmima i njihovim produktima, urin pored metabolita crijevne mikrobiote sadrži i visoku koncentraciju endogenih spojeva koji potječu od čovjekovog metabolizma (148, 149).

Uzorkovanje krvi i krvnog seruma/plazme manje je invazivna metoda, a metabolomska analiza daje uvid u koncentraciju i sastav metabolita i ko-metabolita crijevne mikrobiote i čovjeka koji utječu na cjelokupno zdravlje, kao što su aminokiseline i derivati indola (118, 150).

Istraživanje metaboloma sline koristi najviše u karakterizaciji mikrobiote usne šupljine u bolesnih i zdravih pojedinaca (151), dok se metabolomske analize metabolita u izdahnutom zraku koriste u istraživanju povezanosti između hlapljivih organskih spojeva i različitih bolesti poput Chronove bolesti (152) ili upalne bolesti crijeva (153).

Karakterizacija metaboloma cerebrospinalne tekućine najviše se koristi u istraživanjima neurodegenerativnih bolesti i uloge crijevne mikrobiote u crijevno-mozgovnoj komunikaciji te sintezi neurotransmitera (154-156).

Uzorkovanje tkiva invazivna je metoda čijom je metabolomskom analizom moguće prikupiti vrijedne podatke o utjecaju produkata crijevne mikrobiote na metabolizam različitih organa i tumorskih tvorevina (118).

### 3.5.3. Metabolomski pristup u otkrivanju funkcija crijevne mikrobiote u usporedbi s ostalim –„*omikama*“

Stjecanje znanja o metaboličkim mrežama i putovima biološkog sustava, razumijevanje interakcija između metabolita crijevne mikrobiote i drugih molekula, te istraživanje funkcionalnih promjena izazvanih raznim fiziološkim ili patološkim stanjima glavni su ciljevi metabolomike (71, 118, 119). Metabolomski je pristup široko korištena metoda u razumijevanju utjecaja produkata crijevne mikrobiote na zdravlje domaćina, ali i njezinog utjecaja na ko-metabolizam između crijevne mikrobiote i čovjeka. Stoga nije iznenađujuće da istraživanja koje se baziraju na metabolomici mogu pronaći spojeve koji imaju potencijal da se koriste kao biomarkeri bolesti, jer crijevna mikrobiota komunicira s domaćinom putem metabolita te tako ispoljava povoljne ili nepovoljne učinke na rizik od bolesti (157). Osim toga, može se procijeniti utjecaj prehrane na metaboličke procese, dakle metabolomika nudi informacije o učincima sastojaka hrane na metaboličko zdravlje i pomaže u identifikaciji biomarkera povezanih s određenim prehranbenim intervencijama te omogućuje osmišljavanje adekvatne terapije i preventivnih metoda. (4, 9, 75, 119, 120, 157). Metabolomika predstavlja jedinstven pristup u proučavanju složenih sustava jer u odnosu na ostale metode –„*omike*“ ne pokušava dešifrirati složene interakcije između transkripcijskih i translacijskih podataka, već proučava isključivo krajnji rezultat mikrobnog metabolizma i njegovih interakcija s fiziologijom domaćina dajući detaljan uvid u trenutno stanje čovjekova organizma (111, 158). Budući da metabolomika daje izuzetno velike količine podataka putem relativno jeftinih i neinvazivnih tehnika, ima veliki potencijal za korištenje u dijagnostičke svrhe, u identifikaciji biomarkera koji upućuju na različita zdravstvena stanja te u praćenju odgovora na terapijske postupke (157, 159). Dok metagenomika nastoji povezati genetske čimbenike s bolešću, a metaproteomika identificirati proteine koji omogućuju praćenje napredovanja bolesti, obje imaju neka ograničenja u praktičnoj primjeni (159, 160, 161). Sama genetika ne može u potpunosti objasniti razlike u predispoziciji bolesti, a koncentracija proteina varira u različitim tkivima (27, 162).

Iako se na prvi pogled može učiniti kao da metabolomika predstavlja savršen instrument u brojnim znanstvenim poljima, potrebno je obratiti pažnju i na njezine nedostatke kako bi primjena bila što efikasnija. Koncentracija i sastav mikrobnih metabolita u uzorku mogu varirati ovisno o dobu dana, prehrani, dobi, spolu, itd., ali i položaj pikova za određenu molekulu također može varirati ovisno o pH vrijednosti uzorka (163, 164) što je važno uzeti u obzir tijekom interpretacije rezultata kako se isti ne bi pogrešno protumačili. Nadalje, najveći izazov u metabolomskim analizama predstavlja ogromna količina generiranih podataka čija je

analiza izuzetno složena i dugotrajna (111). Naime, podaci prikupljeni <sup>1</sup>H-NMR spektroskopijom mogu sadržavati informacije o do 100 metabolita ovisno o vrsti uzorka (165), dok podaci prikupljeni MS-spregnutim tehnikama mogu sadržavati informacije o više od 1000 metabolita po uzorku (166).

Integracija metabolomike s metagenomikom, metatranskriptomikom i proteomikom pruža uvid u odnos između četiri važna dijela svakog biološkog sustava, uključujući i crijevni mikrobiom, odnosno daje informacije o odnosima između genoma, RNA transkripta, sintetiziranih proteina te krajnjih produkata odnosno izraženog fenotipa. Za potpuno razumijevanje složenih odnosa između crijevne mikrobiote i čovjeka neophodno je ujediniti saznanja koja nam pružaju metode –„*omike*“, jer jedino ovakav pristup omogućava razvoj boljih i naprednijih metoda u predviđanju, otkrivanju, prevenciji i liječenju bolesti te očuvanju zdravlja (111, 157).

### **3.6. Metabolomski pristup u otkrivanju utjecaja prehrambenih navika na crijevnu mikrobiotu i njezine metabolite te njihov utjecaj na zdravlje**

Metabolomika se može primijeniti u utvrđivanju metaboličkog odgovora crijevne mikrobiote na različite prehrambene komponente. Temeljito razumijevanje zamršenih odnosa između prehrane, crijevne mikrobiote i metabolizma domaćina može se postići integracijom metabolomskog pristupa s drugim –„*omikama*“. Razotkrivanje specifičnih metabolita i metaboličkih puteva reguliranih prehranom predstavlja temelj u daljnjem promicanju zdravlja samog probavnog sustava, ali i cjelokupnog zdravlja čovjeka, kao i u sprječavanju metaboličkih bolesti (9, 120).

Metabolomika može odrediti specifične metabolite na čije razine utječu prehrambene varijable, uspoređujući profile metabolita ljudi koji slijede različite vrste prehrane. Ova metoda pomaže u razumijevanju načina na koji crijevna mikrobiota razgrađuje sastojke hrane i stvara spojeve koji se odražavaju na zdravlje domaćina (9). Dakle, metabolomika otkriva metaboličke puteve koje crijevna mikrobiota koristi za razgradnju i korištenje hranjivih tvari, ali i identificira metaboličke nusprodukte koji nastaju u odgovoru na određene makronutrijente, kao što su ugljikohidrati, proteini ili lipidi. Nastali metaboliti, kao što su SCFA, sekundarne žučne kiseline ili derivati aminokiselina, imaju različite učinke na fiziologiju domaćina što je opisano u poglavlju *Metaboličke funkcije crijevne mikrobiote*.

Pa tako na primjer, otkrivena je nekolicina metabolita koji se povezuju s visokim indeksom tjelesne mase i visceralne masnoće, od kojih se najviše ističe mokraćna kiselina, ali i lipidi, aminokiseline, peptidi i nukleotidi (167, 210). S druge strane, kod pojedinaca koji su

implementirali mediteransku prehranu bogatu vlaknima, primijećen je pad u koncentracijama primarnih i sekundarnih fekalnih žučnih kiselina (168). Dodatno, mediteranska se prehrana povezuje sa poboljšanom sintezom kratkolančanih masnih kiselina koje izražavaju protuupalna svojstva te smanjuju rizik od kroničnih bolesti poput dijabetesa tipa 2 (169). Istraživanje o utjecaju veganske prehrane, prehrane svejeda i umjetno stvorene prehrane bez vlakana dokazalo je da prehrana koja obiluje vlaknima (u ovom slučaju prehrana svejeda i veganska prehrana) potiče rast bakterija koljena Firmicutes koje su sposobne metabolizirati aminokiseline, a samim time i smanjuje razinu aminokiselina u fekalnoj masi (170). Prehrana koja oskudijeva vlaknima rezultira smanjenom proizvodnjom metabolita ugljikohidrata (butirat), ali i derivata aminokiselina (derivati indola), dok su razine lipopolisaharida (engl. *Lipopolysaccharides*; LPS) povišene, što upućuje na moguću propusnost crijevne barijere i upalni odgovor (169, 170).

Dakle, analizom metaboličkog odgovora pojedinca na određene prehrambene intervencije, metabolomika predstavlja izrazito korisnu metodu u razvoju individualiziranog pristupa prehrani tako što identificira metaboličke potpise i određuje najbolje prehrambene planove za pojedince uspoređujući profile metabolita prije i nakon dijetetskih tretmana (168). Manipulacija sastavom i brojnošću mikroorganizama koji su sastavni dio crijevne mikrobiote može se postići promjenom načina prehrane. Određene prehrambene taktike mogu povećati raznolikost mikroba, potaknuti rast korisnih bakterija i poboljšati cjelokupno zdravlje crijeva, a danas sve više privlače pozornost, ne samo znanstvenika i liječnika, već i šire populacije. Neke od promjena u načinu prehrane uključuju povećan unos prehrambenih vlakana, korištenje prebiotika, konzumacija fermentiranih prehrambenih artikala, vegeterijanska/veganska prehrana te smanjen unos jednostavnih šećera i prerađene hrane (31, 32, 169).

Probiotici su živi mikroorganizmi koji, kada se uzimaju u odgovarajućim količinama, doprinose zdravlju i dobrobiti domaćina. Određene korisne bakterije, uključujući vrste *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, koje obiluju u fermentiranim proizvodima, često se koriste kao probiotici, a također mogu neizravno utjecati na brojnost drugih mikrobnih vrsta interakcijom s već prisutnom crijevnom mikrobiotom. To dalje može pomoći u ponovnom uspostavljanju ravnoteže crijevnog mikrobioma, tako što potiče razmnožavanje korisnih bakterija koje istiskuju potencijalne patogene i sprječavaju njihovo razmnožavanje (19, 31, 39, 171). Uzimanje prebiotika doprinosi i cjelovitosti crijevne barijere, tako što zaustavlja prodor i širenje štetnih produkata i mikroorganizama kroz crijevnu sluznicu, ali uz to potiču proizvodnju protuupalnih citokina te na taj način održavaju zdrav imunološki odgovor (172). Prebiotici su definirani kao selektivno fermentirane komponente koje imaju sposobnost

promijeniti sastav i/ili aktivnosti mikroorganizama u probavnom traktu, a korisne su za zdravlje čovjeka (173). Jedan od najboljih načina za poticanje uravnotežene crijevne mikrobiote jest uvođenje prehrane bogate prehranbenim vlaknima. Iako ljudi ne posjeduju enzime za probavljanje prehranbenih vlakana, ona osiguravaju prehranu za crijevne bakterije. Iskorištavanjem prehranbenih vlakana, ove bakterije stvaraju SCFA koji imaju mnoštvo zdravstvenih prednosti (11, 169, 174). Prema nekolicini istraživanja, za razliku od prehrane temeljene na jednostavnim ugljikohidratima, mastima i mesu, prehrana s niskim udjelom masti i visokim udjelom vlakana ima sposobnost mijenjanja mikrobnog crijevnog sastava na pozitivan način, povećanjem broja korisnih bakterija iz rodova *Prevotella* i *Bacteroides* (koljeno Bacteroidetes) uz istovremeno smanjenje broja bakterija koljena Firmicutes, (169, 175). Simbiotici predstavljaju istodobnu uporabu probiotika i prebiotika u istom preparatu i imaju veliki potencijal u oblikovanju crijevne mikrobiote jer obje komponente simbiotika djeluju sinergetički te omogućuju bolje preživljavanje mikroorganizama u gastrointestinalnom traktu. Pravilan odabir probiotika, odnosno bakterijskog taksona i odgovarajućeg prebiotika daje obećavajuće rezultate u terapiji određenih patoloških stanja (Prilog, Slika 11.) (174).

### **3.7. Metabolomski pristup u otkrivanju uloge crijevne mikrobiote i njezinih metabolita u razvoju različitih bolesti**

Posljednjih se godina provodi sve veći broj istraživanja kojima je cilj utvrditi utjecaj crijevne mikrobiote i njezinih metabolita na rizik od razvoja različitih bolesti, njihov tijek, prevenciju i liječenje (Prilog, Slika 12.). To uključuje genetske (cistična fibroza), intestinalne (upalne bolesti crijeva, sindrom iritabilnog crijeva, celijakija, kolorektalni rak), metaboličke (dijabetes, pretilost, bolest masne jetre povezana s metaboličkom disfunkcijom), kardiovaskularne (hipertenzija, ateroskleroza) i neurodegenerativne bolesti (Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, Huntingtonova bolest) (Prilog, Tablica 3.) (71, 146). Prema nedavnim studijama, neki metabolički poremećaji nastaju kao rezultat promjena u strukturi i funkcijama crijevne mikrobiote (146, 176). Analiza metabolita izoliranih iz stanica, tkiva, tjelesnih tekućina omogućuje otkrivanje promjena u sastavu i količinama metabolita povezanih s normalni biokemijskim procesima, ali isto tako i mnogim patogenetskim promjenama poput metaboličkih poremećaja (9, 75). Dodatno, monitoringom metaboloma moguće je predvidjeti rizik za razvoj nekih bolesti (predijabetičko stanje, pretilost, dijabetes tipa 2, kardiovaskularne bolesti), te osmisliti adekvatnu terapiju i preventivne metode na razini pojedinca ili populacije (4, 75, 120).

### 3.7.1. Cistična fibroza

Cistična fibroza (engl. *Cystic Fibrosis*; CF) je autosomno recesivni genetski poremećaj koji se manifestira kao kronična opstruktivna bolest pluća, a karakterizira ju nakupljanje mukusa u dišnom i probavnom sustavu te česte infekcije pluća i sinusa (185, 186). Egzokrine žlijezde, osobito gušterača, zahvaćene su cističnom fibrozom, što može uzrokovati insuficijenciju gušterače. Iz tog razloga, hranjive tvari, osobito lipidi, možda se neće pravilno probaviti i apsorbirati u tankom crijevu (187). Promjenjivo prehrambeno okruženje u crijevima CF bolesnika utječe na funkciju i sastav crijevne mikrobiote. Nadalje, upalni procesi često uzrokuju stanje zvano sindrom propusnog crijeva čija je posljedica ulazak bakterija u krvotok te sistemska infekcija (188, 189).

Proučavanje utjecaja metabolita crijevne mikrobiote na promjene povezane s cističnom fibrozom omogućuje stjecanje saznanja o metaboličkim procesima u organizmu koji igraju ulogu u patogenezi, napredovanju bolesti i eventualnim terapijskim metodama (177, 190). Usporedbom metaboličkog profila oboljelih od CF-a i zdravih pojedinaca, prikupljaju se važne informacije o razlikama u sastavu i brojnosti mikroorganizama crijevnog mikrobioma, kao i njihovih produkata te se na temelju toga mogu ustanoviti mogući biomarkeri i promjene u metabolizmu. Te promjene imaju značajan utjecaj na razvoj, progresiju i ishod same bolesti (177, 190).

U usporedbi sa zdravim osobama, bolesnici s CF-om često pokazuju anomalije u sastavu crijevne mikrobiote što je rezultat primjene antibiotske terapije, abnormalne proizvodnje sluzi i ranije spomenute loše probave (185, 189). Koljena Firmicutes i Bacteroidetes brojčano opadaju, dok moguće patogene vrste pokazuju tendenciju prema povećanju obilja (186). Disbioza crijeva u bolesnika s CF-om može doprinijeti upali pluća i egzacerbacijama utječući na imunološki odgovor i modulirajući proizvodnju metabolita koji utječu na dišni sustav. Metaboliti poput SCFA mogu prodrijeti u krvni i limfni sustav te inducirati imunološke stanice i citokine koji reguliraju imunološki i upalni odgovor (186, 188).

Metabolomska analiza fekalnog metaboloma pomoću GC-MS metode otkriva povećanu razinu masnih kiselina u stolici, no važno je napomenuti da je ova pojava normalna karakteristika same bolesti zbog oslabljene apsorpcije masti u crijevima. Sljedeće važno otkriće je povećana sposobnost bakterija da metaboliziraju ksenobiotike, što je rezultat česte uporabe antibiotika (177). Nadalje, povećane razine alkohola kao što su etanol i propan-1-ol, te estera poput propilbutirata i etilacetata ukazuju na povećanu detoksikaciju kiselina i alkohola. Posljedica povećane produkcije alkohola u crijevima pogoduje razmnožavanju *C.difficile* (178).

Zaključno, disfunkcija CFRT gena u kombinaciji s primjenom antibiotika negativno oblikuje crijevnu mikrobiotu, ali ometa i njezine funkcije što predstavlja temelj za daljnja istraživanja i razvoj probiotske terapije (177, 178). Intenzivno istraživanje specifičnih procesa kojima crijevna mikrobiota utječe na CF provode se u svrhu unapređenja zdravlja i liječenja CF pacijenata. Razmatraju se mogućnosti korištenja probiotika ili transplantacije fekalne mikrobiote kao terapije za modificiranje crijevne mikrobiote i poboljšanje ishoda kod ovih pacijenata. Međutim, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se identificirale najučinkovitije metode za modificiranje crijevne mikrobiote i dugoročnih implikacija na zdravlje CF pacijenata (186).

### 3.7.2. Upalna bolest crijeva

Kronična upala crijevnog trakta obilježje je upalne bolesti crijeva (engl. *Inflammatory Bowel Disease*; IBD), koja obuhvaća stanja poput Crohnove bolesti (engl. *Crohn's disease*; CD) i ulceroznog kolitisa (engl. *Ulcerative Colitis*; UC). Za razliku od zdravih ljudi, pacijenti koji boluju od IBD-a često pokazuju promjene u raznolikosti i sastavu svoje crijevne mikrobiote. Studije su više puta pokazale da pacijenti koji pate od ovakvih bolesti imaju smanjenu mikrobnu raznolikost i promjene u obilju određenih bakterijskih svojti, odnosno pokazuju smanjene razine korisnih bakterija koljena Actinobacteria i Firmicutes, dok su razine proteobakterija u usporedbi sa zdravim subjektima povišene. Također je važno napomenuti da je u crijevima IBD pacijenata otkriven porast potencijalno patogenih bakterija, kao na primjer adherentno invazivna *Escherichia coli* i *Clostridium difficile* (180, 191, 192, 193). Proučavanje ovih patoloških stanja, uvelike je olakšala primjena metabolomskih tehnika koje omogućuju analizu metaboloma, ponajprije u uzorcima fecesa. Primjena metabolomike omogućila je uvid u pojedinosti o utjecaju metaboličkih promjena crijevne mikrobiote povezanim s razvojem upalnih bolesti crijeva, aktivnošću bolesti i terapijskim odgovorima (138, 179, 180, 194, 195, 196).

Metabolomika može pomoći u otkrivanju mogućih biljega za dijagnozu crijevnih upalnih bolesti, procjenu aktivnosti bolesti i predviđanje ishoda bolesti uspoređujući profile metabolita oboljelih i njihovih zdravih kontrola. Zatim, koristi se u vizualizaciji metaboličkih promjena koje podupiru patofiziologiju upalnih bolesti crijeva, odnosno nudi uvid u utjecaj oksidativnog stresa, upale i metabolita crijevne mikrobiote. Omogućava razumijevanje uloge crijevnog mikrobioma u patogenezi, progresiji, ranom otkrivanju, sprječavanju i liječenju ovih stanja profiliranjem metabolita u različitim uzorcima kao na primjer krvi, urinu ili fecesu pacijenata (138, 179, 180, 194-196).

Metodom protonске nuklearne magnetske rezonancije,  $^1\text{H-NMR}$ , u stolici pacijenata koji boluju od IBD-a detektiran je niz metabolita koji ukazuju na narušenu ravnotežu crijevne mikrobiote. Među njima ističe se porast koncentracije aminokiselina poput leucina, izoleucina, valina, alanina i ostalih, dok je koncentracija SCFA, dimetilamina (DMA) i trimetilamina (TMA) bio izrazito snižen u odnosu na zdrave pojedince. Ovi podatci mogu se razumjeti kao smanjen broj mikroba crijevne mikrobiote koji su ključni u razgradnji aminokiselina i produkciji SCFA te DMA i TMA iz sastojaka hrane (196). Nadalje, vrlo korisna tehnika u otkrivanju razlika u fekalnom metabolomu između zdravih ljudi i onih koji pate od ovakvih stanja jest GC-MS, a služi ponajprije za detekciju hlapljivih kemijskih spojeva (71). Značajni metaboliti jesu SCFA i njihovi derivati (alkoholi, esteri i razgranati derivati propanske i butanske kiseline), produkti metabolizma proteina (indol, fenol, *p*-krezol) te ostali česti metaboliti (alkoholi, aldehidi, ketoni i spojevi sumpora) (179, 180). Esteri masnih kiselina kratkoga lanca i aldehidi u većoj su razini pronađeni u uzorcima pacijenata s IBD-om, a isto tako i indol i fenol kod CD pacijenata za koje se smatra da imaju toksične učinke na crijeva (195). Smanjena koncentracija maslačne kiseline te masnih kiselina srednjega lanca (engl. *Medium-Chain Fatty Acids*; MCFA) također su karakteristike fekalnog metaboloma ovih pacijenata, a povezuje se s upalnim procesom (180). Studija nad pojedincima s iritabilnim sindromom crijeva i njihovim kontrolama povezala je pojedine bakterijske vrste i utjecaj njihovih metabolita na simptome bolesti. Pa tako, veći udio roda *Lactobacillus* u pacijenata sa sindromom iritabilnog crijeva uzrokuje veću produkciju organskih kiselina, a posljedično pogoršava simptome same bolesti (197).

Brojni radovi koji se bave ovom problematikom pokazuju da su metaboliti crijevne mikrobiote korisni pokazatelji upalnih crijevnih bolesti, budući da ih je jednostavno analizirati u uzorcima fecesa. Metabolomika nudi prospektivne ciljeve za terapijske intervencije i podržava razvoj novih dijagnostičkih alata nudeći cjelovitu perspektivu metaboličkih promjena kod upalnih bolesti crijeva (138, 179, 180, 194, 195, 196). Dokazano je da se unosom prebiotika može utjecati na povišenje proizvodnje SCFA koje nastaju kao rezultat promjene u bakterijskoj metaboličkoj aktivnosti. Važnost SCFA očituje se u njihovoj sposobnosti da snize pH vrijednost u unutrašnjosti crijeva te na taj način inhibiraju rast patogenih mikroorganizama. Važno je istaknuti i protuupalno svojstvo butirata, koji svojom sposobnošću da inhibira unutarstanični transkripcijski faktor NF $\kappa$ B za posljedicu ima smanjenu sintezu upalnih citokina. Iako su promjene u crijevnoj mikrobioti povezane s IBD-om, važno je imati na umu da različiti pojedinci mogu doživjeti različite promjene i da nemaju svi pacijenti iste obrasce disbioze (40, 198, 199).



### 3.7.3. Celijakija

Celijakija (engl. *Coeliac Disease*; CD) je autoimuni poremećaj karakteriziran intolerancijom, tj. imunološkom reakcijom na gliadin, protein (antigen) koji se nalazi u pšenici, ječmu i raži. Iako je konzumacija glutena glavni okidač celijakije, crijevna flora također može pridonijeti nastanku i napredovanju bolesti (200, 201, 202). Celijakija je kompleksna bolest kod koje su isprepleteni genetski, imunološki i okolišni čimbenici (203).

Metabolomika se sve više koristi kao klinički alat u posljednjih godina te je dosad pomogla u karakterizaciji niza patoloških bolesti. Primjena metabolomike pokazala je da se metabolički otisak u CD pacijenata može identificirati uzimajući u obzir tri različita, ali povezana čimbenika: malapsorpciju, energetske metabolizam i promjene u crijevnoj mikrobioti i/ili crijevnoj propusnosti. Nedavna istraživanja usredotočena su na ulogu crijevne mikrobiote u razvoju bolesti, kao i način hranjenja dojenčeta te kolonizaciju crijeva (203).

Istraživanja ukazuju na premećaje u sastavu i brojnosti crijevnih bakterija kod pacijenata s celijakijom u odnosu na sastav i broj crijevnih mikroba u zdravih ljudi, što znači da je prisutan manji broj korisnih komenzalnih vrsta, dok je broj mogućih patogena povećan. Crijevnu mikrobiotu CD pacijenata čini veći udio gram-negativnih bakterija (*Bacteroides spp.*, *E. coli*, porodica Enterobacteriaceae i koljeno Firmicutes), dok je udio protektivnih rodova *Bifidobacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Provetella spp.* i *Lactobacillus spp.* znatno manji, odnosno u suprotnosti sa sastavom crijevne mikrobiote zdravih pojedinaca (201, 202). Imunološki sustav značajno biva oblikovan od strane crijevne mikrobiote, a njezina neravnoteža može narušiti crijevnu homeostazu te uzrokovati neodgovarajući imunološki odgovor na antigene iz hrane, u ovom slučaju gluten (200). Imunološki posredovano oštećenje koje se vidi kod celijakije pod utjecajem je stvaranja proupalnih citokina, na koje se može utjecati aktivacijom određenih imunoloških stanica i drugih mikroorganizama. Dakle, velik broj polimernih peptida nakupljenih u crijevnom lumenu aktivira imunološki odgovor te posljedično dolazi do upale (202). *In vitro* studije navode da *E. coli* i *Shigella spp.* podupiru translokaciju gliadina te utječu na produkciju citokina što pogoduje nastanku neadekvatnog imunološkog odgovora (204), dok nasuprot tome bakterije iz roda *Bifidobacterium* preveniraju nastanak toksičnih peptida gliadina što rezultira izmjenom domaćinove tolerancije na gluten (205). Prema nekim istraživanjima, postoje crijevne bakterije koje mogu razgraditi proteine glutena. Enzime za razgradnju glutena može proizvoditi nekoliko bakterija, uključujući rod *Pseudomonas* i *Lactobacillus*, no trenutačno nije poznato koliko ovi mikrobn mehanizmi pridonose razgradnji glutena i imaju li ikakvih terapijskih implikacija za celijakiju (206).

Istraživanje provedeno nad djecom s celijakijom i pridruženim zdravim kontrolama pokazalo je jasne razlike u sastavu metabolita crijevne mikrobiote u uzorcima fecesa i urina. Od metabolomskih metoda, koristile su se GC-MS te <sup>1</sup>H-NMR. U fekalnim uzorcima CD pacijenata, srednje vrijednosti estera i nekih alkohola bile su više, ali razine etil-acetata, oktil-acetata i još nekih pojedinačnih estera bile su niže u odnosu na zdrave kontrole, što ukazuje na kompenzacijske mehanizme mikroba kako bi detoksicirali spojeve poput kiselina i alkohola (181, 207). Nadalje, spojevi sumpora i ugljikovodici bili su prisutni u višoj koncentraciji kod CD pacijenata negoli kod pridruženih zdravih kontrola. Najznačajnija razlika uočena je u razinama SCFA. Razine butirata i propionata bile su puno više u fekalnim uzorcima zdrave djece, dok je s druge strane, razina acetata bila viša u djece s celijakijom. <sup>1</sup>H-NMR korištena je kao kontrola GC-MS analize, a uz to pokazala je i povišene razine pojedinih aminokiselina, triamina i trimetilamin-*N*-oksida u djece koja imaju celijakiju (181).

Dosada jedina uspješna metoda u liječenju simptoma celijakije jest primjena bezglutenske prehrane, ali intenzivno se radi i na alternativnim metodama obnavljanja crijevnog mikrobioma. Probiotici, prebiotici i prehrambene intervencije usmjerene na obnovu sastava i broja mikroorganizama crijevne mikrobiote daju obećavajuće rezultate u smanjenju upale, poboljšanju funkcije crijevne barijere i ublažavanju simptoma kod osoba s celijakijom. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se odredili optimalni pristupi i identificirali specifični sojevi mikroba ili intervencije koje mogu pružiti dosljedne kliničke koristi. (200, 201, 202, 206, 208).

#### 3.7.4. Metabolički poremećaji (inzulinska rezistencija, dijabetes tipa 2, pretilost i bolesti masne jetre povezane s metaboličkom disfunkcijom)

Pretilost obuhvaća abnormalno, pretjerano nakupljanje masnoga tkiva, a dijabetes tipa 2, poznat i kao šećerna bolest, predstavlja metaboličko stanje obilježeno inzulinskom rezistencijom i visokom razinom glukoze u krvi. Bolesti masne jetre povezane s metaboličkom disfunkcijom (MAFLD) karakterizirana je nakupljanjem masti u jetri. Ove se bolesti nalaze u skupini metaboličkih poremećaja. (31, 39, 71, 209)

Primjena metabolomike u istraživanju značajki metaboličkih poremećaja daje uvid u mehanizme njihova nastanka, otkrivanje određenih biomarkera te olakšava razvoj strategija u liječenju i spriječavanju istih (210, 211). Otkrivanje biomarkera, odnosno, bakterijskih metaboličkih produkata povezanih s određenim metaboličkim poremećajima, poput dijabetesa, pretilosti, MAFLD i inzulinske rezistencije omogućuje ranu dijagnozu, praćenje napredovanja bolesti i procjenu odgovora na terapiju, a bazira se na usporedbi profila metabolita zdravih ljudi

i pacijenata s metaboličkim bolestima. Otkrivajući metaboličke promjene u korijenu metaboličkih bolesti, metabolomika daje informacije o patofiziološkim procesima. Ona razotkriva neregulirane metaboličke putove i nudi uvid u abnormalnosti u energetske metabolizmu, metabolizmu lipida, metabolizmu aminokiselina i drugim važnim metaboličkim procesima profiliranjem metabolita u prikupljenim uzorcima (9, 75, 210, 211).

Metabolizam žučnih kiselina, koji je ključan za metabolizam lipida i homeostazu glukoze, reguliran je od strane crijevne mikrobiote. Promjene u njezinom sastavu mogu utjecati na profile žučnih kiselina, što može promijeniti signalne putove žučnih kiselina koji kontroliraju metabolizam lipida, osjetljivost na inzulin i metabolizam glukoze (77, 212). Također, crijevna mikrobiota pomaže u održavanju integriteta crijevne barijere, koja regulira prolaz tvari iz lumena crijeva u krvotok. Disbioza može poremetiti funkciju crijevne barijere, što dovodi do povećane crijevne propusnosti, koja zauzvrat omogućuje translokaciju bakterijskih produkata, uključujući i LPS u krvotok, dodatno pridonoseći sustavnoj upali i metaboličkoj disfunkciji. Kronična upala niskog stupnja, povezana s disbiozom, može doprinijeti inzulinskoj rezistenciji i metaboličkoj disfunkciji, potičući razvoj pretilosti i dijabetesa tipa 2 (39, 40, 97). Neuravnoteženost u sastavu i brojnosti mikroba koji čine crijevnu mikrobiotu može rezultirati povećanom ekstrakcijom energije iz prehrane, odnosno pretjeranom sintezom masnih kiselina kratkoga lanca, što potencijalno dovodi do debljanja i pretilosti. Neke od bakterija koje potiču povećanu ekstrakciju energije iz hrane jesu *Eubacterium rectale* i *Clostridium coccoides* (11, 31). Važno je napomenuti da postoje određene vrste bakterija, ponajviše bakterije koljena Firmicutes, koje utječu na ekspresiju gena uključenih u metabolizam lipida, adipogenezu (stvaranje masnih stanica) i upalne procese, a to se odražava na domaćinovo stvaranje i distribuciju masnih zaliha (11, 39, 77, 209, 212). Zanimljivo je i da crijevna mikrobiota različitim mehanizmima utječe na regulaciju apetita. Određene crijevne bakterije proizvode signalne molekule koje mogu utjecati na oslobađanje hormona uključenih u kontrolu apetita, kao što su grelin i peptid YY. Neravnoteža u sastavu crijevne mikrobiote može promijeniti ove hormonske signale, što dovodi do nereguliranog apetita i povećanog unosa hrane (98).

Nedavne studije ukazuju na mogućnost otkrivanja komplikacija povezanih s dijabetesom prije nastanka subkliničkih stanja, a radi se o metabolitima glukoze, ketonskim tijelima te promjenama u bakterijskom metabolizmu koji ukazuju na poremećaje u metaboličkim putevima (75). Metabolomska analiza fekalnog metaboloma fokusira se na nekolicinu metabolita koji se povezuju s povećanom visceralnom masnoćom, a uključuje aminokiseline kao najbrojnije, zatim masne kiseline, nukleotide, šećere i vitamine. Ovo je

dokaz snažne povezanosti između mikrobnog metabolizma aminokiselina i vitamina B te pretilosti (210). Ove informacije olakšavaju razumijevanje patofiziologije metaboličkih bolesti (75, 120, 210, 211). Pa tako na primjer, neciljani metabolomski pristup doveo je do saznanja da se otisci metabolita znatno razlikuju između osoba s promijenjenom tolerancijom glukoze i zdravih osoba, što dalje ukazuje na jasne promjene u metaboličkim putevima između te dvije skupine. Slobodne masne kiseline u plazmi najvažniji su metaboliti koji ukazuju na preddijabetičko stanje (211, 213). Nadalje, nakupljanje glutamina te karnitina u tijelu ukazuje na promjene u metabolizmu masnih kiselina razgranatog lanca, a povišene razine aromatskih aminokiselina u plazmi ukazuju na rizik od nastanka dijabetesa tipa 2 (211). Zapadnjački način prehrane obiluje crvenim mesom koje međuostalom sadrži i prekursore TMA. Ovaj je kemijski spoj produkt bakterijskog metabolizma, a njegovom oksidacijom u jetri nastaje TMAO čije se povišene koncentracije u krvnoj plazmi povezuju s pretilosti i inzulinskom rezistencijom (169). No, ustanovljeno je da crijevna mikrobiota također ima utjecaja na cirkulirajuće razine masnih kiselina razgranatog lanca, čime također potencijalno uzrokuje inzulinsku rezistenciju (213).

Dugo se vremena nagađalo da produkti crijevne mikrobiote mogu pridonijeti etiologiji MAFLD i poslužiti kao potencijalna meta za njezino liječenje, a razvojem metabolomskih analitičkih tehnika omogućena je i detaljna analiza metaboloma ljudi koji boluju od ove vrste bolesti. Poznato je da crijevna mikrobiota svojim produktima igra važnu ulogu u upalnim procesima, regulaciji sinteze žučnih soli i domaćinovom iskorištavanju energije iz hrane, a svi navedeni procesi djeluju na razvoj MAFLD. Brojna istraživanja navode da su bakterije debelog crijeva izvor mnogih hlapljivih metaboličkih produkata, uključujući i etanol koji mogu imati toksične učinke na ljudski organizam nakon intestinalne apsorpcije i dostave u jetru putem portalne vene (214-217). Sastav crijevne mikrobiote kod pretilih ljudi i/ili onih s MAFLD razlikuje se od onoga u osoba zdrave tjelesne mase. Naime, bolesni pojedinci pokazuju povišene razine bakterija koljena Firmicutes i Acinetobacteria, a razine bakterija koljena Bacteroidetes su snižene, što je suprotno sastavu mikrobioma zdravih pojedinaca (216). Uzorci fecesa podvrgnuti su GC-MS analizi te su ustanovljene razlike u koncentracijama i sastavu plinovitih metabolita crijevne mikrobiote između zdrave i oboljele skupine. Ova saznanja nadalje mogu poslužiti u dijagnostici, ranom otkrivanju i liječenju nealkoholne masne bolesti jetre (214-217). U uzorcima pacijenata koji boluju od MAFLD pronađena je povišena koncentracija alkohola, kiselina, aldehida, ketona, amina i estera, a koncentracije aromatskih ugljikovodika i hidrazina bile su niže u odnosu na zdrave kontrole (214, 216). Neki od tih metabolita povezani su s kliničkim parametrima kao na primjer inzulinom, C-peptidom, bilirubinom i hemoglobinom, što se povezuje sa samim razvojem bolesti (215).

Iako je crijevna mikrobiota usko povezana s razvojem metaboličkih poremećaja, ključno je uzeti u obzir da postoje mnogi drugi čimbenici koji također igraju važnu ulogu u njihovom nastanku, kao što su to načina života, genetska predispoziciju, prehrambene preferencije, tjelesna aktivnost i drugi. Prateći promjene u metaboličkom profilu pacijenta, metabolomika može postati ključna metoda u ranom otkrivanju metaboličkih bolesti, njihovu prveniciju i liječenju, a također, sve se više pridaje važnost načinima manipulacije crijevne mikrobiote bilo putem prehrane ili transplantacijom fekalne mikrobiote kao potencijanim rješenjima za ovaj problem današnjice (39, 77, 97, 98, 209, 212).

### 3.7.5. Kardiovaskularne bolesti

Prema nedavnim istraživanjima, crijevna mikrobiota uvelike doprinosi nastanku i napredovanju kardiovaskularnih bolesti (KVB), koje uključuju zatajenje srca, hipertenziju i aterosklerozu. U usporedbi sa zdravim osobama, pacijenti koji boluju od KVB pokazuju promijenjen sastav i brojnost mikroba crijevne mikrobiote. Kod velikog broja takvih pojedinaca pronađen je povećan udio bakterija iz porodice Enterobacteriaceae, u koju spadaju vrste poput *Escherichia coli* i *Klebsiella* spp., te povećan broj bakterijskih rodova *Ruminococcus*, *Acinetobacter* i *Veillonella*. Crijevna mikrobiota može utjecati na razvoj kardiovaskularnih bolesti na mnogo načina, putem više različitih mehanizama (19, 218). Istraživanja koja se temelje na metabolomskim tehnikama uvelike su pomogla u otkrivanju metaboličkih putova povezanih s procesima nastanka i razvoja kardiovaskularnih bolesti. Otkrivanje odnosa između crijevne mikrobiote i njezinih metabolita te ljudskih fizioloških procesa pruža mogućnosti za razvoj novih dijagnostičkih testova i terapijskih pristupa u ranom otkrivanju i liječenju kardiovaskularnih bolesti. Otkriveno je da prehrana koja obiluje crvenim mesom izravno djeluje na povišene razine TMAO u krvnoj plazmi (Prilog, Slika 7., Tablica 1.), za koji je poznato da različitim mehanizmima utječe na razvoj kardiovaskularnih bolesti (219, 220).

Razina kolesterola i metabolizam lipida dva su važna čimbenika rizika za kardiovaskularne i metaboličke bolesti. Na razine kolesterola u cirkulaciji utječu modulacija proizvodnje, apsorpcije i izlučivanja kolesterola od strane crijevnih mikroba. Disbioza dovodi do smetnji u metabolizmu žučnih kiselina, što u konačnici ometa homeostazu kolesterola i povećava rizik od razvoja ateroskleroze (212, 218). Nadalje, disbioza najčešće uzrokuje dugotrajnu upalu niskog stupnja koja može utjecati na napredovanje kardiovaskularnih poremećaja i nastanak ateroskleroze. Zbog povećane crijevne propusnosti, crijevni mikrobnj spojevi, kao što je LPS koje proizvode gram-negativne bakterije, mogu prijeći u krvotok.

Jednom kada dospiju u krvotok, ove tvari mogu potaknuti imunološki sustav, uzrokovati sustavnu upalu i pospješiti endotelnu disfunkciju i razvoj aterosklerotskog plaka (19, 39, 221). U novije vrijeme, sve veći broj istraživanja ukazuju na vezu između crijevne mikrobiote i kontrole krvnog tlaka. Kratki peptidi i metaboliti kao što je TMAO, koji utječu na tonus krvnih žila i vaskularnu funkciju, spadaju među bioaktivne tvari koje crijevne bakterije mogu stvoriti (221, 222). TMAO potiče razvoj kolesterolskih plakova, sprječava uklanjanje kolesterola iz arterija i potiče upalne reakcije koje pospješuju ateroskleroza. Povećane razine TMAO u tijelu povezuju se s prehranom koja se bazira na crvenom mesu, a bakterijske vrste koje doprinose sintezi TMA jesu *Clostridia*, *Proteus*, *Shigella* i *Aerobacter* (19, 40, 218, 223, 224).

Dokazano je da SCFA imaju pozitivan učinak na zdravlje kardiovaskularnog sustava. Pomažu u očuvanju integriteta crijevne barijere, smanjuju upalu i pospješuju metabolizam lipida. Utječući na sintezu vazodilatatora poput dušikova(II) oksida, SCFA također mogu kontrolirati krvni tlak. Iako su potrebna dodatna istraživanja kako bi se utvrdili njihovi učinci, promjene u prehrani, probiotici i prebiotici, imaju potencijal da se koriste kao terapijske intervencije u upravljanju i prevenciji kardiovaskularnih poremećaja (218, 221-224).

Pa tako, istraživanje provedeno nad miševima dokazalo je povezanost između lipida iz hrane (fosfatidilkolina) i njegovih metabolita kao što su kolin, TMAO i betain s rizikom od razvoja kardiovaskularnih bolesti. Uzeti su uzorci krvne plazme te podvrgnuti kombinaciji GC-MS i NMR tehnike. Miševi koji su bili podvrgnuti prehrani obogaćenoj fosfatidilkolinom pokazivali su povećane razine aterosklerotskog plaka. Zaključak koji je izveden jest da su mikrobi crijevne mikrobiote neophodni za sintezu TMA iz fosfatidilkolina, dok su enzimi jetre potrebni za konverziju TMA u TMAO (219).

L-karnitin također je jedna od važnih komponenti crvenog mesa, ali i moguć prekursor u sintezi TMAO. Dokazano je da prehrana bogata L-karnitinom u miševa izaziva porast udjela bakterija crijevne mikrobiote koje su specijalizirane za sintezu TMA, a isto tako primijećene su i povišene koncentracije TMAO u krvnoj plazmi. S druge strane, u miševa kojima je djelovanje crijevne mikrobiote suprimirano antibioticima, unatoč prehrani bogatoj L-karnitinom, razine TMAO u plazmi nisu bile povišene. U radu se također navodi da, iako je povišena koncentracija L-karnitina povezana s incidencijom ateroskleroze i ostalih kardiovaskularnih bolesti, TMAO je ipak pravi pokretač ovih patoloških stanja iz razloga što igra ulogu u supresiji obrnutog transporta kolesterola (220).

Poveznice između povećanog unosa fosfatidilkolina i L-karnitina, metabolizma crijevne mikrobiote i rizika od kardiovaskularnih bolesti ima širok zdravstveni značaj. Studije ovakvog tipa otkrivaju novi put koji potencijalno povezuje unos crvenog mesa s patogenezom

ateroskleroze, ali i ostalim kardiovaskularnim oboljenjima. Dosadašnja saznanja o ulozi crijevne mikrobiote u ovom metaboličkom putu predstavljaju nove potencijalne terapijske i javnozdravstvene ciljeve za prevenciju i liječenje kardiovaskularnih bolesti (219, 220). Prehrana može utjecati na sastav crijevne mikrobiote, a poznato je da prehranske navike utječu i na zdravlje kardiovaskularnog sustava. Neželjene promjene u mikrobnom profilu crijeva najčešće su potaknute prehranom s visokim udjelom zasićenih masti i malo vlakana, što može dovesti do upala, nepravilnosti u metabolizmu lipida i povećanog rizika od nastanka kardiovaskularnih bolesti (218, 221-224).

#### 3.7.6. Neurodegenerativne bolesti

Kategorija stanja poznata kao neurodegenerativne bolesti definirana je postupnim odumiranjem i poremećajem funkcije neurona u mozgu i, u nekim okolnostima, leđne moždine, a podrazumijeva Alzheimerovu, Parkinsonovu i Huntingtonovu bolest. Rezultat ovakvih bolesti jest postupni gubitak kognitivnih funkcija, motoričke kontrole i drugih neuroloških kapaciteta. Brojna novija istraživanja pokazuju da crijevna mikrobiota ima utjecaj na razvoj i napredovanje neurodegenerativnih bolesti, iako točno podrijetlo ovih stanja još nije u potpunosti poznato (9, 182, 225). Identifikacijom i kvantifikacijom metabolita crijevne mikrobiote, metabolomika se pokazala neprocjenjivim alatom u proučavanju neurodegenerativnih poremećaja, u donošenju uvida u patofiziologiju i progresiju bolesti te njihovo rano otkrivanje, prevenciju i liječenje (182, 226). Zatim, metabolomika olakšava razumijevanje metaboličkih promjena u pozadini neurodegenerativnih poremećaja te otkriva izmijenjene metaboličke putove i nudi uvid u energetske metabolizam, metabolizam neurotransmitera, metabolizam lipida, oksidativni stres i druge važne procese koji su uključeni u neurodegeneraciju (182-184).

Crijevno-mozgovna os, zamršena mreža neuronskih, imunoloških i endokrinih putova, posreduje u dvosmjernoj komunikaciji između crijevnih bakterija i mozga. Brojne bioaktivne tvari, poput neurotransmitera (serotonin, dopamina i  $\gamma$ -aminobutirat), signalnih molekula (SCFA) i upalnih medijatora, produkti su crijevnih mikroba, a imaju utjecaj na neuroupalu i sam rad mozga. Neurodegenerativne bolesti mogu se razviti ili pogoršati kao rezultat (1) disbioze i/ili (2) povećane crijevne propusnosti, dva stanja koja remete pravilnu funkciju crijevno-mozgovne osi (182, 225).

Proces starenja karakterizira pojava povećane permeabilnosti crijeva što rezultira „curenjem“ mikroorganizama i njihovih metabolita u krvotok, a takva pojava odgovorna je za nastanak upalnog odgovora. Promjene koje se tiču kratkolančanih masnih kiselina, koje igraju

važnu ulogu u zaštiti živčanog sustava, glavni su, ali ne i jedini indikatori povećane propusnosti crijeva. Povećana crijevna propusnost olakšava prijenos mikrobnih nusprodukata u krvotok, gdje uzrokuju sustavnu upalu, za koju se smatra da bi mogla ubrzati razvoj neurodegenerativnih poremećaja i neuroinflamacije (184). Isto tako, jedna od posljedica crijevne disbioze jest i oksidativni stres, odnosno prekomjerna proizvodnja slobodnih radikala koji se zatim vežu na makromolekule stanica (DNA, proteini i lipidi) te uzrokuje oštećenja živčanih stanica. Nadalje, promjene u sastavu crijevne mikrobiote mogu utjecati i na produkciju neuro-metabolita, kao na primjer serotonin, katekolamini i  $\gamma$ -aminobutirata (GABA), što u konačnici dovodi do promjena u ponašanju (182-184). Ovakva stanja i procesi pogoduju razvoju kognitivnih oštećenja te predstavljaju potencijalni rizik za razvoj različitih neurodegenerativnih bolesti. (182, 184). Oštećenje neurona i nakupljanje proteinskih agregata, kao što su amiloidni beta plakovi u Alzheimerovoj bolesti ili alfa-sinuklein u Parkinsonovoj bolesti, mogu biti posljedica kronične upale mozga. Kao rezultat takve upale, aktivira se abnormalan odgovor imunološkog sustava te nastupa proizvodnja proupalnih citokina što može pogoršati neurodegenerativna stanja (227, 228). Prema nekim istraživanjima, crijevna mikrobiota može utjecati i na nakupljanje i eliminaciju krivo presavijenih proteina povezanih s ovim poremećajima. Stvaranje bakterijskih amiloida ili aktivnost proteolitičkih enzima uključenih u puteve razgradnje proteina mogu biti pod utjecajem disbioze, što dovodi do promjena koje utječu na nakupljanje i eliminiranje krivo presavijenih bjelančevina iz mozga, potencijalno ubrzavajući razvoj navedenih bolesti (227-229).

Za zdravlje čovjeka ključna je uravnotežena sinteza metabolita crijevne mikrobiote kako bi omogućila pravilnu funkciju crijevno-mozgovne osi. Različiti neurodegenerativni i neuropsihijatrijski poremećaji mogu se smatrati rezultatom promjena u metabolizmu crijevnog mikrobioma koje se uspješno mogu detektirati uporabom različitih metabolomskih tehnika (183, 184, 226). Iako postoji mnogo istraživanja na ovu temu, uloga crijevne mikrobiote u razvoju i tijeku neurodegenerativnim poremećajima nije potpuno razjašnjena. Ključno je zapamtiti da je veza između crijevne mikrobiote i ovih bolesti vrlo kompleksna te su potrebna dodatna istraživanja kako bi se razjasnili precizni mehanizmi, uzroci i ishodi neurodegenerativnih bolesti te identificirali novi terapijski postupci u njihovom liječenju (182, 225-229).



## 4. Rasprava

Mikrobiom crijeva funkcionira kao virtualni organ i značajno proširuje metabolički kapacitet domaćina. Kako postoji koevolucijska povijest metaboličkih izmjena između mikroorganizama i čovjeka, organizam domaćin ne samo da tolerira mikroorganizme kako bi izbjegao patogenost, već i iskorištava njihove metaboličke sposobnosti (230).

Sve vrste u crijevima proizvode iznimno raznolik repertoar metabolita iz egzogenih prehrambenih sastojaka i/ili endogenih spojeva koje stvaraju sami mikroorganizmi i domaćin (40). Ove molekule niske molekulske mase mogu biti ili hranjive tvari koje oblikuju sastav mikrobioma (231) ili važni produkti koji imaju značajnu ulogu u održanju fiziologije domaćina i pomažu regulirati metaboličku homeostazu (232, 233). Tako su mikrobni metaboliti uključeni u različite procese, kao što je razvoj i aktivnost imunološkog sustava, metabolizam, pa čak i funkcija mozga (234) što i pokazuje koliko smo ovisni o našim komenzalima za zdrav život (Prilog, Slika 4.).

Budući da svaka osoba nosi rijetke mikrobne sojeve, otprilike polovica sadržaja mikrobnih gena je jedinstvena za svaku osobu zbog čega je velika raznolikost načina na koji mikroorganizmi mogu sintetizirati ili modificirati metabolite (120). Tako udio spojeva dobivenih iz mikrobiote značajno varira među pojedincima, što se može vidjeti na primjeru indolpropionske kiseline (IPA) koja nije mjerljiva u 25 % zdravih ispitanika, a njezina koncentracija u plazmi varira za otprilike tri reda veličine u preostalim 75 % (24). Drugi primjer je jedan od glavnih predstavnika izoflavona soje, daidzein, koje se prevodi bakterijskom metabolizmom do (*S*)-equola. Međutim, samo 30 % - 50 % pojedinaca ima sposobnost sinteze equola. Alternativno, daidzein se može razgraditi do *O*-desmetilangolenzina, ali je ovaj metabolit za razliku od equola i daidzeina, biološki je inaktivan. Postoje dokazi da je daidzein biološki aktivniji od matične komponente i to u pogledu estrogenske i antiestrogenske aktivnosti, antioksidacijske sposobnosti i potencijalnih antikarcenogenih učinaka. Stoga, proizvodnja equola može biti važan nositelj dobrobiti konzumacije soje u kontestu zdravlja kostiju, olakšanja simptoma menopauze i smanjenja rizika nastanka karcinoma dojke (235). Osim u pogledu biološki aktivnih komponenti hrane, otkrivena je interindividualna i geografska varijabilnost odgovora na lijekove povezana s mikrobnim sastavom u crijevima. Jedan primjer je glikozid digoksin koji se koristi za liječenje kongestivnog zatajenja srca, a terapijski djeluje u vrlo uskom rasponu koncentracija (230). Crijevna mikrobiota uklanja trisaharid iz matičnog glikozidnog spoja, oslobađajući farmakološki aktivan digoksinogen. Bakterije crijevne mikrobiote, kao što je *Eggerthella lenta* (do 1999. poznata kao *Eubacterium*

*lentum*) također mogu reducirati digoksin u dihidroksidigoksinen koji je farmakološki neaktivan. Pokazalo se da 36 % stanovnika Sjeverne Amerike u usporedbi s 14 % stanovnika južne Indije na terapiji digoksinom, izlučuje visoku razinu dihidrodigoksina i ne mogu postići predviđenu serumsku razinu digoksina uslijed djelovanja crijevne mikrobiote u reakcijama redukcije.

Budući da pojedinci imaju jedinstven i široko varijabilan crijevni mikrobiom, spomenute razlike u metaboličkom potencijalu mikroorganizama mogu biti važne za odgovor pojedinca na čimbenike okoliša i endogene (pato)fiziološke procese u organizmu (236) i utjecati na prezentaciju, prevalenciju i rizik od bolesti, metabolizam lijeka, njegovu toksičnost i učinkovitost, kao i na odgovor na nutritivne intervencije.

Tijekom posljednja dva desetljeća pristupi systemske biologije otvorili su novi put prema razumijevanju složene mreže interakcija između genetike, metabolizma, čimbenika okoliša, načina života i prehrane. Uvođenje tehnologije sekvenciranja sljedeće generacije u područje mikrobiologije crijeva otvoren je put tehnologiji – „*omika*“ koje omogućuju sveobuhvatnije karakteriziranje mikrobioma mjerenjem tisuća molekula u biološkim uzorcima (DNA, RNA, proteini i metaboliti). Prva od njih bila je metagenomika, koja je pružila vrijedne uvide u taksonomski sastav mikrobne zajednice i njezin genetski funkcionalni kapacitet, kako u eubiotičkim, tako i u disbiotičkim uvjetima (237). Premda i metaproteomika i metatranskriptomika mogu odgovoriti na pitanje „što to te mikrobne zajednice u crijevima rade?“, predstavljaju samo potencijal za biološki ishod, budući da sama prisutnost određenih gena ili proteina ne znači da se oni aktivno transkribiraju ili da su funkcionalni tj. da mogu izazvati metaboličku promjenu i stoga fenotipski učinak (Prilog, Slika 9.).

Otvaranjem biokemijskog prozora u metabolome, korištenjem tehnologija kao što je spektrometrija masa (MS) i nuklearna magnetska rezonancija (NMR), metabolomika je u stanju karakterizirati i kvantificirati spojeve male molekulske mase u biološkim uzorcima koji se jedinstveno mijenjaju kao odgovor na fiziološke i patofiziološke podražaje (111). Primjena metabolomike u području crijevne ekologije omogućuje razumijevanje kako crijevna mikrobiota utječe na metabolički status domaćina kroz vlastiti metabolizam i u ko-metabolizmu s domaćinom (Prilog, Slika 10.).

Općenito, spektroskopske tehnike koje se obično primjenjuju za profiliranje karakterističnog metaboličkog sastava bioloških tekućina i tkiva mogu se koristiti na neciljani način, koji daje pregled globalnog metaboličkog sastava, ili se mogu prilagoditi za mjerenje odabranih klasa metabolita kao što su lipidi ili žučne kiseline. Niti jedna analitička metoda ne može mjeriti ukupni skup metabolita prisutnih u biološkom uzorku zbog analitička ograničenja

i stoga izbor analitičke platforme ovisi o prirodi biološke matrice, dostupnosti platforme, cijene i robusnosti (158).

NMR je visoko ponovljiva tehnika koja omogućuje detekciju metabolita prisutnih u relativno visokim koncentracijama u nekoliko biotekućina (tj. urin, plazma, serum) i tkiva (71). Zbog svoje nedestruktivne prirode, osobito je korisna za proučavanje razine metabolita u intaktnim uzorcima, npr. u uzorcima biopsije, koji se zatim mogu koristiti u daljnjim eksperimentima (28). Međutim, ograničene je osjetljivosti u usporedbi s MS i zahtijeva relativno velike količine uzoraka. MS, s druge strane, zahtijeva odjeljivanje metabolita prije detekcije, što se obično postiže kombiniranjem s drugim tehnikama kao što je plinska kromatografija (GC-MS) ili tekućinska kromatografija (LC-MS), čime se postiže visoka osjetljivost u analizi (71). Međutim, MS analiza može zahtijevati opsežnu pripremu uzorka za ekstrakciju metabolita, ovisno o proučavanoj biološkoj matrici, što može rezultirati gubitkom određenih spojeva.

Za metabolomska istraživanja obje analitičke tehnike se mogu koristiti za identifikaciju strukture metabolita i mjerenje relativne i apsolutne koncentracije molekula (iako je NMR pouzdaniji za određivanje koncentracije, a MS osjetljiviji od NMR), a korištenje obje tehnike često je potrebno za potpunu karakterizaciju metaboloma (158).

Upravo su i neki od novijih dokaza koji govore u prilog da je sastav metaboloma pod jakim utjecajem mikrobioma proizašli iz analize 1116 metabolita u uzorcima debelog crijeva 786 pojedinaca iz populacijske studije blizanaca (TwinsUK), kojom je utvrđeno da primarni metabolom, odnosno endogeni metaboliti i metabolički procesi pod kontrolom genoma domaćina samo skromno doprinose fekalnom metabolomu, dok se prosječno 67 % zabilježene varijance u razinama fekalnih metabolita može objasniti mikrobiomom (210). Varijacije u metaboličkim profilima koje su primjećene u pojedinim dijelovima GIT-a nakon karakterizacije metabolita duodenuma, jejunuma, ileuma, debelog crijeva, jetre, bubrega i urina potvrdile su varijabilnost sastava crijevne mikrobiote duž probavnog sustava, a isto tako su otkrile da je mikrobiota utjecala na kemiju organa na udaljenim mjestima tijela, ilustrirajući tkivno-specifičan utjecaj crijevnih mikroorganizama na metaboličke putove (4, 75). Na primjer, ileum se smatra glavnim mjestom apsorpcije luminalnih žučnih kiselina i emulgiranih lipida iz hrane, a podaci o višim koncentracijama glicerofosfolipida, glutaciona, taurina i betaina u ovom tkivu u skladu s njegovom ulogom u metabolizmu lipida i žučnih kiselina. Također je pokazano da različita bakterijska modulacija metabolizma žučnih kiselina i enterohepatičkog kruženja ima posljedične učinke na apsorpciju masti iz hrane i povratno dovodi nakupljanja lipida u jetri životinja koje imaju neuravnoteženu crijevnu mikrobiotu (75).

To dokazuje da vrsta crijevnih bakterija utječe na učinkovitost iskorištavanja sastojaka hrane u crijevu i njihovu naknadnu dostupnost i daljnji metabolizam u izvancrijevnim tkivima, što se u konačnici odražava na modulaciju metabolizma lipida, ugljikohidrata i aminokiselina domaćina na razini organa i sustava. Na taj način crijevna mikrobiota kontrolira višestruke metaboličke putove u stanicama domaćina i može fino podesiti ili narušiti njihovu regulaciju, s posljedicama koje se ogledaju u nutritivnom i zdravstvenom stanju domaćina (Prilog, Slika 11., Slika 12., Tablica 1.) (238).

Budući da su određene kombinacije i omjeri metabolita u biološkom uzorku specifični za pojedinačna stanja i tkiva, metabolomika može ukazati na organ zahvaćen promjenama. Stoga je većina istraživanja crijevnog mikrobioma imala za cilj istražiti metabolite povezane s bolešću ili metaboličkim putevima čija je regulacija narušena, pa se u tumačenju dobivenih spektara, spektri uzoraka iz organizama interesa (kao što su oni s određenom bolešću) uspoređuju s onima iz kontrola, kako bi se mogle odrediti spektralne značajke uzrokovane određenim stanjem (Prilog, Tablica 3.). Iz dobivenih spektralnih podataka korištenjem naprednih statističkih alata identificiraju se metaboliti koji diskriminiraju patološka od zdravih stanja, a koncentracije ovih metabolita često variraju u odgovoru na terapije za dotičnu bolest ili učinak prehrane. Metaboliti mogu djelovati kao pokazatelji rizika za razvoj bolest, što je u svjetlu današnjih troškova zdravstvene zaštite važan dio strategije za prevenciju bolesti (158). Osim toga, poznavanje obrazaca metabolita koji nastaju u odgovoru na bolest omogućuje razumijevanje mehanizma nastanka bolesti, što je ključno za otkrivanje uloge crijevne mikrobiote u etiologiji, napredovanju i liječenju bolesti (30). Postoji nekoliko primjera u literaturi u kojima je pristup usmjeren na metabolite omogućio mehanističko razumijevanje kako mikrobn metaboliti utječu na zdravlje ljudi. Značajni primjeri uključuju SCFA, organske kiseline, BCFA i derivate aminokiselina (kinurenini, indoli, biogeni amini, imidazol-propionat, sulfidi), trimetilamin-*N*-oksid, vitamine i žučne kiseline.

SCFA-butirat, propionat i acetat-mogu se otkriti pomoću GC-MS i tehnike <sup>1</sup>H-NMR spektroskopije (71) te su krajnji produkti mikrobne fermentacije neprobavljivih ugljikohidrata kao i endogene epitelne sluzi u crijevima (71), a u ovom procesu također u manjoj mjeri nastaju i formijat, fumarat, malonat, sukcinat, kaproat i valerat (4). SCFA također mogu nastati i anaerobnom razgradnjom neprobavljivih proteina iz hrane, premda u značajno nižoj koncentraciji nego fermentacijom ugljikohidrata. Klasteri klostridija IV, XIVa (npr. *Eubacterium*, *Roseburia*, *Faecalibacterium* i *Coprococcus spp.*), bakterije roda *Lactobacillus spp.* koji pripadaju koljenu Firmicutes te koljeno Actinobacteria (*Bifidobacterium spp.*) glavni su taksoni koji imaju središnju ulogu u metabolizmu SCFA (239). Dio SCFA koristi se kao

supstrat za dodatne kataboličke i anaboličke putove domaćina u debelom crijevu, a s obzirom da se lako apsorbiraju metaboliziraju se i u ostalim tkivima uključujući jetru i mišiće. Osim njihove uloge kao izvora energije i gradivnih sastojaka u metaboličkim procesima, luminalne SCFA su i signalne molekule koje djelujući preko epigenetskih mehanizam ili aktivacijom specifičnih receptora spregnutih s G-proteinom (engl. *G-Protein-Coupled Receptors*; GPCR) u probavnom traktu ispoljavaju brojne sistemske učinke (32). SCFA reguliraju rastući popis fizioloških i biokemijskih funkcija domaćina, uključujući održavanje urođene funkcije crijevne barijere (38), regulaciju pokretljivosti crijeva (32), izlučivanja crijevnih hormona (peptid YY (PYY)), serotonin/5-hidroksitriptamin (5-HT), kolekistokinin (engl. *Cholecystokinin*; CCK), želučani inhibitorni peptid (engl. *Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide*; GIP) i peptid sličan glukagonu 1 (GLP-1) (32, 38, 71), regulaciju kromatina (240), crijevno-mozgovne osi, imunološke funkcije (40, 71, 81, 118) i dr (Prilog, Slika 5) .

Promjene u strukturi crijevne mikrobiote koja stvara SCFA, jednako kao i promjene razina SCFA zabilježene su u brojnim stanjima, od kardiometaboličkih bolesti, preko neuroloških i neuropsihijatrijskih poremećaja, do neoplastične transformacije (38). Nedavna istraživanja sugeriraju da SCFA imaju zaštitni učinak u gastrointestinalnim poremećajima, karcinogenezi debelog crijeva i kardiovaskularnim bolestima (4) te mogu predisponirati ili spriječiti patološka stanja uključujući upalnu bolest crijeva, rak i dijabetes (4). Klinička istraživanja pokazala su da primjena SCFA ima pozitivan učinak u liječenju ulceroznog kolitisa, Crohnove bolesti i proljeva povezanog s antibioticima, te raka (71).

SCFA su također povezane s metaboličkim bolestima kao što su pretilost i dijabetes (4), neurološkim i neuropsihijatrijskim poremećajima, uključujući Parkinsonovu bolest, Alzheimerovu bolest, poremećaj autističnog spektra, anksioznost i depresiju (38). Zastupljenost bakterija koje proizvode SCFA i samih SCFA smanjena je u uzorcima fecesa ljudi s pretilošću i dijabetesom (241). U glodavaca s dijabetesom i pretilošću, primjena SCFA poboljšava metabolički fenotip povećanjem potrošnje energije, tolerancije glukoze i homeostaze (93). Kod pretilih ljudi, primjena butirata ili propionata stimulira proizvodnju crijevnih hormona, GLP-1 i PYY, reducira apetiti i smanjuju unos energije (93). Inulin-propionatni ester primijenjen odraslim osobama s prekomjernom tjelesnom težinom značajno smanjuje porast na tjelesnoj težini, intraabdominalnu distribuciju masnog tkiva i hepatocelularni sadržaj lipida te poboljšava inzulinsku rezistenciju. Liječenje acetatom uzrokuje značajno smanjenje nakupljanja lipida u masnom tkivu, štiti od nakupljanja masti u jetri i poboljšava toleranciju glukoze (71). Zaštitni učinci SCFA na metaboličke promjene mogu se pojaviti već u maternici. U miševa, propionat iz majčine mikrobiote potekao iz

prehrane bogatom vlaknima prolazi placentu i daje otpornost na pretilost u potomstvu djelovanjem preko GPCR (241).

Bakterijskim metabolizmom fenolnih sastojaka, neapsorbiranih aminokiselina ili ugljikohidrata nastaju i organske kiseline (242). Visoke razine organskih kiselina u urinu povezane su s prekomjernim mikrobnim rastom *Clostridium difficile*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bifidobacterium spp.*, *Subdoligranulum spp.* i *Lactobacillus spp.* (239, 242).

Među organskim kiselinama, hipurinska kiselina u mokraći može biti koristan biljeg za razlikovanje ulceroznog kolitisa i Chronove bolesti (196) i biomarker hipertenzije i pretilosti kod ljudi, dok su 4-hidroksifenilacetat i fenilacetat u mokraći potencijalni biomarkeri kolorektalnog karcinoma (239).

Mliječna kiselina je glavni produkt fermentacije bakterija mliječne kiseline. Ove bakterije također sintetiziraju bakteriocine, antimikrobne tvari koje mogu pomoći mikroorganizmu proizvođaču da nadmaši druge bakterijske vrste. Također, mliječna kiselina sudjeluje u unakrsnom hranjenju te se pomoću klostridija iz klastera XIVa može pretvoriti u butirat, ili pomoću klostridija iz klastera IX u propionat (71), a preko ovih SCFA mliječna kiselina može pogodovati dodatnim zdravstvenim koristima domaćinima. Detekcija organskih kiselina najčešće se postiže korištenjem LC-MS i <sup>1</sup>H-NMR spektroskopskih platformi.

U debelom crijevu mikroorganizmi također fermentiraju neprobavljive proteine iz hrane do peptida i aminokiselina, ili ih dalje pretvaraju u BCFA, poliamine, indole, fenole, sulfide, amonijak i *N*-nitrozo spojeve, a mnogi od ovih produkta su potencijalno toksični (4). Utvrđeno je da visoke koncentracije amonijaka djeluju kao promotori tumora (243). Bakterijska razgradnja cisteina i metionina (Prilog, Slika 6.) dovodi do stvaranja H<sub>2</sub>S koji može inhibirati citokrom c-oksidadu u respiracijskom lancu i time onemogućiti iskorištavanje butirata u energetske svrhe u kolonocitima (244). Fermentacija aromatskih aminokiselina, tirozina i triptofana (Prilog, Slika 6.), pomoću bakterija debelog crijeva proizvodi fenole odnosno indole, koji se na kraju izlučuju urinom (245), a fenoli, poput *p*-krezola, djeluju kao prokarcinogeni kod raka debelog crijeva (246). *C. difficile* značajan je producent *p*-krezola (247), a njegovo stvaranje u crijevima povezano je s autizmom (248). Neke vrste *Clostridium* (249) i *Peptostreptococcus anaerobius* (250) mogu pretvoriti fenilalanin u benzojevu kiselinu u višestupanjskom procesu s fenilpropionskom kiselinom (toksični metabolički produkt) koja djeluje kao intermedijar (245). Aminokiseline se uglavnom otkrivaju pomoću LC-MS i <sup>1</sup>H-NMR spektroskopskih tehnika, te također pomoću FT-ICR-MS.

Najzastupljenije aminokiseline razgranatog lanca (engl. *Branched Chain Amino Acids*; BCAA) valin, izoleucin i leucin, esencijalne su aminokiseline koje sudjeluju u održavanju

homeostaze kod sisavaca reguliranjem sinteze proteina, metabolizma glukoze i lipida, inzulinske rezistencije, proliferacije hepatocita i imuniteta, a njihov je katabolizam u smeđem masnom tkivu bitan za kontrolu termogeneze. Dodavanje smjese BCAA miševima promiče „zdravu” mikrobiotu koju obilježava porast *Akkermansia muciniphila* i bakterija roda *Bifidobacterium* te smanjenje bakterija iz porodice Enterobacteriaceae. Međutim, povišene sustavne razine BCAA povezane su s pretilošću i dijabetesom. Kod genetski pretilih miševa (*ob/ob* miševi), nakupljanje BCAA izaziva inzulinsku rezistenciju. Crijevna mikrobiota regulira razine BCAA, jer ih može i proizvoditi i iskoristavati. *Prevotella copri* i *B. vulgatus* bitni su producenti BCAA, a njihova brojnost pozitivno korelira s razinama BCAA i inzulinskom rezistencijom. S druge strane, smanjena brojnost bakterija koje mogu iskoristavati BCAA, kao što su *Butyrivibrio crossotus* i *Eubacterium siraeum*, javlja se u bolesnika s inzulinskom rezistencijom (241).

U komunikaciji s domaćinom bitnu ulogu ima i metabolizam triptofana. Osim svoje uloge u sintezi proteina, triptofan se metabolizira na nekoliko putova, uključujući kinureninski put, na kojem nastaje mnoštvo međuprodukata te  $\text{NAD}^+$  kao konačni produkt; serotoninški put u enterokromafinim stanicama; i treći put na kojem nastaju indoli i derivati (38). Osim što ljudi imaju metaboličku sposobnost sinteze kinurenina, nekoliko članova crijevne mikrobiote sisavaca također ima genomski kapacitet za proizvodnju različitih međuprodukata toga puta, a pokazalo se da se nekoliko takvih sintetiziraju *Lactobacillus* spp., patogen *Pseudomonas aeruginosa* i *Pseudomonas fluorescens* (251, 252). Fiziološki učinci kinurenina mogu biti ili zaštitni ili štetni za zdravlje domaćina, ovisno o specifičnom spoju, ciljnom tkivu i uključenim signalnim putovima (38, 251, 252). U središnjem živčanom sustavu, kinolinska kiselina i kinurenska kiselina imaju ekscitotoksične i neuroprotektivne učinke, a defekti na putu kinurenina i promjena njihove razine ustanovljena je u depresiji i shizofreniji, Alzheimerovoj bolesti i Huntingtonovoj bolesti (251). S druge strane, kinureninski put potencijalno doprinosi korisnim mentalnim učincima tjelovježbe. U crijevima metaboliti kinureninskog puta djelujući kao agonisti receptora kinurenske kiseline (engl. *G Protein-Coupled Receptor 35*; GPR35) posreduju u imunološkoj toleranciji domaćina na mikrobiotu (38, 251).

Triptofan se može metabolizirati i u različite derivate indola. Tako, triptofanaza iz crijevnih mikroorganizama pretvara triptofan u indol, koji zatim ulazi u portalnu cirkulaciju domaćina i pretvara se u indoksil-sulfat u jetri te se izlučuje putem bubrega, a prisutan u visokoj koncentraciji doprinosi patogenezi kronične bubrežne bolesti. Genetski izmijenjena triptofanaza iz bakterija roda *Bacteroides* može sniziti razinu indoksil-sulfata u gnotobiotičkom mišjem modelu, što ukazuje na ulogu ciljane manipulacije crijevne mikrobiote u liječenju

bubrežne bolesti (253). Neki indoli djeluju kao ligandi arilnog ugljikovodičnog receptora (engl. *Aryl Hydrocarbon Receptor*; AhR). Metaboličke poremećaje karakterizira smanjena sposobnost mikrobiote da metabolizira triptofan u agoniste AhR (38). Neispravna aktivacija AhR puta dovodi do smanjene proizvodnje GLP-1 i IL-22, koji doprinose intestinalnoj propusnosti i translokaciji lipopolisaharida (LPS), što rezultira upalom, inzulinskom rezistencijom i steatozom jetre. (241) Također, kod štakora je ustanovljeno da više međuprodukata kinureninskog puta inhibira sintezu inzulina, njegovu sekreciju i signalizaciju posredovanu ovim hormonom, a povećane razine kinurenske kiseline i ksanturenske kiseline pronađene su u urinu pojedinaca s dijabetesom tipa 2 (38).

Iako učinci mnogih derivata indola ostaju donekle neobilježeni, indoksil-sulfat je upleten u patogenezu kronične bubrežne bolesti (engl. *Chronic Kidney Disease*; CKD) i također može posredovati u poznatim komorbiditetima bolesti (71). Triptofan je i prekursor biogenih amina, a jedan od njih je serotonin (5-hidroksitriptofan; 5-HT) koji nastaje u neuronima središnjeg živčanog sustava i crijevnog živčanog sustava (254), te u enteroendokrinim stanicama u crijevnoj sluznici. U potonjim stanicama se stvara 90 % ukupnog tjelesnog 5-HT djelovanjem triptofan-hidroksilaze 1 (engl. *Tryptophan Hydroxylase 1*; TPH1) čiju ekspresiju inducira crijevna mikrobiota, osobito komenzalne bakterije koje stvaraju spore. Vežanje 5-HT na specifične 5-HT receptore izaziva različite odgovore. U središnjem živčanom sustavu 5-HT je važan u regulaciji raspoloženja, sna, apetita i ponašanja, dok u perifernim tkivima regulira niz različitih procesa, uključujući crijevnu peristaltiku i sekreciju, upalu, funkciju trombocita, vaskularni tonus, razvoj kostiju te razvoj i održavanje neurona i intersticijskih stanica unutar crijevnog mienteričnog plexusa (254). 5-HT također regulira apetit te je stoga važan za razvoj pretilosti, a tomu doprinosi i njegova sposobnost da inhibira termogenezu u smeđem masnom tkivu, što dovodi do nakupljanja masti. Defekti u sintezi serotonina na periferiji zaštićuju glodavce od pretilosti koja nastaje kao posljedica prekomjernog unosa masti. Podaci o ljudima podupiru ove rezultate, budući da su u plazmi pronađene povišene razine krajnjih produkta metabolizma serotonina, 5-hidroksiindol-3-oksene kiseline kod bolesnika s metaboličkim poremećajima (241).

Osim triptofana, mikrobn metabolizam histidina, fenilalanina i tirozina u crijevnoj mikrobioti stvara brojne spojevima povezane s bolešću. Dekarboksilacijom histidina, kako u stanicama sisavaca tako i u crijevnim bakterijskim stanicama, nastaje biogeni amin histamin koji ima regulatornu ulogu u imunološkom sustavu. Histidin se također može metabolizirati u imidazol-propionat sojevima kao što su *Streptococcus mutans* i *Eggerthella lenta* (255) što može utjecati na metaboličko zdravlje domaćina. Smatra se da imidazol-propionat u jetri utječe



na signalni put inzulina preko rapamicinskog kompleksa 1 (engl. *Mammalian Target of Rapamycin Complex 1*; mTORC1) pa je povišen u osoba s dijabetesom tipa 2 i povezan s inzulinskom rezistencijom (79). Hidroksilacijom fenilalanina u tirozin uz fenilalanin-hidroksilazu nastaje 3,4-dihidroksifenilalanin ili levodopa iz koje se dekarboksilacijom sintetizira biogeni amin dopamin. Dopamin je neurotransmiter koji ima važnu ulogu u kontroli kretanja i raspoloženja, a njegova je sinteza narušena u Parkinsonovoj bolesti zbog gubitka neurona koji proizvode dopamin u području *substantia nigra* u mozgu. Sojevi roda *Enterococcus* i *Lactobacillus brevis* iz crijevne mikrobiote koji posjeduju tirozin-dekarboksilazu mogu dekarboksilirati levodopu u dopamin što otvara nove puteve za liječenje bolesti (256).

Crijevna mikrobiota može metabolizirati kolin i L-karnitin iz prehrambenih izvora (npr. crveno meso, jaja i riba) u TMA. Nakon što se TMA apsorbira u crijevima domaćina, metabolizira se u TMAO u jetri pomoću monooksigenaza 1 i 3 koje sadrže flavin (engl. *Flavin-Containing Monooxygenase*; FMO1 i FMO3) (241). Kako su prekursori TMAO prisutni u namirnicama animalnog podrijetla, značajno više razine TMAO zabilježene su kod svejeda nego kod vegana i vegetrijanaca. Ovaj ko-metabolit crijevnog mikroba i domaćina pospješuje aterosklerozu pa njegova metabolomska identifikacija u serumu pruža mogućnost predviđanja rizika od kardiovaskularnih bolesti uključujući i moždani udar i infarkt miokarda (Prilog, Slika 7.) (38, 40).

Između 40 % i 65 % crijevnih bakterija ima genomski potencijal za proizvodnju nekih ili svih vitamina B skupine (vitamini B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9 i B12), a pokazalo se da je ta sinteza ovisna o dobi. Za razliku od mikrobioma odraslih, mikrobiomi crijeva dojenčadi obogaćeni su genima koji mogu podržati stabilan fiziološki razvoj, kao što su geni uključeni u biosintezu folata, koji je potreban za sintezu, replikaciju i popravak DNA, te geni za sintezu vitamina B12, koji je ključan za neurološku funkciju (38, 71). Unatoč tome što se zadovoljavajući nutritivni status vitamina B skupine može održati prehranom, nedostatak ovih vitamina vrlo je čest i može biti posljedica nedovoljnog unosa hranom, malapsorpcije, primjene određenih lijekova koji ometaju metabolizam folata (metotreksat i sulfasalazin) i genetskih poremećaja. Kroničan nedostatak može uzrokovati avitaminoze kao što su pelagra (vitamin B3), anemije (vitamini B9 i B12), cerebelarna ataksija (vitamin B12) i kognitivno oštećenje (vitamini B9 i B12) koje se liječe suplementacijom, gdje je to moguće. Osim toga, crijevna mikrobiota stvara i vitamin K, jedan od vitamina topljiv u mastima koji je neophodan za karboksilaciju ostataka glutamata u trombinu u  $\gamma$ -karboksilglutamatne ostatke, a time i za

zgrušavanje krvi. (71). Kao važan izvor vitamina crijevna mikrobiota predstavlja potencijalno nove strategije za liječenje hipovitaminoza ili avitaminoza.

Danas je poznato više od 30 žučnih kiselina koje su otkrivene u cirkulaciji i jetri, a za ovakvu raznolikost odgovorna je crijevna mikrobiota koja može mijenjati njihovu strukturu i svojstva (Prilog, Slika 8., Tablica 2.). Žučne kiseline su derivati kolesterola koje olakšavaju izlučivanje kolesterola te probavu i apsorpciju lipida i vitamina topljivih u mastima (4), a njihov je metabolizam posebno povezan s rodovima *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterobacter*, *Eubacterium* i *Escherichia* (239). Biosinteza primarnih žučnih kiselina odvija se u jetri i zahtijeva najmanje 17 različitih enzima, a provodi se dvama putovima. Klasičan put doprinosi 75 % ukupne sinteze žučnih kiselina, a glavni produkti puta su ili kenodeoksikolna kiselina (engl. *Chenodeoxycholic Acid*; CDCA) ili kolna kiselina (engl. *Cholic Acid*; CA), dok je korak koji ograničava brzinu biosinteze kolesterola 7 $\alpha$ -hidroksilaza čija je ekspresija regulirana crijevnom mikrobiotom. Alternativni put proizvodi uglavnom CDCA, a reguliran je steroidnom 27-hidroksilazom, čija je ekspresija također pod utjecajem crijevne mikrobiote. Primarne žučne kiseline konjugiraju se s glicinom ili aminosulfonskom kiselinom taurinom, čija je sinteza također regulirana mikrobiotom crijeva (38, 40), a zatim se pohranjuju u žučnom mjehuru do izlučivanja. U distalnom tankom crijevu i debelom crijevu, iz konjugiranih žučnih kiselina oslobađa se glicin ili taurin djelovanjem mikrobni hidrolaza žučnih soli, a dekonjugirane žučne kiseline mogu se resorbirati u ileumu i enterohepatičkom cirkulacijom vratiti u jetru radi ponovne konjugacije, ili prolaze različite mikrobne biotransformacije u reakcijama dehidroksilacije, epimerizacije i oksidacije hidroksilnih skupina, što dovodi do raznolikog niza sekundarnih žučnih kiselina. Rodovi kao što su *Clostridium* i *Eubacterium* pomoću 7 $\alpha$ -dehidroksilaze transformiraju CDCA i CA u deoksikolnu kiselina (engl. *Deoxycholic Acid*; DCA) i litokolnu kiselinu (engl. *Lithocholic Acid*; LCA) (Prilog, Slika 8., Tablica 2.) koje su i najzastupljenije sekundarne žučne kiseline (4). Većina DCA resorbira se u crijevima te enterohepatičkom cirkulacijom transportira se u jetru, dok se LCA uglavnom izlučuje stolicom. Bakterijsko dekonjugiranje žučnih kiselina smanjuje njihovu učinkovitost u stvaranju micela i emulgiranje organskih lipidnih sastojaka hrane, što može smanjiti probavnu učinkovitost domaćina. Osim toga, pretvorba primarnih u sekundarne žučne kiseline povećava antimikrobnu moć žučnih kiselina što predstavlja povratni mehanizam za kontrolu mikrobne populacije (257). Pored uloge u homeostazi kolesterola i apsorpciji lipida, žučne kiseline su važne signalne molekule koje vezanjem s nuklearnim farnesoidnim X-receptorom (FXR) i receptorom plazmine membrane poznatim kao receptor žučnih kiselina 1 spregnut s G-proteinom (GPBAR1 ili TGR5) sudjeluju u regulaciji

metabolizma lipida, glukoze, i energetskog metabolizma, kao i vlastite biosinteze i homeostaze (4). Aktivacija GPBAR1 (1) potiče sintezu glikogena i inzulinsku osjetljivost u jetri; (2) povećava lučenje inzulina iz gušterače; (3) olakšava potrošnju energije, posebno u jetri, smeđem masnom tkivu i mišićima; (4) pogoduje termogenezi, što rezultira smanjenjem tjelesne težine i (5) posreduje u osjećaju sitosti u mozgu (241). Nekonjugirane žučne kiseline snažniji su aktivatori GPBAR1 od svojih konjugiranih analoga (38). Osim uloge u regulaciji sinteze i transporta žučnih kiselina, FXR također ima glavnu ulogu u regulaciji upale i imuniteta te u regeneraciji jetre, odnosno inducira zaštitne stanične odgovore u hepatocitima i gastrointestinalnom traktu. Uloga FXR-a ovisi o vrsti tkiva i faktorima kao što su prehrana i anatomija nakon želučane prenosnice. Pa tako aktivacija FXR u jetri može zaštititi od steatoze, dok aktivacija FXR u crijevu doprinosi pretilosti i steatozi jetre pod utjecajem prehrane (38). Općenito, postoji ravnoteža između primarnih žučnih kiselina i sekundarnih žučnih kiselina, a može se narušiti pomacima u strukturi crijevne mikrobiote kakvi su u stanju disbioze. Takvi pomaci se u prvom redu ogledaju u nemogućnosti metaboliziranja primarnih žučnih kiselina, pa uz porast njihove koncentracije dolazi do smanjenja koncentracije sekundarnih žučnih kiselina, što može imati ulogu u patogenezi mnogih bolesti (130, 258). Na primjer, promjene u odnosu primarnih naspram sekundarnih žučnih kiselina povezuju se sa steatozom jetre, narušenim metabolizmom glukoze i lipida te upalom u bolesnika s metaboličkim sindromom (241), ali se opažaju i upalnim bolestima crijeva (130, 258) te u malignim bolestima, prije svega kod hepatocelularnog karcinoma i kod raka debelog crijeva (38). Sekundarne žučne kiseline osobito se smatraju faktorom rizika za razvoj raka debelog crijeva, a jedan od mogućih načina za smanjivanje njihova toksičnog potencijala je primjena probiotika *Lactobacillus reuteri*, koji bi mogao istaložiti dekonjugirane žučne kiseline fizičkim vezanjem, čineći ih manje bioraspoloživim (257). Žučne kiseline dobile su pozornost i kao medijatori pozitivnih metaboličkih učinaka barijatrijske kirurgije (38, 71) koja je jedini način liječenja morbidne pretilosti. Platforme LC-MS i <sup>1</sup>H-NMR spektroskopije glavne su tehnike koje se koriste za detekciju žučnih kiselina pa metabolomska istraživanja mogu dovesti do razvoja terapija koje se temelje na mikrobioti i/ili njenim metabolitima kako bi se poboljšale metode smanjenja tjelesne težine posredovane načinom života ili kirurški.

Nadalje, osim uloge u metabolizmu levodope, metabolomska istraživanja mogu se koristiti za otkrivanje doprinosa crijevne mikrobiote u metabolizmu drugih lijekova. Poznato je da neke bakterije izlučuju različite skupove enzima, a neki od tih enzima mogu transformirati lijekove u spojeve s promijenjenom toksičnošću i/ili bioraspoloživošću za domaćina. Neciljanim metaboličkim profiliranjem pokazano je da antioksidans tempol, koji može

doprinijeti gubitku tjelesne težine, mijenja metaboličke pute SCFA u crijevnim mikroorganizmima i time utječe na puteve glikogenolize, glikolize i lipolize domaćina (119). Promijenjene razine metabolita povezanih s crijevnom mikrobiotom koji su rezultat liječenja antibioticima, uključujući žučne kiseline, glukozu, slobodne masne kiseline, dipeptide i šećerne alkohole, mogu stvoriti metaboličko okruženje koje pogoduje osjetljivosti na infekciju s *Clostridium difficile* (119).

Utjecaj crijevnog mikrobioma na metabolom domaćina ogleda se u svim razdobljima životnog ciklusa, a započinje “*in utero*” i nastavlja se s rođenjem. Osim tijekom trudnoće i poroda, metabolomski pristupi mogu pružiti nove uvide u postnatalne događaje koji naknadno određuju i kratkoročan i dugoročan zdravstveni i nutritivni status pojedinca, kao što su laktacija, izloženost majčinom mlijeku, izloženost makro- i mikronutrijentima te kolonizacija crijeva koja je bitna značajka u ranom životnom razdoblju za sazrijevanje gastrointestinalnog i imunološkog sustava (157). Metabolomsko profiliranje moglo bi predstavljati obećavajući alat za određivanje biološke (fiziološke) dobi osobe koja opisuje funkcionalni status osobe, a može biti niža ili viša od kronološke dobi. Metabolomski profili plazme pokazali su da su veće koncentracije poliamina putrescina i indol-3-acetata povezane s nižom biološkom dobi. Nasuprot tome, viša je koncentracija fazolne kiseline uočena u biološki starijih osoba. Također, pokazano je kako sa starenjem dolazi do porasta individualnosti mikrobioma koje prati bolje fizičko zdravlje, bolje kliničke laboratorijske vrijednosti, manja potreba za primjenom lijekova, ali i promjene metabolizma aminokiselina u crijevnoj mikrobioti koje se odražavaju u metabolomu plazme, urina i stolice (65). U plazmi je identificirano više diskriminirajućih metabolita uključujući uremijske toksine, kao što su 3-indoksil-sulfat, 6-hidroksiindol-sulfat, indol-acetat, indol-propionat, *p*-krezil-sulfat, *p*-krezil-glukuronid i fenilacetilglutamin. U urinu, fenilacetilglutamin, 4-krezil-sulfat i trimetilamin-*N*-oksid pozitivno koreliraju s dobi, a više razine *p*-krezil-sulfata i fenilacetilglutamina zabilježene su u urinu stogodišnjaka. Fekalne razine SCFA, kao što su propionska i maslačna kiselina, smanjuju se s godinama, dok su BCFA, kao što su izomaslačna i izovalerijanska kiselina te amonijak i različiti izomeri litokolne kiseline, povećane u fecesu stogodišnjaka. Ovo upućuje da se crijevni mikrobiom mijenja zajedno s fiziološkim starenjem i mogao bi biti ključan za identifikaciju pojedinaca koje karakterizira ubrzani proces starenja unatoč nižoj kronološkoj dobi. Procjena crijevnog metabolomskog sata osobe stoga može olakšati predviđanje fiziološkog statusa povezanog sa starenjem i rizika za razvoja bolesti povezanih sa starenjem (65).

Gore opisane molekule male molekulske mase mikrobog podrijetla koje su identificirane u metabolomskim istraživanjima ne samo da bi se mogli smatrati pokazateljem

uobičajenog biološkog procesa i procesa bolesti, već i odgovora na lijek ili liječenje. Naime, aspekt koji razlikuje crijevni mikrobiom genoma ljudi leži u njegovoj plastičnosti, pa okolišni čimbenici, poput promjena u prehrani ili uporaba antibiotika mogu dovesti do vrlo brzih promjena u strukturi mikrobne zajednice (20). Iako takve promjene u sastavu mikrobne zajednice i brojnosti njezinih članova mogu dovesti do sloma ravnotežnog stanja crijevne mikrobiote i otvariti put disbiozi (259), plastičnost crijevnog mikrobioma čina ga ujedno privlačnom metodom za preciznu medicinu, usmjernu na individualizirano liječenje i intervenciju (260).

Jedan od terapijskih postupaka koji se temelji na mikriobu odobren od strane Američke Agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*; FDA) je transplantacija fekalne mikrobiote (engl. *Fecal Microbiota Transplantation*; FMT). FMT uključuje prijenos cijele mikrobne zajednice sa zdravog donora na bolesnog primatelja kako bi se zamijenio mikrobiom povezan s bolešću. Pokazalo se da FMT ima izvanrednu učinkovitost u liječenju infekcije *Clostridium difficile* koja se najčešće javlja nakon liječenja antibioticima (261), što je generiralo dodatan poticaj istraživanjima koja procjenjuju primjenu FMT u drugim stanjima. Unatoč tome, primjena FMT još uvijek je u povojima, s obzirom da je povezana sa značajnim rizicima za primatelja, uključujući nenamjernu transplantaciju patobionta i negativne interakcije s postojećom mikrobnom zajednicom primatelja. Primjena FMT u kliničkoj praksi vjerojatno će ovisiti o procjeni sigurnosti, razumijevanju mehanizama terapije, razvoju biomarkera za praćenje stabilnosti prijensa mikrobiote donora u primatelja i naknadne kliničke učinkovitosti. Trenutne terapije koje se temelje na mikrobiomu ciljaju prokariotske članove mikrobiote, nastojeći promijeniti sastav crijevne mikrobiote s glavnim ciljem prevencije razvoja bolesti i doprinosa očuvanju zdravlja. Probiotički pristup temelji se na egzogenoj primjeni živih mikroorganizama, a ima za cilj nadomjestiti ili smanjiti broj potencijalno patogenih bakterija u crijevima obogaćivanjem populacije korisnih sojeva koji fermentiraju ugljikohidrate i koji imaju zanemarivu proteolitičku aktivnost (75). Alternativan pristup probioticima su prebiotici, neprobavljivi sastojci hrane (fruktooligosaharidi, galaktooligosaharidi, ksilooligosaharidi, inulin i fruktani) koji mijenjaju ravnotežu crijevne mikrobiote poticanjem aktivnosti zdravlju korisnih bakterija već prisutnih u crijevima, kao što su laktobacili i bifidobakterije (75, 174). Sinbiotici su oni pripravci u kojima prebiotička komponenta selektivno pogoduje rastu probiotika i proizvodnji njihovih metabolita, pa bi stoga kombinacija obje komponente trebala osigurati superiorniji zdravstveni učinak, u usporedbi s djelovanjem samog probiotika ili prebiotika (171, 174). Postbiotici su nova kategorija biotika koji imaju potencijal pružiti zdravstvene dobrobiti temeljem primjene pripravaka koji sadrže

nevijabilne mikroorganizme i/ili njihove komponente. Postbiotičke komponente uključuju kratkolančane masne kiseline, egzopolisaharide, vitamine, teihonske kiseline, bakteriocine, enzime i peptide u nepročišćenom pripravku inaktiviranih stanica. Budući da za razliku od probiotika ne zahtijevaju žive stanice mikroorganizama za postizanje zdravstvenih učinke postbiotici ne podliježu zahtjevima sigurnosti hrane koji se primjenjuju na žive mikroorganizme (262). Za podržavanje tvrdnji o zdravstvenim dobrobiti koje impliciraju navedeni biotski pristupi potrebna su klinička ispitivanja kao i razjašnjavanje molekulskih osnova njihova djelovanja. Primjenjujući metabolomski pristup, Martin i sur. (238) opisali su da modulacija metaboličke funkcije crijevne mikrobiote primjenom pro-, pre- ili sinbitoika dovodi do promjena u metabolizmu lipida, ugljikohidrata i aminokiseina domaćina u mnogim odjeljcima organizma, što pokazuje da je metabolomika u kombinaciji s ključnim fiziološkim pokazateljima moćan i pouzdan pristup za razumijevanje molekulskih temelja korisne ili štetne uloge crijevne mikrobiote na zdravlje bolesti.

## **5. Zaključak**

Metabolomski pristup u otkrivanju metabolita crijevne mikrobiote koji utječu na zdravlje ljudi revolucionaran je način za razumijevanje složenih odnosa između mikrobnih zajednica i ljudskog zdravlja. Ova dinamična i svestrana metoda omogućuje temeljito ispitivanje goleme raznolikosti molekula male molekulske mase, dajući uvid u njihovu funkciju u očuvanju fiziološke ravnoteže, ali i utjecaju na bolesna stanja. Podaci iz ciljane i neciljane metabolomike pružili su uvid u sastave metaboloma mikrobioma povezane sa specifičnim mikrobnim podrijetlom i otkrili su promjene metabolita povezane s endogenim procesima, načinom života i okolišnim čimbenicima.

Prepoznavanje doprinosa crijevne mikrobiote, sa svojom velikom genetskom i metaboličkom raznolikošću, razlikama između pojedinaca u varijabilnosti u prezentaciji bolesti, progresiji i odgovoru na liječenje ukazuje na potrebu sagledavanja mikrobioma kao alata precizne medicine koji bi se trebao uzeti u obzir pri prelasku na individualizirano liječenje. Kako se naše razumijevanje o ulozi crijevne mikrobiote u zdravlju i bolesti produbljuje, metabolomika u konačnici otvara novu eru individualiziranog upravljanja zdravljem, gdje iskorištavanje snage mikrobnih metabolita obećava revoluciju u taktici zdravstvene skrbi na globalnoj razini.

## 6. Literatura

1. Bischoff SC. 'Gut health': a new objective in medicine? *BMC Med.* [Internet]. 14.3.2011. [citirano: 25.7.2023.]; 2011;9:24. Dostupno na: <https://bmcmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1741-7015-9-24>
2. Müller-Lissner SA, Kamm MA, Scarpignato C, Wald A. Myths and misconceptions about chronic constipation. *Am J Gastroenterol.* [Internet]. 1.1.2005. [citirano: 25.7.2023.]; 2005;100(1):232-42. Dostupno na: <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2005.40885.x>
3. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J.* [Internet]. 16.5.2017. [citirano: 25.7.2023.]; 2017;474(11):1823-1836. Dostupno na: <https://portlandpress.com/biochemj/article/474/11/1823/49429/Introduction-to-the-human-gut-microbiota>
4. Xie G, Zhang S, Zheng X, Jia W. Metabolomics approaches for characterizing metabolic interactions between host and its commensal microbes. *Electrophoresis.* [Internet]. 21.3.2022. [citirano: 18.6.2013.]; 2013;34(19):2787-98. Dostupno na: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.201300017>
5. Eloe-Fadros EA, Rasko DA. The human microbiome: from symbiosis to pathogenesis. *Annu Rev Med.* [Internet]. 3.1.2013. [citirano: 25.7.2013.]; 2013;64:145-63. Dostupno na: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-med-010312-133513>
6. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiiano GAD, Gasbarrini A, Mele MC. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms.* [Internet]. 10.1.2019. [citirano: 25.7.2023.]; 2019;7(1):14. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2076-2607/7/1/14>
7. The Human Microbiome Jumpstart Reference Strains Consortium et al. A Catalog of Reference Genomes from the Human Microbiome. *Science.* [Internet]. 21.5.2010. [citirano: 25.7.2023.]; 328,994-999. Dostupno na: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1183605>
8. Flint, H., Scott, K., Louis, P. et al. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* [Internet]. 4.9.2012. [citirano: 25.7.2023.]; 2012;9:577–589. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2012.156>
9. Misheva M, Ilott NE, McCullagh JSO. Recent advances and future directions in microbiome metabolomics, Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research. *ScienceDirect.* [Internet]. 30.10.2021. [citirano: 10.6.2023.]; 2021;20:100283. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2451965021000739>
10. Sprockett D, Fukami T, Relman DA. Role of priority effects in the early-life assembly of the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* [Internet]. 24.1.2018. [citirano: 25.7.2023.]; 2018;15:197e205. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2017.173>
11. Dey P, Chaudhuri SR, Efferth T, Pal S. The intestinal 3M (microbiota, metabolism, metabolome) zeitgeist – from fundamentals to future challenges. *Free Radical Biology and Medicine* [Internet]. 20.11.2021. [citirano: 4.2.2023.]; 2021;176, 265–285. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584921007462>
12. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* [Internet]. 4.3.2010. [citirano: 25.7.2023.]; 2010;464:59e65. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/nature08821>
13. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* [Internet]. 1.7.2006. [citirano: 25.7.2023.]; 2006;7(7):688-93. Dostupno na: <https://www.embopress.org/doi/full/10.1038/sj.embor.7400731>
14. Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Knight R, Gordon JI. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat Rev Microbiol.* [Internet]. 19.10.2008. [citirano: 25.7.2023.]; 2008;6(10):776-88. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/nrmicro1978#citeas>
15. Putignani L, Del Chierico F, Vernocchi P, Cicala M, Cucchiara S, Dallapiccola B; Dysbiotrack Study Group. Gut Microbiota Dysbiosis as Risk and Premorbid Factors of IBD and IBS Along the Childhood-Adulthood Transition. *Inflamm Bowel Dis.* [Internet]. 1.2.2016. [citirano: 29.6.2023.]; 2016;22(2):487-504. Dostupno na: <https://academic.oup.com/ibdjournal/article/22/2/487/4561930>
16. Færgestad EM et al. 4.08 - Analysis of Megavariate Data in Functional Genomics. *Comprehensive Chemometrics.* Elsevier. [Internet]. 1.2.2016. [citirano: 25.07.2023.]; 2009;221-278. Dostupno na: [https://booksite.elsevier.com/brochures/compchemometrics/PDF/Analysis\\_Genomics.pdf](https://booksite.elsevier.com/brochures/compchemometrics/PDF/Analysis_Genomics.pdf)
17. T.S. Postler, S. Ghosh, Understanding the holobiont: how microbial metabolites affect human health and shape the immune system. *Cell Metab.* [Internet]. 5.7.2017. [citirano: 25.07.2023.]; 2017;26(1):110–130. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413117302966>
18. Montalto M, D'Onofrio F, Gallo A, Cazzato A, Gasbarrini G. Intestinal microbiota and its functions. *Digestive and Liver Disease Supplements.* [Internet]. 17.6.2009. [citirano: 15.07.2023.]; 2009;3 (2):30-34. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1594580409600164?via%3Dihub>



19. Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 4.9.2020. [citirano: 16.2.2023.]; 2021;19(1):55-71. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/s41579-020-0433-9>
20. Sonnenburg JL, Fischbach MA. Community health care: therapeutic opportunities in the human microbiome. *Sci Transl Med.* [Internet]. 13.4.2011. [citirano: 25.7.2023.]; 2011;3(78):78ps12. Dostupno na: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3001626>
21. W. Van Treuren, D. Dodd, Microbial contribution to the human metabolome: implications for health and disease. *Annu Rev. Pathol.* [Internet]. 17.10.2019. [citirano: 25.7.2023.]; 2020;15:345–369. Dostupno na: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-020117-043559>
22. Kinross JM, von Roon AC, Holmes E, Darzi A, Nicholson JK. The human gut microbiome: implications for future health care. *Curr Gastroenterol Rep.* [Internet]. 16.10.2008. [citirano: 25.7.2023.]; 2008; 10(4):396–403. Dostupno na: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11894-008-0075-y>
23. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* [Internet]. 10.6.2005. [citirano: 25.7.2023.]; 2005;308(5728):1635–8. Dostupno na: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1110591>
24. Zhang Y, Chen R, Zhang D, Qi S, Liu Y. Metabolite interactions between host and microbiota during health and disease: Which feeds the other? *Biomed Pharmacother.* [Internet]. 27.1.2023. [citirano: 25.7.2023.]; 2023;160:114295. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332223000835?via%3Dihub>
25. Kho ZY, Lal SK. The Human Gut Microbiome - A Potential Controller of Wellness and Disease. *Front Microbiol.* [Internet]. 14.8.2018. [citirano: 25.7.2023.]; 2018;9:1835. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01835/full>
26. Hou K, Wu ZX, Chen XY, Wang JQ, Zhang D, Xiao C, Zhu D, Koya JB, Wei L, Li J, Chen ZS. Microbiota in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* [Internet]. 23.4.2022. [citirano: 17.3.2023.]; 2022;7(1):135. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/s41392-022-00974-4>
27. Nicholson JK. Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology. *Mol Syst Biol.* [Internet]. 3.10.2006. [citirano: 25.7.2023.]; 2006;2:52. Dostupno na: <https://www.emboPress.org/doi/full/10.1038/msb4100095>
28. Holmes E, Wilson ID, Nicholson JK. Metabolic phenotyping in health and disease. *Cell.* [Internet]. 5.9.2008. [citirano: 25.7.2023.]; 2008;134(5):714-7. Dostupno na: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(08\)01071-4?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867408010714%3Fsho%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(08)01071-4?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867408010714%3Fsho%3Dtrue)
29. Chemometrics. Multivariate solutions to metabonomic profiling and functional genomics, part 2. [Internet]. 2.9.2006. [citirano: 25.7.2023.]; 2006. Dostupno na: <http://chemometrics.se/2006/09/02/multivariate-solutions-to-metabonomic-profiling-and-functional-genomics-part-2/>
30. Cameron SJS, Takats Z. Mass spectrometry approaches to metabolic profiling of microbial communities within the human gastrointestinal tract. *Methods.* [Internet]. 1.10.2018. [citirano: 25.7.2023.]; 2018;149:13-24. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1046202317304437?via%3Dihub>
31. Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ* [Internet]. 13.06.2018. [citirano: 4.2.2023.]; 2018;361:k2179. Dostupno na: <https://www.bmj.com/content/361/bmj.k2179>
32. Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites, *Cell* [Internet]. 2.6.2016. [citirano: 13.6.2023.]; 2016;165(6):1332-1345. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041>
33. Rajpoot M, Sharma AK, Sharma A, Gupta GK. Understanding the microbiome: Emerging biomarkers for exploiting the microbiota for personalized medicine against cancer. *Semin Cancer Biol.* [Internet]. 6.2.2018. [citirano: 20.7.2023.]; 2018;52(1):1-8. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1044579X17301463?via%3Dihub>
34. Deo PN, Deshmukh R. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *JOMFP* [Internet]. 1.1.2019. [citirano: 13.6.2023.]; 2019;23(1):122-128. Dostupno na: [https://journals.lww.com/jpat/Fulltext/2019/23010/Oral\\_microbiome\\_Unveiling\\_the\\_fundamentals.25.aspx](https://journals.lww.com/jpat/Fulltext/2019/23010/Oral_microbiome_Unveiling_the_fundamentals.25.aspx)
35. Hills RD Jr, Pontefract BA, Mishcon HR, Black CA, Sutton SC, Theberge CR. Gut Microbiome: Profound Implications for Diet and Disease. *Nutrients* [Internet]. 16.7.2019. [citirano: 13.6.2023.]; 2019;11(7):1613. Dostupno na: <https://karger.com/Article/PDF/523712>
36. Kilian, M, Chapple I, Hannig M et al. ipid si microbiome – an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J* [Internet]. 18.11.2016. [citirano: 14.6.2023.]; 2016;221, 657–666. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/sj.bdj.2016.865>
37. NIH HMP Working Group. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* [Internet]. 9.10.2009. [citirano: 16.7.2023.]; 2009;19(12):2317-23. Dostupno na: <https://genome.cshlp.org/content/19/12/2317>

38. Krautkramer, KA, Fan J, Bäckhed F. Gut microbial metabolites as multi-kingdom intermediates. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 23.9.2020. [citirano: 5.2.2023.]; 2021; 19(2):77–94 Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/s41579-020-0438-4>
39. Olofsson LE, Bäckhed F. The Metabolic Role and Therapeutic Potential of the Microbiome. *Endocr Rev*. [Internet]. 26.9.2022. [citirano: 4.2.2023.]; 2022;43(5):907-926. Dostupno na: <https://academic.oup.com/edrv/article/43/5/907/6517545>
40. Li C, Liang Y, Qiao Y. Messengers From the Gut: Gut Microbiota-Derived Metabolites on Host Regulation. *Front Microbiol* [Internet]. 22.4.2022. [citirano: 5.2.2023.]; 2022;13:863407. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.863407/full>
41. Floch, MH, Ringel Y, Walker WA, authors; Floch, MH, Ringel Y, Walker WA, editors. The microbiota in gastrointestinal pathophysiology implications for human health, prebiotics, probiotics, and dysbiosis [Internet]. 1st edition. Elsevier AP. Dostupno na: <https://shop.elsevier.com/books/the-microbiota-in-gastrointestinal-pathophysiology/floch/978-0-12-804024-9>
42. Ishiguro E, Haskey N, Campbell K, authors; Ball M, editor. Gut Microbiota: Interactive Effects on Nutrition and Health [Internet]. 1st edition. Elsevier AP. Dostupno na: <https://shop.elsevier.com/books/gut-microbiota/ishiguro/978-0-12-810541-2>
43. Park CH. A Step Toward Discovering the New World of Esophageal Microbiota. *J Neurogastroenterol Motil*. [Internet]. 30.4.2022. [citirano: 17.2.2023.]; 2022;30;28(2):167-168. Dostupno na: <https://www.jnmjournal.org/journal/view.html?uid=1749&vmd=Full>
44. Pei Z, Bini EJ, Yang L, Zhou M, Francois F, Blaser MJ. Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 11.3.2004. [citirano: 17.2.2023.]; 2004;101(12):4250–5. Dostupno na: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0306398101>
45. Nardone G, Compare D. The human gastric microbiota: ipid time to rethink the pathogenesis of stomach diseases? *United European Gastroenterol*. [Internet]. 14.1.2015. [citirano: 16.2.2023.]; 2015;3(3):255-260. Dostupno na: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/2050640614566846>
46. Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter*. [Internet]. 28.8.2014. [citirano: 18.2.2023.]; 2014;1:1-5. Dostupno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/hel.12165>
47. Bik EM, et al. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc. Natl. Acad.* [Internet]. 4.6.2006. [citirano: 16.2.2023.]; 2006;103(3):732–737. Dostupno na: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0506655103>
48. El Aidy S, van den Bogert B, Kleerebezem M. The small intestine microbiota, nutritional modulation and relevance for health. *Curr Opin Biotechnol*. [Internet]. 8.10.2014. [citirano: 14.7.2023.]; 2015;32:14-20. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958166914001657?via%3Dihub>
49. Delbaere K, Roegiers I, Bron A, Durif C, Van de Wiele T, Blanquet-Diot S, Marinelli L. The small intestine: dining table of host-microbiota meetings. *FEMS Microbiol Rev*. [Internet]. 19.5.2023. [citirano: 14.7.2023.]; 2023;47(3):fuad022. Dostupno na: <https://academic.oup.com/femsre/article/47/3/fuad022/7165754?login=false>
50. Yasuda K, Oh K, Ren B, Tickle TL, Franzosa EA, Wachtman LM, et al. Biogeography of the intestinal mucosal and luminal microbiome in the rhesus macaque. *Cell Host Microbe*. [Internet]. 11.3.2015. [citirano: 14.7.2023.]; 2015;17(3):385-391. Dostupno na: [https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128\(15\)00035-9?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1931312815000359%3Fsho%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128(15)00035-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1931312815000359%3Fsho%3Dtrue)
51. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med*. [Internet]. 21.5.2014. [citirano: 6.7.2023.]; 2014;6(237):237ra65. Dostupno na: [https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3008599?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3008599?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed)
52. Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, Jernberg C, et al. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut*. [Internet]. 7.8.2013. [citirano: 6.7.2023.]; 2014 Apr;63(4):559-66. Dostupno na: <https://gut.bmj.com/content/63/4/559.long>
53. Ihekweazu FD, Versalovic J. Development of the Pediatric Gut Microbiome: Impact on Health and Disease. *Am J Med Sci*. [Internet]. 20.8.2018. [citirano: 6.7.2023.]; 2018 Nov;356(5):413-423. Dostupno na: [https://www.amjmedsci.org/article/S0002-9629\(18\)30302-1/fulltext](https://www.amjmedsci.org/article/S0002-9629(18)30302-1/fulltext)
54. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [Internet]. 15.3.2011. [citirano: 7.7.2023.]; 2011;108(1):4586-4591. Dostupno na: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1000097107>

55. Ragonnaud E, Biragyn A. Gut microbiota as the key controllers of „healthy“ gin of elderly people. *Immun Ageing*. [Internet]. 5.1.2021. [citirano: 7.7.2023.]; 2021;18(1):2. Dostupno na: <https://immunityageing.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12979-020-00213-w>
56. Antal I, Jelić M, Sila S, Kolaček S, Tambić Andrešević A. Ljudska mikrobiota i mikrobiom. *Acta Med Croatica*. [Internet]. 4.4.2019. [citirano: 20.7.2023.]; 2019;73:3-11. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/file/319582>
57. Sommer F, Anderson JM, Bharti R, Raes J, Rosenstiel P. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nat Rev Microbiol*. [Internet]. 19.6.2017. [citirano: 20.7.2023.]; 2017;15(10):630-638. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/nrmicro.2017.58>
58. Berg G, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. [Internet]. 30.6.2020. [citirano: 20.7.2023.]; 2020;8(1):103. Dostupno na: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-020-00875-0>
59. Risely A. Applying the core microbiome to understand host-microbe systems. *J Anim Ecol*. [Internet]. 14.4.2020. [citirano: 22.7.2023.]; 2020;89(7):1549-1558. Dostupno na: <https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1365-2656.13229>
60. Sharon I, Quijada NM, Pasolli E, Fabbrini M, Vitali F, Agamennone V, et al. The Core Human Microbiome: Does It Exist and How Can We Find It? A Critical Review of the Concept. *Nutrients*. [Internet]. 13.7.2022. [citirano: 23.7.2023.]; 2022;14(14):2872. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2072-6643/14/14/2872>
61. Caporaso JG, Lauber CL, Costello EK, Berg-Lyons D, Gonzalez A, Stombaugh J, et al. Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biology*. [Internet]. 30.5.2011. [citirano: 23.7.2023.]; 2011; 12-5-r50. Dostupno na: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2011-12-5-r50>
62. Toju H, Peay KG, Yamamichi M, Narisawa K, Hiruma K, Naito K, et al. Core microbiomes for sustainable agroecosystems. *Nat Plants*. [Internet]. 30.4.2018. [citirano: 24.7.2023.]; 2018;4(5):247-257. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/s41477-018-0139-4>
63. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. [Internet]. 22.1.2009. [citirano: 24.7.2023.]; 2009;457(7228):480-4. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/nature07540>
64. Engen PA, Green SJ, Voigt RM, Forsyth CB, Keshavarzian A. The Gastrointestinal Microbiome: Alcohol Effects on the Composition of Intestinal Microbiota. *Alcohol Res*. [Internet]. 1.1.2015. [citirano: 16.2.2023.]; 2015;37(2):223-36. Dostupno na: <https://arcr.niaaa.nih.gov/alcohol-and-immune-system/gastrointestinal-microbiome-alcohol-effects-composition-intestinal-microbiota>
65. Ratiner K, Abdeen SK, Goldenberg K, Elinav E. Utilization of Host and Microbiome Features in Determination of Biological Aging. *Microorganisms*. [Internet]. 21.3.2022. [citirano: 18.7.2023.]; 2022 Mar 21;10(3):668. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/3/668>
66. Clemente JC et al. The microbiome of uncontacted Amerindians. *Sci*. [Internet]. 3.4.2015. [citirano: 25.4.2023.]; 2015;1(3):e1500183. Dostupno na: [https://www.science.org/doi/full/10.1126/sciadv.1500183?rfr\\_dat=cr\\_pub++0pubmed&url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org](https://www.science.org/doi/full/10.1126/sciadv.1500183?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org)
67. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [Internet]. 17.8.2010. [citirano: 24.8.2023.]; 2010;107(33):14691-6. Dostupno na: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1005963107>
68. Singh RP, Halaka DA, Hayouka Z, Tirosh O. High-Fat Diet Induced Alteration of Mice Microbiota and the Functional Ability to Utilize Fructooligosaccharide for Ethanol Production. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. [Internet]. 7.8.2020. [citirano: 24.8.2023.]; 2020;10:376. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00376/full>
69. Schaan AP, Sarquis D, Cavalcante GC, Magalhães L, Sacuena ERP, Costa J, et al. The structure of Brazilian Amazonian gut microbiomes in the process of urbanisation. *NPJ Biofilms Microbiomes*. [Internet]. 5.8.2021. [citirano: 24.8.2023.]; 2021;7(1):65. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/s41522-021-00237-0>
70. Ruggles KV, Wang J, Volkova A, Contreras M, Noya-Alarcon O, Lander O, et al. Changes in the Gut Microbiota of Urban Subjects during an Immersion in the Traditional Diet and Lifestyle of a Rainforest Village. *mSphere*. [Internet]. 29.8.2018. [citirano: 25.4.2023.]; 2018;3(4):e00193-18. Dostupno na: [https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSphere.00193-18?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%200pubmed](https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSphere.00193-18?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed)
71. Vernocchi P, Del Chierico F, Putignani L. Gut Microbiota Profiling: Metabolomics Based Approach to Unravel Compounds Affecting Human Health. *Front Microbiol*. [Internet]. 26.7.2016. [citirano: 10.6.2023.]; 2016;7:1144. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01144/full>
72. Liu J, Tan Y, Cheng H, Zhang D, Feng W, Peng C. Functions of Gut Microbiota Metabolites, Current Status and Future Perspectives. *Aging and disease*. [Internet]. 1.4.2022. [citirano: 10.7.2023.]; 2022, 13(4): 1106-1126. Dostupno na: <https://www.aginganddisease.org/EN/10.14336/AD.2022.0104>

73. Ahern PP, Maloy KJ. Understanding immune-microbiota interactions in the intestine. *Immunology*. [Internet]. 27.11.2019. [citirano: 10.7.2023.]; 2020;159(1):4-14. Dostupno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/imm.13150>
74. Wiley NC at al. The microbiota-gut-brain axis as a key regulator of neural function and the stress response: Implications for human and animal health. *Journal of Animal Science*. [Internet]. 1.7.2017. [citirano: 17.3.2023.]; 2017;95(7):3225–3246. Dostupno na: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/95/7/3225/4702927?redirectedFrom=fulltext&login=false>
75. Martin FP, Collino S, Rezzi S, Kochhar S. Metabolomic applications to decipher gut microbial metabolic influence in health and disease. *Front Physiol*. [Internet]. 26.4.2012. [citirano: 18.7.2023.]; 2012 Apr 26;3:113. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2012.00113/full>
76. Holmes E, Li JV, Athanasiou T, Ashrafi H, Nicholson JK. Understanding the role of gut microbiome-host metabolic signal disruption in health and disease. *Trends Microbiol*. [Internet]. 22.6.2011. [citirano: 18.7.2023.]; 2011;19(7):349-59. Dostupno na: [https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X\(11\)00095-3?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X11000953%3Fhowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(11)00095-3?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X11000953%3Fhowall%3Dtrue)
77. Oliphant K, Allen-Vercoe E. Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation byproducts and their impact on host health. *Microbiome*. [Internet]. 13.6.2019. [citirano: 1.7.2023.]; 2019;7(1):91. Dostupno na: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-019-0704-8>
78. Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*. [Internet]. 1.10.1987. [citirano: 30.7.2023.]; 1987;28(10):1221-7. Dostupno na: <https://gut.bmj.com/content/28/10/1221.citation-tools>
79. Martens EC, Chiang HC, Gordon JI. Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont. *Cell Host Microbe*. [Internet]. 13.11.2008. [citirano: 30.7.2023.]; 2008;4(5):447-57. Dostupno na: [https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128\(08\)00303-X?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS193131280800303X%3Fhowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128(08)00303-X?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS193131280800303X%3Fhowall%3Dtrue)
80. Sonnenburg JL, Xu J, Leip DD, Chen CH, Westover BP, Weatherford J, Buhler JD, Gordon JI. Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science*. [Internet]. 25.5.2005. [citirano: 30.7.2023.]; 2005;307(5717):1955-9. Dostupno na: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1109051>
81. Bachem A, Makhlof C, Binger KJ, de Souza DP, Tull D, Hochheiser K, et al. Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids Promote the Memory Potential of Antigen-Activated CD8+ T Cells. *Immunity*. [Internet]. 1.7.2019. [citirano: 30.7.2023.]; 2019;51(2):285-297.e5. Dostupno na: [https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613\(19\)30247-X?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS107476131930247X%3Fhowall%3Dtrue](https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613(19)30247-X?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS107476131930247X%3Fhowall%3Dtrue)
82. Kasahara K, Krautkramer KA, Org E, Romano KA, Kerby RL, Vivas EI, et al. Interactions between *Roseburia intestinalis* and diet modulate atherogenesis in a murine model. *Nat Microbiol*. [Internet]. 5.11.2018. [citirano: 30.7.2023.]; 2018;3(12):1461-1471. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/s41564-018-0272-x>
83. Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [Internet]. 17.10.2008. [citirano: 30.7.2023.]; 2008;105(43):16767-72. Dostupno na: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0808567105>
84. Bhattacharya T, Ghosh TS, Mande SS. Global Profiling of Carbohydrate Active Enzymes in Human Gut Microbiome. *PLoS One*. [Internet]. 6.11.2015. [citirano: 30.7.2023.]; 2015;10(11):e0142038. Dostupno na: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0142038>
85. McNeil NI. The contribution of the large intestine to energy supplies in man. *Am J Clin Nutr*. [Internet]. 10.2.1984. [citirano: 30.7.2023.]; 1984 Feb;39(2):338-42. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0002916523245992?via%3Dihub>
86. den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res*. [Internet]. 2.6.2013. [citirano: 30.7.2023.]; 2013;54(9):2325-40. Dostupno na: [https://www.jlr.org/article/S0022-2275\(20\)35124-5/fulltext](https://www.jlr.org/article/S0022-2275(20)35124-5/fulltext)
87. Puupponen-Pimiä R, et al. Development of functional ingredients for gut health. *Trends Food Sci. Tech*. [Internet]. 12.1.2002. [citirano: 30.7.2023.]; 2002;13:3–11. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/222747795\\_Development\\_of\\_functional\\_ingredients\\_for\\_gut\\_health](https://www.researchgate.net/publication/222747795_Development_of_functional_ingredients_for_gut_health)
88. Vijay N, Morris ME. Role of monocarboxylate transporters in drug delivery to the brain. *Curr Pharm Des*. [Internet]. 10.1.2014. [citirano: 30.7.2023.]; 2014;20(10):1487-98. Dostupno na: <https://www.eurekaselect.com/article/53230>

89. Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*. [Internet]. 28.10.1987. [citirano: 28.7.2023.]; 1987;28(10):1221-7. Dostupno na: <https://gut.bmj.com/content/28/10/1221>
90. Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev*. [Internet]. 1.6.2001. [citirano: 24.7.2023.]; 2001;81(3):1031-64. Dostupno na: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.2001.81.3.1031>
91. Clausen MR, Mortensen PB. Kinetic studies on colonocyte metabolism of short chain fatty acids and glucose in ulcerative colitis. *Gut*. [Internet]. 29.3.1995. [citirano: 26.7.2023.]; 1995;37(5):684-9. Dostupno na: <https://gut.bmj.com/content/37/5/684>
92. van der Hee B, Wells JM. Microbial Regulation of Host Physiology by Short-chain Fatty Acids. *Trends Microbiol*. [Internet]. 2.3.2021. [citirano: 26.7.2023.]; 2021;29(8):700-712. Dostupno na: [https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X\(21\)00035-4?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X21000354%3Fsho%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(21)00035-4?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X21000354%3Fsho%3Dtrue)
93. Lin HV, Frassetto A, Kowalik EJ Jr, Nawrocki AR, Lu MM, Kosinski JR, et al. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PLoS One*. [Internet]. 10.4.2012. [citirano: 26.7.2023.]; 2012;7(4):e35240. Dostupno na: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035240>
94. Quaglio AEV, Grillo TG, De Oliveira ECS, Di Stasi LC, Sasaki LY. Gut microbiota, inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. [Internet]. 14.8.2022. [citirano: 29.6.2023.]; 2022;28(30):4053-4060. Dostupno na: <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v28/i30/4053.htm>
95. He J, Zhang P, Shen L, Niu L, Tan Y, Chen L, Zhao Y, Bai L, Hao X, Li X, Zhang S, Zhu L. Short-Chain Fatty Acids and Their Association with Signalling Pathways in Inflammation, Glucose and Lipid Metabolism. *Int J Mol Sci*. [Internet]. 2.9.2020. [citirano: 11.7.2023.]; 2020;21(17):6356. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/17/6356>
96. Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Front Endocrinol (Lausanne)*. [Internet]. 31.1.2020. [citirano: 11.7.2023.]; 2020; 11:25. Dostupno na: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11010-022-04471-8>
97. Saad MJ, Santos A, Prada PO. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. *Physiology (Bethesda)*. [Internet]. 1.6.2016. [citirano: 1.7.2023.]; 2016;31(4):283-93. Dostupno na: [https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physiol.00041.2015?rfr\\_dat=cr\\_pub++0pubmed&url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org](https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physiol.00041.2015?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org)
98. Asadi A, et al. Obesity and gut-microbiota-brain axis: A narrative review. *J Clin Lab Anal*. [Internet]. 14.4.2022. [citirano: 3.7.2023.]; 2022;36(5):e24420. Dostupno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcla.24420>
99. Levy M, Thaiss CA, Zeevi D, Dohnalová L, Zilberman-Schapira G, Mahdi JA, et al. Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. *Cell*. [Internet]. 3.12.2015. [citirano: 3.7.2023.]; 2015;163(6):1428-43. doi: Dostupno na: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(15\)01404-X?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS009286741501404X%3Fsho%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(15)01404-X?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS009286741501404X%3Fsho%3Dtrue)
100. Wang Z, Zhao Y. Gut microbiota derived metabolites in cardiovascular health and disease, *Protein & Cell*. [Internet]. 3.5.2018. [citirano: 17.6.2023.]; 2018;9(5):416-431. Dostupno na: <https://academic.oup.com/proteincell/article/9/5/416/6760125?login=false#376913618>
101. Thomas MS, Fernandez ML. Trimethylamine N-Oxide (TMAO), Diet and Cardiovascular Disease. *Curr Atheroscler Rep*. [Internet]. 17.2.2021. [citirano: 12.7.2023.]; 2021;23(4):12. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33594574/>
102. Sehgal R, de Mello VD, Männistö V, Lindström J, Tuomilehto J, Pihlajamäki J, et al. Indolepropionic Acid, a Gut Bacteria-Produced Tryptophan Metabolite and the Risk of Type 2 Diabetes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients*. [Internet]. 6.11.2022. [citirano: 17.6.2023.]; 2022;14(21):4695. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2072-6643/14/21/4695>
103. Konopelski P, Mogilnicka I. Biological Effects of Indole-3-Propionic Acid, a Gut Microbiota-Derived Metabolite, and Its Precursor Tryptophan in Mammals' Health and Disease. *Int J Mol Sci*. [Internet]. 22.1.2022. [citirano: 12.7.2023.]; 2022;23(3):1222. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/3/1222>
104. Crump GM, Zhou J, Mashayekh S, Grimes CL. Revisiting peptidoglycan sensing: interactions with host immunity and beyond. *Chem Commun (Camb)*. [Internet]. 11.11.2020. [citirano: 12.7.2023.]; 2020;56(87):13313-13322. Dostupno na: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2020/CC/D0CC02605K>
105. Schertzer JD, Klip A. Give a NOD to insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. [Internet]. 1.10.2011. [citirano: 12.7.2023.]; 2011;301(4):E585-6. Dostupno na:

- [https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpendo.00362.2011?rfr\\_dat=cr\\_pub++0pubmed&url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org](https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpendo.00362.2011?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org)
106. Zeng H, Umar S, Rust B, Lazarova D, Bordonaro M. Secondary Bile Acids and Short Chain Fatty Acids in the Colon: A Focus on Colonic Microbiome, Cell Proliferation, Inflammation, and Cancer. *Int J Mol Sci*. [Internet]. 11.3.2019. [citirano: 12.7.2023.]; 2019;20(5):1214. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/5/1214>
107. Magnúsdóttir S, Ravcheev D, de Crécy-Lagard V, Thiele I. Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests co-operation among gut microbes. *Front Genet*. [Internet]. 20.4.2015. [citirano: 17.7.2023.]; 2015;6:148. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2015.00148/full>
108. Rampelli S, Soverini M, D'Amico F, Barone M, Tavella T, Monti D, et al. Shotgun Metagenomics of Gut Microbiota in Humans with up to Extreme Longevity and the Increasing Role of Xenobiotic Degradation. *mSystems*. [Internet]. 24.3.2020. [citirano: 11.7.2023.]; 2020;5(2):e00124-20. Dostupno na: [https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSystems.00124-20?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%200pubmed](https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSystems.00124-20?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed)
109. Yadav SP. The wholeness in suffix -omics, -omes, and the word om. *J Biomol Tech*. [Internet]. 1.12.2007. [citirano: 6.8.2023.]; 2007;18(5):277. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2392988/>
110. Hasin Y, Seldin M, Lusic A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol*. [Internet]. 5.5.2017. [citirano: 6.8.2023.]; 2017;18(1):83. Dostupno na: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-017-1215-1>
111. Kosmides AK, Kamisoglu K, Calvano SE, Corbett SA, Androulakis IP. Metabolomic fingerprinting: challenges and opportunities. *Crit Rev Biomed Eng*. [Internet]. 14.7.2013. [citirano: 6.8.2023.]; 2013;41(3):205-21. Dostupno na: <https://www.dl.begellhouse.com/journals/4b27cbfc562e21b8,4863d6072e2ac4d2,7fd840d0527bd32e.html>
112. Dai X, Shen L. Advances and Trends in Omics Technology Development. *Front Med (Lausanne)*. [Internet]. 1.7.2022. [citirano: 12.8.2023.]; 2022;9:911861. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2022.911861/full>
113. Daliri EB, Ofosu FK, Chelliah R, Lee BH, Oh DH. Challenges and Perspective in Integrated Multi-Omics in Gut Microbiota Studies. *Biomolecules*. [Internet]. 17.2.2021. [citirano: 12.8.2023.]; 2021;11(2):300. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7922017/pdf/biomolecules-11-00300.pdf>
114. Nalbantoglu S, Karadag A. Metabolomics bridging proteomics along metabolites/oncometabolites and protein modifications: Paving the way toward integrative multiomics. *J Pharm Biomed Anal*. [Internet]. 30.5.2021. [citirano: 12.8.2023.]; 2021;199:114031. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708521001436?via%3Dihub>
115. Mesuere B et al. Unipept web services for metaproteomics analysis. *Bioinformatics*. [Internet]. 27.1.2016. [citirano: 12.8.2023.]; 2016;32(11):1746-1748. Dostupno na: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw039>
116. Peralbo-Molina Á, Solà-Santos P, Perera-Lluna A, Chicano-Gálvez E. Data Processing and Analysis in Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Methods Mol Biol*. [Internet]. 25.9.2022. [citirano: 13.7.2023.]; 2023;2571:207-239. Dostupno na: [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-2699-3\\_20](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-2699-3_20)
117. Qiu S, Cai Y, Yao H, Lin C, Xie Y, Tang S, Zhang A. Small molecule metabolites: discovery of biomarkers and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*. [Internet]. 20.3.2023. [citirano: 24.6.2023.]; 2023;8(1):132. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/s41392-023-01399-3>
118. Chen MX, Wang SY, Kuo CH, Tsai IL. Metabolome analysis for investigating host-gut microbiota interactions. *J Formos Med Assoc*. [Internet]. 27.9.2018. [citirano: 13.7.2023.]; 2019;118(1):S10-S22. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929664618306193?via%3Dihub#sec3>
119. Yan S, Huang J, Chen Z, Jiang Z, Li X, Chen Z. Metabolomics in gut microbiota: applications and challenges. *Sci. Bull*. [Internet]. 6.7.2016. [citirano: 13.7.2023.]; 2016;61(15):1151-1153. Dostupno na: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11434-016-1142-7>
120. Lee-Sarwar KA, Lasky-Su J, Kelly RS, Litonjua AA, Weiss ST. Metabolome-Microbiome Crosstalk and Human Disease. *Metabolites*. [Internet]. 1.5.2020. [citirano: 18.7.2023.]; 2020 May 1;10(5):181. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2218-1989/10/5/181>
121. Bauermeister A, Mannochio-Russo H, Costa-Lotufu LV, Jarmusch AK, Dorrestein PC. Mass spectrometry-based metabolomics in microbiome investigations. *Nat Rev Microbiol*. [Internet]. 22.9.2021. [citirano: 13.7.2023.]; 2022;20(3):143-160. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/s41579-021-00621-9>
122. Kim SJ, Song HE, Lee HY, Yoo HJ. Mass Spectrometry-based Metabolomics in Translational Research. *Adv Exp Med Biol*. [Internet]. 9.4.2021. [citirano: 13.7.2023.]; 2021;1310:509-531. Dostupno na: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-33-6064-8\\_19#citeas](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-33-6064-8_19#citeas)
123. Williams HR, Cox IJ, Walker DG, Cobbold JF, Taylor-Robinson SD, Marshall SE, et al. Differences in gut microbial metabolism are responsible for reduced hippurate synthesis in Crohn's disease. *BMC Gastroenterol*. [Internet]. 17.9.2010. [citirano: 13.7.2023.]; 2010;10:108. Dostupno na: <https://bmcgastroenterol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-230X-10-108>

124. Zhang SL, Mao YQ, Zhang ZY, Li ZM, Kong CY, Chen HL, Cai PR, Han B, Ye T, Wang LS. Pectin supplement significantly enhanced the anti-PD-1 efficacy in tumor-bearing mice humanized with gut microbiota from patients with colorectal cancer. *Theranostics*. [Internet]. 19.2.2021. [citirano: 14.7.2023.]; 2021;11(9):4155-4170. Dostupno na: <https://www.thno.org/v11p4155.htm>
125. Vascellari S, et al. Gut Microbiota and Metabolome Alterations Associated with Parkinson's Disease. *mSystems*. [Internet]. 15.9.2020. [citirano: 14.7.2023.]; 2020;5(5):e00561-20. Dostupno na: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSystems.00561-20>
126. Mojsak P, et al. Optimization of a GC-MS method for the profiling of microbiota-dependent metabolites in blood samples: An application to type 2 diabetes and prediabetes. *Front Mol Biosci*. [Internet]. 23.9.2022. [citirano: 14.7.2023.]; 2022;9:982672. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2022.982672/full>
127. Smirnov KS, Maier TV, Walker A, Heinzmann SS, Forcisi S, Martinez I, Walter J, Schmitt-Kopplin P. Challenges of metabolomics in human gut microbiota research. *Int J Med Microbiol*. [Internet]. 15.3.2016. [citirano: 9.8.2023.]; 2016;306(5):266-279. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1438422116300212?via%3Dihub>
128. Dunn WB, Ellis DI. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends Anal. Chem.* [Internet]. 21.11.2004. [citirano: 22.7.2023.]; 2005;24(4):285-294. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993605000348>
129. Sugimura N, et al. *Lactobacillus gallinarum* modulates the gut microbiota and produces anti-cancer metabolites to protect against colorectal tumorigenesis. *Gut*. [Internet]. 22.12.2021. [citirano: 15.7.2023.]; 2021;71(10):2011-21. Dostupno na: <https://gut.bmj.com/content/71/10/2011>
130. Wegner K, et al. Rapid analysis of bile acids in different biological matrices using LC-ESI-MS/MS for the investigation of bile acid transformation by mammalian gut bacteria. *Anal Bioanal Chem*. [Internet]. 7.11.2016. [citirano: 15.7.2023.]; 2017;409(5):1231-1245. Dostupno na: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-016-0048-1>
131. Liu Y, Li J, Yu J, Wang Y, Lu J, Shang EX, Zhu Z, Guo J, Duan J. Disorder of gut amino acids metabolism during CKD progression is related with gut microbiota dysbiosis and metagenome change. *J Pharm Biomed Anal*. [Internet]. 5.2.2018. [citirano: 15.7.2023.]; 2018;149:425-435. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708517313201?via%3Dihub>
132. Xue B, et al. Low-concentration of dichloroacetonitrile (DCAN) in drinking water perturbs the health-associated gut microbiome and metabolic profile in rats. *Chemosphere*. [Internet]. 26.5.2020. [citirano: 15.7.2023.]; 2020;258:127067. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653520312601?via%3Dihub>
133. Stolz A, Jooß K, Höcker O, Römer J, Schlecht J, Neusüß C. Recent advances in capillary electrophoresis-mass spectrometry: Instrumentation, methodology and applications. *Electrophoresis*. [Internet]. 12.11.2018. [citirano: 15.7.2023.]; 2019 Jan;40(1):79-112. Dostupno na: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.201800331>
134. Martins-de-Souza D. Proteomics, metabolomics, and protein interactomics in the characterization of the molecular features of major depressive disorder. *Dialogues Clin Neurosci*. [Internet]. 16.1.2014. [citirano: 15.7.2023.]; 2014;16(1):63-73. Dostupno na: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.31887/DCNS.2014.16.1/dmartins>
135. Moore WS, Holland GN. Nuclear magnetic resonance imaging. *Br Med Bull*. [Internet]. 1.9.1980. [citirano: 15.7.2023.]; 1980 Sep;36(3):297-9. Dostupno na: <https://academic.oup.com/bmb/article-abstract/36/3/297/355439?redirectedFrom=fulltext&login=false>
136. Chen J, et al. Practical approach for the identification and isomer elucidation of biomarkers detected in a metabonomic study for the discovery of individuals at risk for diabetes by integrating the chromatographic and mass spectrometric information. *Anal Chem*. [Internet]. 15.1.2008. [citirano: 16.7.2023.]; 2008;80(4):1280-9. Dostupno na: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac702089h>
137. Nagana Gowda GA, Raftery D. NMR-Based Metabolomics. *Adv Exp Med Biol*. [Internet]. 1.4.2021. [citirano: 16.7.2023.]; 2021;1280:19-37. Dostupno na: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-51652-9\\_2](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-51652-9_2)
138. Jansson J, Willing B, Lucio M, Fekete A, Dicksved J, Halfvarson J, Tysk C, Schmitt-Kopplin P. Metabolomics reveals metabolic biomarkers of Crohn's disease. *PLoS One*. [Internet]. 28.6.2009. [citirano: 16.7.2023.]; 2009;4(7):e6386. Dostupno na: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0006386>
139. Zhao Y, Wu J, Li JV, Zhou NY, Tang H, Wang Y. Gut microbiota composition modifies fecal metabolic profiles in mice. *J Proteome Res*. [Internet]. 7.6.2013. [citirano: 15.7.2023.]; 2013 Jun 7;12(6):2987-99. Dostupno na: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/pr400263n>

140. Harrigan GG, and Goodacre R. (2003.) *Metabolic Profiling: Its Role in Biomarker Discovery and Gene Function Analysis*. Boston, MA: Springer US; Imprint; Springer. [Internet]. Dostupno na: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4615-0333-0>
141. Dole MN, Patel PA, Sawant SD, Shedpure PS. (2011). Advance applications of fourier transform infrared spectroscopy. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* [Internet]. 1.3.2011. [citirano: 15.7.2023.]; 7(2):159–166. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/288543442\\_Advance\\_applications\\_of\\_fourier\\_transform\\_infrared\\_spectroscopy](https://www.researchgate.net/publication/288543442_Advance_applications_of_fourier_transform_infrared_spectroscopy)
142. Daniel H, Gholami A, Berry D. et al. High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. *ISME J.* [Internet]. 12.9.2013. [citirano: 15.7.2023.]; 2014;8:295–308. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/ismej2013155#citeas>
143. Rosselló-Mora R, Lucio M, Peña A, Brito-Echeverría J, López-López A, Valens-Vadell M, et al. Metabolic evidence for biogeographic isolation of the extremophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *ISME J.* [Internet]. 31.1.2008. [citirano: 15.7.2023.]; 2008;2(3):242–53. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/ismej200793>
144. Zheng X, Xie G, Zhao A, Zhao L, Yao C, Chiu NH, et al. The footprints of gut microbial-mammalian co-metabolism. *J Proteome Res.* [Internet]. 4.10.2011. [citirano: 15.7.2023.]; 2011;10(12):5512–22. Dostupno na: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/pr2007945>
145. Zhao L, Hartung T. Metabonomics and toxicology. *Methods Mol Biol.* [Internet]. 1.1.2015. [citirano: 15.7.2023.]; 2015;1277:209–31. Dostupno na: [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-2377-9\\_15](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-2377-9_15)
146. Karu N, Deng L, Slae M, Guo AC, Sajed T, Huynh H, Wine E, Wishart DS. A review on human fecal metabolomics: Methods, applications and the human fecal metabolome database. *Anal Chim Acta.* [Internet]. 12.5.2018. [citirano: 19.7.2023.]; 2018;1030:1–24. Dostupno na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267018306354>
147. Behr C, Sperber S, Jiang X, Strauss V, Kamp H, Walk T, Herold M, Beekmann K, Rietjens IMCM, van Ravenzwaay B. Microbiome-related metabolite changes in gut tissue, cecum content and feces of rats treated with antibiotics. *Toxicol Appl Pharmacol.* [Internet]. 6.7.2018. [citirano: 19.7.2023.]; 2018;355:198–210. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0041008X18302916?via%3Dihub>
148. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica.* [Internet]. 22.9.2008. [citirano: 19.7.2023.]; 1999;29(11):1181–9. Dostupno na: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/004982599238047>
149. Obrenovich ME, Tima M, Polinkovsky A, Zhang R, Emancipator SN, Donskey CJ. Targeted Metabolomics Analysis Identifies Intestinal Microbiota-Derived Urinary Biomarkers of Colonization Resistance in Antibiotic-Treated Mice. *Antimicrob Agents Chemother.* [Internet]. 25.7.2017. [citirano: 19.7.2023.]; 2017;61(8):e00477–17. Dostupno na: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.00477-17>
150. Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, Schultz PG, Lesley SA, Peters EC, Siuzdak G. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* [Internet]. 10.3.2009. [citirano: 19.7.2023.]; 2009;106(10):3698–703. Dostupno na: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0812874106>
151. Kodukula K, Faller DV, Harpp DN, Kanara I, Pernokas J, Pernokas M, Powers WR, Soukos NS, Steliou K, Moos WH. Gut Microbiota and Salivary Diagnostics: The Mouth Is Salivating to Tell Us Something. *Biores Open Access.* [Internet]. 1.10.2017. [citirano: 19.7.2023.]; 2017;6(1):123–132. Dostupno na: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/biores.2017.0020>
152. Smolinska A, Tedjo DI, Blanchet L, Bodelier A, Pierik MJ, Masclee AAM, Dallinga J, Savelkoul PHM, Jonkers DMAE, Penders J, van Schooten FJ. Volatile metabolites in breath strongly correlate with gut microbiome in CD patients. *Anal Chim Acta.* [Internet]. 26.9.2018. [citirano: 19.7.2023.]; 2018;1025:1–11. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267018304252?via%3Dihub>
153. Monasta L, Pierobon C, Princivale A, Martelossi S, Marcuzzi A, Pasini F, et al. Inflammatory bowel disease and patterns of volatile organic compounds in the exhaled breath of children: A case-control study using Ion Molecule Reaction-Mass Spectrometry. *PLoS One.* [Internet]. 31.8.2017. [citirano: 19.7.2023.]; 2017;12(8):e0184118. Dostupno na: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0184118>
154. Pieragostino D, D'Alessandro M, di Ioia M, Rossi C, Zucchelli M, Urbani A, et al. An integrated metabolomics approach for the research of new cerebrospinal fluid biomarkers of multiple sclerosis. *Mol Biosyst.* [Internet]. 7.6.2015. [citirano: 19.7.2023.]; 2015;11(6):1563–72. Dostupno na: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/MB/C4MB00700J>
155. Cassol E, Misra V, Dutta A, Morgello S, Gabuzda D. Cerebrospinal fluid metabolomics reveals altered waste clearance and accelerated aging in HIV patients with neurocognitive impairment. *AIDS.* [Internet]. 17.7.2014. [citirano: 19.7.2023.]; 2014;28(11):1579–91. Dostupno na: [https://journals.lww.com/aidsonline/fulltext/2014/07170/cerebrospinal\\_fluid\\_metabolomics\\_reveals\\_altered.4.aspx](https://journals.lww.com/aidsonline/fulltext/2014/07170/cerebrospinal_fluid_metabolomics_reveals_altered.4.aspx)



156. O'Mahony SM, Clarke G, Borre YE, Dinan TG, Cryan JF. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav Brain Res.* [Internet]. 15.1.2015. [citirano: 19.7.2023.]; 2015;277:32-48. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166432814004768?via%3Dihub>
157. Moco S, Collino S, Rezzi S, Martin FP. Metabolomics perspectives in pediatric research. *Pediatr Res.* [Internet]. 11.1.2013. [citirano: 8.8.2023.]; 2013;73(4 Pt 2):570-6. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/pr20131>
158. Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: Metabonomics. *Nature.* [Internet]. 23.10.2008. [citirano: 8.8.2023.]; 2008 Oct 23;455(7216):1054-6. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/4551054a>
159. Brindle JT, Antti H, Holmes E, Tranter G, Nicholson JK, Bethell HW, et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using <sup>1</sup>H-NMR-based metabonomics. *Nat Med.* [Internet]. 25.11.2002. [citirano: 8.8.2023.]; 2002;8(12):1439-44. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/nm802>
159. Kauwe JS, Cruchaga C, Bertelsen S, Mayo K, Latu W, Nowotny P, et al. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative; Goate AM. Validating predicted biological effects of Alzheimer's disease associated SNPs using CSF biomarker levels. *J Alzheimers Dis.* [Internet]. 2.2.2011. [citirano: 8.8.2023.]; 2010;21(3):833-42. Dostupno na: <https://doi.org/10.3233%2FJAD-2010-091711>
160. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* [Internet]. 31.5.2001. [citirano: 8.8.2023.]; 2001 May 31;411(6837):599-603. Dostupno na: <https://doi.org/10.1038/35079107>
161. Hinkelbein J, Feldmann RE Jr, Peterka A, Schubert C, Schelshorn D, Maurer MH, et al. Alterations in cerebral metabolomics and proteomic expression during sepsis. *Curr Neurovasc Res.* [Internet]. 10.11.2007. [citirano: 8.8.2023.]; 2007;4(4):280-8. Dostupno na: <https://www.eurekaselect.com/article/10858>
162. Nicholson JK, Holmes E, Lindon JC, Wilson ID. The challenges of modeling mammalian biocomplexity. *Nat Biotechnol.* [Internet]. 6.10.2004. [citirano: 8.8.2023.]; 2004;22(10):1268-74. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/nbt1015>
163. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc.* [Internet]. 25.10.2007. [citirano: 8.8.2023.]; 2007;2(11):2692-703. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/nprot.2007.376>
164. Lenz EM, Wilson ID. Analytical strategies in metabonomics. *J Proteome Res.* [Internet]. 13.12.2007. [citirano: 8.8.2023.]; 2007;6(2):443-58. Dostupno na: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/pr0605217>
165. Griffin JL. The Cinderella story of metabolic profiling: does metabolomics get to go to the functional genomics ball? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* [Internet]. 29.1.2006. [citirano: 8.8.2023.]; 2006;361(1465):147-61. Dostupno na: <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1734>
166. O'Hagan S, Dunn WB, Knowles JD, Broadhurst D, Williams R, Ashworth JJ, et al. Closed-loop, multiobjective optimization of two-dimensional gas chromatography/mass spectrometry for serum metabolomics. *Anal Chem.* [Internet]. 15.1.2007. [citirano: 8.8.2023.]; 2007 Jan 15;79(2):464-76. Dostupno na: <https://doi.org/10.1021/ac061443+>
167. Cirulli ET, Guo L, Leon Swisher C, Shah N, Huang L, Napier LA, et al. Profound Perturbation of the Metabolome in Obesity Is Associated with Health Risk. *Cell Metab.* [Internet]. 5.2.2019. [citirano: 18.7.2023.]; 2019 Feb 5;29(2):488-500.e2. Dostupno na: [https://www.cell.com/cell-metabolism/fulltext/S1550-4131\(18\)30630-2?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1550413118306302%3Fsho%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-metabolism/fulltext/S1550-4131(18)30630-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1550413118306302%3Fsho%3Dtrue)
168. Meslier V, Laiola M, Roager HM, De Filippis F, Roume H, Quinquis B, et al. Mediterranean diet intervention in overweight and obese subjects lowers plasma cholesterol and causes changes in the gut microbiome and metabolome independently of energy intake. *Gut.* [Internet]. 19.2.2020. [citirano: 18.7.2023.]; 2020 Jul;69(7):1258-1268. Dostupno na: <https://gut.bmj.com/content/69/7/1258>
169. Beam A, Clinger E, Hao L. Effect of Diet and Dietary Components on the Composition of the Gut Microbiota. *Nutrients.* [Internet]. 15.8.2021. [citirano: 5.7.2023.]; 2021;13(8):2795. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2072-6643/13/8/2795>
170. Tanes C, Bittinger K, Gao Y, Friedman ES, Nessel L, Paladhi UR, et al. Role of dietary fiber in the recovery of the human gut microbiome and its metabolome. *Cell Host Microbe.* [Internet]. 10.3.2021. [citirano: 19.7.2023.]; 2021 Mar 10;29(3):394-407.e5. Dostupno na: <https://nutritionj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12937-022-00782-0>
171. Leeuwendaal NK, Stanton C, O'Toole PW, Beresford TP. Fermented Foods, Health and the Gut Microbiome. *Nutrients.* [Internet]. 6.4.2022. [citirano: 5.7.2023.]; 2022;14(7):1527. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2072-6643/14/7/1527>

172. La Fata G, Weber P, Mohajeri MH. Probiotics and the Gut Immune System: Indirect Regulation. *Probiotics Antimicrob Proteins*. [Internet]. 31.8.2017. [citirano: 5.7.2023.]; 2018;10(1):11-21. Dostupno na: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-017-9322-6#Sec3>
173. Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev*. [Internet]. 14.12.2007. [citirano: 5.7.2023.]; 2004;17(2):259-75. Dostupno na: <https://www.cambridge.org/core/journals/nutrition-research-reviews/article/dietary-modulation-of-the-human-colonic-microbiota-updating-the-concept-of-prebiotics/E445EDF28DD9C50CAE5E6BCCED5D0805>
174. Markowiak P, Śliżewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*. [Internet]. 15.9.2017. [citirano: 5.7.2023.]; 2017;9(9):1021. Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
175. Sakkas H, Bozidis P, Touzios C, Kolios D, Athanasiou G, Athanasopoulou E, et al. Nutritional Status and the Influence of the Vegan Diet on the Gut Microbiota and Human Health. *Medicina (Kaunas)*. [Internet]. 22.2.2020. [citirano: 5.7.2023.]; 2020;56(2):88. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/1648-9144/56/2/88>
176. de Vos WM, Tilg H, Van Hul M, Cani PD. Gut microbiome and health: mechanistic insights. *Gut*. [Internet]. 1.2.2022. [citirano: 27.6.2023.]; 2022;71(5):1020-1032. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8995832/pdf/gutjnl-2021-326789.pdf>
177. Fouhy F, Ronan NJ, O'Sullivan O, McCarthy Y, Walsh AM, Murphy DM, et al. A pilot study demonstrating the altered gut microbiota functionality in stable adults with Cystic Fibrosis. *Sci Rep*. [Internet]. 27.7.2017. [citirano: 22.7.2023.]; 2017;7(1):6685. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-06880-y>
178. Vernocchi P, Del Chierico F, Russo A, Majo F, Rossitto M, Valerio M, et al. Gut microbiota signatures in cystic fibrosis: Loss of host CFTR function drives the microbiota enterophenotype. *PLoS One*. [Internet]. 6.12.2018. [citirano: 22.7.2023.]; 2018 Dec 6;13(12):e0208171. Dostupno na: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0208171#sec007>
179. Walton C, Fowler DP, Turner C, Jia W, Whitehead RN, Griffiths L et al. Analysis of volatile organic compounds of bacterial origin in chronic gastrointestinal diseases. *Inflamm Bowel Dis*. [Internet]. 1.9.2013. [citirano: 21.7.2023.]; 2013 Sep;19(10):2069-78. Dostupno na: <https://academic.oup.com/ibdjournal/article/19/10/2069/4602985?login=false>
180. De Preter V, Machiels K, Joossens M, Arijs I, Matthys C, Vermeire S, et al. Faecal metabolite profiling identifies medium-chain fatty acids as discriminating compounds in IBD. *Gut*. [Internet]. 8.5.2014. [citirano: 21.7.2023.]; 2015 Mar;64(3):447-58. Dostupno na: <https://gut.bmj.com/content/64/3/447>
181. Di Cagno R, De Angelis M, De Pasquale I, Ndagijimana M, Vernocchi P, Ricciuti P, et al. Duodenal and faecal microbiota of celiac children: molecular, phenotype and metabolome characterization. *BMC Microbiol*. [Internet]. 4.10.2011. [citirano: 24.7.2023.]; 2011 Oct 4;11:219. Dostupno na: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-11-219>
182. Sun P, Su L, Zhu H, Li X, Guo Y, Du X, Zhang L, Qin C. Gut Microbiota Regulation and Their Implication in the Development of Neurodegenerative Disease. *Microorganisms*. [Internet]. 2.11.2021. [citirano: 4.7.2023.]; 2021;9(11):2281. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/11/2281>
183. Luan H, Wang X, Cai Z. Mass spectrometry-based metabolomics: Targeting the crosstalk between gut microbiota and brain in neurodegenerative disorders. *Mass Spectrom Rev*. [Internet]. 12.11.2017. [citirano: 19.7.2023.]; 2019 Jan;38(1):22-33. Dostupno na: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mas.21553>
184. Konjevod M, Nikolac Perkovic M, Sáiz J, Svob Strac D, Barbas C, Rojo D. Metabolomics analysis of microbiota-gut-brain axis in neurodegenerative and psychiatric diseases. *J Pharm Biomed Anal*. [Internet]. 5.2.2021. [citirano: 19.7.2023.]; 2021 Feb 5;194:113681. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708520315673?via%3Dihub>
185. Dickinson KM, Collaco JM. Cystic Fibrosis. *Pediatr Rev*. [Internet]. 1.2.2021. [citirano: 28.6.2023.]; 2021;42(2):55-67. Dostupno na: <https://publications.aap.org/pediatricsinreview/article-abstract/42/2/55/35475/Cystic-Fibrosis?redirectedFrom=fulltext>
186. Li L, Somerset S. The clinical significance of the gut microbiota in cystic fibrosis and the potential for dietary therapies. *Clin Nutr*. [Internet]. 14.4.2014. [citirano: 28.6.2023.]; 2014;33(4):571-80. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261561414000946>
187. Singh VK, Schwarzenberg SJ. Pancreatic insufficiency in Cystic Fibrosis. *J Cyst Fibros*. [Internet]. 6.11.2017. [citirano: 28.6.2023.]; 2017;16(2):S70-S78. Dostupno na: [https://www.cysticfibrosisjournal.com/article/S1569-1993\(17\)30813-5/fulltext](https://www.cysticfibrosisjournal.com/article/S1569-1993(17)30813-5/fulltext)
188. Chunxi L, Haiyue L, Yanxia L, Jianbing P, Jin S. The Gut Microbiota and Respiratory Diseases: New Evidence. *J Immunol Res*. [Internet]. 31.7.2020. [citirano: 28.6.2023.]; 2020;2020:2340670. Dostupno na: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2020/2340670/>
189. Binienda A, Twardowska A, Makaro A, Salaga M. Dietary Carbohydrates and lipid sin the Pathogenesis of Leaky Gut Syndrome: An Overview. *Int J Mol Sci*. [Internet]. 8.11.2020. [citirano: 29.6.2023.]; 2020;21(21):8368. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/21/8368>

190. Burke DG, Fouhy F, Harrison MJ, Rea MC, Cotter PD, O'Sullivan O, Stanton C, Hill C, Shanahan F, Plant BJ, Ross RP. The altered gut microbiota in adults with cystic fibrosis. *BMC Microbiol.* [Internet]. 9.3.2017. [citirano: 22.7.2023.]; 2017 Mar 9;17(1):58. Dostupno na: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-017-0968-8>
191. Kinross JM, Darzi AW, Nicholson JK. Gut microbiome-host interactions in health and disease. *Genome Med.* [Internet]. 4.3.2011. [citirano: 23.7.2023.]; 2011;3(3):14. Dostupno na: <https://doi.org/10.1186/gm228>
192. Carroll IM, Ringel-Kulka T, Siddle JP, Ringel Y. Alterations in composition and diversity of the intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil.* [Internet]. 20.2.2012. [citirano: 23.7.2023.]; 2012;24(6):521-30, e248. Dostupno na: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2012.01891.x>
193. Mukhopadhyaya I, Hansen R, El-Omar EM, Hold GL. IBD-what role do Proteobacteria play? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* [Internet]. 21.2.2012. [citirano: 23.7.2023.]; 2012;9(4):219-30. Dostupno na: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.14>
194. Bunge M, Araghipour N, Mikoviny T, Dunkl J, Schnitzhofer R, Hansel A, Schinner F, Wisthaler A, Margesin R, Märk TD. On-line monitoring of microbial volatile metabolites by proton transfer reaction-mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol.* [Internet]. 1.4.2008. [citirano: 21.7.2023.]; 2008 Apr;74(7):2179-86. Dostupno na: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.02069-07>
195. Ahmed I, Greenwood R, Costello Bde L, Ratcliffe NM, Probert CS. An investigation of fecal volatile organic metabolites in irritable bowel syndrome. *PLoS One.* [Internet]. 13.3.2013. [citirano: 21.7.2023.]; 2013;8(3):e58204. Dostupno na: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0058204>
196. Marchesi JR, Holmes E, Khan F, Kochhar S, Scanlan P, Shanahan F, et al. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. *J Proteome Res.* [Internet]. 4.1.2007. [citirano: 21.7.2023.]; 2007 Feb;6(2):546-51. Dostupno na: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/pr060470d>
197. Ponnusamy K, Choi JN, Kim J, Lee SY, Lee CH. Microbial community and metabolomic comparison of irritable bowel syndrome faeces. *J Med Microbiol.* [Internet]. 1.6.2011. [citirano: 21.7.2023.]; 2011 Jun;60(6):817-827. Dostupno na: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.028126-0>
198. Oliver L, Ramió-Pujol S, Amoedo J, Malagón M, Serrano M, Bahí A, et al. A Novel Grape-Derived Prebiotic Selectively Enhances Abundance and Metabolic Activity of Butyrate-Producing Bacteria in Faecal Samples. *Front Microbiol.* [Internet]. 23.3.2021. [citirano: 29.6.2023.]; 2022;28(30):4053-4060. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.639948/full>
199. Konturek PC, Konturek K, Brzozowski T, Wojcik D, Magierowski M, Targosz A, et al. Participation of the intestinal microbiota in the mechanism of beneficial effect of treatment with synbiotic Syngut on experimental colitis under stress conditions. *J Physiol Pharmacol.* [Internet]. 26.9.2020. [citirano: 29.6.2023.]; 2020;71(3):329-342. Dostupno na: [https://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/06\\_20/pdf/10.26402/jpp.2020.3.03.pdf](https://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/06_20/pdf/10.26402/jpp.2020.3.03.pdf)
200. Galipeau HJ, Verdu EF. Gut microbes and adverse food reactions: Focus on gluten related disorders. *Gut Microbes.* [Internet]. 3.1.2015. [citirano: 30.6.2023.]; 2014;5(5):594-605. Dostupno na: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/19490976.2014.969635>
201. Chibbar R, Dieleman LA. The Gut Microbiota in Celiac Disease and probiotics. *Nutrients.* [Internet]. 5.10.2019. [citirano: 30.6.2023.]; 2019; 11(10):2375. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/10/2375#B14-nutrients-11-02375>
202. Wu X, Qian L, Liu K, Wu J, Shan Z. Gastrointestinal microbiome and gluten in celiac disease. *Ann Med.* [Internet]. 14.10.2021. [citirano: 30.6.2023.]; 2021;53(1):1797-1805. Dostupno na: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07853890.2021.1990392>
203. Calabrò A, Gralka E, Luchinat C, Saccenti E, Tenori L. A metabolomic perspective on coeliac disease. *Autoimmune Dis.* [Internet]. 9.2.2014. [citirano: 24.7.2023.]; 2014;2014:756138. Dostupno na: <https://www.hindawi.com/journals/ad/2014/756138/>
204. Cinova J, De Palma G, Stepankova R, Kofronova O, Kverka M, Sanz Y, Tuckova L. Role of intestinal bacteria in gliadin-induced changes in intestinal mucosa: study in germ-free rats. *PLoS One.* [Internet]. 13.1.2011. [citirano: 24.7.2023.]; 2011 Jan 13;6(1):e16169. Dostupno na: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0016169>
205. Laparra JM, Sanz Y. Bifidobacteria inhibit the inflammatory response induced by gliadins in intestinal epithelial cells via modifications of toxic peptide generation during digestion. *J Cell Biochem.* [Internet]. 1.3.2010. [citirano: 24.7.2023.]; 2010 Mar 1;109(4):801-7. Dostupno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.22459>
206. Kõiv V, Tenson T. Gluten-degrading bacteria: availability and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* [Internet]. 10.4.2021. [citirano: 30.6.2023.]; 2021;105(8):3045-3059. Dostupno na: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-021-11263-5>

207. Vitali B, Ndagijimana M et al. Impact of a synbiotic food on the gut microbial ecology and metabolic profiles. *BMC Microbiol.* [Internet]. 7.1.2010. [citirano: 24.7.2023.]; 2010 Jan 7;10:4. Dostupno na: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-10-4>
208. Cristofori F, Dargenio VN, Dargenio C, Miniello VL, Barone M, Francavilla R. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Probiotics in Gut Inflammation: A Door to the Body. *Front Immunol.* [Internet]. 26.2.2021. [citirano: 30.6.2023.]; 2021;12:578386. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.578386/full>
209. Ruze R, Liu T, Zou X, Song J, Chen Y, Xu R et al. Obesity and type 2 diabetes mellitus: connections in epidemiology, pathogenesis, and treatments. *Front Endocrinol (Lausanne).* [Internet]. 21.4.2023. [citirano: 1.7.2023.]; 2023;14:1161521. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2023.1161521/full>
210. Zierer J et al. The fecal metabolome as a functional readout of the gut microbiome. *Nat Genet.* [Internet]. 28.5.2018. [citirano: 18.7.2023.]; 2018 Jun;50(6):790-795. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/s41588-018-0135-7>
211. Newgard CB. Metabolomics and Metabolic Diseases: Where Do We Stand? *Cell Metab.* [Internet]. 10.1.2017. [citirano: 18.7.2023.]; 2017 Jan 10;25(1):43-56. Dostupno na: [https://www.cell.com/cell-metabolism/fulltext/S1550-4131\(16\)30503-4?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1550413116305034%3Fsho%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-metabolism/fulltext/S1550-4131(16)30503-4?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1550413116305034%3Fsho%3Dtrue)
212. Ghazalpour A, Cespedes I, Bennett BJ, Allayee H. Expanding role of gut microbiota in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* [Internet]. 1.4.2016. [citirano: 1.7.2023.]; 2016;27(2):141-147. Dostupno na: [https://journals.lww.com/co-lipidology/Abstract/2016/04000/Expanding\\_role\\_of\\_gut\\_microbiota\\_in\\_lipid.7.aspx](https://journals.lww.com/co-lipidology/Abstract/2016/04000/Expanding_role_of_gut_microbiota_in_lipid.7.aspx)
213. Pedersen, H. K. et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature.* [Internet]. 13.6.2016. [citirano: 19.7.2023.]; 2016;535, 376–381. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/nature18646>
214. Raman M, Ahmed I, Gillevet PM, Probert CS, Ratcliffe NM, Smith S et al. Fecal microbiome and volatile organic compound metabolome in obese humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* [Internet]. 1.3.2013. [citirano: 24.7.2023.]; 2013 Jul;11(7):868-75.e1-3. Dostupno na: [https://www.cghjournal.org/article/S1542-3565\(13\)00272-3/fulltext](https://www.cghjournal.org/article/S1542-3565(13)00272-3/fulltext)
215. Calabrese FM, Celano G, Bonfiglio C, Campanella A, Franco I, Annunziato A, et al. Synergistic Effect of Diet and Physical Activity on a NAFLD Cohort: Metabolomics Profile and Clinical Variable Evaluation. *Nutrients.* [Internet]. 25.5.2023. [citirano: 24.7.2023.]; 2023 May 25;15(11):2457. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2072-6643/15/11/2457>
216. Del Chierico F, Nobili V, Vernocchi P, Russo A, De Stefanis C, Gnani D, et al. Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach. *Hepatology.* [Internet]. 2.6.2016. [citirano: 24.7.2023.]; 2017 Feb;65(2):451-464. Dostupno na: [https://journals.lww.com/hep/Abstract/2017/02000/Gut\\_microbiota\\_profiling\\_of\\_pediatric\\_nonalcoholic.9.aspx](https://journals.lww.com/hep/Abstract/2017/02000/Gut_microbiota_profiling_of_pediatric_nonalcoholic.9.aspx)
217. Boursier J, Rawls JF, Diehl AM. Obese humans with nonalcoholic fatty liver disease display alterations in fecal microbiota and volatile organic compounds. *Clin Gastroenterol Hepatol.* [Internet]. 29.4.2013. [citirano: 24.7.2023.]; 2013 Jul;11(7):876-8. Dostupno na: [https://www.cghjournal.org/article/S1542-3565\(13\)00575-2/fulltext](https://www.cghjournal.org/article/S1542-3565(13)00575-2/fulltext)
218. Tang WH, Kitai T, Hazen SL. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circ Res.* [Internet]. 31.3.2017. [citirano: 4.7.2023.]; 2017;120(7):1183-1196. Dostupno na: [https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.117.309715?url\\_ver=Z39.88-2003&rft\\_id=ori:rid:crossref.org&rft\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.117.309715?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori:rid:crossref.org&rft_dat=cr_pub%20%20pubmed)
219. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature.* [Internet]. 7.4.2011. [citirano: 25.7.2023.]; 2011 Apr 7;472(7341):57-63. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/nature09922>
220. Koeth RA, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med.* [Internet]. 7.4.2013. [citirano: 25.7.2023.]; 2013 May;19(5):576-85. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/nm.3145>
221. Verhaar BJH, Prodan A, Nieuwdorp M, Muller M. Gut Microbiota in Hypertension and Atherosclerosis: A Review. *Nutrients.* [Internet]. 29.9.2020. [citirano: 4.7.2023.]; 2020;12(10):2982. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/10/2982>
222. Duttaroy AK. Role of Gut Microbiota and Their Metabolites on Atherosclerosis, Hypertension and Human Blood Platelet Function: A Review. *Nutrients.* [Internet]. 3.1.2021. [citirano: 4.7.2023.]; 2021;13(1):144. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2072-6643/13/1/144>
223. Witkowski M, Weeks TL, Hazen SL. Gut Microbiota and Cardiovascular Disease. *Circ Res.* [Internet]. 31.7.2020. [citirano: 4.7.2023.]; 2020;127(4):553-570. Dostupno na:

[https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.120.316242?url\\_ver=Z39.88-2003&rft\\_id=ori:rid:crossref.org&rft\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed#d1e1058](https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.120.316242?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori:rid:crossref.org&rft_dat=cr_pub%20%20pubmed#d1e1058)

224. Gatarek P, Kaluzna-Czaplinska J. Trimethylamine N-oxide (TMAO) in human health. *EXCLI J.* [Internet]. 11.2.2021. [citirano: 4.7.2023.]; 2021;20:301-319. Dostupno na: <https://www.excli.de/Internet.php/excli/article/view/3239>
225. Borsom EM et al. Predicting Neurodegenerative Disease Using Prepathology Gut Microbiota Composition: a Longitudinal Study in Mice Modeling Alzheimer's Disease Pathologies. *Microbiol Spectr.* [Internet]. 6.3.2023. [citirano: 4.7.2023.]; 2023;11(2):e0345822. Dostupno na: [https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/spectrum.03458-22?rft\\_dat=cr\\_pub++0pubmed&url\\_ver=Z39.88-2003&rft\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org](https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/spectrum.03458-22?rft_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori%3Arid%3Acrossref.org)
226. Botas A, Campbell HM, Han X, Maletic-Savatic M. Metabolomics of neurodegenerative diseases. *Int Rev Neurobiol.* [Internet]. 6.5.2015. [citirano: 19.7.2023.]; 2015;122:53-80. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0074774215000227?via%3Dihub>
227. Pluta R, Ułamek-Kozioł M, Januszewski S, Czuczwar SJ. Gut microbiota and pro/prebiotics in Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY).* [Internet]. 19.3.2020. [citirano: 4.7.2023.]; 2020;12(6):5539-5550. Dostupno na: <https://www.aging-us.com/article/102930/text>
228. Yemula N, Dietrich C, Dostal V, Hornberger M. Parkinson's Disease and the Gut: Symptoms, Nutrition, and Microbiota. *J Parkinsons Dis.* [Internet]. 12.10.2021. [citirano: 4.7.2023.]; 2021;11(4):1491-1505. Dostupno na: <https://content.iospress.com/articles/journal-of-parkinsons-disease/jpd212707>
229. González-Sanmiguel J et al. Complex Interaction between Resident Microbiota and Misfolded Proteins: Role in Neuroinflammation and Neurodegeneration. *Cells.* [Internet]. 13.11.2020. [citirano: 4.7.2023.]; 2020;9(11):2476. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/11/2476>
230. Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat Rev Microbiol.* [Internet]. 8.4.2005. [citirano: 17.8.2023.]; 2005;3(5):431-8. Dostupno na: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1152>
231. Branton WG, et al. Brain microbiota disruption within inflammatory demyelinating lesions in multiple sclerosis. *Sci Rep.* [Internet]. 28.11.2016. [citirano: 17.8.2023.]; 2016;6:37344. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/srep37344>
232. Brydges CR, et al. Mood Disorders Precision Medicine Consortium. Indoxyl sulfate, a gut microbiome-derived uremic toxin, is associated with psychic anxiety and its functional magnetic resonance imaging-based neurologic signature. *Sci Rep.* [Internet]. 25.10.2021. [citirano: 17.8.2023.]; 2021;11(1):21011. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-99845-1>
233. Byndloss MX, et al. Microbiota-activated PPAR- $\gamma$  signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science.* [Internet]. 11.8.2017. [citirano: 17.8.2023.]; 2017;357(6351):570-575. Dostupno na: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aam9949>
234. Muller PA, et al. Microbiota modulate sympathetic neurons via a gut-brain circuit. *Nature.* [Internet]. 8.7.2020. [citirano: 17.8.2023.]; 2020;583(7816):441-446. Dostupno na: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2474-7>
235. Lampe JW. Is equol the key to the efficacy of soy foods? *Am J Clin Nutr.* [Internet]. 8.4.2009. [citirano: 17.8.2023.]; 2009;89(5):1664S-1667S. Dostupno na: <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.26736t>
236. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* [Internet]. 13.6.2012. [citirano: 17.8.2023.]; 2012;486(7402):207-14. Dostupno na: <https://doi.org/10.1038/nature11234>
237. Zhernakova A et al. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science.* [Internet]. 29.4.2016. [citirano: 17.8.2023.]; 2016;352(6285):565-9. Dostupno na: <https://doi.org/10.1126/science.aad3369>
238. Martin FP, et al. Panorganismal gut microbiome-host metabolic crosstalk. *J Proteome Res.* [Internet]. 13.3.2009. [citirano: 18.8.2023.]; 2009;8(4):2090-2105. Dostupno na: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/pr801068x>
239. Nicholson JK et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science.* [Internet]. 8.6.2012. [citirano: 18.8.2023.]; 2012;336(6086):1262-7. Dostupno na: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1223813>
240. Martin AM, Sun EW, Rogers GB, Keating DJ. The Influence of the Gut Microbiome on Host Metabolism Through the Regulation of Gut Hormone Release. *Front Physiol.* [Internet]. 16.4.2019. [citirano: 18.8.2023.]; 2019;10:428. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2019.00428/full>
241. Agus A, Clément K, Sokol H. Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders. *Gut.* [Internet]. 3.12.2020. [citirano: 19.8.2023.]; 2021;70(6):1174-1182. Dostupno na: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323071>
242. Lord RS, Bralley JA. Clinical applications of urinary organic acids. Part 2. Dysbiosis markers. *Altern Med Rev.* [Internet]. 1.12.2008. [citirano: 19.8.2023.]; 2008;13(4):292-306. Dostupno na: <https://altmedrev.com/wp-content/uploads/2019/02/v13-4-292.pdf>

243. Clinton SK, Bostwick DG, Olson LM, Mangian HJ, Visek WJ. Effects of ammonium acetate and sodium cholate on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced colon carcinogenesis of rats. *Cancer Res.* [Internet]. 1.6.1988. [citirano: 19.8.2023.]; 1988;48(11):3035-9. Dostupno na: [https://www.academia.edu/17536805/Effects\\_of\\_ammonium\\_acetate\\_and\\_sodium\\_cholate\\_on\\_N\\_methyl\\_N\\_nitro\\_N\\_nitrosoguanidine\\_induced\\_colon\\_carcinogenesis\\_of\\_rats](https://www.academia.edu/17536805/Effects_of_ammonium_acetate_and_sodium_cholate_on_N_methyl_N_nitro_N_nitrosoguanidine_induced_colon_carcinogenesis_of_rats)
244. Roediger WE, Duncan A, Kapaniris O, Millard S. Reducing sulfur compounds of the colon impair colonocyte nutrition: implications for ulcerative colitis. *Gastroenterology.* [Internet]. 1.3.1993. [citirano: 19.8.2023.]; 1993;104(3):802-9. Dostupno na: [https://www.gastrojournal.org/article/0016-5085\(93\)91016-B/pdf?referrer=https%3A%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F](https://www.gastrojournal.org/article/0016-5085(93)91016-B/pdf?referrer=https%3A%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F)
245. Macfarlane GT, Macfarlane S. Human colonic microbiota: ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scand J Gastroenterol Suppl.* [Internet]. 1.4.2016. [citirano: 19.8.2023.]; 1997;222:3-9. Dostupno na: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00365521.1997.11720708>
246. Bone E, Tamm A, Hill M. The production of urinary phenols by gut bacteria and their possible role in the causation of large bowel cancer. *Am J Clin Nutr.* [Internet]. 1.12.1976. [citirano: 19.8.2023.]; 1976;29(12):1448-54. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0002916523341753?via%3Dihub>
247. Sivsamy G, Sims HV. Presumptive identification of *Clostridium difficile* by detection of p-cresol in prepared peptone yeast glucose broth supplemented with p-hydroxyphenylacetic acid. *J Clin Microbiol.* [Internet]. 1.8.1990. [citirano: 20.8.2023.]; 1990;28(8):1851-3. Dostupno na: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.28.8.1851-1853.1990>
248. Clayton TA. Metabolic differences underlying two distinct rat urinary phenotypes, a suggested role for gut microbial metabolism of phenylalanine and a possible connection to autism. *FEBS Lett.* [Internet]. 5.4.2012. [citirano: 20.8.2023.]; 2012;586(7):956-61. Dostupno na: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.febslet.2012.01.049>
249. Moss CW, Lambert MA, Goldsmith DJ. Production of hydrocinnamic acid by clostridia. *Appl Microbiol.* [Internet]. 1.2.1970. [citirano: 20.8.2023.]; 1970;19(2):375-8. Dostupno na: <https://doi.org/10.1128%2Fam.19.2.375-378.1970>
250. Lambert MA, Moss CW. Production of p-hydroxyhydrocinnamic acid from tyrosine by *Peptostreptococcus anaerobius*. *J Clin Microbiol.* [Internet]. 1.8.1980. [citirano: 20.8.2023.]; 1980;12(2):291-3. Dostupno na: <https://doi.org/10.1128/jcm.12.2.291-293.1980>
251. Agus A, Planchais J, Sokol H. Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host Microbe.* [Internet]. 13.6.2018. [citirano: 20.8.2023.]; 2018;23(6):716-724. Dostupno na: [https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128\(18\)30257-9?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1931312818302579%3Fshoall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128(18)30257-9?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1931312818302579%3Fshoall%3Dtrue)
252. Vujkovic-Cvijin I, Dunham RM, Iwai S, Maher MC, Albright RG, Broadhurst MJ, et al. Dysbiosis of the gut microbiota is associated with HIV disease progression and tryptophan catabolism. *Sci Transl Med.* [Internet]. 10.7.2013. [citirano: 20.8.2023.]; 2013;5(193):193ra91. Dostupno na: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3006438>
253. Devlin AS, Marcobal A, Dodd D, Nayfach S, Plummer N, Meyer T, et al. Modulation of a Circulating Uremic Solute via Rational Genetic Manipulation of the Gut Microbiota. *Cell Host Microbe.* [Internet]. 14.12.2016. [citirano: 21.8.2023.]; 2016;20(6):709-715. Dostupno na: [https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128\(16\)30447-4?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1931312816304474%3Fshoall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128(16)30447-4?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1931312816304474%3Fshoall%3Dtrue)
254. Walther DJ, et al. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science.* [Internet]. 3.1.2003. [citirano: 21.8.2023.]; 2003;299(5603):76. Dostupno na: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1078197>
255. Koh A, Molinaro A, Ståhlman M, et al. Microbially Produced Imidazole Propionate Impairs Insulin Signaling through mTORC1. *Cell.* [Internet]. 1.11.2018. [citirano: 21.8.2023.]; 2018;175(4):947-961.e17. Dostupno na: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(18\)31306-0?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867418313060%3Fshoall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(18)31306-0?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867418313060%3Fshoall%3Dtrue)
256. Maini Rekdal V, Bess EN, Bisanz JE, Turnbaugh PJ, Balskus EP. Discovery and inhibition of an interspecies gut bacterial pathway for Levodopa metabolism. *Science.* [Internet]. 14.6.2019. [citirano: 21.8.2023.]; 2019;364(6445):eaau6323. Dostupno na: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aau6323>
257. De Boever P, Wouters R, Verschaeve L, Berckmans P, Schoeters G, Verstraete W. Protective effect of the bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* against bile salt cytotoxicity. *Appl Microbiol Biotechnol.* [Internet]. 1.6.2000. [citirano: 22.8.2023.]; 2000;53(6):709-14. Dostupno na: <https://link.springer.com/article/10.1007/s002530000330>

258. Hu Y, Chen Z, Xu C, Kan S, Chen D. Disturbances of the Gut Microbiota and Microbiota-Derived Metabolites in Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients*. [Internet]. 2.12.2022. [citirano: 22.8.2023.]; 2022;14(23):5140. Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/nu14235140>
259. Iebba V, et al. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. *New Microbiol*. [Internet]. 11.11.2015. [citirano: 22.8.2023.]; 2016;39(1):1-12. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/296481400\\_Eubiosis\\_and\\_Dysbiosis\\_The\\_Two\\_Sides\\_of\\_the\\_Microbiota](https://www.researchgate.net/publication/296481400_Eubiosis_and_Dysbiosis_The_Two_Sides_of_the_Microbiota)
260. Schupack DA, Mars RAT, Voelker DH. et al. The promise of the gut microbiome as part of individualized treatment strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. [Internet]. 27.8.2021. [citirano: 23.8.2023.]; 2022;19:7–25. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/s41575-021-00499-1#citeas>
261. Mullish BH, et al. The use of faecal microbiota transplant as treatment for recurrent or refractory *Clostridium difficile* infection and other potential indications: joint British Society of Gastroenterology (BSG) and Healthcare Infection Society (HIS) guidelines. *Gut*. [Internet]. 28.8.2018. [citirano: 24.8.2023.]; 2018;67(11):1920-1941. Dostupno na: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316818>
262. Scott E, De Paepe K, Van de Wiele T. Postbiotics and Their Health Modulatory Biomolecules. *Biomolecules*. [Internet]. 4.11.2022. [citirano: 24.8.2023.]; 2022;12(11):1640. Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/biom12111640>

## 7. Popis skraćenica i akronima

- AhR- (engl. *Aryl Hydrocarbon Receptor*) arilnog ugljikovodičnog receptora
- BCAA- (engl. *Branched Chain Amino Acids*) aminokiseline razgranatog lanca
- BCFA- (engl. *Branched Chain Fatty Acids*) masne kiseline razgranatoga lanca
- CA- (engl. *Cholic Acid*) kolna kiselina
- CCK- (engl. *Cholecystokinin*) kolecistokinin
- CD- (engl. *Crohn's Disease*) Chronova bolest
- CD- (engl. *Coeliac Disease*) celijakija
- CDCA- (engl. *Chenodeoxycholic Acid*) kenodeoksikolna kiselina
- CE- kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary Electrophoresis*;
- CE-MS- (engl. *Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry*) kapilarna elektroforeza spregnuta sa spektrometrijom masa
- CF- (engl. *Cystic Fibrosis*) cistična fibroza
- CKD- (engl. *Chronic Kidney Disease*) kronična bubrežna bolest
- CLK- ciklus limunske kiseline
- DCA- (engl. *Deoxycholic Acid*) deoksikolnu kiselina
- DMA- dimetilamin
- FDA- (engl. *Food and Drug Administration*) Američke Agencije za hranu i lijekove
- FMO- (engl. *Flavin-Containing Monooxygenase*) monooksigenaza koja sadrži flavin
- FMT- (engl. *Fecal Microbiota Transplantation*) transplantacija fekalne mikrobiote
- FT-IR- (engl. *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*) infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom
- FXR- (engl. *Farnesoid X Receptor*) nuklearni farnezoidni X-receptor
- GABA-  $\gamma$ - aminobutirat
- GC- (engl. *Gas Chromatography*) plinska kromatografija
- GC-MS- (engl. *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*) plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa
- GIP- (engl. *Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide*) želučani inhibitorni peptid
- GIT- gastrointestinalni trakt
- GLP-1- (engl. *Glucagon-Like Peptide-1*) glukagonu sličan peptid-1
- GPBAR1/TGR5- (engl. *G Protein-Coupled Bile Acid Receptor 1*) receptor žučnih kiselina 1 spregnut G-proteinom
- GPCR- (engl. *G-Protein-Coupled Receptors*) receptor spregnut G-proteinom
- HMO- (engl. *Human Milk Oligosaccharides*) oligosaharidi iz majčina mlijeka
- 5-HT- serotonin/5-hidroksitriptamin
- IBD- (engl. *Inflammatory Bowel Disease*) upalna bolest crijeva



IBS- (engl. *Irritable Bowel Syndrome*) sindromom iritabilnog crijeva

IL- interleukin

IPA- (engl. *Indole Propionic Acid*) indolpropionska kiselina

KVB- kardiovaskularne bolesti

LC- (engl. *Liquid Chromatography*) tekućinska kromatografija

LCA- (engl. *Lithocholic Acid*) litokolna kiselina

LC-MS- (engl. *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*) Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa

LPS- (engl. *Lipopolysaccharides*) lipopolisaharidi

MAFLD- (engl. *Metabolic (Dysfunction) Associated Fatty Liver Disease*) bolest masne jetre povezana s metaboličkom disfunkcijom

MCFA- (engl. *Medium-Chain Fatty Acids*) masne kiseline srednjega lanca

MS- (engl. *Mass Spectrometry*) spektrometrija masa

mTORC1- (engl. *Mammalian Target of Rapamycin Complex*) rapamicinski kompleks 1

NMR- (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*) nuklearna magnetska rezonancija

PGN- (engl. *Peptidoglycan Fragments*) peptidoglikanski fragmenti

PYY- peptid YY

RF- radiofrekvencijski

SCFA- (engl. *Short Chain Fatty Acids*) masne kiseline kratkog lanca

TMA- trimetilamin

TMAO- trimetilamin-*N*-oksid

TNF- $\alpha$ - (engl. *Tumor Necrosis Factor*) faktora nekroze tumora-alfa

TPH1- (engl. *Tryptophan Hydroxylase 1*) triptofan-hidroksilaza 1

UC- (engl. *Ulcerative Colitis*) ulcerozni kolitis

## 8. Životopis

Mattea Simonelli rođena je 2. studenog 2001. godine u Puli. Od 2008. do 2012. godine pohađala je Osnovnu školu „Giuseppina Martinuzzi“ u Galižani, od 2012. do 2016. godine pohađala je Osnovnu školu „Veli Vrh Pula“ u Puli. Od 2016. do 2020. pohađala je opću gimnaziju „Gimnazija Pula“, također u Puli. Godine 2020. stekla je uvjete za polaganje državne mature te je upisala Sveučilišni prijediplomski studij Sanitarno inženjerstvo pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Dana 19.9.2023. godine obranila je završni rad pod naslovom *Metabolomski pristup u funkciji otkrivanja metabolita crijevne mikrobiote koji utječu na zdravlje ljudi* pod mentorstvom doc.dr.sc. Jelene Marinić dipl.ing.preh.teh. Trenutno živi u Galižani, a privremeno boravi i studira u Rijeci. Posjeduje vozačku dozvolu B kategorije te govori engleski jezik (C1) i talijanski jezik (C1).

## 9. Prilog

**Slika 1.** Distribucija bakterija po različitim regijama ljudskoga tijela (37). - stranica III

**Slika 2.** Čimbenici koji utječu na sastav i brojnost mikroorganizama u crijevima (39). - stranica IV

**Slika 3.** Prikaz crijevnog mikrobioma ljudi koji se sastoji od dvije komponente: (1) sržnog mikrobioma (zajedničkog svim pojedincima) i (2) varijabilnog mikrobioma (jedinstven za svakog pojedinca te je pod utjecajem različitih čimbenika) (33). - stranica IV

**Slika 4.** Pregled učinaka metabolita i ko-metabolita crijevne mikrobiote i čovjeka na fiziološke procese u tijelu domaćina, kao što su to regulacija metabolizma lipida, proteina i glukoze, regulacija termogeneze, regulacija sitosti lučenjem glukagonu sličnog peptida-1 (GLP-1) i peptida YY (PYY), utjecaj na pokretljivost organa (mišići i srce), sintezu i izlučivanje inzulina te osjetljivost na inzulin (72). – stranica V

**Slika 5.** Kratkolančane masne kiseline (SCFA) nastale bakterijskom fermentacijom prehrambenih vlakana sudjeluju u održavanju homeostaze crijevne imunosti, obnovi epitela crijeva i uklanjanju patogenih mikroorganizama (40). – stranica VI

**Slika 6.** Metaboliti aminokiselina nastali kao produkti metabolizma crijevnih bakterija. Glutamin (Glu), lizin (Lys), arginin (Arg), histidin (His), alanin (Ala), glicin (Gly), prolin (Pro), hidroksiprolin (Hyp), cistein (Cys), metionin (Met), valin (Val), leucin (Leu), izoleucin (Ile), serin (Ser), treonin (Thr), fenilalanin (Phe), triptofan (Trp), acetat (Ac), propionat (Pr), butirrat (Bu), ornitin (Orn), citrulin (Cit), metilamin (MA), izobutirat (isoBu), 2-metilbutirat (2-meBu), izovalerat (isoVal), asimilacijski metabolizam (assim), fenolni spojevi (Ph), fenilacetat (PA), indolacetat (IAA) (38). – stranica VII

**Slika 7.** Uloga crijevne mikrobiote u nastanku trimetilamina (TMA) iz prehrambenog fosfatidilkolina i oksidacija TMA u jetri do trimetilamin-N-oksida (TMAO) koji ima negativan utjecaj na zdravlje kardiovaskularnog sustava (40). – stranica VIII

**Slika 8.** Uloga crijevne mikrobiote u sintezi sekundarnih žučnih kiselina (40). – stranica VIII

**Slika 9.** Pregled „omika“ i informacija koje pružaju (113). – stranica IX

**Slika 10.** Prikaz utjecaja načina života, prehrane i okoliša čovjeka na crijevnu mikrobiotu i metabolite koje proizvodi, te primjena metabolomike u profiliranju metabolita i u održavanju zdravlja (75). – stranica X

**Slika 11.** Utjecaj prehrane na sastav mikroorganizama crijevne mikrobiote i njihov metabolizam. Prehrana bogata biljnim vlaknima, a siromašna proteinima i mastima životinjskog porijekla pomaže u održavanju mikrobiote povezane sa zdravljem. Neprobavljive, ali fermentabilne polisaharide mikrobiota debelog crijeva fermentita i time proizvodi niz metabolita koji povoljno utječu na zdravlje crijeva. Kratkolančane masnih kiselina (SCFA) osiguravaju dodatni izvor energije za kolonocite i sižavaju pH lumena crijeva, mogu se vezati i na receptor spregnut G-proteinom (GPCR-41 GPCR-43), koji se eksprimiraju na enteroendokrinim L-stanicama, i naknadno induciraju izlučivanje glukagonu sličnog peptida 1 (GLP-1) i peptida YY (PYY) koji pridonose povećanoj potrošnji energije, smanjenom unosu hrane i poboljšanju metabolizam glukoze i lučenju inzulina. Prehrana bogata proteinima i mastima životinjskog porijekla dovodi do disbioze. Smanjena produkcija SCFA dovodi do smanjene ekspresije hormona koje izlučuju L-stanice. Proteini uneseni hranom prevode se do aminokiselina i kratkih peptida, koji podliježu bakterijskoj fermentaciji čime nastaju masne kiseline razgranatog lanca (BCFA), organske kiseline i niz štetnih produkata kao što su to neki plinovi i derivati indola. Ovakvo metaboličko okruženje dovodi do oslabljene funkcije crijevne barijere, sistemske upale niskog supnja i metaboličkih poremećaja (19). – stranice XI

**Slika 12.** Kronične bolesti izravno ili neizravno povezane s funkcionalnošću crijevne mikrobiote (11). – stranica XII

**Tablica 1.** Prikaz čestih produkata crijevne mikrobiote, bakterijskih taksona koje sudjeluju u njihovoj produkciji, porijekla i učinaka na zdravlje čovjeka pojedinih skupina metabolita (24, 71, 72, 76). – stranice XIII

**Tablica 2.** Prikaz sinteze primarnih i sekundarnih žučnih kiselina ko-metabolizmom između domaćina i članova crijevne mikrobiote (38). – stranica XVI

**Tablica 3.** Prikaz metabolita i ko-metabolita crijevne mikrobiote i domaćina koji služe kao potencijalni biljezi određenih bolesti, te metode u metabolici kojima se mogu identificirati i kvantificirati. (71, 72, 76, 177-184).- stranice XVII