

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Marina Panek

**Sastav crijevne mikrobiote i čimbenici
upale u bolesnika s upalnim bolestima
crijeva**

DISERTACIJA



Zagreb, 2018.

Disertacija je izrađena u Centru za translacijska i klinička istraživanja, Odjel za međustaničnu komunikaciju, Sveučilište u Zagrebu Medicinski fakultet u suradnji sa Zavodom za gastroenterologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Zavodom za gastroenterologiju Kliničke bolnice Dubrava.

**Voditelj rada: doc.dr.sc.Donatella Verbanac
i su – voditelj prof. dr.sc. Željko Krznarić**

Rad je napravljen u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Utvrđivanje sastava crijevne mikrobiote, upalnih markera, prehrambenog i endokrinog statusa u pacijenata s upalnom bolesti crijeva“ broj 5467 i projekta Hrvatske zaklade za znanost u sklopu natječaja „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“.

Od sveg srca zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Donatelli Verbanac na ukazanom povjerenju i pruženoj mogućnosti za izradu ovog doktorskog rada. Hvala vam Dona, jer ste jednostavno uvijek vjerovali u mene, spremni pomoći kad god je trebalo. Hvala mojim kolegama Mario, Mihaela, Hana jer ste uvijek bili spremni pomoći i udijeliti koristan savjet. Hvala vam svima na divnoj, toploj i prijateljskoj atmosferi i što ste sa mnom tragali za svjetlom na kraju tunela.

Hvala mojim roditeljima, sestri i bratu što ste uvijek imali toliko razumijevanja, podrške i strpljenja za mene, volim vas!

I hvala tebi, jer na kraju svakog puta i nebeskih letova, valja imati mjesto gdje možeš da se spustiš, srce uz koje možeš da se stisneš...

Sadržaj

1. UVOD I SVRHA RADA.....	1
1.1. Crijevna mikrobiota.....	1
1.2. Upalne bolesti crijeva	5
1.3. Crohnova bolest i ulcerozni kolitis	7
1.4. Modulacija mikrobiote u upalnim bolestima crijeva.....	9
1.4.1. Hrana	9
1.4.2. Probiotici i prebiotici	12
1.4.3. Antibiotici.....	13
1.4.4. Transplantacija fekalne mikrobiote	14
1.5. Disbioza kod upalnih bolesti crijeva.....	15
1.6. Imunološki sustav u upalnim bolestima crijeva	18
1.7. Biomarkeri u upalnim bolestima crijeva	19
1.7.1. Upalni biomarkeri	20
1.8. Sekvenciranje nove generacije – analiza sastava crijevne mikrobiote	21
1.9. Imunodetekcijska metoda - analiza biomarkera iz seruma krvi	24
2. HIPOTEZA.....	27
3. CILJEVI RADA	27
4. MATERIJALI I METODE.....	28
4.1. Dizajn studije i regrutacija pacijenata	28
4.2. Prikupljanje uzoraka fecesa i izolacija DNA	29
4.3. Prikupljanje uzoraka biopsije sluznice crijeva i izolacija DNA.....	30
4.4. Određivanje koncentracije DNA i provjera uspješnosti izolacije metodom PCR	31
4.5. Sekvenciranje i procesiranje DNA.....	31
4.5.1. Priprema biblioteka 16S rRNA	31
4.5.2. Priprema predložaka za sekvenciranje	32
4.5.3. Procesiranje dobivenih sljedova.....	32
4.6. Analiza podataka sekvenciranja	33
4.6.1. Normalizacija i analiza operacijskih taksonomskih jedinica (OTU).....	33
4.6.2. Analiza glavnih koordinati	33
4.6.3. Analiza alfa i beta raznolikosti	33

4.7. Prikupljanje uzoraka krvi	34
4.8. Procesiranje uzoraka seruma (imunodetekcijska metoda)	34
4.9. Analiza proteina.....	35
4.9.1. Normalizacija i statistika	35
5. REZULTATI	36
5.1. Analiza sastava mikrobiote fecesa	36
5.1.1. Taksonomska analiza	36
5.1.2. Statistička analiza najzastupljenijih taksona u uzorcima fecesa	42
5.1.3. Analiza alfa i beta raznolikost.....	44
5.2. Analiza sastava mikrobiote iz sluznice crijeva	46
5.2.1. Taksonomska raznolikost.....	46
5.2.2. Statistička analiza najzastupljenijih taksona u sluznici kolona	48
5.3. Upalni biomarkeri iz uzoraka krvnog seruma.....	50
6. RASPRAVA	55
7. ZAKLJUČAK.....	64
8. SAŽETAK	66
9. ABSTRACT	68
10. LITERATURA	68
11. BIOGRAFIJA	83

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1. Crijevna mikrobiota

Mikroorganizmi koji nastanjuju ljudsko tijelo nazivaju se skupno **mikrobiota**, a ovisno o organu/tkivu/sluznici pojedinih područja tijela koje nastanjuju razlikujemo mikrobiotu gastrointestinalnog, urološkog, respiratornog i reproduktivnog trakta te mikrobiotu kože i usne šupljine.

Crijevna mikrobiota predstavlja mikroorganizme koji koloniziraju gastrointestinalni trakt i žive u simbiozi sa svojim domaćinom i igra jednu od glavnih uloga unutar ljudskog probavnog sustava. Ti se organizmi nazivaju još i **komenzalnim "prijateljskim" bakterijama** jer sprječavaju prodor patogenih bakterija (npr. *Salmonela*) kroz crijevnu barijeru. Trebalo je proći dosta vremena kako bi znanstvena zajednica počela prihvaćati Hipokratovu tvrdnju kako sve bolesti počinju u crijevima, a zdrava crijeva i zdrava probava predstavljaju ključ cjelokupnog ljudskog zdravlja. Procjenjuje se da u probavnom sustavu u simbiozi s ljudskim stanicama živi u prosjeku 1,5 do 2 kg bakterija pri čemu svaka vrsta ima svoju ulogu, a neke bakterije dominiraju i kontroliraju druge. Najvažnija, kod zdravih osoba najbrojnija, grupa mikroorganizama naziva se **esencijalna ili korisna flora** i čine ju vrste iz klasa bakterija *Bifidobacteria*, *Lactobacteria*, *Propionobacteria*, fiziološke vrste bakterija *E. Coli*, *Peptostreptococci*, *Enterococci* i mnoge druge. Sastavni dio normalne crijevne flore je i tzv. oportunistička flora koju čine mikroorganizmi *Bacteroidi*, *Peptococci*, *Staphylococci*, *Clostridia*, *Yeasts* - gljive *Enterobacteria* i mnogi drugi (1,2). Kod zdravih osoba broj ovih bakterija je ograničen i pod kontrolom dominantnih pripadnika crijevne mikrobiote, ali u slučaju disbioze i gubitka homeostaze, odnosno ako se prekomjerno razmnože, ovi mikroorganizmi mogu izazvati bolesti. Unatoč velikoj sličnosti na genetičkoj razini, male razlike u ljudskoj DNA daju iznimno veliku ulogu u fenotipskoj raznolikosti ljudske populacije. Nasuprot tome, ukupni sadržaj DNA mikroba koji nastanjuju naše tijelo poprilično je promjenjiv s trećinom gena zajedničkih većini zdravih ljudi. Stoga istraživanje i definiranje mikrobnih karakteristika koje podržavaju zdravlje u ljudskoj populaciji predstavlja bitan korak u identifikaciji mikrobnih obilježja koja su uključena u bolesti (3). Koliko je mikrobiota važna u ljudskom organizmu govore i činjenice da bakterija u tijelu u prosjeku ima deset puta više nego ljudskih stanica (mikrobna zajednica čini 90%, a tek 10% na

odraslom organizmu zauzimaju eukariotske stanice). Nadalje, bakterijskih gena ima oko 3 milijuna, dok humani genom broji oko 23 000 funkcionalnih gena. Raznolikost crijevne mikrobiote je velika i smatra se da sadrži od 400-1500 vrsta ovisno o domaćinu. Većina tih bakterija nije štetna svom domaćinu, već ima bitnu ulogu u održavanju zdravlja. Usko su povezane sa stanicama epitela i obavljaju važnu metaboličku, strukturnu i zaštitnu ulogu te na taj način održavaju fiziološku i metaboličku homeostazu koja podrazumijeva održavanje nekog biološkog sustava i njegove unutarnje sredine u okviru fizioloških uvjeta. Primjerice, bakterije proizvode određene vitamine koje naše tijelo ne može sintetizirati jer ne proizvodimo potrebne enzime i proteine za sintezu istih. Zatim, bakterije prisutne u našim crijevima razgrađuju hranu, iskorištavaju, metaboliziraju i stvaraju iz hrane potrebne nam nutritivne tvari i biološki aktivne spojeve te sudjeluju u razvoju i sazrijevanju imunološkog sustava (4). Općenito može se reći da ljudska crijeva sadrže ogroman broj bakterija koje međusobno surađuju i pomažu u probavljanju hrane i na taj način osiguravaju veliki broj različitih nutrijenata/metabolita. Bakterije proizvode veliki broj spojeva niskih molekularnih masa (engl. "*low-molecular-weight*", LMW) kao što su folat, butirat, biotin i acetat (5). Transformacija prehrambenih spojeva pomoću crijevne mikrobiote rezultira značajnim utjecajem na epigenetičke mehanizme koji su zaslužni za ekspresiju gena. Sluznica crijeva je neposredno izložena metabolitima crijevne mikrobiote, ali metaboliti ulaze i u sistemsku cirkulaciju te mogu utjecati na ekspresiju gena i u drugim regijama i organima (6). Crijevna mikrobiota također igra veliku ulogu u apsorpciji i ekstrakciji minerala kao što su cink, jod, selen i kobalt. Ti minerali sudjeluju kao kofaktori u mnogim procesima. Nadalje, mnogi enzimi kao što su metiltransferaza, acetiltransferaza, deacetilaza, fototransferaza nastaju metabolizmom crijevnih bakterija (4). Unazad nekoliko desetljeća, poznato je da bakterije u našim crijevima proizvode vitamine K, B1, B2, B3, B6 i B12 i aminokiseline pa tako osiguravaju neprestani prtok vitamina i aminokiselina, čak i kad je količina i vrsta hrane ograničena (2). Ovi vitamini jako su važni za metabolizam bakterija, ali također imaju metaboličko i fiziološko značenje za domaćina (1). Osim za razgradnju hrane i pravilnu apsorpciju nutrijenata, esencijalno korisne bakterije igraju ulogu u uspostavi i izgradnji pojedinih elemenata imunološkog sustava – limfocita i imunoglobulina. Sluznica zdravog crijeva prepuna je limfocita, dok je kod osoba s neuravnoteženom crijevnom mikrobiotom taj broj daleko manji.

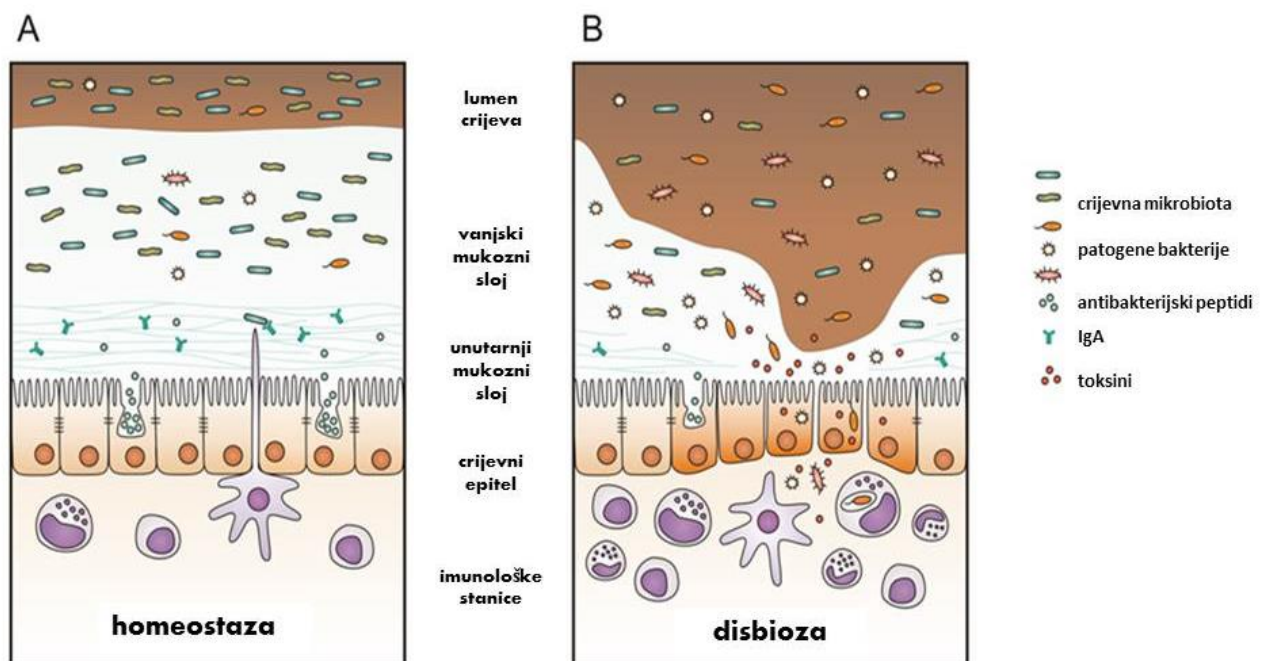
Limfociti proizvode imunoglobuline koji uništavaju ili deaktiviraju "napadače" – bakterije, viruse, gljivice i parazite. Zdrava mikrobiota neophodna je i za pravilan rad drugih stanica imunološkog sustava – neutrofila i makrofaga koji uništavaju viruse, štetne bakterije, njihov otpad i toksine koje proizvode (2,7).

Gastrointestinalni trakt (GIT) ima dvojaku ulogu – dok s jedne strane omogućava propusnost tekućine i hranjivih tvari, s druge strane predstavlja fizičku granicu i odvaja tkivo od potencijalno toksičnih i patogenih mikroorganizama. Tu ulogu održavanja crijevne homeostaze u probavnom traktu preuzeo je visoko elastični **sloj mukusa (sloj sluzi)** u obliku gela, kojeg luče sekretorne stanice unutar crijevnog epitela. Vanjski sloj mukusa ispunjen je tekućinom i sastoji se od komenzalnih "dobrih" bakterija i velikog broja stanica pod kontrolom mehanizama koji održavaju ravnotežu unutar crijeva (*Slika 1*) (1).

Uz funkcije zaštite, lubrikacije te hidracije crijevnog epitela, mukus igra bitnu ulogu i u održavanju crijevne homeostaze promovirajući interakcije s komenzalnim bakterijama, povisujući intenzitet imunološke reakcije te djelujući kao „mamac“ za patogene. Sposobnost mikroorganizama da se povežu s mukusom povećava njihove kolonizacijske mogućnosti te produljuje obitavanje korisnih bakterija (8). Tijekom života uspostavlja se složena interakcija koja uključuje različite vrste imunoloških stanica, crijevne epitelne stanice, intra-epitelne efektorske limfocite, dendritičke stanice, monocite/makrofage, kao i novo identificirane urođene limfoidne stanice. Takvo antigen bogato područje održava ravnotežu između mreže protuupalnih i proupalnih signalnih molekula. S druge strane, nedovoljna debljina mukusa s unutrašnje strane sluznice crijeva može dovesti do propusnosti sadržaja iz crijeva u sistemsku cirkulaciju i time aktivirati različite signalne putove, što dovodi do snažnih imunoloških odgovora (9–11). **Mukozna barijera** predstavlja mjesto funkcionalne interakcije između crijevne mikrobiote i epitelnih stanica crijeva. Permeabilnost te barijere omogućava koegzistenciju s bakterijskim simbiontima koji su prijeko potrebni našem organizmu, a s druge strane onemogućava penetraciju štetnih makromolekula i patogena u enterocite i u sistemsku cirkulaciju. Oštećena mukozna barijera može se povezati s povećanom propusnošću sluznice crijeva koja potiče imunološki odgovor i dovodi do upale sluznice, smanjenja brojnosti dobrih bakterija te rasta populacije patogenih bakterija (12). Posljednjih nekoliko godina raste interes za istraživanje GIT-

a što rezultira brojnim novim otkrićima o sastavu crijevne mikrobiote i njezine važnosti u zdravlju i bolesti.

Tijekom proteklog desetljeća uloženi su veliki naponi za određivanje složenosti mikrobnih zajednica te je uočeno da kod poremećaja kao što su upalna bolest crijeva, sindrom iritabilnog crijeva, pretilost i nekrotizirajući enterokolitis, sastav mikrobiote uvelike odstupa od onoga u zdravom crijevu (13).



Slika 1. Kronična upala - vodi do nastanka kroničnih metaboličkih bolesti.

Shematski prikaz sluznice crijeva u stanju (A) homeostaze i (B) disbioze - promjene normalne bakterijske ravnoteže koja dovodi do nastanka trajne upale u području narušene crijevne barijere. Debeli sloj mukusa prekriva cijeli epitel zdravog crijeva. Bakterije prolaze kroz vanjski sloj mukusa, a unutarnji je gust i otporan na prodor bakterija zbog antimikrobnih peptida koje luče epitelne stanice i imunoglobulina A kojeg proizvode B stanice limfocita. Crijevna mikrobiota u kombinaciji s imunološkim sustavom sprječava prodor patogenih bakterija i na taj način se održava stanje homeostaze. Prilagođeno prema Matijašić 2016 (1).

1.2. Upalne bolesti crijeva

Kada se brojnost bakterijskih vrsta naruši, dolazi do smanjenja raznolikosti crijevne mikrobiote, a samim time i do pojave mnogih bolesti. **Upalna bolest crijeva** (eng. "*Inflammatory Bowel Disease*", IBD) kronična je bolest koja nastaje zbog upalnih promjena, zahvaćaju stjenku probavnoga sustava i značajno pogoršavaju kvalitetu života oboljelih. U upalne bolesti crijeva ubrajaju se Crohnova bolest (eng. "*Crohn disease*", CD) i ulcerozni kolitis (eng. "*ulcerative colitis*", UC). Iako su to kronične, odnosno doživotne bolesti, upalne bolesti crijeva prolaze kroz dvije temeljne faze: **relaps** – aktivacija upale i pojava znakova bolesti (simptoma) i **remisija** – stanje mirovanja bolesti, bez simptoma. Prvi put IBD se može pojaviti u bilo kojem životnom razdoblju, od prve godine života pa sve do duboke starosti. No, najčešće se javlja tijekom adolescencije i mlađe odrasle dobi, ponajprije između 15. i 30. godine života. Štoviše, danas se čak 25-30 % svih bolesti dijagnosticira u dječjoj dobi (12). Upalne bolesti crijeva predstavljaju jedan od najvećih problema današnjice, što zbog učestalosti bolesti, što zbog velikog raspona u godinama oboljelih koji obuhvaća osobe u svim životnim fazama. Bolest se sastoji od upalnih procesa koji se javljaju na sluznici crijeva, dužinom cijelog probavnog sustava, a vrlo su česte izmjene aktivne i pasivne faze bolesti. Dostupni lijekovi služe u svrhu tretiranja simptoma, dok sam uzrok bolesti ostaje nepoznat. Znanstvenici smatraju da na bolest utječe više različitih parametara, koji zajedno u kombinaciji čine pogodni medij za razvijanje upalnih bolesti crijeva. Do sada je poznato nekoliko mehanizma koji objašnjavaju složeni odnos između crijevne mikrobiote i IBD-a: i) narušena brojnost i raznolikost crijevne mikrobiote, ii) indukcija crijevne upale pod utjecajem patogena i funkcionalno izmijenjena crijevna mikrobiota, iii) neispravna imunoregulacija domaćina (13) te se tako uzimaju u obzir geni koje smo naslijedili, okoliš u kojem živimo, hrana koju jedemo te sastav i raznolikost bakterija koje žive u simbiozi s našim stanicama. Do sada je poznato da se upalne bolesti crijeva ne prenose s oboljele na zdravu osobu i smatra se da nisu uzrokovane patogenom iz vanjskog okoliša, a čini se da je uzrok bolesti kombinacija stalnog upalnog procesa koji narušava brojnost i raznolikost komenzalnih bakterija (disbioza). Osim toga, genetički utemeljene interakcije između crijevne mikrobiote i imunološkog sustava sluznice crijeva i načina na koji okolišni čimbenici mijenjaju te odnose, posebno su važni za razvoj IBD-a (9).

Upalne bolesti crijeva prisutne su diljem svijeta s razlikama u epidemiologiji, izloženosti čimbenicima rizika i fenotipovima između regija. Incidencija upalnih bolesti crijeva u svijetu zadnjih desetljeća raste, a istraživanja provedena u Hrvatskoj pokazuju da incidencija za ulcerozni kolitis iznosi 4,3/100.000, a za Crohnovu bolest 7,0/100.000 (14). Incidencija IBD-a stalno je u porastu u industrijskim zemljama tijekom 20. stoljeća te iako su neke studije pokazale da je „plato“ postignut u nekim regijama tijekom 21. stoljeća, nedavna izvješća sugeriraju da bi se ona mogla još povećati. Prevalencija IBD-a veća je u razvijenim zemljama (npr. zapadnoj Europi, Sjedinjenim Američkim Državama, Kanadi, Australiji i Novom Zelandu) nego u zemljama u razvoju (Azija, Bliski Istok, Južna Amerika i Afrika) (15,16). Zemlje u razvoju tradicionalno se smatraju područjima s niskom pojavnosću bolesti, iako je nešto uvećana incidencija opisana i za te zemlje početkom 21. stoljeća (6).

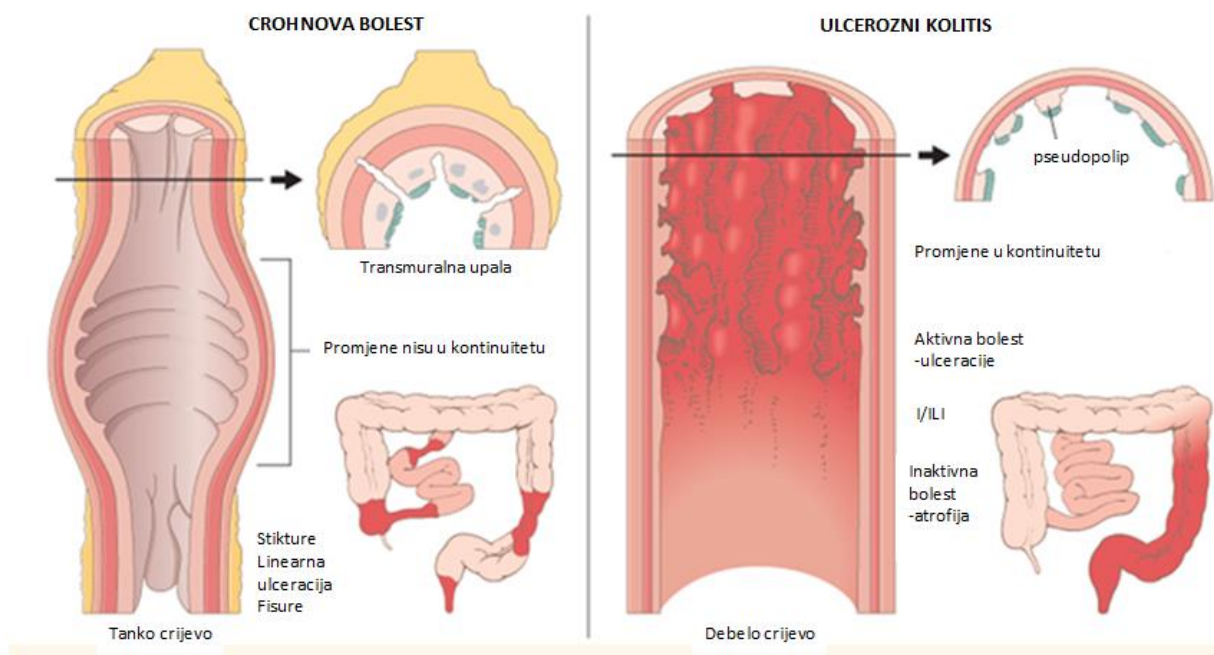
1.3. Crohnova bolest i ulcerozni kolitis

Crohnova bolest (CD) predstavlja upalu koja zahvaća punu debljinu stijenke crijeva i može zahvatiti bilo koji dio probavnog sustava, dok **ulcerozni kolitis (UC)** predstavlja upalu koja je ograničena samo na unutrašnji sloj stijenke i zahvaća samo debelo crijevo (*Slika 2*). Stopa hospitalizacije je visoka, iako se polako smanjuje kod CD-a, a stopa hospitalizacije kod UC-a ostala je ista kroz dulje razdoblje i odražava ozbiljnost bolesti i rizik od uklanjanja dijela debelog crijeva - kolektomije (17). Većina oboljelih doživljava relaps bolesti, dok 20-25% pacijenata pati od kroničnih simptoma. Bolest zahvaća sluznicu crijeva koja je crvenkasta, upaljena i lako krvari. U teškim slučajevima kod oboljelih postoji velika ulceracija, pri čemu se na susjednoj sluznici pojavljuju upalni polipi. Pacijenti boluju od čestih krvavih dijareja, bolova u truhu, vrućice, a većina ih intenzivno mršavi. Osnovne razlike između CD-a i UC-a prikazane su u *Tablici 1*. Prema podacima iz te tablice čini se da ih je lako razlikovati, ali nažalost, obje bolesti u djece mogu zahvatiti velike crijevne površine i stoga imaju teži tijek i vrlo sličnu kliničku sliku pa je i njihovo razlikovanje teže nego li u odraslih bolesnika (12,18). Nastanak bolesti povezan je s imunološkim statusom, sastavom crijevne mikrobiote te okolišnim čimbenicima (18,19). Trenutno ne postoji jedinstveno viđenje etiologije upalnih bolesti crijeva te se uvelike raspravlja o tome jesu li CD i UC dva različita oblika koji pripadaju grupi upalnih bolesti crijeva ili je riječ o istoj bolesti s različitim morfološkim i kliničkim obilježjima.

Tablica 1. Razlike između Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa

	Crohnova bolest	Ulcerozni kolitis
Upala	Može zahvatiti bilo koji dio probavnog sustava	Ograničena samo na debelo crijevo
	Zahvaća sve slojeve crijevne stijenke, od unutrašnjeg sloja do vanjskog	Zahvaća samo unutarnji sloj crijevne stijenke
	Između oštećenja na crijevu nalazi se normalna zdrava regija	Crijevo je zahvaćeno kontinuirano. Između upaljenih dijelova nema normalne sluznice
Najčešće zahvaćeno mjesto	Završni dio tankog crijeva i dio debelog crijeva	Cijelo debelo crijevo
Suženja crijeva	Mogu biti prisutne	Nema ih
Fistule	Mogu biti prisutne	Nema ih
Najčešći simptomi	Bolovi u truhu, proljev, mršavljenje, zastoj u rastu	Krvavi proljev
Upalni parametri (CRP, SE)	Najčešće povišeni	Vrlo često su normalni

Neki znanstvenici smatraju da su bolesti uzrokovane različitim etiološkim čimbenicima koji pri djelovanju na organizam aktiviraju isti univerzalni patogeni mehanizam autoimune upale. Pristalice teorije zaraze, glavnu etiološku ulogu kod CD-a pripisuju bakteriji *Mycobacterium paratuberculosis* i virusu ospica (19–21). Zagovornici virusne prirode upalne bolesti crijeva vjeruju da virus ospica može oštetiti krvne žile na stjenkama crijeva, iako do sada nisu uspjeli potvrditi virus ospica u intestinalnim tkivima (19–21). Dosadašnje znanstvene spoznaje o specifičnim pokretačima i dijagnostičkim markerima bolesti su ograničene te su za bolje razumijevanje patofiziologije upalnih bolesti crijeva neophodne nove informacije o sastavu crijevne mikrobiote i upalnom statusu pacijenata. Iako je etiologija bolesti za sada nepoznata, dominantna hipoteza upućuje na to da upala nastaje zbog kontinuiranog imunološkog odgovora prema promijenjenoj brojnosti bakterijskih vrsta ili patogenima unutar genetički osjetljivog domaćina (1).



Slika 2. Razlike u zahvaćenosti crijeva između Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa. Crohnova bolest (CD) predstavlja upalu koja zahvaća punu debljinu stijenke crijeva i može zahvatiti bilo koji dio probavnog sustava, dok ulcerozni kolitis (UC) predstavlja upalu koja je ograničena samo na unutrašnji sloj stijenke i zahvaća samo debelo crijevo (8).

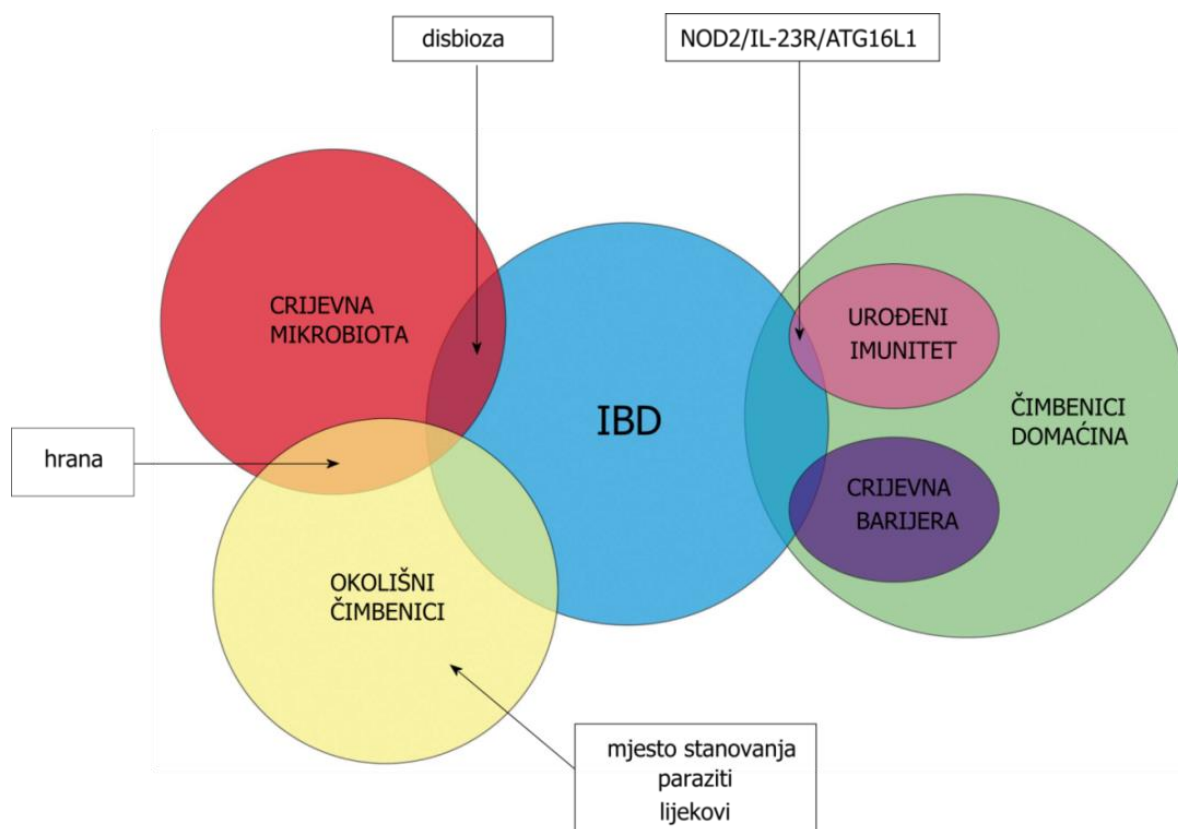
1.4. Modulacija mikrobiote u upalnim bolestima crijeva

Sastav i funkcija mikrobiote vrlo je prilagođena prehrabnim navikama i pokazuje visoku otpornost na kratkotrajne promjene. Međutim, studije pokazuju da dugotrajne promjene u prehrabnim navikama, izloženost antibioticima ili enteričkim patogenima, mogu potaknuti nagle transformacije unutar strukture i funkcije crijevne mikrobiote, vodeći cijeli sustav u stanje disbioze (*Slika 3*). Uslijed tih saznanja, znanstvenici su osim dugoročnih prehrabnih navika proučavanje usmjerili i na probiotike, prebiotike, antibiotike kao i nedavno uvedeni terapijski pristup, transplantaciju fekalne mikrobiote (TFM) (1).

1.4.1. Hrana

Poznato je da prehrabne navike i hrana utječu na sastav i djelovanje crijevnih bakterija. Zapadni način prehrane (eng. "*Western food diet*") karakterističan po visokom unosu šećera i masne hrane s niskom razinom prehrabnih vlakana, voća i povrća, a povezan je s promijenjenom strukturom i funkcijom komenzalnih bakterija u crijevima (22), što bi moglo pridonijeti povećanju incidencije upalnih bolesti crijeva (IBD) (23). Hrana, endogeni spojevi i probavni enzimi prolaze kroz crijevo i bivaju dodatno fermentirani od strane bakterija. Razgradnja tih spojeva rezultira velikom raznolikošću metabolita koji dolaze u bliski kontakt sa stanicama domaćina. Na taj način metaboliti utječu na metabolički fenotip domaćina i mnoge bolesti (24). Ugljikohidrati i proteini čine glavnu hranu crijevnim bakterijama. Produkti bakterijske razgradnje/fermentacije hrane najčešće su masne kiseline, amonijak, fenolni spojevi i plinovi, uključujući vodik, metan i sumporovodik. Bakterije (koljeno *Bacteroidetes* i *Firmicutes*) također u crijevima fermentiraju i prehrabna vlakna iz hrane i na taj način stvaraju kratko lančane masne kiseline (eng. "*Short-chain fatty acids*", SCFA), koje imaju sposobnost regulacije aktivnosti gena uključenih u proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu crijevnih epitelnih stanica i mogu utjecati na sastav crijevne mikrobiote i upalni odgovor domaćina (25). Različite studije govore o smanjenoj proizvodnji SCFA ili smanjenoj brojnosti bakterija koje proizvode SCFA (bakterije *Roseburia hominis* i *Faecalibacterium prausnitzii*) u bolesnika s IBD-om (25–27), što upućuje na važnu ulogu SCFA u upalnim procesima IBD-a. Povoljni terapijski učinci SCFA također su zapaženi nakon primjene SCFA ili prebiotika u životinjskim modelima ili UC pacijentima (23).

Prehrambeni sastojci sadržavaju supstrate koji tijekom fermentacije mogu rezultirati različitim produktima. Promjene u mikrobnjoj strukturi zbog prehrambenih modifikacija rezultat su sposobnosti određene bakterijske zajednice da bolje metabolizira ponuđene supstrate. Isti supstrat može se koristiti u više metaboličkih puteva, obzirom na tip bakterije koji kolonizira crijeva. Jedan od takvih primjera je laktat. Laktat se može transformirati u butirrat ili u kratko lančane masne kiseline poput acetata, sukcinata i propionata tijekom anaerobne bakterijske fermentacije, ovisno o tipu mikrobiote (148). Kada imamo prisutne bakterijske rodove *Prevotella* i *Akkermansia* laktat se razgrađuje do butirata. Butirat doprinosi sintezi mukusa i sklapanju čvrstih veza. Kada su brojniji rodovi *Bacteroides* i *Veillonella*, laktat se razgrađuje do sukcinata, acetata i propionata. Ovi spojevi narušavaju sintezu mukusa i povećavaju propusnost crijevne barijere (8). Tijekom posljednjih nekoliko godina istraživači su počeli primjenjivati različite prehrambene pristupe kao dio plana liječenja pacijenata s IBD-om. Poznati prehrambeni pristup predstavlja *Mediteranska prehrana* (MP) koja je poznata po pozitivnom učinku na zdravlje. Njezine karakteristične komponente predstavljaju zlatni standard dobro uravnotežene prehrane i preporučuje ju Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) kao prevenciju za koronarne bolesti srca, određenih vrsta karcinoma i drugih bolesti povezanih s prehrambenim navikama (28). Utjecaj MP-a na upalne bolesti crijeva predmet su mnogih istraživačkih skupina, a dosadašnji rezultati pokazuju blagotvorne učinke prehrane na suzbijanje upale i stabilizaciju crijevne mikrobiote. *Lynnette Feruson i sur.* analizirali su aktivnost svih gena u organizmu da bi ispitali utjecaj MP-a na smanjenje upale kod CD pacijenata. Nakon šest tjedana uočene su smanjene vrijednosti C-reaktivnog proteina (CRP) kao trend u normalizaciji ravnoteže crijevne mikrobiote – povećanje bakterija *Bacteroidetes* i *Clostridium* te smanjenje bakterija *Bacillaceae* i *Proteobacteria* (29). Nadalje, *in vivo* mišji modeli bolesti su pokazali da dijeta zasnovana na ekstra djevičanskom maslinovom ulju obogaćenom hidroksitirozolum (sastojak MP) ima sposobnost smanjiti kliničke i histološke znakove oštećenja te poboljšati indeks oporavka od bolesti, što je izvrstan pretkliničkih podatak u istraživanju IBD-a (30). Osim toga, prirodni fenoli iz vina mogu djelovati kao prebiotici i vratiti ravnotežu crijevne mikrobiote sprečavajući upalne procese i smanjujući oštećenja mukusa kod IBD-a (31).



Slika 3. Vennov dijagram prikazuje preklapajuću ulogu crijevne mikrobiote, domaćina i okolišnih čimbenika u patogenezi upalnih bolesti crijeva (IBD). Disbiotičke promjene u sastavu bakterija mogu biti pod utjecajem prehrane i drugih čimbenika iz okoline, uzimanje lijekova, okoliš u kojem živiom, paraziti kojima smo izloženi. Mali udio bolesnika s IBD-om ima dokazane čimbenike genetske osjetljivosti; NOD2, ATG16L1, IL-23R. A jednu od najvažnijih uloga igra narušena stabilnost crijevne barijere, aktivacija imuno stanica epitela i kronični upalni odgovor. Prilagođeno prema *Carding i sur. (24)*

1.4.2. Probiotici i prebiotici

Kada je riječ o moduliranju mikrobiote, probiotici i prebiotici smatraju se jednim od ključnih elemenata u terapijskim pristupima liječenja gastrointestinalnih poremećaja. **Probiotici** su definirani kao živi mikroorganizmi koji se primjenjuju u odgovarajućim količinama za dobrobit ljudskog zdravlja. Brojna izvješća sugeriraju korisnu aktivnost specifičnih bakterijskih vrsta koje se unose u organizam mliječnim proizvodima, imaju antimikrobnu aktivnost, utječu na patogene bakterije i suzbijaju njihov rast, poboljšavaju crijevnu barijeru domaćinja moduliranjem upalnog odgovora kod bolesnika s IBD-om (1). Ti probiotici, uglavnom ljudskog podrijetla, moraju biti nepatogeni i imati sposobnost da prežive put kroz gastrointestinalni trakt (32). Najcijenjeniji probiotički soj je *Escherichia coli* (*E. coli*). Nepatogeni *E. coli* pokazuje da je soj učinkovit i siguran kao mesalazin za održavanje remisije u pacijenata s UC-om (33,34). Bakterija *Lactobacillus* GG se također smatra učinkovitim za održavanje remisije u bolesnika s UC-om (35), ali ne i kod bolesnika s CD-om (36,37). Drugi važni probiotički pojedinačni sojevi za liječenje IBD-a su sojevi bakterija *Lactobacillus* (38), *Bifidobacteria* (39) i soj kvasca *Saccharomyces boulardii* (40). Na tržištu trenutno najbolje rezultate u liječenju IBD-a pokazuje VSL#3 koktel bakterija (na europskom tržištu poznat kao Vivomix). Sastoji se od visoko koncentriranog (450 milijardi bakterija / vrećica) praha koji sadrži nekoliko različitih bakterijskih vrsta: jedan rod *Streptococcus* (*S. thermophilus*), tri vrste roda *Bifidobacteria* (*B. breve*, *B. infantis* i *B. longum*) i četiri vrste roda *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus* i *L. plantarum*). Spomenuti probiotički koktel je koristan u održavanju remisije u UC pacijenata. Iako su uspostavljeni korisni učinci probiotika u liječenju crijevnih poremećaja i dalje nema dovoljno podataka koji pokazuju njihov utjecaj na crijevnu mikrobiotu. Jedna od nekoliko studija pokazuje da VSL#3 (Vivomix) povećava koncentracije bakterija *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Streptococcus salivarius* u crijevima koje se ipak nakon 15 dana od tretmana vraćaju u svoje prvobitno stanje (41). **Prebiotici** su neprobavljivi oligosaharidi koji selektivno fermentiraju SCFA u debelom crijevu i mogu mijenjati sastav i aktivnost mikrobiote u svrhu dobrobiti domaćina. U prebiotike spadaju inulin, fruktooligosaharidi (FOS), galaktooligosaharidi i laktuloza (32). Također mogu selektivno stimulirati rast određenih probiotičkih sojeva unutar crijeva, kao što su bakterije *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, s druge strane smanjuju pH unutar lumena crijeva i povećavaju

proizvodnju SCFA poput acetata i butirata koji igraju važnu ulogu u epitelni stanicama i dendritičnim stanicama (32). Nekoliko kliničkih studija provelo je analizu prebiotika kao potencijalnih terapeutika u IBD-u. Slad iz sirovog ječma (eng. "*Germinated barley foodstuff*" GBF) predstavlja jedan od najčešće istraživanih prebiotika bogat glutaminom i hemicelulozom. Nađeno je da GBF značajno utječe na aktivnost bolesti kod pacijenata s blagim do umjerenim UC-om, povećavajući razine rodova *Bifidobacterium* i *Eubacterium* i povećavajući koncentraciju fekalnog butirata (42). Također se pokazao dobrim u održavanju remisije kod UC (43) snižavajući razinu proupalnih citokina (interleukina IL-6 i IL-8) i CRP-a (44,45).

1.4.3. Antibiotici

Liječenje upalnih bolesti crijeva antibioticima temelji se na dokazima da crijevna mikrobiota ima važnu ulogu u patogenezi bolesti. Antibiotici mogu smanjiti brojnost patogenih bakterija koje sprječavaju rast komenzalnih bakterija. Dokazano je da su upalne bolesti crijeva okarakterizirane povećanim brojem patogenih bakterija kao što su bakterije *Escherichia*, *Shigella* i *Faecalibacterium* (46).

Samim time antibiotska terapija ima potencijal da utječe na tijek IBD-a smanjenjem ukupnog broja bakterija i gljivica u želucu, modificiranjem sastava crijevnih bakterija kao i smanjenjem formiranja bakterijskog tkiva (47). Kombiniranim korištenjem metronidazola i ciprofloksacina kod IBD-a uočen je pad brojnosti bakterija čak i nakon prvog dana terapije, iako se s produženim korištenjem antibiotika ovaj pozitivni učinak smanjuje (48,49). Istraživanja na pacijentima s CD-om pokazala su da rifaksimim ima sklonost povećanju koncentracije korisnih bakterija *Bifidobacterium* i *Faecalibacterium prausnitzii*, ali njihov dugoročni utjecaj na crijeva tek treba definirati (50). Kod pacijenta s teškim UC-om, primijenjeni metronizadol zajedno s kortikosteroidima nije bio bolji od placeba, dok su različite studije s rifaksiminom rezultirale značajnim smanjenjem rektalnog krvarenja i učestalih stolica (51). Iako se liječenje antibioticima i dalje koristi u kliničkoj praksi, dokazani su mnogi dugoročno negativni ishodi uslijed utjecaja lijeka na sastav mikrobiote unutar crijeva. Studije pokazuju da dugotrajna izloženost antibioticima povećava incidenciju CD-a zbog njihovog utjecaja na crijevnu mikrobiotu. Još jedan problem u pogledu liječenja antibioticima za IBD je razvoj i širenje otpornosti na antibiotike. Sve to govori u prilog činjenici da se antibiotici trebaju pažljivo prepisivati i koristiti (23). Iako antibiotici

doista predstavljaju koristan terapijski alat za smanjenje crijevnog opterećenja bakterijama, rizika od napredovanja i povratka bolesti, kao i ozbiljnosti same bolesti. Istraživanja na životinjskim modelima pokazuju da nisu sve bakterijske vrste zastupljene jednako kada je u pitanju nastanak upale u gastrointestinalnom traktu (52,53) stoga nije razumno očekivati da će jednaki antibakterijski pristup biti učinkovit na svakom pacijentu u svim skupinama oboljelih. Iako se većina studija usredotočila na metronidazol i ciprofloksacin, moraju se uzeti u obzir sve njihove nuspojave, što nam govori da svakako postoji potreba za daljnjim kliničkim istraživanjima i novim antimikrobnim pristupima u liječenju IBD-a, ali i drugih bolesti (1).

1.4.4. Transplantacija fekalne mikrobiote

Transplantacija fekalne mikrobiote (TFM) predstavlja prijenos crijevnih bakterija iz zdravog donora u oboljelog pacijenta. Naziva se još i "*fekalna bakterijska terapija*" ili "*fekalna infuzija*". Koristi se u kliničkoj praksi kod liječenja pacijenata s *Clostridium difficile* infekcijom (CDI) gdje se na infekciju ne može utjecati antibioticima (23). TFM je također ispitan u bolestima s narušenom crijevnom mikrobiotom, uključujući IBD i metabolički sindrom te se pokazao potencijalnim novim terapijskim pristupom.

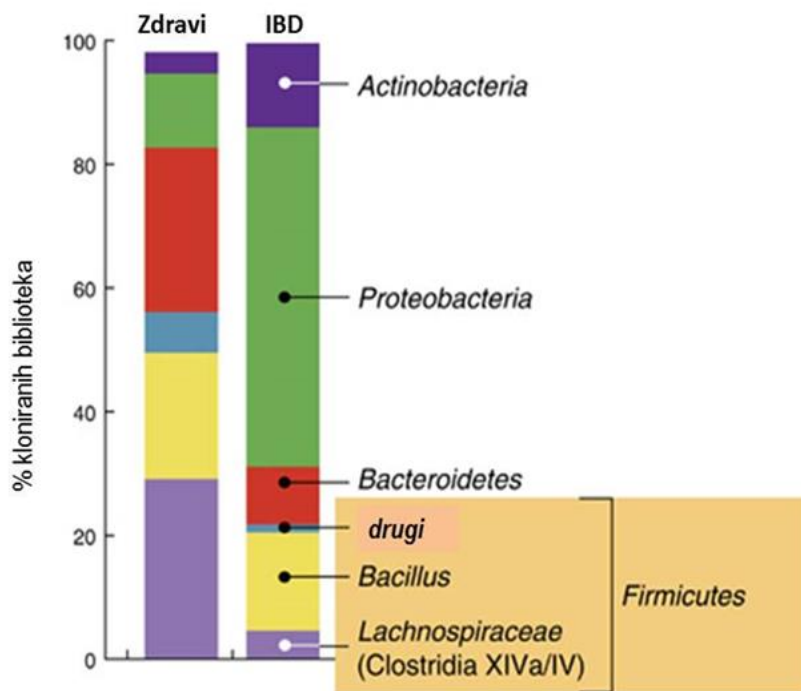
Prvi slučaj korištenja transplantacije fekalne mikrobite objavljen je 1989. godine, u kojem autor sam liječi svoj UC primjenom fekalnih bakterija od zdravih donora (54). Bolest koja je bila aktivna sedam godina i liječena steroidima i antibioticima, ublažila je simptome samo šest mjeseci nakon postupka bez znakova akutne upale u sluznici kolona. Nakon toga je uslijedio niz slučajeva od 6 pacijenata s UC-om koji su postigli remisiju bolesti nakon primjene TFM-a bez povratka aktivne faze bolesti narednih 13 godina tijekom praćenja (55,56). Meta-analiza 18 studija koje uključuju 122 pacijenta s IBD tretiranim TFM-om pokazale su stopu remisije bolesti kod 22% UC i 60,5 % CD pacijenata (57). Problem je taj što studije variraju u tipu bolesti, fenotipu i ozbiljnosti, te nedostaje ujednačenosti u protokolima liječenja i nisu uključene kontrolne skupine, na temelju čega je teško donijeti zaključke o sigurnosti i djelotvornosti postupka TFM-a u IBD-u (58). Za razliku od jako dobrih rezultata za liječenje CDI (92%), do sada se TFM-om uspjelo smanjiti simptome u samo 20% pacijenata s IBD-om. Velika razlika u učinkovitosti krije se u složenosti bolesti i simptoma: i) težina i trajanje simptoma mogu utjecati na ishod liječenja (57), ii) IBD je kronična bolest povezana s različitim čimbenicima, kao što su crijevna mikrobiota, genetski i okolišni čimbenici,

stoga na razvoj IBD-a utječe sinergija svih tih čimbenika zajedno, iii) imunološki sustav IBD pacijenata upravlja kroničnom upalom koja može utjecati na terapijski učinak TFM-a, iv) u obzir treba uzeti i zdrave donore fekalne mikrobiote i izbor kriterija prema kojima jedan donor biva bolji od drugog. Svi ti čimbenici mogu pridonijeti nižem kliničkom ishodu liječenja u usporedbi s CDI (59).

1.5. Disbioza kod upalnih bolesti crijeva

Promjena normalne ravnoteže bakterijske flore nazva se - **disbioza**. Smatra se da igra veliku ulogu u bolestima probavnog sustava jer se zbog narušavanja i nedostatka korisnih bakterija, razmnožavaju „loši“ sojevi bakterija i gljivica i dolazi do poremećaja sastava crijevne mikrobiote i zdravih tjelesnih funkcija (13,24,32). U posljednje vrijeme sve se više govori o uključenosti crijevne mikrobiote u upalne bolesti crijeva. Nedavni napredak tehnologije sekvenciranja nove generacije (eng. "*Next generation sequencing*", NGS) omogućava analizu crijevne mikrobiote neovisno o uzgoju u laboratoriju, otkrivajući da je u upalne bolesti crijeva uključena promjena u ravnoteži crijevne mikrobiote, prije nego specifični patogeni (60).

Ljudska mikrobiota najčešće se dijeli u grupe uravnoteženih, sastava mikrobni zajednica, poznatih kao "enterotipovi" (61), dok okolišni čimbenici poput prehrane, mogu utjecati na sastav mikrobiote bez utjecaja na enterotip. Više od 90% ljudske crijevne mikrobiote sastoji se od 4 glavna koljena. Koljena *Firmicutes* (47-76%) i *Bacteroidetes* (16-23%) dominiraju, a prate ih koljena *Proteobacteria* i *Actinobacteria* u mnogo manjem postotku. Kod pacijenata s upalnom bolesti crijeva (IBD) zamijećena je smanjena raznolikost i stabilnost (disbioza) crijevne mikrobiote, pad u omjeru koljena *Firmicutes/Bacteroidetes* i fakultativnih anaeroba poput porodice *Enterobacteriaceae* te rast koljena *Proteobacteria* i *Actinobacteria* (10,13,60,62,63) u usporedbi sa sastavom crijevne mikrobiote kod zdravih ljudi (*Slika 4*). Neke od bakterijskih vrsta s upalnim djelovanjem obogaćene su u pacijenata s IBD-om (*Escherichia*, *Fusobacterium*), dok su protuupalne vrste (*Faecalibacterium*, *Roseburia*) uvelike smanjene (64). Primjerice, istraživanja su pokazala da pacijenti s aktivnim IBD-om imaju manju količinu bakterija *Clostridium coccooides*, *Clostridium leptum*, *Faecalibacterium prausnitzii* i *Bifidobacterium* (65). Također je primijećena značajna razlika u sastavu mikrobiote kod pacijenata s CD-om u odnosu na UC.



Slika 4. Prikaz razlike brojnosti mikrobiote kod IBD bolesnika u odnosu na zdrave. Kod pacijenata s upalnom bolesti crijeva zamijećena je smanjena raznolikost i stabilnost crijevne mikrobiote, pad u omjeru koljena *Firmicutes/Bacteroidetes* te rast koljena *Proteobacteria* i *Actinobacteria* u usporedbi sa sastavom crijevne mikrobiote kod zdravih ljudi. Prilagođeno prema Sartor 2012 (13).

Do sada se još ne zna je li disbioza crijevne mikrobiote izravna posljedica upale ili je rezultat narušenog okruženja gastrointestinalnog trakta (6,23,66). Studija provedena s ciljem utvrđivanja statusa mikrobiote u rano dijagnosticiranim CD slučajevima (64) koja je analizirala veliki broj novo dijagnosticiranih pedijatrijskih pacijenata ukazuje na jasne razlike između zdravih i oboljelih. CD pacijenti imali su povećani udio porodica *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Veillonellaceae* i *Fusobacteria* uz istovremeno smanjeni udio porodica *Erysipelotrichaceae*, *Bacteroidales* i *Clostridiales* u usporedbi s kontrolnim zdravim ispitanicima. Pojedine promjene zajedničke su za CD i UC, pa je tako u oba slučaja prisutan pad broja zastupljenih vrsta, naročito iz koljena *Firmicutes*, kojem pripada nekoliko rodova čija prisutnost djeluje protektivno, kao što su rodovi *Fecalibacterium* i *Lactobacillus*. Također je uočeno da crijevna mikrobiota na upaljenim dijelovima sluznice crijeva ima povećanu razinu aeroba i fakultativnih anaeroba (npr. *Proteobacteria*), dok su obligatni anaerobi prevladavali u fecesu (npr. *Bacteroidetes* i *Clostridiales*) (64). U studiji koju je proveo *Ricanek i sur.* (67) na 4 novodijagnosticirana CD pacijenta i jednoj kontroli, detektirali su razred *Proteobacteria* samo u CD ispitanicima, u koji spadaju aerobne vrste: *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *C. braakii*, *Pseudomonas f.*, *Enterobacter h.*, *Sutterella spp.* Promjene u sastavu mikrobiote odražavaju se i na metaboličku aktivnost pa tako dolazi do većeg udjela gena za pojedine metaboličke putove, naročito one povezane s povećanom tolerancijom na oksidativni stres i izbjegavanje imunološkog sustava (24,68). Ovo je u skladu s nedavnim saznanjima da se razina kisika u lumenu crijeva povećava kao odgovor na upalu, što dovodi do promjene mikrobiote u aerotolerantnu kao odgovor na oksidativni stres (69). Studija provedena na odraslim IBD pacijentima u Španjolskoj pokazuje da je disbioza veća u CD pacijenata nego kod UC-a, a opisuje je manja raznolikost s izmijenjenom i nestabilnom bakterijskom zajednicom (70). Mnoga istraživanja do sada provedena su na ispitanicima kojima je upalna bolest crijeva bila dijagnosticirana ranije (67,70–72), osim dvije studije (18,64) u kojoj su sudjelovali rano dijagnosticirani pacijenti.

1.6. Imunološki sustav u upalnim bolestima crijeva

Crijevna mikrobiota predstavlja ključni čimbenik u oblikovanju i moduliranju imunološkog sustava i njegovog odgovora na okoliš, te je povezana s mnogim bolestima u kojima imunološki sustav i kronična upala igraju glavnu ulogu. Crijevne bakterije upravljaju urođenim i adaptivnim imuno odgovorom i utječu na prag aktivacije odgovora na patogene bakterije proizvodnjom različitih metabolita, malih molekula (SCFA) koje sudjeluju u mikrobiološkoj interakciji s domaćinom. SCFA predstavljaju dobar primjer kako molekule dobivene iz bakterija pridonose imunološkoj homeostazi u crijevima. Bakterija koje proizvode ove masne kiseline sastavni su dio mikrobiote zdravih crijeva i sastoje se u velikom broju od anaeroba; *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Aspergillus*, *Ruminococcus*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*. Također u korisne bakterije crijevne mikrobiote spada i rod *Clostridium* koji regulira imunološke funkcije, modulirajući propusnost sluznice crijeva na antigene iz hrane (73).

Sluznica crijeva kontinuirano je izložena velikom broju antigena, bilo bakterijskih ili iz hrane, koje prepoznaje imunološki sustav sluznice. U zdravom crijevu tolerira se crijevna mikrobiota, a istovremeno se uklanjaju patogene bakterije. Dok u bolesnom crijevu imamo prekomjerni odgovor imunološkog sustava na crijevnu mikrobiotu što predstavlja glavni mehanizam u nastanku IBD-a (74).

Posljednjih desetljeća uloženi su mnogi naponi da bi se identificirali specifični patogeni u IBD-u, a neke bakterije kao što su npr. *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* ili invazivna bakterija *Escherichia coli* (AIEC) smatraju se uzročnicima CD-a (75). U današnje vrijeme se općenito pretpostavlja da umjesto jednog patogena, cjelokupno promijenjena crijevna mikrobiota dovodi do disbioze i kroničnog upalnog odgovora. Dobro je utvrđeno da se mikrobiota IBD pacijenata značajno razlikuje od zdravih ispitanika. Jedna od glavnih razlika je i smanjena zastupljenost bakterija *Firmicutes*, *Clostridium leptum* i *Coccolides*, a osobito smanjena količina bakterija *Faecalibacterium prausnitzii*. Štoviše, gubitak tih bakterije može rezultirati smanjenom proizvodnjom butirata (predstavlja jedan od najvažnijih proizvoda u crijevima i ima različita protuupalna svojstva), reguliranjem migracije neutrofila, inhibicijom proizvodnje proupalnih citokina (74). Drugi važan rod predstavlja rod *Lactobacillus* koji posjeduje nekoliko probiotičkih sojeva. Neki od njih imaju blagotvorne učinke na IBD i sposobni su inhibirati NOD2-ovisne putove,

degradirati proupalni kemokin IP-10 i time ublažiti upalu unutar sluznice kolona (76). Upravo zbog ovih svojstava, smanjena količina roda *Lactobacillus* u crijevnoj mikrobioti pridonosi patogenezi IBD-a. Rod *Bifidobacterium* unutar koljena *Actinobacteria* također sadrži nekoliko probiotičkih sojeva s protuupalnim svojstvima. Istraživanja na rodu *Bifidobacterium* su pokazala da imaju blagotvoran učinak i u animalnim modelima i kod CD i UC pacijenata (77,78), dok je smanjeni broj uočen kod IBD-a. Ovaj rod smanjuje stvaranje i aktivaciju raznih proupalnih, dendritičkih i t-staničnih markera, poput IL-6, TNF- α , COX-2, CD40-L ili IFN- γ (79). Narušena regulacija imunološkog sustava u sluznici crijeva u IBD-u dovodi do proizvodnje upalnih citokina što rezultira nekontroliranom i kroničnom upalom sluznice. Dok kod homeostaze imamo ravnotežu između regulatora (Treg) i efektorskih T-stanica (Th1, Th2 i Th17), u stanju kronične upale sluznice imamo aktivne t-stanice i proupalne citokine (TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-12, IL-17, IL-23), a smanjena je funkcija Treg stanica i razina protuupalnih citokina (TGF- α , IL-4, IL-10 ili IL-11). Citokini stoga mogu predstavljati glavne ciljeve IBD terapije. Štoviše, smanjenje upale sluznice može se postići smanjenjem populacije efektorskih T stanica ili povećanjem regulatorne aktivnosti T stanica (80).

1.7. Biomarkeri u upalnim bolestima crijeva

Dijagnoza rane faze upalne bolesti crijeva, odnosno dvaju njenih glavnih oblika ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti, predstavlja veliki klinički izazov. Dijagnostika se temelji na kombinaciji kliničkih pokazatelja bolesti, endoskopije i detekcije markera iz krvi. CD i UC predstavljaju genetski složene bolesti u kojima stotine nezavisnih gena doprinosi osjetljivosti bolesti, dok molekularni mehanizmi i funkcije mnogih gena povezanih s IBD-om ostaju nepoznati. Osim genetike IBD je i pod snažnim utjecajem mikrobioloških i ekoloških čimbenika. Uslijed nedovoljno dobrog odgovora pacijenata na konvencionalnu medicinsku terapiju, bolje razumijevanje mehanizama biomarkera i imunološkog odgovora u IBD-u, može dovesti do novih alternativnih pristupa u ranoj dijagnozi i procesu praćenja pacijenata (81).

Biomarkeri se definiraju kao mjerljive tvari dobivene iz tkiva ili tjelesnih tekućina. Predstavljaju korisni alat u dijagnostici i liječenju bolesti jer su manje invazivni od drugih dijagnostičkih pristupa (npr. kolonoskopija) i financijski pristupačniji. Brojni

geni povezani s IBD-om, imaju ulogu u imunološkim putovima i upalnom odgovoru. Proučavanjem interakcija upalnih proteina, kao što su citokini u imuno-regulacijskim putovima IBD-a, zasigurno će pridonijeti novim modalitetima i pristupima u dijagnostici i liječenju IBD pacijenata. Nedavne studije usredotočile su se na više od 160 genskih lokusa povezanih s IBD-om, od kojih je većina nađena i u CD i u UC (82). Iako je posljednjih godina otkriveno nekoliko biomarkera za upalne bolesti crijeva (ASCA- anti- *Saccharomyces cerevisiae* protutijelo, ANCA- anti-neutrofil-citoplazmatsko protutijelo i C-reaktivni protein – CRP) (83–86), niti jedan dosad nije uspješno uveden u svakodnevnu dijagnostičku praksu te se pomoću ovih biomarkera bolest ne može sa sigurnošću identificirati kao UC ili CD. Trenutno se biomarkeri koriste samo kao dodatak liječenja ili praćenja napredovanja bolesti, te se serološki i imunološki biomarkeri zajedno s kliničkim i endoskopskim rezultatima široko koriste za procjenu procesa bolesti. Iako biomarkeri imaju prednost nad invazivnim postupcima ipak ne koreliraju uvijek s endoskopskim lezijama crijeva i pokazuju nisku osjetljivost u pacijenata s blagim i umjerenim IBD-om (87).

Nedavna studija na CD, UC pacijentima i zdravim kontrolama *Andersson i sur.* (83) pokazala je veliki broj serumskih proteina koji potencijalno mogu razlikovati navedene grupe i pomoći u stratifikaciji pacijenata, te su identificirali 17 upalnih proteina sa značajno različitim razinama u usporedbi CD i zdravih kontrola i UC i zdravih kontrola.

1.7.1. Upalni biomarkeri

U istraživanjima IBD-a najviše dominira proučavanje imunoloških procesa unutar sluznice crijeva. Rezultati upućuju na to da narušeni urođeni i adaptivni imunološki putovi doprinose kroničnom upalnom odgovoru unutar crijeva pacijenata. Urođeni imunološki odgovor predstavlja prvu liniju obrane od patogena i započinje prepoznavanjem mikrobnih antigena preko TLR receptora (eng. "*Toll-like receptors*", TLR) na staničnoj površini i NLR receptora u citoplazmi (eng. "*NOD-like receptors*", NLR) (88,89). Većina studija u zadnja dva desetljeća usmjerena je na ulogu adaptivnog imunog odgovora u patogenezi IBD-a, proučavanjem interakcija između različitih elemenata i sudionika imuno-regulacijskih putova (T stanica i citokina) (90). Citokini su mali proteini koje proizvode imunološke stanice, olakšavaju komunikaciju među stanicama i igraju bitne uloge u razvoju i diferencijaciji stanica. Pro-upalni citokini imaju ključnu ulogu u imunološkom odgovoru kod IBD-a, a regulacija

aktivnosti posredovana je imunoregulatornim citokinima (91). Postoji nekoliko procesa/putova u patogenezi bolesti. Uključujući funkciju crijevne barijere i antimikrobnu aktivnost, stres endoplazmatskog retikuluma, autofagiju i razvoj i funkciju CD4+T pomoćnih stanica. Citokini reguliraju svaki od ovih putova, čime se omogućuje molekularna komunikacija između epitela, imuno stanica sluznice i mikrobiote. Prema tome, citokini, receptori citokina i regulatori aktivnosti citokina predstavljaju najzastupljenije grupe gena povezanih s IBD-om.

Razvijeni su do sada mnogi pristupi za sprečavanje ovih staničnih i međustaničnih procesa i spremni su za prenošenje u kliniku u svrhu liječenja. Međutim, pri razvoju ovih kliničkih lijekova treba uzeti u obzir da se inhibicija upalnih citokina može povezati i s ozbiljnim nuspojavama, budući da su te molekule također uključene u regulaciju fizioloških procesa i imunološki odgovor na različite infekcije (92).

1.8. Sekvenciranje nove generacije – analiza sastava crijevne mikrobiote

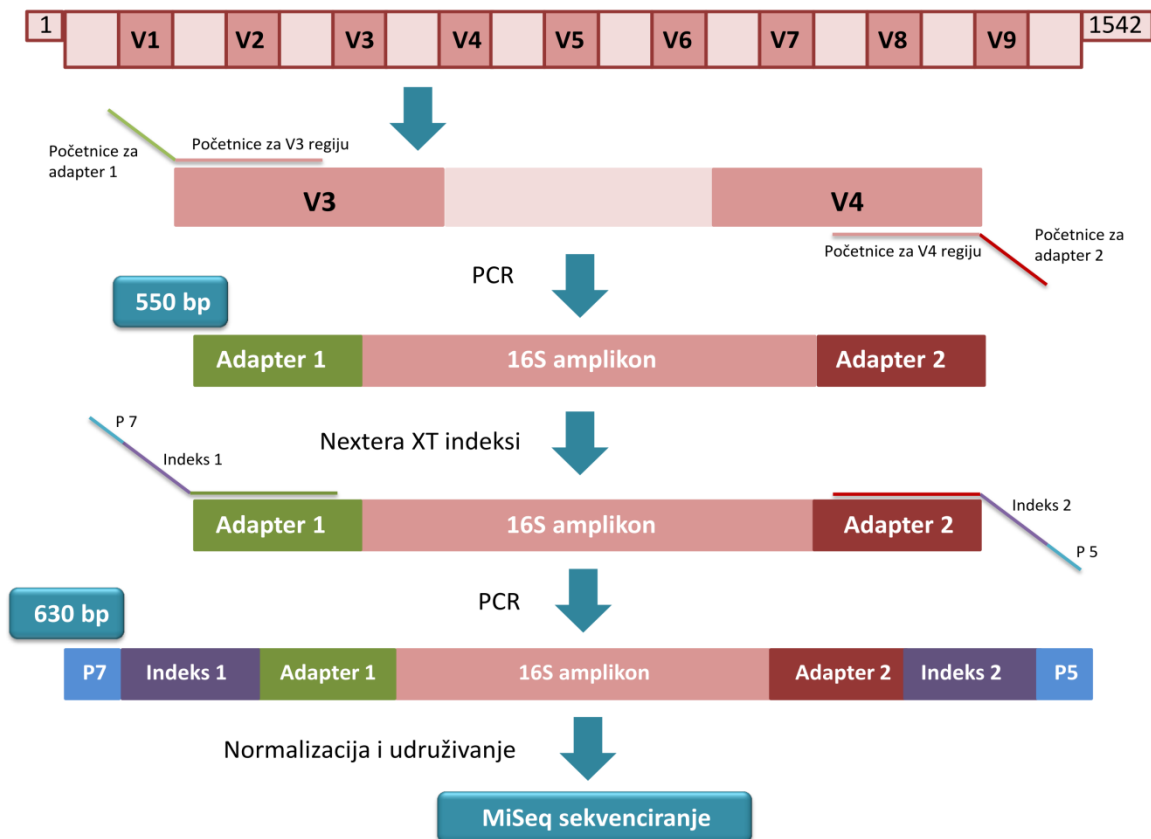
Budući da većinu bakterija koje nastanjuju probavni sustav za sada nije moguće uzgojiti u laboratoriju, za utvrđivanje sastava mikrobiote koristi se metoda **sekvenciranja nove generacije** (NGS) (93) koja je pogodna i za filogenetsku analizu i analizu ukupnog sastava genoma u nekom okolišnom uzorku – metagenoma (94). Tijekom sekvenciranja ljudskog genoma došlo je do razvijanja mnogih novih tehnika za sekvenciranje, koje su na temelju svojih karakteristika s vremenom postajale sve primjenjivije. Prednosti sekvenciranja nove generacije (NGS) temelje se na: i načinu pripreme uzoraka u obliku knjižnica (od eng. "*library*"), ii) tisuće do milijun reakcija koje se odvijaju istovremeno, iii) odvajanje fragmenata DNA bez elektroforeze. Navedene značajke sekvenciranja nove generacije omogućavaju dobivanje velikih količina podataka u kratkom vremenskom roku uz znatno manji financijski trošak (95,96).

NGS se temelji na principu sekvenciranja sintezom koje je slično Sangerovoj metodi, ali koristi modificirane dNTP-ove koji sadrže terminator koji blokira daljnju polimerizaciju i na taj način polimeraza može dodati samo jednu bazu na rastući lanac DNA. Terminator sadrži fluorescentne markere koji se mogu detektirati pomoću kamere (97). Dostupno je nekoliko različitih NGS tehnologija/platformi, a jedna od najpouzdanijih je **Illumina MiSeq platforma** koju je 2006. godine predstavila tvrtka Solexa (98).

MiSeq Illumina platforma, prema dostupnoj literaturi, predstavlja zlatni standard u analizi složenih bakterijskih zajednica iz kompleksnih uzoraka. Za sekvenciranje Illumina-om, DNA fragmenti se priređuju izotermnim "most PCR-om" (eng. "*bridge PCR*"), koji istodobno pojačava svaku molekulu DNA i povezuje fragmente s čvrstim supstratom da bi formirao skupine fragmenata DNA. Proces započinje pročišćavanjem DNA, koja se zatim izreže na manje fragmente, a na krajeve fragmenata se dodaju adapteri koji služe kao referentne točke tijekom sekvenciranja. Fragmenti DNA se dodaju na specijalizirane čipove na kojima se nalaze oligonukleotidi koji se vežu na komplementarne dijelove duž DNA. Nakon što se sitni fragmenti spoje za DNA, započinje faza umnažanja svake DNA u tisuće kopija koje se grupiraju zajedno (eng. "*cluster*"). Zatim se na čip nanese početnice i fluorescentno obilježeni nukleotidi s blokatorima na 3' kraju, pa se u svakom koraku dodaje samo jedan nukleotid. Skupine se zatim sekvenciraju kroz ponovljene cikluse produljivanja dodavanjem jedne baze upotrebom mješavine 4 fluorescentno obilježenih i reverzibilnih terminatorskih lanaca. Illumina sekvenciranje također omogućava sekvenciranje fragmenata s oba kraja. Na kraju svakog kruga sinteze, kamera snimi čip i na temelju valne duljine fluorescentne oznake računalno bilježi koja je baza dodana na fragment DNA (96,99). Sekvenciranje nove generacije vrlo je dinamično znanstveno i metodološko područje u kojem se tehnologija kontinuirano unapređuje. Kada je riječ o analizi mikrobiote, cilj je postići što veću „dubinu“ sekvenciranja kako bi se u idealnom slučaju omogućila identifikacija prisutnih bakterija do razine vrste te odredila njihova relativna zastupljenost. Sastav bakterija iz uzorka dobivene DNA utvrđuje se umnažanjem i sekvenciranjem gena za 16S rRNA primjenom Illumina MiSeq platforme (100,101).

Sekvenciranje gena za 16S rRNA predstavlja dobro definiranu metodu za utvrđivanje filogenetike i taksonomije u metagenomskim uzorcima tj. za utvrđivanje sastava bakterija koje nisu dostupne za uzgoj u laboratorijskim uvjetima, nego se njihova prisutnost može utvrditi samo na osnovi detekcije njihove DNA u uzorku (102). Gen za 16S rRNA veličine ~1500 baznih parova, sastoji se od 9 varijabilnih regija (V1 – V9) između kojih se nalaze konzervirane regije. Na temelju sekvenciranja V3-V4 varijabilnih regija određuje se sastav crijevne mikrobiote (*Slika 5*). Kvalitetna filogenetska stratifikacija bakterija u uzorcima ključni je korak u nastojanju da se

identificiraju potencijalni mikrobn biomarkeri povezani s nastankom i/ili progresijom upalnih bolesti crijeva.



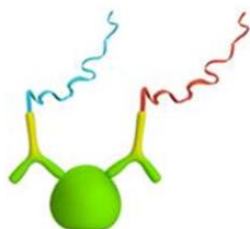
Slika 5. Sekvenciranje nove generacije pomoću MiSeq Illumina platforme, priprema 16S rRNA biblioteke. Na slici prikazan prvi korak umnažanja V3 – V4 varijabilnih regija gena 16S rRNA lančanom reakcijom polimeraze pomoću početnica koje na sebi osim dijelova koji se preklapaju s V3-V4 regijom, sadrže i dijelove koji su kompatibilni s Illumina indeksima i adapterima za sekvenciranje, što omogućava sekvenciranje s oba kraja i produkt umnažanja je amplicon od 464 baznih parova.

1.9. Imunodetekcijska metoda - analiza biomarkera iz seruma krvi

Postoje znatna odstupanja unutar pojedinaca u koncentraciji različitih proteina u serumu, što otežava primjenu tradicionalnih proteomskih tehnika (prilikom analize seruma pacijenata) kao što su dvodimenzionalna elektroforeza (eng. "2D gel electrophoresis") i tekuća kromatografija u sprezi s spektrometrijom masa (HPLC_MS). Nasuprot tome, imunološke/molekularno-biološke tehnike zasnovane na protutijelima i pridruženim oligonukleotidima za umnažanje i kvantifikaciju lančanom reakcijom polimeraze (PCR) nude kombinaciju visoke osjetljivosti i širokog kvantitativnog raspona pojedinih proteina, čime se izbjegavaju greške koje se javljaju radi različitih koncentracija proteina u vrlo malom volumenu uzorka (83,84). Pouzdan i validirani biomarkeri za upalne bolesti crijeva omogućili bi ranu dijagnozu bolesti i dali predikciju njenog razvoja, a time i olakšali liječnicima odluku o primjerenijoj terapiji. Također, jednostavna detekcija pouzdanog biomarkera ili više njih, bila bi omogućena primjenom neinvazivnog, jeftinog, brzog i reproducibilnog testa.

Detekcija upalnih čimbenika iz kompleksnih bioloških uzoraka krvi izuzetno je zahtjevan proces, posebice ukoliko je prikupljena mala količina uzorka, ili ako je koncentracija pojedinog čimbenika u uzorku niska. U tu svrhu korištena je nova i visoko osjetljiva imunodetekcijska metoda koja pomoću specifičnih protutijela koja na sebi imaju vezane oligonukleotide, umnažanjem DNA detektira i vrlo male količine proteina (eng. "Proximity Extension Assay", PEA) (85). **Imunodetekcijska metoda (PEA)** nova je „*state-of-the-art*“ tehnologija koja omogućava detekciju izuzetno malih količina proteina u složenim biološkim uzorcima (Slika 6), te se primjenjuje za kvantifikaciju odabranih čimbenika upale i predstavlja inovativni pokušaj evaluacije niza citokina/kemokina i raznih signalnih molekula u svrhu otkrića biomarkera uključenih u regulaciju IBD-a te uspostavi poveznica s crijevnom mikrobiotom bolesnika (84). Ova metoda omogućava kvantitativno određivanje upalnih čimbenika kao relevantnih biomarkera upalnih bolesti crijeva iz uzoraka krvi ispitanika.

1. Inkubacija



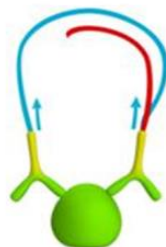
Protutijela obilježena oligonukleotidima vežu se na ciljani protein (*Proseek probe*)

2. Produljivanje



Produljivanje i stvaranje PCR amplikona

3. Detekcija



Amplifikacija i detekcija lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (qPCR)



Slika 6. Imunodetekcijska metoda (PEA) za analizu biomarkera iz seruma krvi. PEA metoda koristi dvije posebno konstruirane probe (protutijela obilježena karakterističnim slijedom oligonukleotida) za specifičnu detekciju ciljnog proteina u uzorcima. Nakon vezivanja obaju proba za ciljani protein, protutijela dolaze u neposrednu blizinu čime je omogućeno spajanje oligonukleotida te formiranje amplikona za lančanu reakciju polimerazom u realnom vremenu (qPCR) kojom se kvantificiraju PCR produkti (Dynamic Array IFC, Fluidigm Biomark) na uređaju Biomark HD.

Brojna istraživanja provedena tijekom posljednjih dvadesetak godina ukazala su na iznimno važnu ulogu mikrobiote u održavanju zdravlja, ali i razvoju mnogih bolesti, poput upalne bolesti crijeva, metaboličkog sindroma ili dijabetesa. Bolje razumijevanje uloge mikrobiote bitno je ne samo za održavanje homeostaze i zdravlja, nego i za kreiranje novih terapijskih modaliteta (32,86,103,104). Dijagnoza upalnih bolesti crijeva temelji se na kombinaciji simptoma, kliničkih pregleda, laboratorijskih nalaza, radiologiji, endoskopiji i histologiji. Analiza i kvantifikacija čimbenika upale kao potencijalnih biomarkera zahtjevan je i opsežan postupak, ali se rezultati uvelike mogu iskoristiti kao originalni doprinos u razvoju novih dijagnostičkih i/ili automatiziranih metoda. Razvijanje tako sofisticiranih biokemijskih testova, uvelike doprinosi i boljoj obradi pacijenata uz minimalnu količinu uzoraka.

U ovom istraživanju prikupljeni su uzorci tkiva sluznice kolona, uzorak fecesa i uzorak krvi rano dijagnosticiranih IBD pacijenata (ispitanici iznad 18 godina) koji prethodno nisu bili tretirani niti liječeni uobičajenom terapijom (antibiotici, kortikosteroidi, aminosalicilati, azatioprin, metotreksat, i ostali terapijski pristupi) i pacijenata sa sindromom iritabilnog kolona koji služe kao kontrolna skupina.

2. HIPOTEZA

Hipoteza istraživanja bila je da su kod pacijenata s upalnom bolesti crijeva: (i) promijene u sastavu crijevne mikrobiote kod različitih grupa ispitivanih pacijenata specifične i značajne; te (ii) da su povezane s upalnim statusom pacijenta i njegove bolesti.

3. CILJEVI RADA

Cilj ovog prospektivnog istraživanja bio je povezivanje najnovijih spoznaja iz područja temeljnih i kliničkih znanosti kako bi se utvrdili ključni parametri odgovorni za nastanak i razvoj upalnih bolesti crijeva i time stvorili preduvjeti za raniju i precizniju dijagnozu i uspješnije liječenje pacijenata.

Specifični ciljevi:

- Analiza sastava crijevne mikrobiote sekvenciranjem DNA iz uzoraka stolice i uzoraka tkiva sluznice kolona (dijelova bakterijskih 16S rRNA gena) kod pacijenata s upalnom bolesti crijeva (ulcerozni kolitis i Crohnova bolest) te ispitanika kod kojih upalna bolest crijeva nije potvrđena (kontrola).
- Kvantitativno određivanje upalnih čimbenika kao relevantnih biomarkera iz uzoraka krvi navedenih ispitanika metodom imunodetekcije (engl. *Proximity extension assay*, PEA).

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Dizajn studije i regrutacija pacijenata

Istraživanje prospektivnog tipa provedeno je u Centru za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u suradnji sa Zavodom za gastroenterologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Zavodom za gastroenterologiju Kliničke bolnice Dubrava. Informirani pristanak prikupljen je i potpisan od strane svih sudionika te su svi postupci bili provedeni sukladno odobrenom protokolu studije (Etički odbor Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, slučaj broj: 380-59-10106-14-55/149). Osobni podaci ispitanika pohranjeni su u elektroničkom obliku, a istraživači i suradnici bili su dužni u potpunosti poštivati propisane postupke za zaštitu osobnih podataka. U bazu podataka ispitanik je unesen prema inicijalima imena i prezimena i pomoću posebnog koda. Na taj način osiguralo se da ime ispitanika nikada ne bude otkriveno trećim osobama. Istraživanje je obuhvatilo 35 ispitanika s CD, UC i IBS dijagnozom (Tablica 2), a prikupljeni su i analizirani uzorci krvi, stolice te biopsije sluznice crijeva od svakog ispitanika. Krvni serum koristio se za analizu upalnih markera, a biopsija sluznice i uzorak fecesa za analizu sastava mikrobiote. Kriteriji za uključivanje ispitanika u istraživanje bili su: (a) odrasli pacijenti u dobi iznad osamnaest godina, (b) bolesnici s novodijagnosticiranom upalnom bolesti crijeva na temelju standardnih kliničkih, endoskopskih i radioloških kriterija, (c) pacijenti koji još nisu počeli uzimati terapiju za upalnu bolest crijeva (5-aminosalicilna kiselina, kortikosteroidi, TNF- α antitijela, azatioprin, 6-merkaptopurin), (d) pacijenti koji tijekom prethodna tri mjeseca nisu bili na terapiji antibioticima. Kriteriji za isključivanje ispitanika iz istraživanja su: (a) pacijenti mlađi od osamnaest godina, (b) pacijentice s potvrđenom trudnoćom ili koje planiraju trudnoću, (c) oboljeli od koronarne bolesti (d) oboljeli od dijabetesa, (e) oboljeli od kronične opstruktivne bolesti pluća, (f) oboljeli od kronične bubrežne insuficijencije, (g) oboljeli od malignih bolesti, (h) oboljeli od drugih autoimunih bolesti, (i) ispitanici koji boluju od bilo koje teže kronične bolesti, bolesti ovisnosti, teže psihijatrijske bolesti, (j) ispitanici za koje istraživač procijeni da iz bilo kojih razloga neće moći adekvatno surađivati u studiji. Kontrolnu skupinu čini 12 ispitanika koji su se javili sa simptomima upalnih bolesti crijeva (sindrom iritabilnog kolona - IBS), ali kod kojih bolest nije dijagnosticirana.

Tablica 2. Usporedba karakteristika CD, UC i IBS pacijenata

		Crohnova bolest (CD)	Ulcerozni kolitis (UC)	Sindrom iritabilnog crijeva (IBS)
Broj pacijenata	n	11	12	12
Spol	M/Ž	4/ 7	6/6	5/ 7
Starost (godine)	Raspon	21-72	18-53	22-56
	Srednja vrijednost	46	32,5	36

4.2. Prikupljanje uzoraka fecesa i izolacija DNA

Uzorci fecesa prikupljeni su na Zavodu za gastroenterologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Zavodu za gastroenterologiju Kliničke bolnice Dubrava, a analizirani su u Centru za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu prema protokolu opisanom u radu *Panek i sur.* (98). U svrhu analize sastava mikrobiote iz fecesa, regrutirano je 12 UC, 11 CD i 12 IBS kontrolnih pacijenata. Jedinstveni uzorak fecesa za svakog ispitanika prikupljen je novim komercijalnim kitom za prikupljanje fecesa pod nazivom OMNIgene.GUT, proizvođača DNA Genotek. Feces je prikupljen prema uputama proizvođača. Priloženim drvenim štapićem uzima se manja količina fecesa. Postupak se ponavlja dok predviđeni dio epruvete nije potpuno ispunjen. Epruveta se zatim energično i brzo miješa 30 sekundi pomicanjem gore-dolje te se tako uzorak pomiješa s tekućinom za stabilizaciju. Prema uputama proizvođača ovako prikupljen feces može biti na sobnoj temperaturi do 14 dana, bez utjecaja na količinu ili kvalitetu DNA.

Za izolaciju bakterijske DNA iz uzoraka fecesa korišten je *MP Biomedicals Fast DNA spin kit for feces* (MP Biomedicals, #116570200) dizajniran za brzu i učinkovitu izolaciju DNA iz svježih ili zamrznutih uzoraka ljudskog i životinjskog fecesa. Kit se sastoji od reagensa koji su pažljivo razvijeni za razbijanje stanica, pružajući zaštitu nukleinskim kiselinama nakon razgradnje stanica te olakšavaju izolaciju DNA iz stolice. U prvom koraku 250 µL OMNIgene.GUT uzorka fecesa miješa se s 825 µL natrij fosfata i 275 µL PLS otopine u matriks E tubicama za homogenizaciju. Uzorak se centrifugira, odlije se supernatant i na talog se dodaje 978 µL natrij fosfata i 122 µL MTT otopine. Uzorak se zatim homogenizira u Minilys homogenizatoru (Bertin

technologies) koji omogućava razaranje stanične stjenke i oslobađanje molekula DNA u otopinu. Nakon homogenizacije slijedi centrifugiranje i dalje se supernatant miješa s 250 μ L PPS otopine i inkubira 10 minuta na 4°C. Jedan mL uzorka prebacuje se na kolonice s filterom za vezanje DNA. DNA se ispiru 2 puta s 2 različita pufera i nakon toga se dodaje 100 μ L pufera za DNA stabilizaciju (TE). Uzorak se pohranjuje na -20°C.

4.3. Prikupljanje uzoraka biopsije sluznice crijeva i izolacija DNA

Uzorci biopsije sluznice crijeva prikupljeni su na Zavodu za gastroenterologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Uzorci sluznice crijeva prikupljeni su u dijelovima terminalnog ileuma za ulcerozni kolitis i kolona za Crohn-ovu bolest gdje je prisutna vidljiva upala. Uzorci tkiva odmah potom pohranjeni su na -80°C kako bi se spriječilo raspadanje tkiva i razgradnja enzimima te sačuvala cjelovitost molekula DNA. Za izolaciju bakterijske DNA iz tkiva korišten je *Epicentre MasterPure™ DNA Purification Kit* (Epicentre, #MC85200). Prema Epicentre protokolu i uputama proizvođača, 5mg svježeg ili smrznutog tkiva miješa se s 300 μ L pufera za razbijanje stanica i tkiva i 1 μ L proteinaze K. Prije izolacije DNA provodi se homogenizacija tkivnih uzoraka u Minilys homogenizatoru (Bertin technologies) pomoću Soil grinding kit SK38 (Bertin Pharma, # D34016) koji se sastoji od 0,1 mm staklenih zrnaca, 1,4 mm keramičkih zrnaca i jedne staklene kuglice od 4,0 mm. Nakon homogenizacije, uzorci se inkubiraju 15 minuta na 65°C. Uzorci se ohlade na sobnu temperaturu, doda se 5 μ g/ μ L RNase A i opet inkubira 30 minuta na 37°C. Poslije inkubacije provodi se taloženje proteina pomoću 175 μ L MPC reagensa. Supernatant se miješa s 600 μ L izopropanola, centrifugira i nastaje talog DNA. Talog se ispiru 2 puta u 70 postotnom etanolu i nakon toga dodaje 100 μ L TE pufera za DNA stabilizaciju i pohranjuje uzorak na -20°C.

4.4. Određivanje koncentracije DNA i provjera uspješnosti izolacije metodom PCR

Određivanje koncentracije izolirane DNA ključan je korak u metodologiji NGS sekvenciranja budući da je optimalna količina DNA koja se koristi u pripremi biblioteka za sekvenciranje jedan od značajnih parametara za postizanje kvalitetnih rezultata. Za mjerenje koncentracije DNA korištena su dva uređaja: Nanodrop 2000 i Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific). Oba uređaja rade na principu spektrofotometrije (apsorbancije za Nanodrop te fluorescencije za Qubit) no Qubit točnije i preciznije određuje koncentraciju dvolančane DNA te se zato koristi kao finalna i konačna provjera prije NGS sekvenciranja. Uspješnim umnažanjem gena za 16S rRNA pomoću PCR-a pokazana je zadovoljavajuća kvaliteta izolirane bakterijske DNA te odsutnost inhibitora reakcije PCR. Uzorci su umnoženi početnicama specifičnima za varijabilne regije V3 i V4 gena za 16S rRNA, a odgovarajući amplicon od ~460 parova baza detektiran je elektroforezom na agaroznom gelu.

4.5. Sekvenciranje i procesiranje DNA

Za analizu bakterijske DNA iz uzoraka fecesa i tkiva korišteno je sekvenciranje nove generacije pomoću Illumina MiSeq uređaja. Primijenjeni su reagensi, početnice i protokoli prema uputama proizvođača.

4.5.1. Priprema biblioteka 16S rRNA

Za konstrukciju biblioteka 16S rRNA korišten je Illumina MiSeq Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina, #FC-131-1096) prema uputama proizvođača. Prvi korak predstavlja PCR umnažanje V3 – V4 varijabilnih regija gena 16S rRNA pomoću početnica koje na sebi osim dijelova koji se preklapaju s V3-V4 regijom, sadrže i dijelove koji su kompatibilni s Illumina indeksima i adapterima za sekvenciranje, što omogućava sekvenciranje s oba kraja i produkt umnažanja je amplicon od 464 baznih parova (bp). PCR umnažanje provedeno je početnicama prema uputi *Klindworth i sur.* (105) i KAPA HiFi HotStart Ready Mix polimerazom koja ima najnižu stopu pogreške prilikom ugradnje nukleotida u lanac (1 pogreška na $3,6 \times 10^6$ ugrađenih nukleotida). Početnice na sebi imaju vezane adaptere koji moraju biti dodani sekvencama radi kompatibilnost s Illumina indeksima i adapterima za sekvenciranje (105).

4.5.2. Priprema predložaka za sekvenciranje

Nakon 25 ciklusa PCR umnažanja dobiveni amplikoni pročišćavaju se pomoću Agencourt AMPure XP zrnaca (Beckman Coulter, #A63881). Na tako pročišćene amplikone pomoću Nextera XT Index kita (Illumina, #FC-131-1002), PCR reakcijom umnažanja, dodaju se adapteri za sekvenciranje i dvostruki-indeks barkodovi. Nextera indeks kit omogućava označavanje do 384 uzorka u jednom eksperimentu. Nakon dodavanja dvaju indeksa svakom fragmentu DNA, po 96 uzoraka je grupirano i zajedno sekvencirano u pojedinom eksperimentu. Sekvenciranje je provedeno na MiSeq platformi (Illumina) s MiSeq Reagent Kit v3 (600 ciklusa, Illumina, #MS-102-3003) prema uputama proizvođača.

4.5.3. Procesiranje dobivenih sljedova

Izvorni podaci sekvenciranja (eng. "*raw data*") fragmenta gena 16S rRNA dolaze u formatu FASTQ koji sadržava podatke o očitanoj slijedi nukleotida i o kvaliteti očitavanja svakog pojedinog nukleotida i obrađeni su prema protokolu QIIME. Prvi korak predstavlja proces kraćenja/micanja (eng. "*trimming*") dijela originalnog slijeda koji ne zadovoljava minimalni kriterij kvalitete i tako obrađeni sljedovi nazivaju se filtrirani sljedovi. Uzorci čiji se sljedovi nukleotida podudaraju s minimalnom pokrivenošću od 97% i minimalnom identičnošću od 97% grupirani su u iste operacijske taksonomske jedinice (eng. "*Operational Taxonomic Units*", OTU) pomoću *vsearch* algoritma i PyNast svrstavanjem unutar baze podataka GreenGenes (verzija 13_8, May 2013) implementiranih u programskom paketu QIIME. Ukupni brojevi OTU za svaku razinu taksonomije od koljena do roda, izdvojeni su u zasebne tablice. Naknadna obrada i analiza napravljena je za svaku taksonomsku razinu odvojeno u skladu i prema uputi Gloor CoDa Microbiome protokola, koristeći paket ALDeX2, s dodatkom multivarijatnih generaliziranih linearnih modela za testiranje višestrukih čimbenika i njihovih interakcija (98,106–108).

4.6. Analiza podataka sekvenciranja

4.6.1. Normalizacija i analiza operacijskih taksonomskih jedinica (OTU)

Dobiveni podaci sekvenciranja spadaju u kategoriju kompozicijskih podataka i statističke analize su izvedene prema protokolu (106–108). Pristup uključuje Bayesovu multiplikativnu zamjenu nula i transformaciju operativnih taksonomskih jedinica log-omjer (clr) centriranjem. Originalni OTU na taksonomskim razinama od roda do koljena, transformirani su u kompozicijske vrijednosti pomoću programa ALDEx2 (analiza diferencijalne ekspresije poput ANOVA) i R. Transformirani podaci su nadalje testirani pomoću *Kruskal-Wallisovog* multivarijatnog testa za otkrivanje ukupnog značaja za svaku varijablu po operativnim taksonomskim jedinicama. Testovi su izvedeni na 128 Monte Carlo simuliranih primjeraka i Dirichlet-distribuiranih izvornih podataka kako bi se procijenile tehničke varijacije po pojedinom uzorku. Sve p -vrijednosti se uzimaju u obzir nakon prilagodbe za višestruko testiranje s *Benjamini-Hochberg* (BH) korekcijom, te se $p < 0,05$ smatra statistički značajnim. Paralelne usporedbe transformiranih podataka provedene su za grupe Crohnova bolest, ulcerozni kolitis i kontrolna skupina na razini od koljena do roda (koljeno, razred, red, porodica, rod) (98).

4.6.2. Analiza glavnih koordinata

Analiza glavnih koordinata predstavlja projekciju multivariantnih opažanja na nove pravokutne osi, na koje se nanose osnovne komponente i koje su linearne kombinacije originalnih varijabli. Osnovne koordinate su svojstveni vektori matrice varijanca-kovarijanca. Osnovna analiza koordinati (eng. "*Principal coordinates analysis*", PCoA) prikazana je na nulte imputirane i clr transformirane brojeve pomoću funkcije 'prcomp' u programu R.

4.6.3. Analiza alfa i beta raznolikosti

Kompozicijska raznolikost unutar svakog uzorka/grupe utvrđuje se upotrebom nekoliko indeksa raznolikosti koji su implementirani u protokol QIIME (OTU-i, PD stablo, Chao1 alfa indeksi). Beta raznolikost mjerena je preko "weighted UniFrac distance", tj. težinske UniFrac metrike koja pri izračunu udaljenosti zajednica uzima u

obzir prisutnost i zastupljenost pojedine taksonomske jedinice. Za vizualizaciju usporedbe sastava mikrobiote između svih uzoraka korištena je PCoA analiza glavnih koordinata. Metoda PCoA smješta uzorke u trodimenzionalni okvir na temelju udaljenosti koja je određena metrikom UniFrac.

4.7. Prikupljanje uzoraka krvi

Uzorci krvi ispitanika prikupljeni su na Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centru Zagreb nakon potpisivanja informiranog pristanka te prije kolonoskopije i obrađeni standardnom institucionalnom procedurom za dobivanje seruma. U svrhu analize sastava upalnih markera iz seruma, regrutirano je 13 UC, 10 CD i 12 IBS kontrola. Krv se sakupljala u serumske epruvete (2mL), a zatim centrifugirala 10 minuta na 3500 okretaja. Nakon centrifugiranja odvojen je serum, alikvotiran u kriotubice po 400 μ L i pohranjen na -80° C.

4.8. Procesiranje uzoraka seruma (PEA metoda)

Detekcija i analiza čimbenika upale kao potencijalnih biomarkera upalnih bolesti crijeva provedena je najsuvremenijom imunodetekcijskom metodom (engl. "*Proximity extension assay*" - PEA) na komercijalno dostupnom upalnom panelu, ProSeek Multiplex Inflammation I 96x96 (Olink Proteomics, Uppsala, Švedska) koji se sastoji od 92 prethodno odabranih upalnih proteina (niza citokina, kemokina, transkripcijskih čimbenika rasta). Određivanje količine biomarkera iz 1 μ l seruma krvi s osjetljivošću od 0,01 do 10.000 pM provedeno je na 3 različite grupe: Crohn-ova bolest, ulcerozni kolitis i kontrolni ispitanici sa sindromom iritabilnog kolona (IBS). Analize su provedene na Clinical Biomarkers Facility, Science for Life Laboratory, Uppsala, Švedska.

4.9. Analiza proteina

4.9.1. Normalizacija i statistika

Svi proteini u ispitivanoj skupini normalizirani su pomoću kvantilne normalizacije, a koncentracije proteina ispod LOD-a (granica detekcije, eng. "*Limit of Detection*") postavljena je na nulu. Količine dobivenih proteina prikazane su kao normalizirane log₂ vrijednosti proteina pomoću Olink Wizard za GenEx (Multid Analyzes, Švedska) i predstavljaju „Ct“ (eng. "*threshold cycle*", Ct) vrijednosti normalizirane oduzimanjem vrijednosti za kontrolu. Sve karakteristike ispitivanja uključujući ograničenja detekcije i mjerenja izvedbe ispitivanja i validacije dostupne su na web stranici proizvođača (<http://www.olink.com/products/proseek-multiplex/downloads/>). Za testiranje značajnosti upalnih biomarkera među grupama CD, UC i IBS, rađena je univarijatna analiza varijance ANOVA, a za višestruko uspoređivanje korišten je *Tukey test*. Razina statističke značajnosti (p) postavljena je na $p < 0,05$. Podaci su analizirani upotrebom programske podrške GraphPad Prism softvera (7.00).

5. REZULTATI

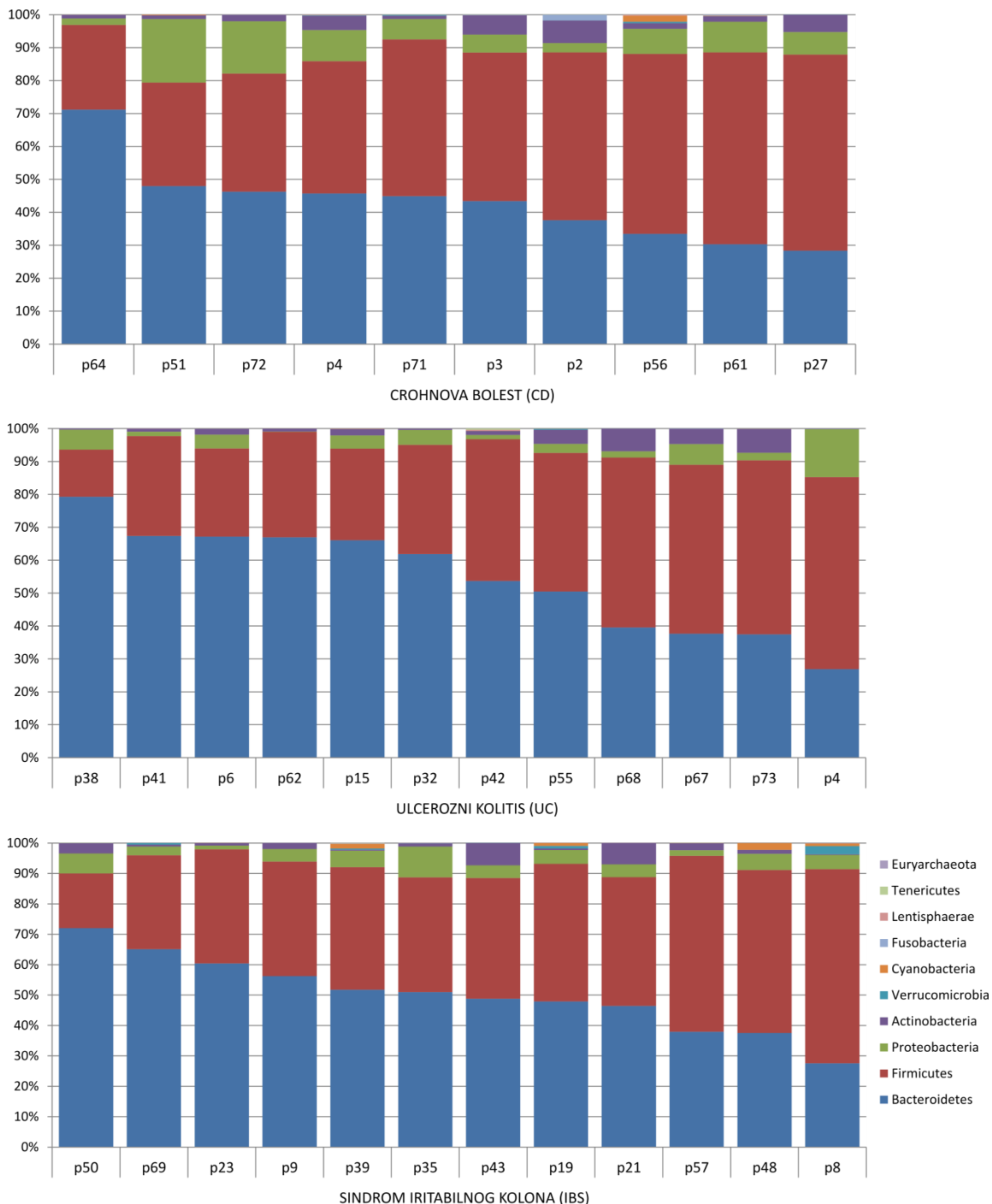
U sklopu istraživanja regrutirani su punoljetni pacijenti s rano dijagnosticiranom Crohnovom bolesti (CD) i ulceroznim kolitisom (UC). Kao kontrolna skupina u istraživanje su uključeni pacijenti sa sindromom iritabilnog kolona (IBS), koji pokazuju simptome crijevnih poremećaja. Ispitanici nisu prethodno tretirani protuupalnim lijekovima niti antibioticima te predstavljaju takozvane „naïve“ pacijente. Uključeno je ukupno 35 ispitanika. Uzorci fecesa i krvi prikupljeni su po prijemu, a uzorci sluznice kolona tijekom prve kolonoskopije. Nakon adekvatne obrade i spremanja prikupljenih uzoraka provedena je analiza sastava mikrobiote iz uzoraka fecesa i uzoraka sluznice kolona te analiza upalnih biomarkera iz krvnog seruma za svakog ispitanika.

5.1. Analiza sastava mikrobiote fecesa

5.1.1. Taksonomska analiza

Za utvrđivanje sastava mikrobiote u fecesu analizirano je 35 ispitanika s rano dijagnosticiranom upalnom bolesti crijeva, CD (n=11), UC (n=12) i IBS (n=12) u dobi od 18-72 godine. Demografski podaci uključuju 20 žena (Ž) i 15 muškaraca (M); (4M i 7Ž u CD, 6M i 6Ž u UC i 5M i 7Ž u IBS) srednje dobi 46 (CD), 32,5 (UC) i 36 (IBS). Rezultati prikazani na Slikama 7 do 9 pokazuju detaljnu taksonomsku analizu na razinama od roda do koljena, budući da je na tim razinama najveća pokrivenost grupiranih operacijskih taksonomskih jedinica (>85%). Relativna zastupljenost taksonomskih jedinica koje su detektirane u svim uzorcima, prikazana je pomoću stupičastih dijagrama za svaki uzorak koji su zatim grupirani prema dijagnozi. Relativna zastupljenost analizirane mikrobiote pokazuje promjene u taksonomskoj raznolikosti na razini koljena. Stupičasti dijagrami pokazuju zastupljenost bakterijskih koljena unutar IBD (CD i UC) pacijenata i kontrolnih uzoraka (IBS). Iz Slike 7 vidljivo je da su u svim ispitivanim grupama dva najzastupljenija koljena *Bacteroidetes* (IBS medijan=49,90%; UC medijan=46,76%; CD medijan=44,16%) i *Firmicutes* (IBS medijan=39,99%; UC medijan=37,68%; CD medijan=46,33%) te se njihova zastupljenost i brojnost ne mijenja značajno među grupama. Druga dva koljena po zastupljenosti su koljeno *Proteobacteria* (CD median=7,23%, IBS median=4,37%, UC

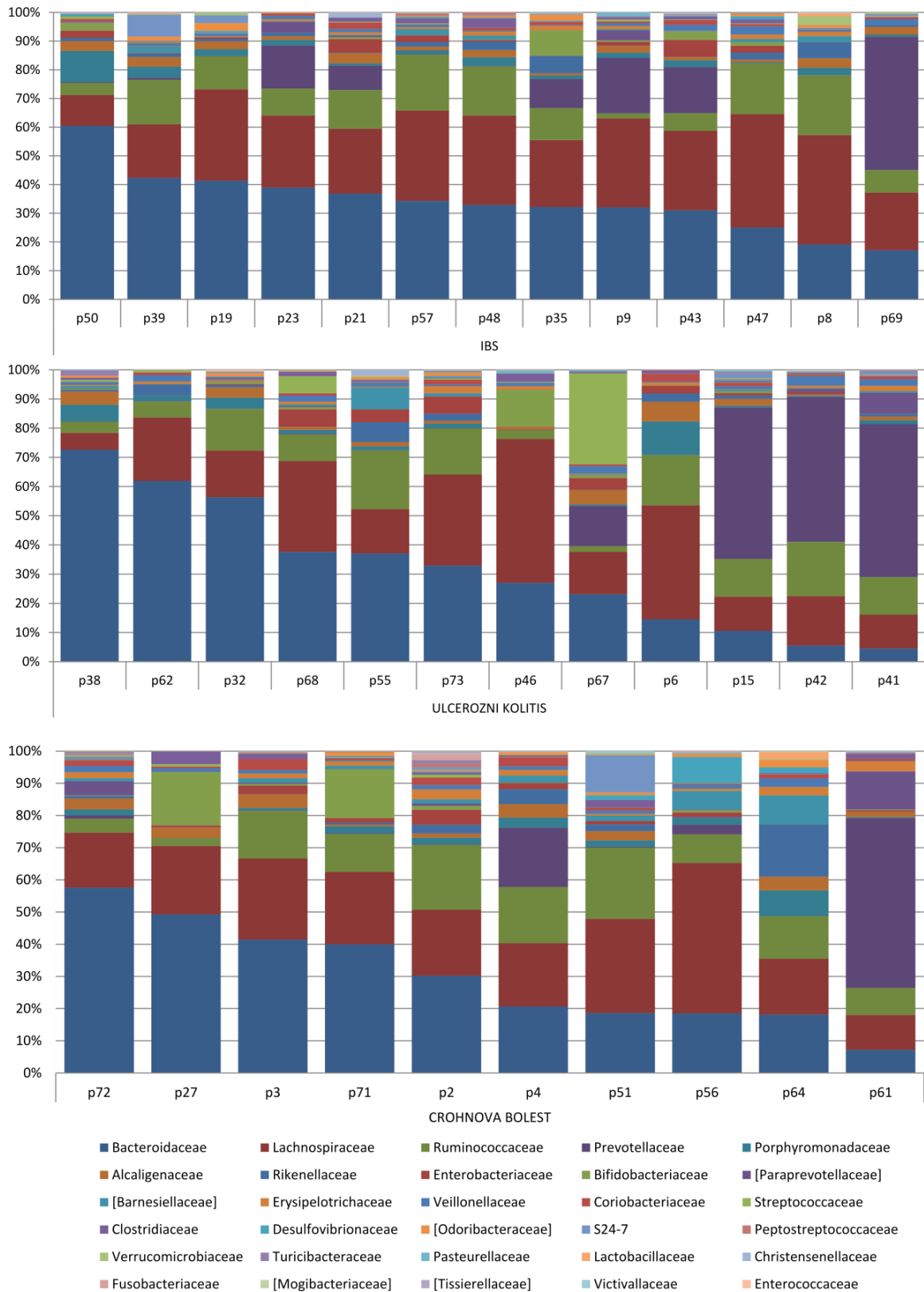
median=3,38%) i koljeno *Actinobacteria* ((CD median=1,85%, IBS median=1,17%, UC median=1,51%).



Slika 7. Analiza relativne zastupljenosti taksona iz uzorka fecesa za pojedinog pacijenta na razini koljena za Crohnovu bolest (n=10), ulcerozni kolitis (n=12) i sindrom iritabilnog kolona (IBS) (n=12)

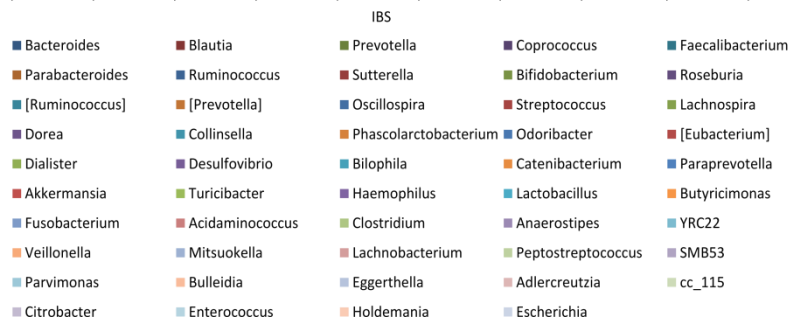
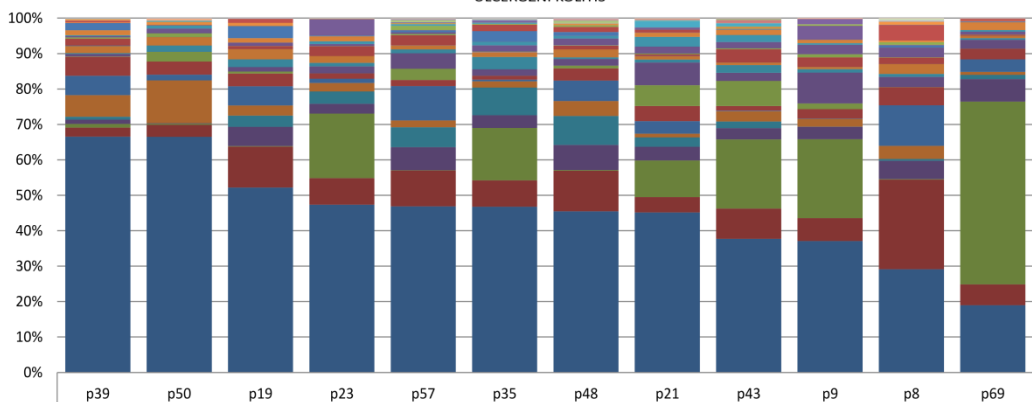
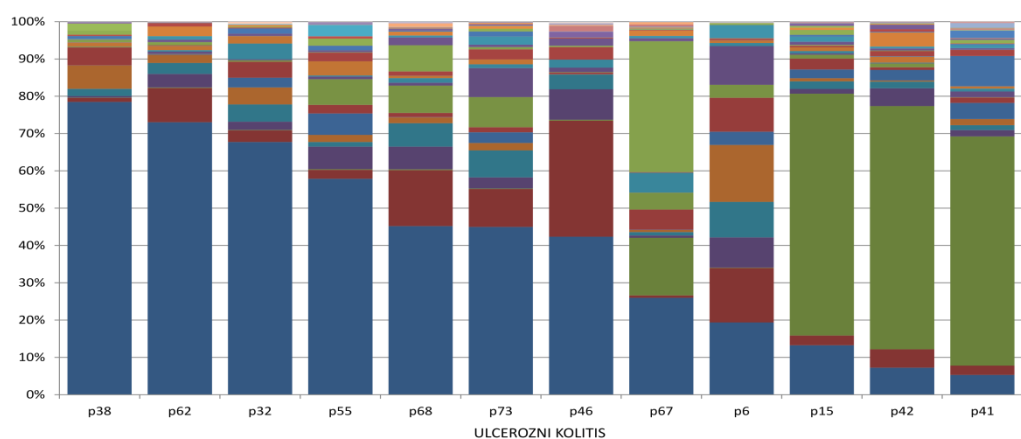
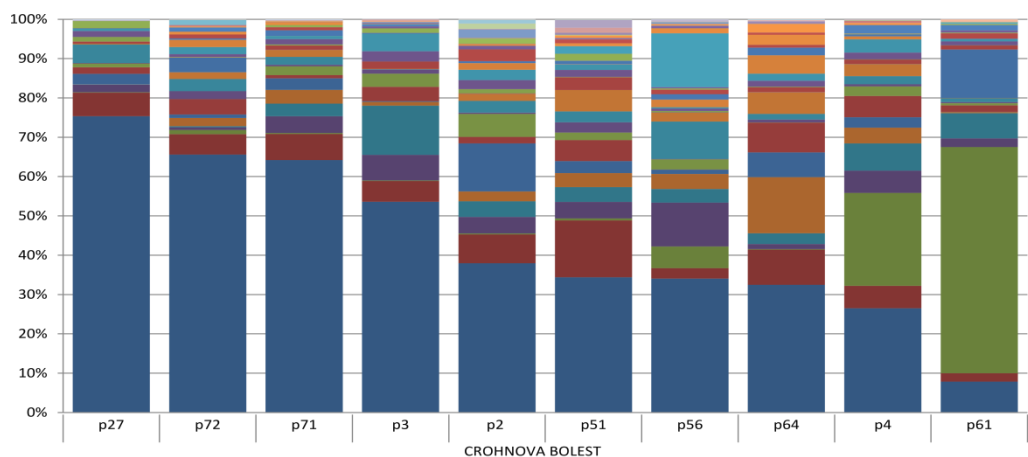
Na Slici 8 prikazana je relativna zastupljenost taksona na razini porodice unutar IBD pacijenata i kontrolnih uzoraka (IBS). Rezultati sumirani prema grupama i iskazani kao medijani, pokazuju sljedeće. Najzastupljenije su porodice *Bacteroidaceae* (IBS medijan=32,91%; UC medijan=29,99%; CD medijan=25,43%), *Lachnospiraceae* (IBS medijan= 27,67%; UC medijan=16,49%; CD medijan=20,88%) i *Ruminococcaceae* (IBS medijan= 11,54%; UC medijan= 12,89%; CD medijan= 12,54%). Postotak pokrivenosti OTU-a za prve tri porodice iznosi od 58-72% (CD 58,8%, UC 59,37%, IBS 72,12%).

Najveću razliku u porodicama među grupama vidimo kod porodice *Lachnospiraceae* (IBS medijan= 27,67%; UC medijan=16,49%; CD medijan=20,88%) i porodice *Prevotellaceae* (IBS medijan= 0,68%; UC medijan=0,15%; CD medijan=0,23%).



Slika 8. Analiza relativne zastupljenosti taksona iz uzorka fecesa za pojedinog pacijenta na razini porodice za Crohnovu bolest (n=10), ulcerozni kolitis (n=12) i sindrom iritabilnog kolona (IBS) (n=12)

Na Slici 9 prikazana je relativna zastupljenost taksonomskih jedinica na razini roda unutar CD, UC i kontrolnih grupa uzoraka (IBS). Rezultati sumirani prema grupama i iskazani kao medijani, pokazuju sljedeće. Tri najzastupljenija roda predstavljaju rodovi *Bacteroides* (IBS medijan=46,14%; UC medijan=43,65%; CD medijan=36,16%), *Blautia* (IBS medijan=7,45%; UC medijan=4,04,% i UC medijan=5,85%) i *Prevotella* (IBS medijan=5,72%; UC medijan=0,20% i UC medijan=0,39%). Postotak pokrivenosti OTU-a za prva tri roda iznosi od 42,4-59,31% (CD 42,4%, UC 47,9%, IBS 59,31%). Najveću razliku među grupama vidimo kod rodova *Blautia* i *Prevotella*.



Slika 9. Analiza relativne zastupljenosti taksona iz uzorka fecesa za pojedinog pacijenta na razini roda za Crohnovu bolest (n=10), ulcerozni kolitis (n=12) i sindrom iritabilnog kolona (IBS) (n=12)

5.1.2. Statistička analiza najzastupljenijih taksona u uzorcima fecesa

Rezultati relativne zastupljenosti na razini koljena, porodice i roda (Slika 6, 7 i 8) ukazuju na postojanje razlika među ispitivanim uzorcima, a detaljna analiza pokazala je značajne promjene povezane s određenom dijagnozom. Nakon normalizacije izvornih podataka sekvenciranja, provedena je statistička analiza. Za analizu značajnosti bakterijskih taksona na svim razinama koristila se veličina učinka i Kruskal-Wallisov multivarijantni test za otkrivanje ukupnog značaja po operativnim taksonomskim jedinicama. Paralelne usporedbe taksona provedene su za grupe CD, UC i IBS (koljeno, razred, red, porodica, rod). Statistička analiza taksona na temelju veličine učinka i prema Kruskal-Wallisovom testu, upućuje na postojanje značajnih razlika u zastupljenosti pojedinih taksona na svim razinama između sve tri grupe pacijenata, CD i IBS, UC i IBS, CD i UC (veličina učinka je mala ($\leq -0,2$ i $\geq 0,2$), srednje velika ($\leq -0,5$ i $\geq 0,5$) i velika ($\leq -0,8$ i $\geq 0,8$)).

Posebice izražene razlike uočene su u povećanju brojnosti koljena *Actinobacteria* i koljena *Proteobacteria* i roda *Lachnobacterium* kod CD, te povećanju brojnosti reda *Turicibacterales* ($p=0,01$), porodice *Turicibacteraceae* ($p=0,009$) i porodice *Veillonellaceae* ($p=0,03$) i rodova SMB53 ($p=0,02$) i roda *Turicibacter* ($p=0,009$) kod UC u odnosu na IBS kontrolne pacijente.

Međusobna usporedba uzoraka pacijenata s IBD-om također pokazuje određene razlike u zastupljenosti taksona na svim razinama. Statistička analiza je pokazala da su koljena *Proteobacteria* i *Verrucomicrobia* ($p=0,03$), te rodovi *Clostridium* ($p=0,01$), *Coprococcus*, *Dorea* i *Escherichia* zastupljeniji kod CD pacijenata, a razredi *Bacilli* ($p=0,02$) i *Synergistia* i red *Lactobacillales* zastupljeniji kod UC pacijenata (Tablica 3).

Tablica 3. Analiza taksona na razini fecesa između CD, UC i IBS grupa na temelju veličine učinka (eng. "effect size") i sa statističkom značajnosti prema *Kruskal-Wallisovom testu* ($p < 0,05$), bez BH korekcije

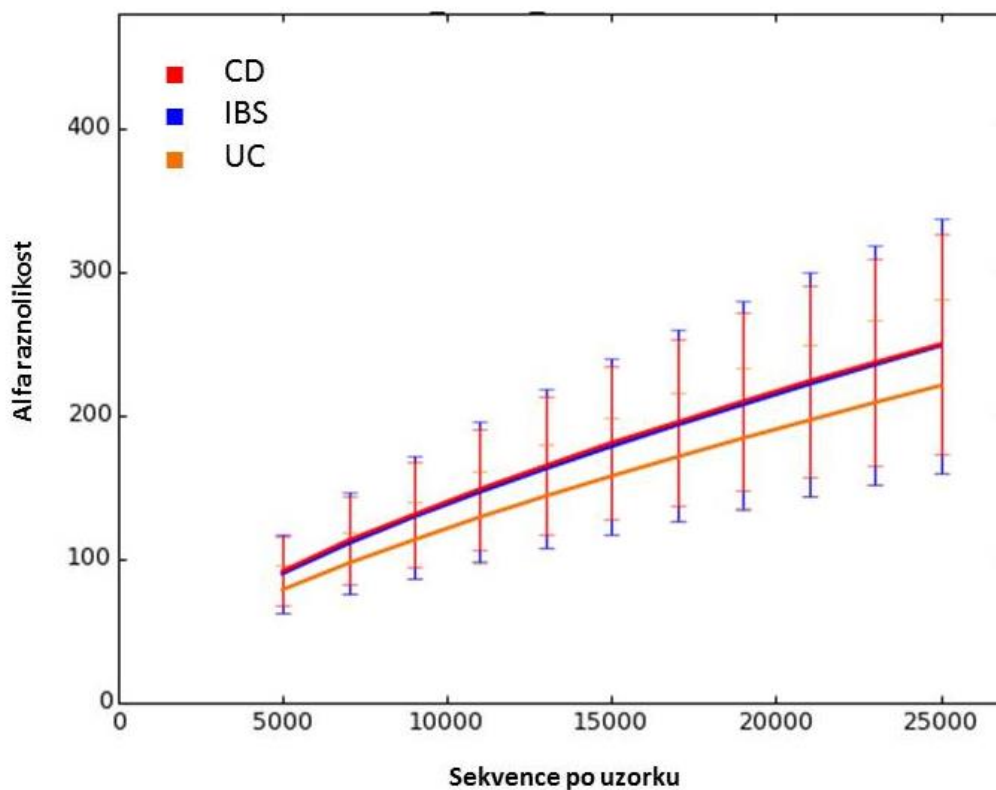
Veličina učinka			
	CD:IBS	UC:IBS	CD:UC
Koljeno			
<i>Actinobacteria</i>	0,5664		
<i>Proteobacteria</i>	0,5061		0,5599
<i>Verrucomicrobia</i>			0,7127*
Razred			
<i>Bacilli</i>			-0,5875*
<i>Synergistia</i>			-0,5351
Red			
<i>Turicibacterales</i>		0,7381*	
<i>Lactobacillales</i>			-0,5150
Porodica			
<i>Enterococcaceae</i>	-0,5850		
<i>Turicibacteraceae</i>		0,6994*	
<i>Veillonellaceae</i>		0,6564*	
Rod			
<i>Lachnobacterium</i>	0,5378		
<i>SMB53</i>		0,5367*	
<i>Turicibacter</i>		0,7330*	
<i>Clostridium</i>			0,7219*
<i>Coprococcus</i>			0,5176
<i>Dorea</i>			0,5324
<i>Escherichia</i>			0,5423

(*) predstavlja $p < 0,05$ bez BH korekcije

(-) negativan predznak manja brojnost taksona kod CD i UC

5.1.3. Analiza alfa i beta raznolikost

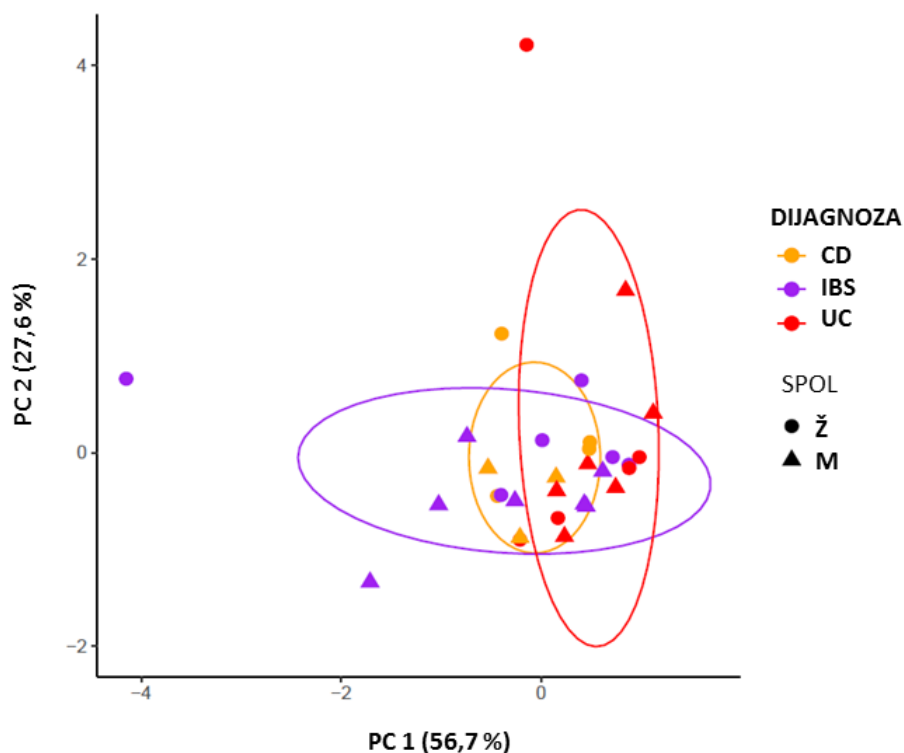
Indeks alfa raznolikosti odražava raznolikost i brojnost vrsta unutar pojedinog uzorka. Za vizualizaciju alfa raznolikosti koriste se regresijske krivulje. Na Slici 10 su prikazane rarefrakcijske krivulje za svakog pacijenta unutar CD (crvena krivulja), UC (narančasta krivulja) i IBS (plava krivulja) grupe. Indeks alfa raznolikosti (prikazan PD cijelo drvo) pokazuje da brojnost vrsta i raznolikost varira među svakom grupom. UC grupa pokazuje manju raznolikost bakterijskih vrsta u usporedbi s grupom CD i IBS (Slika 10).



Slika 10. Alfa raznolikost nakon rarefrakcije (PD indeks) na temelju brojnosti zajednica i raznolikosti za svaki uzorak unutar grupa CD (crvena boja), UC (narančasta boja) i IBS (plava boja).

Beta raznolikost predstavlja raznolikost između više uzoraka unutar neke grupe ili među grupama. Za vizualizaciju strukture mikrobnih zajednica CD, UC i kontrolnih ispitanika koristi se analiza glavnih koordinata (eng. "*Principal coordinates analysis*" – PCoA). Uzorci se smještaju unutar trodimenzionalnog okvira na temelju međusobne raznolikosti. PCoA analiza među komponentama PC1 i PC2 na Slici 11

prikazuje određenu razinu grupiranja prema dijagnozi, iako u određenom postotku postoje preklapanja među grupama. U crvenom obroču koji se najmanje preklapa s ljubičastim obročem koji čine IBS kontrole nalaze se UC pacijenti, dok CD pacijenti većim dijelom narančastog obroča ulaze unutar IBS kontrole (Slika 11). Na temelju udaljenosti obroča u PCoA analizi vidimo da se UC pacijenti najviše razdvajaju i razlikuju od kontrolne skupine IBS pacijenata, dok su po raznolikosti UC pacijenti bliži kontrolnoj skupini.



Slika 11. Beta raznolikost - za vizualizaciju strukture mikrobnih zajednica CD, UC i IBS kontrolnih ispitanika koristi se analiza glavnih koordinata (eng. "Principal coordinates analysis" – PCoA). PCoA analiza među koordinatama PC1 i PC2 prikazuje određenu razinu grupiranja prema dijagnozi UC (crveno), CD (narančasto) i IBS (ljubičasto), iako u određenom postotku postoje preklapanja među grupama.

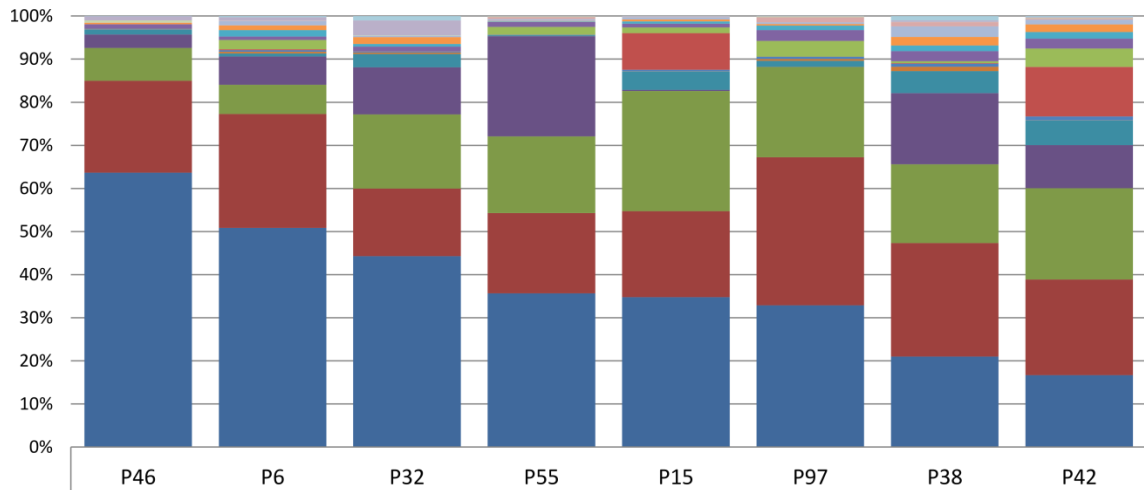
5.2. Analiza sastava mikrobiote iz sluznice crijeva

5.2.1. Taksonomska raznolikost

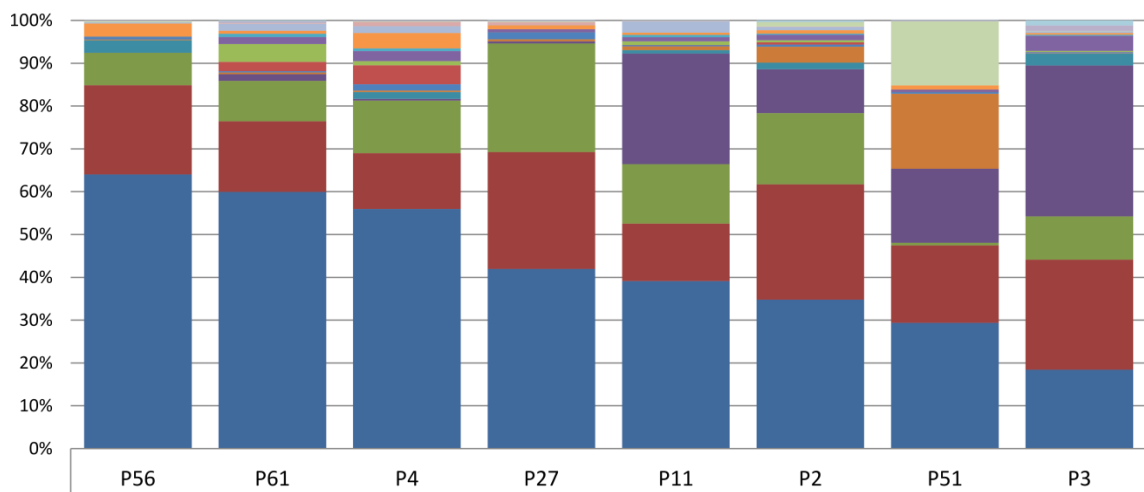
Za analizu sastava mikrobiote iz sluznice crijeva obrađeni su uzorci prikupljeni kod 24 pacijenata kojima je bolest rano dijagnosticirana, CD (n=8), UC (n=8) i IBS (n=8) u rasponu od 27-72 godine. Demografski podaci uključuju 12 žena (Ž) i 12 muškaraca (M) (4M i 4Ž u CD, 5M i 3Ž u UC i 3M i 5Ž u IBS) srednje dobi 47,5 (CD), 31 (UC) i 33 (IBS). Uzorci tkiva prikupljeni su tijekom rutinske kolonoskopije. Prikazani rezultati pokazuju detaljnu taksonomsku analizu na razini porodice. Relativna zastupljenost bakterijskih porodica koje su detektirane u svim uzorcima, prikazana je pomoću stupičastih dijagrama za svaki uzorak koji su grupirani prema dijagnozi (Slika 12).

Relativna zastupljenost analizirane mikrobiote na Slici 12 pokazuje promjene u taksonomskoj raznolikosti na razini porodice. Stupičasti dijagrami pokazuju zastupljenost bakterijskih porodica unutar skupina IBD pacijenata i IBS kontrola. Iz slike je vidljivo da su u svim ispitivanim grupama tri najzastupljenije porodice *Lachnospiraceae* (IBS medijan=38,99%; UC medijan=34,79%; CD medijan=39,02%), *Bacteroidaceae* (IBS medijan=22,27%; UC medijan=21,45%; CD medijan=20,82%) i *Ruminococcaceae* (IBS medijan=9,01%; UC medijan=17,53%; CD medijan=10,13%). Brojnost porodice *Ruminococcaceae* kod UC-a je veća naspram druge dvije grupe CD i IBS (Slika 12).

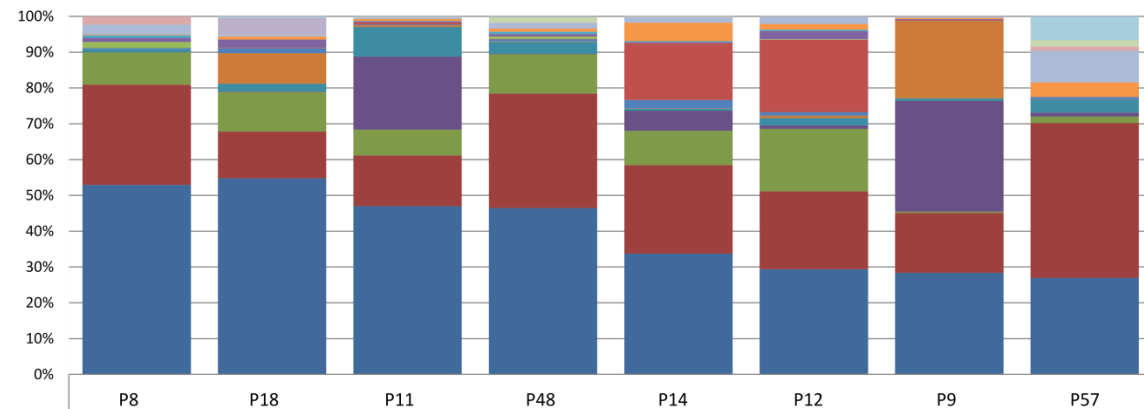
Brojnost najzastupljenijih porodica unutar svake grupe, smanjuje se u određenim uzorcima, kako brojnost porodice *Lachnospiraceae* opada tako raste brojnost porodice *Ruminococcaceae* kod UC pacijenata, porodice *Enterobacteriaceae* kod CD pacijenata i porodice *Bacteroidaceae* kod IBS pacijenata. Ukupni postotak zastupljenosti prve tri porodice čini 73,77% za UC, 69,98% za CD i 70,28% za IBS, dok preostali postotak otpada na 20-tak manje zastupljenih porodica.



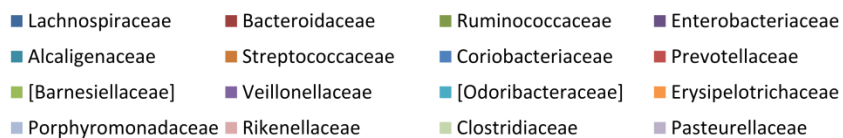
ULCEROZNI KOLITIS



CROHNOVA BOLEST



SINDROM IRITABILNOG KOLONA



Slika 12. Relativna zastupljenost bakterija u sluznici kolona za svakog pacijenta na razini porodice za Crohnovu bolest (n=8), ulcerozni kolitis (n=8) i sindrom iritabilnog kolona (IBS) (n=8)

5.2.2. Statistička analiza najzastupljenijih taksona u sluznici kolona

Nadalje, provedena je detaljna statistička analiza koja nam ukazuje na postojanje specifičnih promjena unutar taksona koje su povezane s pojedinom dijagnozom (CD, UC i IBS). Uočene su razlike na temelju veličine učinka (veličina učinka je mala ($\leq -0,2$ i $\geq 0,2$), srednje velika ($\leq -0,5$ i $\geq 0,5$) i velika ($\leq -0,8$ i $\geq 0,8$)) (eng. "effect size") i statističke značajnosti prema *Kruskal-Wallisovom* testu ($p < 0,05$), ali ne i nakon BH korekcije (*Tablica 4*). Statistička analiza podataka upućuje na postojanje razlika u zastupljenosti taksona na svim razinama između sve tri grupe pacijenata (veličina učinka je mala, srednje velika i velika).

Taksoni koji pripadaju razredima *Coriobacteria* i *Actinobacteria*, redu *Bifidobacteriales* ($p = 0,03$), porodicama *Clostridiaceae* i *Pasteurellaceae* te rodovima *Collinsella*, *Dialister* ($p = 0,022$), *Haemophilus* i *Ruminococcus* pokazuju veću brojnost kod CD pacijenata u odnosu na kontrolnu IBS skupinu. S druge strane, porodica *Brevibacteriaceae* i rodovi *Butyricimonas* i *Prevotella* zastupljeniji kod kontrolne IBS skupine u odnosu na CD skupinu (*Tablica 4*).

Usporedbom brojnosti taksona između UC i IBS skupine, uočeno je da taksoni koji pripadaju redovima *Oceanospirillales* i *Turicibacterales*, porodicama *Clostridiaceae*, *Comamonadaceae* i *Oceanospirillaceae* te rodovima *Delfia*, *Lachnobacterium* i *Marinomonas* pokazuju veću brojnost kod UC pacijenata u odnosu na kontrolnu IBS skupinu. Međutim, porodice *Actinomycetaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Neisseriaceae*, *Oxalobacteraceae* ($p = 0,011$), *Porphyromonadac*, *Sphingomonadace* ($p = 0,034$) i *Streptococcaceae* te rodovi *Ruminococcus*, *Actinomyces*, *Collinsella*, *Coprococcus* i *Lactobacillus* pokazuju veću brojnost kod IBS pacijenata (*Tablica 4*).

Tablica 4. Analiza taksona u sluznici kolona između CD, UC i IBS grupa na temelju veličine učinka (>0,5) i statističke značajnosti prema *Kruskal-Wallisovom* testu ($p < 0,05$), bez BH korekcije.

Veličina učinka (>0,5)					
	CD vs IBS	UC vs IBS		CD vs IBS	UC vs IBS
Razred			Porodica		
<i>Actinobacteria</i>	0,5126		<i>Barnesiellaceae</i>	0,7130	
<i>Coriobacteriia</i>	0,6094		<i>Bifidobacteriaceae</i>	0,7697*	
Red			<i>Clostridiaceae</i>	0,5319	0,5130
<i>Bifidobacteriales</i>	0,8513*		<i>Coriobacteriaceae</i>	0,6121	
<i>Coriobacteriales</i>	0,6499		<i>Pasteurellaceae</i>	0,7177	
<i>Neisseriales</i>		-0,5858	<i>Prevotellaceae</i>	-0,5624	
<i>Oceanospirillales</i>		0,6796	<i>Brevibacteriaceae</i>	-0,5391	
<i>Turicibacterales</i>		0,5177	<i>Actinomycetaceae</i>		-0,6437
Rod			<i>Carnobacteriaceae</i>		-0,5344
<i>Bifidobacterium</i>	0,7499*		<i>Comamonadaceae</i>		0,6024
<i>Collinsella</i>	0,5837		<i>Lactobacillaceae</i>		-0,5982
<i>Dialister</i>	0,9487*		<i>Neisseriaceae</i>		-0,6200
<i>Haemophilus</i>	0,6833		<i>Oceanospirillaceae</i>		0,6596
<i>Ruminococcus</i>	0,6994		<i>Oxalobacteraceae</i>		-0,9634*
<i>Brevibacterium</i>	-0,5487		<i>Porphyromonadac</i>		-0,5298
<i>Butyricimonas</i>	-0,5412		<i>Sphingomonadace</i>		-0,8354*
<i>Prevotella</i>	-0,5635		<i>Streptococcaceae</i>		-0,5046
[<i>Ruminococcus</i>]		-0,6102			
<i>Actinomyces</i>		-0,6295			
<i>Collinsella</i>		-0,5751			
<i>Coprococcus</i>		-0,5555			
<i>Delfia</i>		0,6648			
<i>Granulicatella</i>		-0,6536			
<i>Lachnobacterium</i>		0,6325			
<i>Lactobacillus</i>		-0,6721			
<i>Marinomonas</i>		0,5757			
<i>Streptococcus</i>		-0,5796			

(*) predstavlja $p < 0,05$ bez BH korekcije

(-) negativan predznak manja brojnost taksona kod CD i UC

5.3. Upalni biomarkeri iz uzoraka krvnog seruma

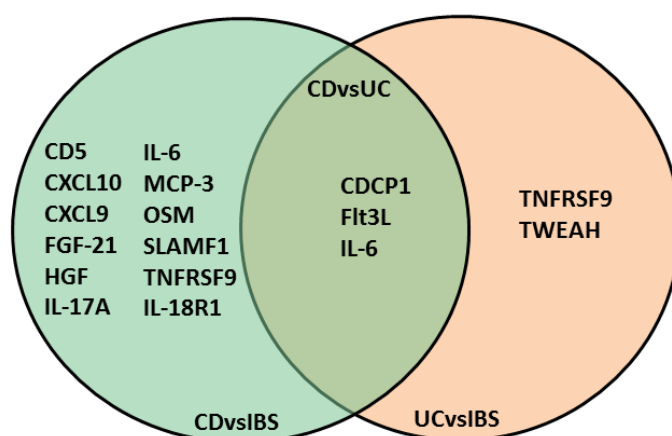
Za određivanje upalnih biomarkera iz krvnog seruma analizirani su uzorci prikupljeni od 35 pacijenta s rano dijagnosticiranom upalnom bolesti crijeva, CD (n=10), UC (n=13) i IBS (n=12) u rasponu od 27-72 godine. Demografski podaci uključuju 20 žena (Ž) i 15 muškaraca (M) (4M i 7Ž u CD, 6M i 6Ž u UC i 5M i 7Ž u IBS) sa srednjom vrijednosti godina 46 (CD), 32,5 (UC) i 36 (IBS). Imunodetekcijskom metodom (eng. "Proximity extension assay", PEA) analizirana su 92 upalna proteina (Tablica 5).

Tablica 5. Komercijalno dostupni upalni panel, ProSeek Multiplex Inflammation I 96x96 (Olink Proteomics, Uppsala, Švedska)

Upalni panel – proteinski biomarkeri					
ADA	FGF-5	CCL11	IL-33	CXCL11	CXCL6
ARTN	Flt3L	4E-BP1	IL-4	IL-2	OSM
AXIN1	CX3CL1	FGF-19	IL-5	NT-3	CXCL5
Beta-NGF	GDNF	FGF-21	IL-6	TWEAK	IL-2RB
BDNF	HGF	FGF-23	IL-7	DNER	NRTN
CASP-8	IFN-gamma	IL-8	SLAMF1	IL-24	TNF
CCL19	IL-1 alpha	LAP TGF-beta-1	SIRT2	EN-RANGE	TNFSF14
CCL20	IL-10	LIF	STAMBP	VEGF-A	CXCL10
CCL23	IL-10RA	LIF-R	SCF	CST5	IL-18R1
CCL25	IL-10RB	CSF-1	ST1A1	IL-22 RA1	CD244
CCL28	IL-12B	MMP-1	CD6	PD-L1	TGF-alpha
CCL3	IL-13	MMP-10	CD5	uPA	TNFRSF9
CCL4	IL-15RA	MCP-1	TSLP	CXCL9	
CD40	IL-17A	MCP-2	TNFB	IL-20	
CDCP1	IL-17C	MCP-3	TRANCE	IL-20RA	
CXCL1	IL-18	MCP-4	TRAIL	OPG	

Ukupno 75 proteina (82%) je prešlo granicu detekcije i uključeno je u analizu. Koncentracije proteina nakon normalizacije prikazane su kao NPX (eng. "Normalized Protein eXpression") te je na svim uzorcima provedena kontrola kvalitete. Svakom uzorku su dodane 4 interne kontrole kako bi se mjerila kvaliteta testa, ali i kvaliteta pojedinog uzorka. Kontrola kvalitete je provedena u dva koraka: i) svaki uzorak se procjenjuje prema standardnoj devijaciji unutarnjih kontrola, ii) kvaliteta svakog uzorka procjenjuje se prema odstupanju od srednje vrijednosti kontrole za svaki pojedini uzorak. Uzorci koji odstupaju manje od 0,3 NPX od medijana prošli su kontrolu kvalitete.

Svi testirani uzorci su prošli kontrolu kvalitete i uključeni su u analizu rezultata. Statističkom obradom pomoću univarijatne analize varijance ANOVA i *Tukey-evog* testa, značajnom ($p < 0,05$) se pokazala razlika u koncentraciji 15 upalnih proteina između grupa CD i IBS, UC i IBS, CD i UC (Slika 13). Usporedbom CD pacijenata s kontrolnom IBS grupom (Tablica 6) utvrđeno je 13 povišenih biomarkera kod CD pacijenata; CD5 ($p < 0,05$), CDCP1 ($p < 0,05$), CXCL10 ($p < 0,0005$), CXCL9 ($p < 0,05$), FGF-21 ($p < 0,05$), HGF ($p < 0,005$), IL-17A ($p < 0,005$), IL-18R1 ($p < 0,05$), IL6 ($p < 0,0005$), MCP-3 ($p < 0,05$), OSM ($p < 0,05$), SLAMF1 ($p < 0,05$), TNFRSF9 ($p < 0,05$). Usporedbom UC pacijenata s kontrolnom IBS grupom utvrđena su 2 povišena biomarkera kod UC pacijenata; TNFRSF9 ($p < 0,05$) i TWEAK ($p < 0,05$). Usporedbom CD i UC grupa utvrđena su 3 povišena biomarkera kod CD pacijenata; CDCP1 ($p < 0,05$), Flt3L ($p < 0,05$) i IL6 ($p < 0,005$) (Tablica 6).



Slika 13. Na slici su pomoću Venn-ovog dijagrama prikazani značajno povišeni upalni proteini ($p < 0,05$) između grupa CD i IBS, UC i IBS i CD i UC. 3 proteina pokazuju razlike između oboljelih CD naspram UC.

Tablica 6. Analiza upalnih proteina iz uzoraka krvi.

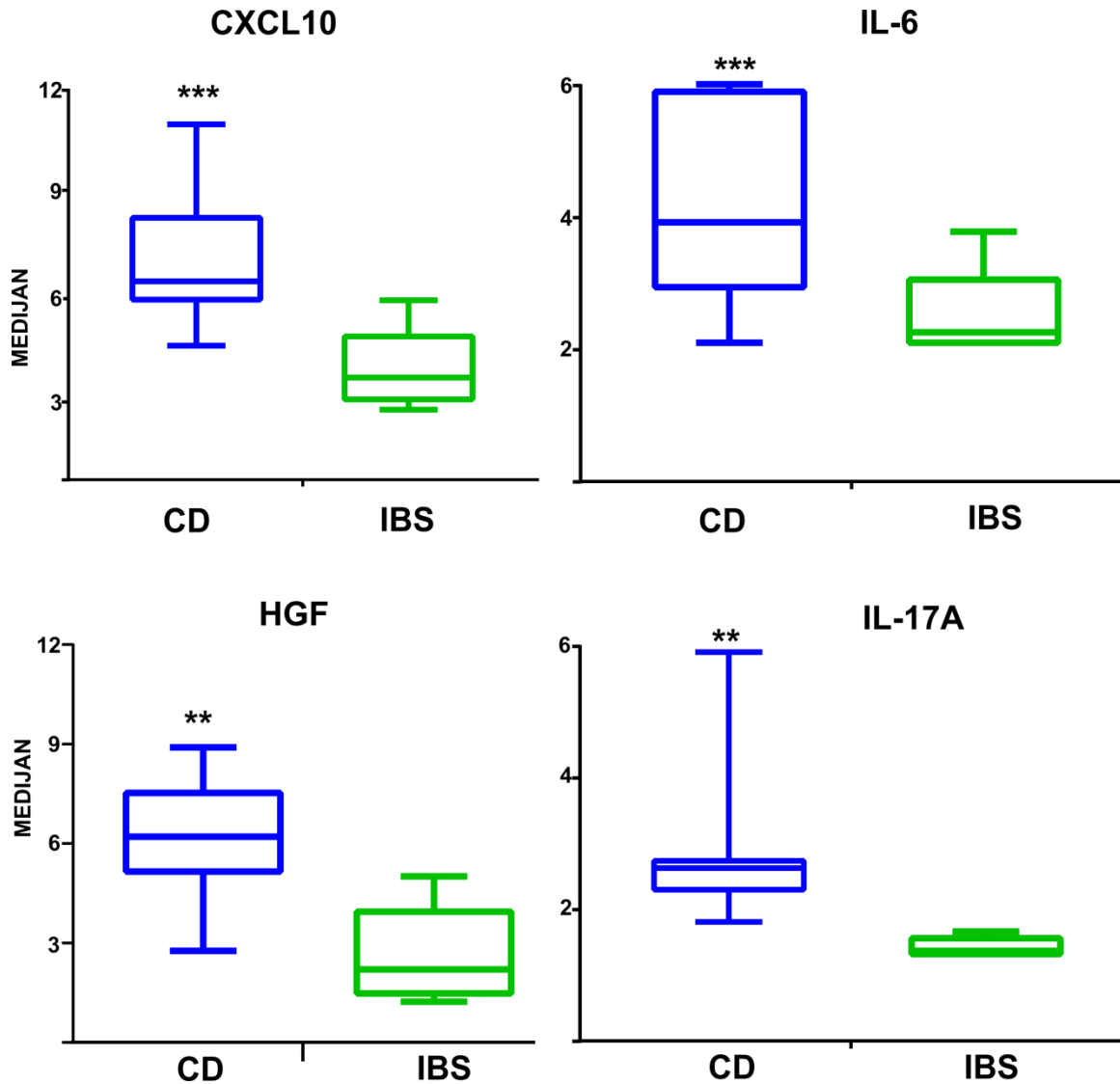
Statističkom obradom rezultata pomoću univarijatne analize varijance ANOVA i Tukey testa, značajnom ($p < 0,05$) se pokazala razlika 15 upalnih proteina između CD i IBS, UC i IBS, CD i UC grupa.

ANOVA (Tukey) test			
	UC vs CD	UC vs IBS	CD vs IBS
CD5			*
CDCP1	*		*
CXCL10			***
CXCL9			*
FGF-21			*
Flt3L	*		
HGF			**
IL-17A			**
IL-18R1			*
IL-6	**		***
MCP-3			*
OSM			*
SLAMF1			*
TNFRSF9		*	*
TWEAK		*	

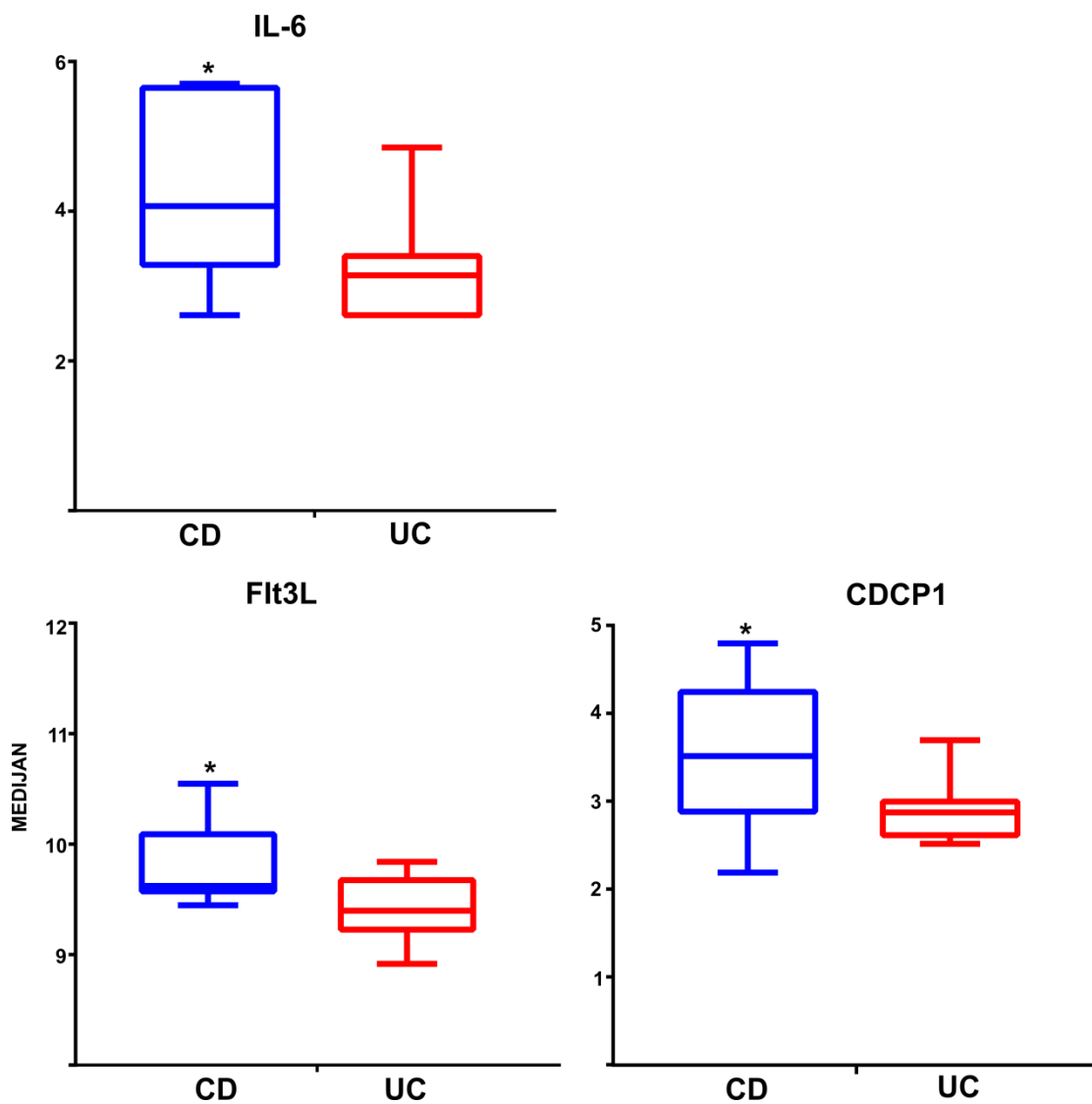
* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$

Statistička analiza između CD i IBS grupa, ukazuje na velike razlike kod 4 upalna proteina - *CXC kemokinu 10* (CXCL10) koji djeluje na monocite, T stanice, NK stanice i dendritičke stanice; proupalnom citokinu *inteleukinu 6* (IL-6) koji potiče rast i diferencijaciju stanica; *čimbeniku rasta hepatocita* (HGF) koji sudjeluje u angiogenezi, tumorigenezi i regeneraciji tkiva; te proupalnom citokinu *interleukinu 17-A* (IL-17A) koji inducira nastajanje drugih citokina, kemokina i prostaglandina (Slika 14). Usporedba grupa CD i UC pokazala je da se pacijenti s upalnom bolesti crijeva razlikuju na temelju 3 upalna markera - *transmembranskog proteina* (CDCP1) koji je uključen u regulaciju adhezije stanica; *Fms-nalik receptora tirozinske kinaze 3* (Flt3L) koji sudjeluje u razvoju dendritičkih stanica; i *interleukina 6* (IL-6) (Slika 15).

Najveće razlike u upalnim biomarkerima pokazuju CD pacijenti naspram kontrolnih IBS pacijenata.



Slika 14. Usporedbom CD pacijenata s kontrolnom IBS grupom utvrđena su 4 statistički najznačajnija markera upale (** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$). C-X-C kemokin 10 (CXCL10), interleukin – 6 (IL-6), čimbeniku rasta hepatocita (HGF) i interleukin 17A (IL-17A).



Slika 15. Usporedbom CD i UC pacijenata, utvrđena su 3 statistički značajna upalna markera. Transmembranski protein (CDCP1), Fms-nalik receptor tirozin-kinaza 3 (Fl3L) i interleukin 6 (IL-6) (* $p < 0.05$).

6. RASPRAVA

Tijekom proteklih desetljeća veliki su naponi uloženi u proučavanje i istraživanje kroničnih upalnih bolesti crijeva te je uočeno da kod poremećaja kao što su Crohnova bolest (CD) i ulcerozni kolitis (UC) sastav crijevne mikrobiote uvelike odstupa od onoga u zdravom crijevu. Iako CD i UC dijele mnoga epidemiološka, imunogenetička, terapijska i klinička obilježja, rezultati ove studije podupiru tezu da se radi o dva različita podtipa upalnih bolesti crijeva, što je pokazano na razini sastava crijevne mikrobiote i povećanih markera upale u krvnom serumu (*Tablica 3 i 6*).

Najveći broj istraživanja koja se bave analizom sastava mikrobiote upalnih bolesti crijeva, provedena su na već dijagnosticiranim pacijentima s dijagnozom CD i UC-a te je vrlo malo znanstvenih studija koje se bave rano dijagnosticiranim pacijentima (64,67). Analiza promijenjenosti crijevne mikrobiote kod rano dijagnosticiranih pacijenata koji prije toga nisu primali nikakvu terapiju (npr. antibiotike koji dodatno pridonose narušenom stanju mikrobiote), govori nam o stanju mikrobiote na samom početku bolesti. Na taj se način može vidjeti i koje su to bakterije koje počinju mijenjati svoju brojnost i kakvu imaju ulogu u ljudskom organizmu pod utjecajem okolišnih čimbenika.

Usporedbom bakterijskih zajednica iz uzoraka fecesa i uzoraka sluznice kolona između CD i IBS kontrola te UC i IBS kontrola, utvrdili smo da određeni taksoni bivaju više ili manje zastupljeni ovisno o dijagnozi, što nam pruža mogućnost bolje grupacije pacijenata prema određenoj dijagnozi. Kod pacijenata s upalnom bolesti crijeva (IBD) zamijećena je smanjena raznolikost crijevne mikrobiote, pad u omjeru koljena *Firmicutes/Bacteroidetes* (*Slika 7*) i fakultativnih anaeroba poput porodice *Prevotellaceae* te rast koljena *Proteobacteria* i *Actinobacteria* u usporedbi sa sastavom crijevne mikrobiote kod IBS kontrola, što je u skladu s objavljenim rezultatima (10,13,60,62,63).

Usporedba IBD pacijenata s IBS kontrolama na razini fecesa pokazuje da kod CD pacijenata imamo povećanu brojnost koljena *Proteobacteria*, *Actinobacteria* te roda *Lachnobacterium*, dok kod UC pacijenata imamo povećanu brojnost porodica *Turicibacteraceae* i *Veillonellaceae* (*Tablica 3*). Promjena u brojnosti koljena *Proteobacteria* kod IBD pacijenata (najviše CD) zabilježena je u mnogim studijama

do sada (18,64,67,109). Mnogi značajni patogeni pripadaju koljenu *Proteobacteria* za koje se smatra da igraju ključnu ulogu u kroničnoj upali kod IBD-a (32). Koljeno *Proteobacteria* je koljeno koje se sastoji od aerobnih bakterija, što ide u prilog tzv. "kisik" hipotezi koja govori da se crijevna mikrobiota u IBD-u mijenja iz anaerobne u aerobnu uslijed oksidativnog stresa (69). Dosadašnje studije ukazuju na to da se mikrobiota fecesa kod IBD pacijenata sastoji od manjeg broja anaeroba (18,64) dok raste broj aeroba, što ide u prilog činjenici da se prilikom upale unutar crijeva povećava razina kisika, a oksidativni stres potiče rast i razmnožavanje aerotolerantnih bakterijskih vrsta u koje spadaju aerobi i fakultativni anaerobi (69). Osim povišenih aeroba koljena *Proteobacteria* kod CD pacijenata, rezultati pokazuju da je u ovom istraživanju u crijevnoj mikrobioti fecesa zastupljena anaerobna mikrobiota. Razlog tome može biti taj što smo ispitivali rano dijagnosticirane IBD pacijente kod kojih oksidativni stres još uvijek nastupa unutar uobičajenih granica i omjer aeroba/anaeroba nije u potpunosti narušen. U prilog tome govore i pojedina istraživanja koja pokazuju kako anaerobne bakterije mogu do određene razine tolerirati povišenu koncentraciju kisika, koristeći svoje vlastite mehanizme za preživljavanje (110). Također na razini fecesa dolazi i do smanjenja brojnosti porodice *Enterococcaceae* kod CD pacijenata.

Kod UC pacijenata utvrđena je povišena brojnost porodice *Turicibacteraceae* ($p=0,009$) koja do sada nije zabilježena u drugim istraživanjima (*Tablica 3*). Studije provedene na toj porodici pokazale su da se javlja u poremećenom crijevnom okolišu izmijenjenom tijekom upale ili uslijed gubitka otpornosti na kolonizaciju nakon akutne upale koja im omogućuje da se prošire i povećaju svoju brojnost (66).

Također je primijećena značajna razlika u sastavu mikrobiote kod pacijenata s CD-om u odnosu na UC. Rezultati pokazuju značajne razlike u povećanju brojnosti koljena *Proteobacteria* i rodova *Clostridium*, *Coprococcus*, *Dorea* i *Escherichia* kod CD pacijenata, a razred *Bacilli* i *Synergistia* i red *Lactobacillales* zastupljeniji su kod UC pacijenata dok je koljeno *Verrucomicrobia* manje zastupljeno (*Tablica 3*). Na temelju toga moguće je razlikovati o kojoj se dijagnozi radi, te preložiti potencijalne fekalne biomarkere za bolju grupaciju pacijenata prema određenoj dijagnozi. Mnoge studije do sada radile su usporedbu CD i UC pacijenata (18,70), no još uvijek nije predložen model fekalnih markera na temelju kojih bismo mogli razdvojiti jednu bolest od druge. Tome u prilog ide i činjenica da su i unatoč narušenoj crijevnoj mikrobioti,

individualne razlike unutar pacijenta veće od razlika među ispitivanim pacijentima, te je vrlo teško razlučiti koje su promjene specifične za pacijenta, a koje su nastale uslijed bolesti (111).

Usporedba IBD pacijenata s IBS kontrolama na razini sluznice kolona pokazuje povećanu brojnost rodova *Bifidobacterium*, *Dialister*, *Haemophilus*, *Ruminococcus* i *Collinsella*, te porodica *Clostridiaceae* i *Pasteurellaceae* kod CD pacijenata, dok kod UC pacijenata nalazimo povećane brojnost porodica *Clostridiaceae*, *Comamonadaceae*, *Oceanospirillaceae* i rodova *Delfia*, *Lachnobacterium* i *Marinomonas* (Tablica 4) i značajno smanjenu brojnost porodica *Oxalobacteraceae* ($p=0,011$) i *Sphingomonadaceae* ($p=0,034$). Veliku brojnost kod CD pacijenata naspram drugih grupa pokazuje rod *Bifidobacterium* ($p=0,04$) koji predstavlja najvažniju i najbrojniju skupinu mikroorganizama kod zdravih ljudi te je zabilježena manja brojnost kod IBD pacijenata. Ipak istraživanja roda *Bifidobacterium* i aktivne faze bolesti kod IBD pacijenata pokazala su da *Bifidobacterium* može biti zastupljeniji kod UC i CD pacijenata u odnosu na zdrave kontrole (112). U prilog tome navodi se nerazumno uzimanje probiotika na bazi vrste *Bifidobacterium bifidum* uslijed probavnih smetnji i u svrhu smanjenja simptoma bolesti. Osim ovog roda, prisutno je i značajno povećanje brojnosti roda *Dialister* ($p=0,02$) koji se koristi kao bakterijski marker za bolest ankilozantnog spondilitisa koja prema svojim simptomima odgovara ranoj fazi CD bolesti, te se preklapa 50% u simptomima s IBD-om (113). Porodica *Pasteurellaceae* pokazuje veću brojnost kod CD pacijenata te je njezina pozitivna korelacija s IBD pacijentima zabilježena već u prijašnjim studijama (18,64,114). Porodica *Ruminococcus* pokazuje veću brojnost kod CD pacijenata na razini tkiva, a razlog tome leži u činjenici da su članovi ove obitelji dobri izvori energije za druge bakterije. Nalaze se na sluznici crijeva i razgradnjom mukusa proizvode nutrijente koji služe kao hrana drugim bakterijama te je zabilježena njihova povećana brojnost kod IBD pacijenata (60). Kod UC pacijenata uočavamo smanjene porodice *Oxalobacteraceae* ($p=0,011$) i *Sphingomonadaceae* ($p=0,034$), koje do sada nisu zabilježene u upalnim bolestima crijeva. Porodica *Oxalobacteraceae* predstavlja gram negativne anaerobne bakterije dok porodica *Sphingomonadaceae* predstavlja gram negativne aerobne i fakultativno anaerobne bakterije.

Unatoč brojnim studijama i naporima znanstvenika i dalje je nepoznato je li disbioza crijevne mikrobiote izravna posljedica upale sluznice crijeva ili rezultat

narušenog okoliša unutar gastrointestinalnog trakta. Studija *Gevers i sur.* (64) pokušala je determinirati status crijevne mikrobiote u rano dijagnosticiranim pedijatrijskim pacijentima i utvrdili su da postoje jasne razlike između CD i UC pacijenata na razini tkiva u usporedbi sa zdravim kontrolama. U sluznici kolona kod CD pacijenata pokazali su povišenu brojnost porodica *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidales*, *Clostridiales*, *Pasteurellaceae*, *Veillonellaceae*, *Fusobacteriaceae* i *Neisseriaceae*. Naše istraživanje je također pokazalo povišenu brojnost porodice *Pasteurellaceae* kod CD na razini tkiva i porodice *Veillonellaceae* kod CD na razini fecesa, ali i drugih porodica, poput *Turicibacteraceae* kod UC na razini fecesa i porodica *Barnesiellaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Coriobacteriaceae* kod CD i porodica *Comamonadaceae* i *Oceanospirillaceae* kod UC na razini tkiva. Razlog tome može biti i činjenica da je naše istraživanje rađeno na tek zaprimljenim, rano dijagnosticiranim odraslim pacijentima s rasponom godina od 18-72 godina koji su pod utjecajem drugačijih čimbenika okoliša (životne navike) u donosu na djecu.

Analizom sastava mikrobiote fecesa i mikrobiote sluznice kolona utvrdili smo da dolazi do disbioze, narušavanja sastava bakterijske flore u odnosu na kontrolnu skupinu kod obje vrste uzoraka. Uzorci fecesa pokazali su promjene u zastupljenosti kod 3 porodice i 7 rodova, dok u sluznici kolona nalazimo promjene u zastupljenosti kod 17 porodica i 18 rodova u usporedbi UC i CD sa IBS kontrolama. Na temelju tih rezultata uočili smo da sluznica kolona pokazuje veću narušenost sastava mikrobiote naspram fecesa. Rezultati su u skladu sa studijom *Gevers i suradnici* na rano dijagnosticiranim pedijatrijskim pacijentima, što nam govori da se u ranoj fazi bolesti najveće promjene događaju i mogu pouzdanije dokazati na uzorcima sluznice kolona.

Posljednjih nekoliko godina raste interes za razvoj neinvazivnih biomarkera, prihvatljivih od strane pacijenata, kao idealan dijagnostički alat upalnih bolesti crijeva. Iako trenutno postoje mnogi dostupni dijagnostički testovi koji su jeftini i pouzdani, uključujući C-reaktivni protein (CRP) i stupanj sedimentacije eritrocita (ESR) i dalje ogroman problem predstavlja njihova nespecificnost. Više novih biomarkera, uključujući genetska testiranja, miRNA i metabolomika mogu u budućnosti dovesti do vrlo točnih testova, ne samo u dijagnostici simptomatskih bolesnika, nego potencijalno i u ranoj dijagnostici prije pojave same bolesti. Istraživanja su također pokazala da izmijenjena ravnoteža između upalnih i regulatornih citokina doprinosi

nastanku kronične upale na sluznici crijeva kod CD i UC pacijenata (115,116). Budući da postoje dokazi da do oštećenog tkiva dolazi uslijed imunološkog odgovora pomoću citokina koji se aktiviraju preko mnogih signalnih putova, logično je za pretpostaviti da je istovremeno potrebno ciljati više signala, nego se selektivno usredotočiti samo na jednostruke signalne putove. Jedna od obećavajućih terapijskih strategija temelji se na obnovi regulacijskih mehanizama koji su narušeni u IBD-u. Budući da je poznato da niti jedan lijek ne odgovara jednako svim pacijentima, potrebni su individualizirani biomarkeri u svrhu prognoze bolesti, brzine reakcije na neku terapiju i odabira najbolje biološke terapije za svakog pacijenta (81). Poznato je da crijevna mikrobiota igra veliku ulogu u nastajanju i aktivaciji stanica imunološkog sustava te se postavlja pitanje na koji način disbioza crijevne mikrobiote vodi do upale sluznice crijeva i preko kojih modulatora. Mikrobiom bakterija sadrži 100 puta više gena nego ih se nalazi u ljudskom genomu, a metaboliti mikrobiote igraju važnu ulogu u funkciji epitelnih stanica i utječu na okolna tkiva u probavnom sustavu. Dosadašnje studije na genima mikrobiote pokazuju rast gena odgovornih za metabolizam ugljikohidrata i rast gena koji sudjeluju u signalnim putovima oksidativnog stresa u IBD pacijenata (117,118), što ide u prilog teoriji da porast kisika u lumenu crijeva vodi do kronične upale sluznice crijeva (60). Najbolji način za dokazivanje te hipoteze predstavlja analiza razine upalnih proteina iz krvi IBD pacijenata i utvrđivanje njihove uloge u upalnom procesu unutar sluznice crijeva. Analizom markera upale, pokazali smo da je statistički značajno povišena razina 15 upalnih proteina u krvnom serumu kod CD i UC pacijenata u usporedbi s IBS kontrolom.

Usporedbom CD pacijenata s kontrolnom IBS grupom utvrđeno je 13 povišenih biomarkera kod CD pacijenata. Usporedbom UC pacijenata s kontrolnom IBS grupom utvrđena su 2 povišena biomarkera kod UC pacijenata. Usporedbom CD i UC grupa utvrđena su 3 povišena biomarkera kod CD pacijenata (*Slika 13 i Tablica 6*). Kao potencijalni markeri upale kod IBD pacijenata ističu se CXCL10, IL-6, HGF i IL-17A između CD i IBS pacijenata te CD136, F13L i IL-6 između CD i UC pacijenata (*Slika 14 i 15*). Statistička analiza između CD i IBS grupa, ukazuje na velike razlike između 4 upalna proteina: CXC kemokin 10 (CXCL10) koji djeluje na monocite, T stanice, NK stanice i dendritičke stanice; proupalni citokin interleukin 6 (IL-6) koji potiče rast i diferencijaciju stanica; čimbenik rasta hepatocita (HGF) koji sudjeluje u

angiogenezi, tumorigenezi i regeneraciji tkiva; te proupalni citokin interleukin 17-A (IL-17A) koji inducira nastajanje drugih citokina, kemokina i prostaglandina (*Slika 14*).

Među mrežom proupalnih posrednika koji su uključeni u patogenezu IBD-a, posebnu pažnju zauzimaju citokini i kemokini, mali imuno-regulacijski proteini koji igraju središnju ulogu u razvoju i homeostazi imunološkog sustava. Njihov patogeni položaj u IBD-u odavno je u središtu pažnje i podvrgnut opsežnom ispitivanju. A sama neravnoteža protu- i pro-upalnih citokina/kemokina dovodi do upalnih bolesti crijeva. Naša studija pokazala je da su kod CD i UC pacijenata poviše određeni citokini i kemokini te nam mogu poslužiti kao markeri bolesti. Svi proupalni citokini najveću razinu u serumu pokazuju kod CD pacijenata, a zatim kod UC pacijenata u usporedbi s IBS kontrolama. **Interferon- γ -inducirani protein-10 (IP-10 ili CXCL10)** je kemokin koji igra važnu ulogu u migraciji stanica na mjesto upale (epitelne i endotelne stanice, t-stanice, monociti, NK stanice, eozinofili). Dosadašnje studije su potvrdila da je CXCL10 povišen u IBD-u, točnije UC-u (119), dok naša studija najveću razinu kemokina pokazuje kod CD pacijenata u odnosu na UC i IBS kontrole. Promjene u CXCL10 ekspresijskim razinama povezane su s upalnim bolestima uključujući infektivne bolesti, imunološku disfunkciju i razvoj tumora. CXCL10 je također prepoznat kao biomarker koji predviđa ozbiljnost različitih bolesti (hepatitis C, encefalitis, multipla skleroza, psorijaza) (120).

Proupalni citokin 17-A (IL-17A) povišen kod CD pacijenata u odnosu na IBS kontrole, inducira nastajanje drugih citokina, kemokina i prostaglandina. Igra važnu ulogu u održavanju integriteta mukozne barijere i detektiran je u velikom broju autoimunih bolesti kod miševa i ljudi (121). Studije su pokazale da specifične SFB bakterije (eng. "*Segmented filamentous bacteria*", SFB) aktiviraju Th17 stanice koje onda proizvode IL-17A citokin (60). SFB bakterije filogenetski predstavljaju jedinstvenog člana reda *Clostridiales* s visoko reduciranim genomom. Komparativne analize otkrivaju da su SFB bakterije funkcionalno povezane s pripadnicima roda *Clostridium* i nekoliko patogenih rodova, uključujući rodove *Fingoldia*, *Mycoplasma*, *Borrelia* i *Phytoplasma* (121). Analiza sastava mikrobiote u našoj studiji pokazala je povišenu brojnost porodice *Clostridiaceae* kod CD pacijenata u koju spada genus *Clostridium*. **Proupalni citokin IL-6** povišen kod CD pacijenata u odnosu na UC i IBS kontrole, potiče rast i diferencijaciju stanica i sudjeluje u imunološkom odgovoru i autoimunim procesima. Opisano je da sudjeluje u nekoliko bolesti koje su povezane s

upalom (primjerice reumatoidni artritis, lupus, ateroskleroza) te je povišen kod IBD pacijenata i vjeruje se da inhibitori IL-6 mogu igrati važnu ulogu u liječenju upalnih bolesti (122). IL-6 predstavlja ključni citokin povezan s IBD-om kao i drugim kroničnim upalnim bolestima. Međutim korelacija IL-6 i prodora bakterija kroz mukoznu barijeru još uvijek nije potpuno opisana. Studija *Tzyy-Bin Tsay i sur.* (123) pokazala je da se razina proupalnog citokina IL-6 povećava prodorom bakterija (bakterijski fragmenti, toksične komponente kao što su; lipopolisaharidi, lipoteična kiselina, endotoksin) kroz mukoznu barijeru. Razina IL-6 ovisi i o bakterijama koje su sposobne proizvoditi spojeve poput butirata. Naime, butirata negativno djeluje na stvaranje i aktivnost proupalnih citokina IL-12, IL-6 i inhibira njihovo djelovanje.

I dok patogeneza IBD-a ostaje i dalje do kraja ne razjašnjena, poznato je do sada da su UC i CD povezani s upalom sluznice crijeva i njenom nemogućnosti da kontrolira u potpunosti imunološki odgovor, te je potreba za popravkom ozlijeđenog crijeva velika. Brojne populacije stanica reguliraju ove kompleksne procese popravka kroz aktivaciju složenog niza peptida i drugih spojeva. Važnu ulogu u popravku čine i čimbenici rasta, koji imaju sposobnost regulacije proliferacije stanica. Faktori rasta također posreduju u procesima kao što su stvaranje izvanstraničnog matriksa, migracija i diferencijacija stanica, imunološka regulacija i preoblikovanje tkiva. Naša studija pokazuje povećanu razinu **čimbenika rasta hepatocita (HGF)** kod CD pacijenata u odnosu na IBS kontrolne ispitanike, koji sudjeluje u angiogenezi, tumorigenezi i regeneraciji tkiva. HGF djeluje protuupalno, ciljajući mnoge procese u upalnom odgovoru i igra važnu ulogu u zaštiti sluznice probavnog sustava. Trenutno je dostupno malo informacija o potencijalnim ulogama HGF-a kod odraslih IBD pacijenata, dok neke studije tvrde da nisu uspjele detektirati statistički značajnu razliku u razini HGF-a kod IBD pacijenata i zdravih kontrola. Povećana koncentracija ovog čimbenika rasta u našoj studiji, može biti povezana s potrebom organizma za liječenja oštećenih dijelova sluznice kolona nastalih uslijed upale (124). Osim proupalnih citokina i čimbenika rasta detektirali smo i povišene razine transmembranskog proteina i receptora tirozin kinaze. Transmembranski proteini igraju važne uloge u održavanju integriteta crijevno-epitelne barijere te u komunikaciji bakterijskih stanica i stanica imunološkog sustava. **CDCP1** povišen kod CD pacijenata u odnosu na UC pacijente predstavlja transmembranski protein koji je uključen u regulaciju adhezije stanica i do sada nije zabilježen u drugim

istraživanjima kod IBD pacijenata (*Slika 15*). Ovaj transmembranski protein prvi puta je opisan 2001. godine (125) u kolorektalnom karcinomu i od tada je predložen kao prognostički čimbenik napretka bolesti u nekoliko drugih karcinoma (126). Smatra se da CDCP1 igra važnu ulogu u regulaciji stanične diferencijacije i proliferacije kroz suradnju s izvanstaničnim matriksom. Sve je više dokaza da je poremećaj integriteta epitelne barijere jedan od glavnih faktora koji se mogu povezati sa upalnim bolestima crijeva. Povišena razina CDCP1 transmembranskog proteina koji je uključen u regulaciju adhezije stanica može imati ulogu u narušavanju integriteta same barijere i time pridonijeti nastanku IBD-a, budući da prekomjerna ekspresija CDCP1 dovodi do gubitka stanične adhezije i proliferacije stanica. **Receptor tirozin kinaze Flt3L** povišen kod CD pacijenata u odnosu na UC pacijente predstavlja fms-nalik receptor tirozin kinaze 3, a djeluje kao citokin i faktor rasta koji povećava broj imunoloških stanica (limfociti B i T) aktivacijom hematopoetskih progenitora. Opisano je da sudjeluje u nekoliko bolesti koje su povezane s upalom (npr. reumatoidni artritis) te se smatra da visoke razine Flt3L mogu potaknuti modulaciju autoreaktivnosti i autoimunosti (127) (*Slika 15*). Do sada je provedeno vrlo malo istraživanja na Flt3L koji predstavlja ligand za Flt3, koji je ključni regulatorni citokin za razvoj dendritičkih stanica. Istraživanja govore o sudjelovanju Flt3L u regulaciji dendritičkih stanica (eng. "*Dendritic cells*", DC) i T-regulacijskih stanica (T-reg) u UC-pacijenata (128). DC su najvažnije antigen prezentirajuće stanice uključene u regulaciju upalnog odgovora ili imuno tolerancije, dok T-reg stanice predstavljaju podgrupu T stanica u koje spadaju CD4+CD25+FoxP3+ T-reg, Tr1, Th3, and CD8+T-reg, čija je uloga suzbiti imunološki sustav i samo održavati svoju aktivnost. Za razliku od navedene studije, naša pokazuje još veću razinu liganda kod CD pacijenata u usporedbi s UC pacijentima.

Unazad nekoliko godina postignut je veliki napredak u otkrivanju genetske podloge upalnih bolesti crijeva. Međutim, rezultati pokazuju da genetske varijacije nisu jedini uzrok bolesti. Aktivnost gena također je pod velikim utjecajem epigenetskih mehanizama, a transkriptom prolazi mnoge modifikacije prije prepisivanja u protein. Samim time proteom IBD pacijenata odražava genetske i okolišne čimbenike važne u patofiziologiji IBD-a. Dosadašnja istraživanja na ovom području su neuspjela zbog velikih razlika u koncentracijama različitih proteina u serumu. Ovakav nedostatak nadvladala je relativno nova metoda imunodetekcije na principu protutijela obilježenih oligonuklotidima (eng. "*Proximity extension assay*"),

PEA). Prvi puta PEA metodu na serumima krvi pacijenata s upalnim bolestima crijeva istražili su *Anderson i sur.* (83) te su identificirali 17 upalnih proteina sa značajno različitim razinama proteina u usporedbi CD i zdravih kontrola i UC i zdravih kontrola. U usporedbi s tom studijom naši rezultati preklapaju se u 3 upalna proteina; CXCL9, IL-17A i IL-6 i za razliku od Andersona, pokazuju stanje upalnih proteina u rano dijagnosticiranim IBD pacijentima.

Prema dosadašnjim saznanjima, većina studija provedenih na proteinima iz seruma analizirala je tek mali broj proteina. U tom kontekstu naša studija unapređuje polje proteomike IBD-a uvođenjem novih proteina kao upalnih markera za upalne bolesti crijeva. Ono što limitira studiju, a i samu metodu jest korištenje komercijalno dostupnog panela s predodređenim upalnim proteinima.

Analizom sastava crijevne mikrobiote kod rano dijagnosticiranih IBD pacijenata uspjeli smo pokazati da su određene promjene u sastavu bakterijskih rodova i porodica specifične za određeni pod-tip bolesti (Crohnova bolest i ulcerozni kolitis) te da se mikrobiota mijenja ovisno o tome radi li se o fecesu ili sluznici kolona. Korištenjem PEA metode i analizom upalnih proteina kod rano dijagnosticiranih pacijenata identificirali smo proteinski profil za razlikovanje IBD pacijenata u usporedbi s IBS kontrolama. Istraživanje ističe potencijal serumskog IBD proteoma kao izvora za identifikaciju budućih dijagnostičkih biomarkera, ali za daljnje istraživanje potrebno je povećati broj ispitanika, pri čemu je potrebno kod svakog pacijenta detaljno analizirati uzorak stolice i biopsije sluznice kolona za analizu bakterijskih promjena te uzorak krvi za analizu upalnih markera.

Budući da se radi o rano dijagnosticiranim pacijentima, dok još nije primijenjena terapija, smatramo da će rezultati istraživanja doprinijeti naporima usmjerenim prema postavljanju točne dijagnoze upalnih bolesti crijeva za koje još uvijek ne postoji pouzdani način rane dijagnoze, predviđanju tijeka i praćenju razvoja bolesti, odnosno praćenju uspješnosti primijenjene terapije. Kombinacijom parametara moguće je poboljšati dijagnostičke alate, preciznije razdvojiti Crohnovu bolest od ulceroznog kolitisa i omogućiti individualan terapijski pristup svakom pacijentu s ciljem ublažavanja simptoma bolesti i poboljšanja kvalitete života.

7. ZAKLJUČAK

Upalna bolest crijeva predstavlja kronični proces u probavnom traktu koji je nedvojbeno povezan sa sastavom crijevne mikrobiote, imunim statusom i unosom hrane, a trenutne znanstvene spoznaje o specifičnim pokretačima i dijagnostičkim biomarkerima bolesti su ograničene.

Iz rezultata provedenog istraživanja možemo zaključiti sljedeće:

1. Analiza sastava crijevne mikrobiote u fecesu metodom sekvenciranja DNA ukazuje na povećanu brojnost određenih taksona kod CD i UC pacijenata. Među njima najznačajniji kod CD pacijenata su koljena *Proteobacteria* i *Actinobacteria*, a kod UC pacijenata porodice *Turibacteraceae* i *Veillonellaceae*.
2. Analiza sastava crijevne mikrobiote u sluznici kolona metodom sekvenciranja DNA ukazuje na povećanu brojnost određenih taksona kod CD pacijenata, a među njima najznačajniji je rod *Dialister*. Za UC pacijente značajno smanjenu brojnost taksona pokazuju porodice *Oxalobacteraceae* i *Sphingomonadaceae*.
3. Analizom crijevne mikrobiote utvrđeni su taksoni na temelju kojih možemo razlikovati Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis, a to su koljeno *Verrucomicrobia*, razred *Bacilli* i rod *Clostridium*.
4. Na temelju analize alfa raznolikosti utvrđeno je da UC pacijenti imaju manju raznolikost i brojnost bakterijskih vrsta u odnosu na CD i IBS pacijente.
5. Na temelju analize beta raznolikosti utvrđeno je da se UC pacijenti po sastavu crijevne mikrobiote najviše razlikuju od kontrolne skupine IBS pacijenata.
6. Analizom upalnih biomarkera u serumu utvrđene su značajne razlike u razinama 15 proteina. Najznačajnija je razlika u razinama CXCL10, IL-6, HGF i IL-17A između CD i IBS pacijenata te razlika u razinama CDCP1, FI3L i IL-6 između CD i UC pacijenata.

Dobiveni rezultati potvrđuju hipotezu da su promjene u sastavu mikrobiote u uzorku fecesa i sluznice kolona specifične i značajne za Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis te da promjene u sastavu mikrobiote također utječu i na aktivaciju određenih

upalnih proteina koji igraju veliku ulogu u kroničnom imunološkom odgovoru na tu istu mikrobiotu.

Određivanje sastava mikrobiote fecesa i sluznice kolona te utvrđivanje razine upalnih markera kod pacijenata s upalnim bolestima crijeva može pomoći u boljoj stratifikaciji pacijenta i odabiru boljih terapijskih pristupa prilikom liječenja upalnih bolesti crijeva.

8. SAŽETAK

Sastav crijevne mikrobiote i čimbenici upale u bolesnika s upalnim bolestima crijeva

Upalna bolest crijeva predstavlja kronični proces sa sve većom učestalošću koja se dijeli na Crohn-ovu bolest (CD) i ulcerozni kolitis (UC). Nastanak bolesti povezan je sa sastavom crijevne mikrobiote, imunim statusom i unosom hrane. U ovoj studiji analizirana je crijevna mikrobiota u uzorcima stolice i biopsiji sluznice kolona novodijagnosticiranih pacijenata i pripadajućih kontrola metodom sekvenciranja nove generacije, te je utvrđen upalni status svakog pacijenta analizom upalnih proteina u krvi imunodetekcijskom metodom pomoću specifičnih protutijela. Rezultati pokazuju da su promjene u sastavu mikrobiote u fecesu i sluznici kolona specifične i značajne za Crohnovu bolest (koljeno *Proteobacteria*, *Actinobacteria* i roda *Dialister*) i ulcerozni kolitis (porodice *Turibacteraceae*, *Veillonellaceae*, *Oxalobacteraceae* i *Sphingomonadaceae*). Analizom crijevne mikrobiote utvrđeni su i taksoni na temelju kojih možemo razlikovati CD i UC, a to su koljeno *Verrucomicrobia*, razred *Bacilli* i rod *Clostridium*. Te promjene u sastavu mikrobiote također utječu i na aktivaciju određenih upalnih proteina koji igraju veliku ulogu u kroničnom imunološkom odgovoru. Najznačajnija je razlika u serumskim proteinima CXCL10, IL-6, HGF i IL-17A između CD i IBS pacijenata te razlika u serumskim proteinima CDCP1, FI3L i IL-6 između CD i UC pacijenata. Rezultati provedenih istraživanja u novodijagnosticiranih pacijenata mogu pomoći boljoj stratifikaciji pacijenata i boljem odabiru terapijskih pristupa kod upalnih bolesti crijeva.

9. ABSTRACT

Gut microbiota composition and inflammatory markers in IBD patients

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic process in the gastrointestinal tract with increasing prevalence that consist of Crohn disease (CD) and ulcerative colitis (UC). The disease is associated with intestinal microbiota composition, immune status and food intake. In this study microbiota composition in intestinal biopsy samples and stool of newly diagnosed IBD patients and non-IBD individuals, as well as inflammatory status from the blood of each participant was investigated. Microbiota composition was determined by the next generation sequencing method while serum biomarkers were detected by specifically tagged antibodies. Results show that the changes in feces and colon microbiota are specific and significant for Crohn's disease (*Proteobacteria*, *Actinobacteria* phylum and *Dialister* genus) and ulcerative colitis (*Turibacteraceae*, *Veillonellaceae*, *Oxalobacteraceae* and *Sphingomonadaceae* families). These changes in microbiota composition induce activation of certain inflammatory proteins that play a major role in chronic inflammatory response. The most significant differences in a protein level are in CXCL10, IL-6, HGF and IL-17A between CD and control patients and differences observed in CDCP1, FI3L and IL-6 proteins between CD and UC patients. Results of this translational research on newly diagnosed patients could help in better stratification of patients and selection of more suitable therapeutic approaches in the treatment of inflammatory bowel disease.

KRATICE:

GIT – gastrointestinalni trakt

IBD - upalna bolest crijeva (eng. "*Inflammatory Bowel Disease*")

CD - Crohnova bolest (eng. "*Crohn Disease*")

UC - ulcerozni kolitis (eng. "*ulcerative colitis*")

IBS - sindromom iritabilnog kolona (eng. "*Irritable bowel disease*")

NGS - metoda sekvenciranja nove generacije (eng. "*Next generation sequencing*")

PCR – lančana reakcija polimerazom (eng. "*polymerase chain reaction*")

PEA – imunodetekcijska metoda. (eng. "*Proximity Extension Assay*")

TFM - transplantacija fekalne mikrobiote

SCFA - kratko lančane masne kiseline (eng. "*Short-chain fatty acids*")

MP - mediteranska prehrana

CRP – C-reaktivni protein

GBF - slad iz sirovog ječma (eng. "*Germinated barley foodstuff*")

CDI - *Clostridium difficile* infekcija

OTU – operacijske taksonomske jedinica (eng. "*Operational Taxonomic Units*")

PCoA - analiza glavnih koordinata (eng. "*Principal coordinates analysis*")

NPX - koncentracije proteina nakon normalizacije (eng. "*Normalized Protein expression*")

LOD – granica detekcije (eng. "*Limit of Detection*")

BH - *Benjamini-Hochberg* korekcija

10. LITERATURA

1. Matijašić M, Meštović T, Perić M, Čipčić Paljetak H, Panek M, Vranešić Bender D, et al. Modulating Composition and Metabolic Activity of the Gut Microbiota in IBD Patients. *Int J Mol Sci.* 2016;17(4).
2. web1. Šupe A. Disbioza crijevne flore i sindrom propusnih crijeva - uzrok sve većem broju bolesti; 2014 lipanj 7. Dostupno na <http://istineilaziohrani.blogspot.hr/2014/06/disbioza-crijevne-flore-i-sindrom.html>.
3. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med.* 2016;8(1).
4. Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr.* Springer Berlin Heidelberg; 2017;0(0):1–24.
5. Duncan SH, Belenguer A, Holtrop G, Johnstone AM, Flint HJ, Lobley GE. Reduced Dietary Intake of Carbohydrates by Obese Subjects Results in Decreased Concentrations of Butyrate and Butyrate-Producing Bacteria in Feces. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(4):1073–8.
6. Aleksandrova K, Romero-Mosquera B, Hernandez V. Diet, gut microbiome and epigenetics: Emerging links with inflammatory bowel diseases and prospects for management and prevention. *Nutrients.* 2017;9(9):1–13.
7. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet.* 2007;369(9573):1627–40.
8. Pajić A. Ljudska mikrobiota: Funkcija, modulacija mikrobiote u kliničkim ispitivanjima i implementacija u praksi. Zagreb; 2017.
9. Cader MZ, Kaser A. Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation. *Gut.* 2013;62(11):1653–64.
10. Manichanh C, Borrueal N, Casellas F, Guarner F. The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;9(10):599–608.
11. Tomasello E, Bedoui S. Intestinal innate immune cells in gut homeostasis and

- immunosurveillance. *Immunol Cell Biol.* 2013;91(3):201–3.
12. Rosen MJ, Dhawan A, Saeed SA. Inflammatory Bowel Disease in Children and Adolescents. *JAMA Pediatr.* NIH Public Access; 2015;169(11):1053–60.
 13. Sartor RB, Mazmanian SK. Intestinal Microbes in Inflammatory Bowel Diseases. *Am J Gastroenterol Suppl.* 2012;1(1):15–21.
 14. Vucelić B, Čuković-čavka S. Upalne bolesti crijeva Inflammatory Bowel Diseases. 2006;15(1):53–62.
 15. Ye Y, Pang Z, Chen W, Ju S, Zhou C. The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(12):22529–42.
 16. Ranjbar R. The Incidence and Prevalence of Crohn's Disease in Global Scale. *SOJ Immunol.* 2015;3(2):6–9.
 17. Rogler G, Luc B, Scharl M. New insights into the pathophysiology of inflammatory bowel disease: microbiota, epigenetics and common signalling pathways. *Swiss Med Wkly.* 2018;148(1112):w14599.
 18. Papa E, Docktor M, Smillie C, Weber S, Preheim SP, Gevers D, et al. Non-invasive mapping of the gastrointestinal microbiota identifies children with inflammatory bowel disease. *PLoS One.* Public Library of Science; 2012;7(6):e39242.
 19. Naser SA, Sagrainsingh SR, Naser AS, Thanigachalam S. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis causes Crohn's disease in some inflammatory bowel disease patients. *World J Gastroenterol.* Baishideng Publishing Group Inc; 2014;20(23):7403–15.
 20. Wakefield AJ, Pittilo RM, Sim R, Cosby SL, Stephenson JR, Dhillon AP, et al. Evidence of persistent measles virus infection in Crohn's disease. *J Med Virol.* 1993 Apr;39(4):345–53.
 21. Ghosh S, Armitage E, Wilson D, Minor PD, Afzal MA. Detection of persistent measles virus infection in Crohn's disease: current status of experimental work. *Gut.* BMJ Publishing Group; 2001;48(6):748–52.

22. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014;505(7484):559–63.
23. Zhang M, Sun K, Wu Y, Yang Y, Tso P, Wu Z. Interactions between Intestinal microbiota and host immune response in inflammatory bowel disease. *Front Immunol*. 2017;8(AUG):1–13.
24. Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM, Owen LJ. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Health Dis*. 2015;26:26191.
25. Ríos-Covián D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, de los Reyes-Gavilán CG, Salazar N. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Front Microbiol. Frontiers*; 2016;7:185.
26. Thibault R, Blachier F, Darcy-Vrillon B, de Coppet P, Bourreille A, Segain J-P. Butyrate utilization by the colonic mucosa in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. Oxford University Press; 2010;16(4):684–95.
27. Vinolo MAR, Rodrigues HG, Nachbar RT, Curi R. Regulation of Inflammation by Short Chain Fatty Acids. *Nutrients. Molecular Diversity Preservation International*; 2011;3(10):858–76.
28. Willett WC, Sacks F, Trichopoulos A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, et al. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr*. 1995;61(6):1402S–1406S.
29. Marlow G, Ellett S, Ferguson IR, Zhu S, Karunasinghe N, Jesuthasan AC, et al. Transcriptomics to study the effect of a Mediterranean-inspired diet on inflammation in Crohn's disease patients. *Hum Genomics*. 2013 Nov;7(1):24.
30. Sánchez-Fidalgo S, Sánchez de Ibarguen L, Cárdeno A, Alarcón de la Lastra C. Influence of extra virgin olive oil diet enriched with hydroxytyrosol in a chronic DSS colitis model. *Eur J Nutr*. 2012;51(4):497–506.
31. Biasi F, Deiana M, Guina T, Gamba P, Leonarduzzi G, Poli G. Wine consumption and intestinal redox homeostasis. *Redox Biol*. 2014;2:795–802.
32. Hold, Georgina Megan Smith, Charlie Grange, Euan Robert Watt, Emad M El-

- Omar IM, Georgina. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: What have we learnt in the past 10 years? *World J Gastroenterol.* 2014;20(5):1192.
33. Henker J, Müller S, Laass M, Schreiner A, Schulze J. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) for Successful Remission Maintenance of Ulcerative Colitis in Children and Adolescents: an Open-Label Pilot Study. *Z Gastroenterol.* 2008;46(9):874–5.
 34. Kruis W, Schütz E, Frick P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 1997;11(5):853–8.
 35. Zocco MA, Dal Verme LZ, Cremonini F, Piscaglia AC, Nista EC, Candelli M, et al. Efficacy of *Lactobacillus GG* in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;23(11):1567–74.
 36. Bousvaros A, Guandalini S, Baldassano RN, Botelho C, Evans J, Ferry GD, et al. A randomized, double-blind trial of *Lactobacillus GG* versus placebo in addition to standard maintenance therapy for children with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2005;11(9):833–9.
 37. Schultz M, Timmer A, Herfarth HH, Sartor RB, Vanderhoof JA, Rath HC. *Lactobacillus GG* in inducing and maintaining remission of Crohn's disease. *BMC Gastroenterol.* 2004;4(1):5.
 38. Oliva S, Di Nardo G, Ferrari F, Mallardo S, Rossi P, Patrizi G, et al. Randomised clinical trial: the effectiveness of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 rectal enema in children with active distal ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012 Feb;35(3):327–34.
 39. Kato K, Mizuno S, Umesaki Y, Ishii Y, Sugitani M, Imaoka A, et al. Randomized placebo-controlled trial assessing the effect of bifidobacteria-fermented milk on active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004 Nov;20(10):1133–41.
 40. Guslandi M. *Saccharomyces Boulardii* Plus Rifaximin in Mesalamine-intolerant Ulcerative Colitis. *J Clin Gastroenterol.* 2010;44(5):1.

41. Venturi A, Gionchetti P, Rizzello F, Johansson R, Zucconi E, Brigidi P, et al. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 1999;13(8):1103–8.
42. Kanauchi O, Mitsuyama K, Homma T, Takahama K, Fujiyama Y, Andoh A, et al. Treatment of ulcerative colitis patients by long-term administration of germinated barley foodstuff: multi-center open trial. *Int J Mol Med.* 2003;12(5):701–4.
43. Hanai H, Kanauchi O, Mitsuyama K, Andoh A, Takeuchi K, Takayuki I, et al. Germinated barley foodstuff prolongs remission in patients with ulcerative colitis. *Int J Mol Med.* 2004;13(5):643–7.
44. Faghfoori Z, Navai L, Shakerhosseini R, Somi MH, Nikniaz Z, Norouzi MF. Effects of an oral supplementation of germinated barley foodstuff on serum tumour necrosis factor- α , interleukin-6 and -8 in patients with ulcerative colitis. *Ann Clin Biochem.* 2011;48(3):233–7.
45. Faghfoori Z, Shakerhosseini R, Navai L, Somi MH, Nikniaz Z, Abadi A. Effects of an Oral Supplementation of Germinated Barley Foodstuff on Serum CRP Level and Clinical Signs in Patients with Ulcerative Colitis. *Heal Promot Perspect.* 2014;4(1):116–21.
46. Thorkildsen LT, Nwosu FC, Avershina E, Ricanek P, Perminow G, Brackmann S, et al. Dominant Fecal Microbiota in Newly Diagnosed Untreated Inflammatory Bowel Disease Patients. *Gastroenterol Res Pract.* 2013;2013:1–13.
47. Kerman DH, Deshpande AR. Gut Microbiota and Inflammatory Bowel Disease: The Role of Antibiotics in Disease Management. *Postgrad Med.* 2014;126(4):7–19.
48. Berg D, Clemente JC, Colombel J-F. Can inflammatory bowel disease be permanently treated with short-term interventions on the microbiome? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;9(6):781–95.
49. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Bengmark S, Scholze J, Doerffel Y. Bacterial Biofilm Suppression with Antibiotics for Ulcerative and Indeterminate Colitis:

- Consequences of Aggressive Treatment. *Arch Med Res.* 2008 Feb;39(2):198–204.
50. Maccaferri S, Vitali B, Klinder A, Kolida S, Ndagijimana M, Laghi L, et al. Rifaximin modulates the colonic microbiota of patients with Crohn's disease: an in vitro approach using a continuous culture colonic model system. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(12):2556–65.
 51. Gionchetti P, Rizzello F, Ferrieri A, Venturi A, Brignola C, Ferretti M, et al. Rifaximin in patients with moderate or severe ulcerative colitis refractory to steroid-treatment: a double-blind, placebo-controlled trial. *Dig Dis Sci.* 1999;44(6):1220–1.
 52. Becker C, Neurath MF, Wirtz S. The Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *ILAR J.* 2015;56(2):192–204.
 53. Hörmannspurger G, Schaubeck M, Haller D. Intestinal Microbiota in Animal Models of Inflammatory Diseases. *ILAR J.* 2015;56(2):179–91.
 54. Bennet J, Brinkman M. Treatment of ulcerative colitis by implantation of normal colonic flora. *Lancet.* Elsevier; 1989;333(8630):164.
 55. Borody TJ, George L, Andrews P, Brandl S, Noonan S, Cole P, et al. Bowel-flora alteration: a potential cure for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome? *Med J Aust.* 1989;150(10):604.
 56. Borody TJ, Warren EF, Leis S, Surace R, Ashman O. Treatment of ulcerative colitis using fecal bacteriotherapy. *J Clin Gastroenterol.* 2003 Jul;37(1):42–7.
 57. Colman RJ, Rubin DT. Fecal microbiota transplantation as therapy for inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *J Crohn's Colitis.* 2014;8(12):1569–81.
 58. Matijašić M, Meštrović T, Perić M, Čipčić Paljetak H, Panek M, Vranešić Bender D, et al. Modulating Composition and Metabolic Activity of the Gut Microbiota in IBD Patients. *Int J Mol Sci.* 2016;17(4):578.
 59. Ianiro G, Bibbò S, Scaldaferrì F, Gasbarrini A, Cammarota G. Fecal Microbiota Transplantation in Inflammatory Bowel Disease. *Medicine (Baltimore).*

- 2014;93(19):e97.
60. Matsuoka K, Kanai T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Semin Immunopathol.* 2015;37(1):47–55.
 61. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011;473(7346):174–80.
 62. Elson CO, Cong Y. Host-microbiota interactions in inflammatory bowel disease. *Gut Microbes.* 2012;3(4):332–44.
 63. Chow J, Mazmanian SK. A Pathobiont of the Microbiota Balances Host Colonization and Intestinal Inflammation. *Cell Host Microbe.* Elsevier Ltd; 2010;7(4):265–76.
 64. Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, Vázquez-Baeza Y, Van Treuren W, Ren B, et al. The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn’s disease. *Cell Host Microbe.* 2014;15(3):382–92.
 65. Prosberg M, Bendtsen F, Vind I, Petersen AM, Gluud LL. The association between the gut microbiota and the inflammatory bowel disease activity: a systematic review and meta-analysis. *Scand J Gastroenterol.* 2016;51(12):1407–15.
 66. Zhou M, He J, Shen Y, Zhang C, Wang J, Chen Y. New Frontiers in Genetics, Gut Microbiota, and Immunity: A Rosetta Stone for the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Biomed Res Int.* 2017;2017:1–17.
 67. Ricanek P, Lothe SM, Frye SA, Rydning A, Vatn MH, Tønjum T. Gut bacterial profile in patients newly diagnosed with treatment-naïve Crohn’s disease. *Clin Exp Gastroenterol.* 2012;5(1):173–86.
 68. Vrieze a., Holleman F, Zoetendal EG, de Vos WM, Hoekstra JBL, Nieuwdorp M. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia.* 2010;53(4):606–13.
 69. Mimouna S, Gonçalves D, Barnich N, Darfeuille-Michaud A, Hofman P, Vouret-Craviari V. Crohn disease-associated *Escherichia coli* promote gastrointestinal inflammatory disorders by activation of HIF-dependent responses. *Gut Microbes.*

- 2011;2(6):335–46.
70. Pascal V, Pozuelo M, Borrueal N, Casellas F, Campos D, Santiago A, et al. A microbial signature for Crohn's disease. *Gut*. 2017;66(5):813–22.
 71. Pedamallu CS, Bhatt AS, Bullman S, Fowler S, Freeman SS, Durand J, et al. Metagenomic Characterization of Microbial Communities In Situ Within the Deeper Layers of the Ileum in Crohn's Disease. *Cmgh*. Elsevier Inc; 2016;2(5):563–566.e5.
 72. Imhann F, Vila AV, Bonder MJ, Fu J, Gevers D, Visschedijk MC, et al. Interplay of host genetics and gut microbiota underlying the onset and clinical presentation of inflammatory bowel disease. *Gut*. 2016;1–12.
 73. D'Amore R, Ijaz UZ, Schirmer M, Kenny JG, Gregory R, Darby AC, et al. A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling. *BMC Genomics*. BioMed Central; 2016;17(1):55.
 74. Gyires K, Toth E, Zadori S. Gut Inflammation: Current Update on Pathophysiology, Molecular Mechanism and Pharmacological Treatment Modalities. *Curr Pharm Des*. 2014;20(7):1063–81.
 75. Flanagan P, Campbell BJ, Rhodes JM. Bacteria in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Biochem Soc Trans*. 2011;39(4):1067–72.
 76. von Schillde M-A, Hörmannspurger G, Weiher M, Alpert C-A, Hahne H, Bäuerl C, et al. Lactocepin Secreted By *Lactobacillus* Exerts Anti-Inflammatory Effects By Selectively Degrading Proinflammatory Chemokines. *Cell Host Microbe*. 2012;11(4):387–96.
 77. Furrie E, Macfarlane S, Kennedy A, Cummings JH, Walsh S V, O'neil DA, et al. Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut*. 2005;54(2):242–9.
 78. Sang L-X, Chang B, Zhang W-L, Wu X-M, Li X-H, Jiang M. Remission induction and maintenance effect of probiotics on ulcerative colitis: a meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2010;16(15):1908–15.

79. Philippe D, Favre L, Foata F, Adolfsson O, Perruisseau-Carrier G, Vidal K, et al. *Bifidobacterium lactis attenuates onset of inflammation in a murine model of colitis.* *World J Gastroenterol.* 2011;17(4):459.
80. Izcue A, Coombes JL, Powrie F. *Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation.* *Immunol Rev.* 2006;212(1):256–71.
81. Norouzinia M, Chaleshi V, Alizadeh AHM, Zali MR. *Biomarkers in inflammatory bowel diseases: insight into diagnosis, prognosis and treatment.* *Gastroenterol Hepatol from bed to bench. Shahid Beheshti University of Medical Sciences;* 2017;10(3):155–67.
82. van Heel DA, Fisher SA, Kirby A, Daly MJ, Rioux JD, Lewis CM, et al. *Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs.* *Hum Mol Genet.* 2004;13(7):763–70.
83. Andersson E, Bergemalm D, Kruse R, Neumann G, D’Amato M, Repsilber D, et al. *Subphenotypes of inflammatory bowel disease are characterized by specific serum protein profiles.* *PLoS One.* 2017;12(10):1–16.
84. Assarsson E, Lundberg M, Holmquist G, Björkesten J, Thorsen SB, Ekman D, et al. *Homogenous 96-plex PEA immunoassay exhibiting high sensitivity, specificity, and excellent scalability.* *PLoS One. Public Library of Science;* 2014 Jan 22;9(4):e95192.
85. Lundberg M, Eriksson A, Tran B, Assarsson E, Fredriksson S. *Homogeneous antibody-based proximity extension assays provide sensitive and specific detection of low-abundant proteins in human blood.* *Nucleic Acids Res.* 2011;39(15):e102.
86. Hildebrand F, Nguyen TLA, Brinkman B, Yunta RG, Cauwe B, Vandenabeele P, et al. *Inflammation-associated enterotypes, host genotype, cage and inter-individual effects drive gut microbiota variation in common laboratory mice.* *Genome Biol. BioMed Central Ltd;* 2013;14(1):R4.
87. Mendoza JL, Abreu MT. *Biological markers in inflammatory bowel disease:*

- Practical consideration for clinicians. *Gastroentérologie Clin Biol.* 2009;33:S158–73.
88. Zhang Y-Z, Li Y-Y. Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 2014;20(1):91.
 89. Medzhitov R, Janeway C. Innate Immunity. Mackay IR, Rosen FS, editors. *N Engl J Med.* 2000;343(5):338–44.
 90. Abreu MT, Fukata M, Arditi M. TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol.* 2005;174(8):4453–60.
 91. Fonseca-Camarillo G, Yamamoto-Furusho JK. Immunoregulatory Pathways Involved in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2015;21(9):2188–93.
 92. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host–microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2012;491(7422):119–24.
 93. Gena Z, Ribosomsko Z a, Šimenc J, Golle A, Potočnik U. Molecular Identification of Several Clinically Important Bacteria Including Enterobacteria By Partial 16S Ribosomal Rna Gene Sequence Comparison. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008;547–52.
 94. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn’s disease revealed by a metagenomic approach. *Gut.* 2006;55(2):205–11.
 95. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* 2014;30(9):418–26.
 96. Kaltak M. Metode sekvenciranja novih generacija u dijagnostici. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2016.
 97. Ju J, Kim DH, Bi L, Meng Q, Bai X, Li Z, et al. Four-color DNA sequencing by synthesis using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103(52):19635–40.

98. Panek M, Paljetak HČ, Barešić A, Perić M, Matijašić M, Lojkić I, et al. Methodology challenges in studying human gut microbiota – effects of collection, storage, DNA extraction and next generation sequencing technologies. *Sci Rep.* 2018;8:5143.
99. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:251364.
100. Illumina. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. 2013;1–28. Available from:
https://support.illumina.com/downloads/16s_metagenomic_sequencing_library_preparation.html
101. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 2012 Aug;6(8):1621–4.
102. Thomas T, Gilbert J, Meyer F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microb Inform Exp. BioMed Central Ltd;* 2012;2(1):3.
103. Leone V, Chang EB, Devkota S. Diet, microbes, and host genetics: the perfect storm in inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol.* 2013;48(3):315–21.
104. Lai H-C, Young J, Lin C-S, Chang C-J, Lu C-C, Martel J, et al. Impact of the gut microbiota, prebiotics, and probiotics on human health and disease. *Biomed J.* 2014;37(5):259.
105. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(1):e1.
106. Gloor G.B. ALDEx2 CoDa microbiome tutorial [Internet]. 2016. Available from:
https://github.com/ggloor/CoDa_microbiome_tutorial
107. Gloor GB, Reid G. Compositional analysis: a valid approach to analyze microbiome high throughput sequencing data. *Can J Microbiol.* 2016;703(April):cjm-2015-0821.

108. Fernandes AD, Reid JN, Macklaim JM, McMurrough TA, Edgell DR, Gloor GB. Unifying the analysis of high-throughput sequencing datasets: characterizing RNA-seq, 16S rRNA gene sequencing and selective growth experiments by compositional data analysis. *Microbiome*. BioMed Central; 2014;2(1):15.
109. Frank St Amand, A. L., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., Pace, N. R. DN. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(34):13780–5.
110. Belizario JE, Napolitano M. Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Front Microbiol*. 2015;6(OCT):1–16.
111. Milani C, Hevia A, Feroni E, Duranti S, Turrone F, Lugli GA, et al. Assessing the fecal microbiota: an optimized ion torrent 16S rRNA gene-based analysis protocol. *PLoS One*. Public Library of Science; 2013;8(7):e68739.
112. Wang W, Chen L, Zhou R, Wang X, Song L, Huang S, et al. Increased proportions of Bifidobacterium and the Lactobacillus group and loss of butyrate-producing bacteria in inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol*. 2014;52(2):398–406.
113. Tito RY, Cypers H, Joossens M, Varkas G, Van Praet L, Glorieus E, et al. Brief Report: Dialister as a Microbial Marker of Disease Activity in Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2017;69(1):114–21.
114. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward D V, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol*. BioMed Central; 2012;13(9):R79.
115. Soubières AA, Poullis A. Emerging Biomarkers for the Diagnosis and Monitoring of Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2016;22(8):2016–22.
116. Nourian M, Chaleshi V, Pishkar L, Azimzadeh P, Baradaran Ghavami S, Balaii H, et al. Evaluation of tumor necrosis factor (TNF)- α mRNA expression level and the rs1799964 polymorphism of the TNF- α gene in peripheral mononuclear cells of

- patients with inflammatory bowel diseases. *Biomed Reports*. 2017;6(6):698–702.
117. Sun M, He C, Wu W, Zhou G, Liu F, Cong Y, et al. Hypoxia inducible factor-1 α -induced interleukin-33 expression in intestinal epithelia contributes to mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*. 2017;187(3):428–40.
 118. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward D V., et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol*. BioMed Central Ltd; 2012;13(9):R79.
 119. Uguccioni M, Gionchetti P, Robbiani DF, Rizzello F, Peruzzo S, Campieri M, et al. Increased expression of IP-10, IL-8, MCP-1, and MCP-3 in ulcerative colitis. *Am J Pathol*. American Society for Investigative Pathology; 1999;155(2):331–6.
 120. Liu M, Guo S, Hibbert JM, Jain V, Singh N, Wilson NO, et al. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011;22(3):121–30.
 121. Sczesnak A, Segata N, Qin X, Gevers D, Petrosino JF, Huttenhower C, et al. The genome of th17 cell-inducing segmented filamentous bacteria reveals extensive auxotrophy and adaptations to the intestinal environment. *Cell Host Microbe*. NIH Public Access; 2011;10(3):260–72.
 122. Allocca M, Jovani M, Fiorino G, Schreiber S, Danese S. Anti-IL-6 treatment for inflammatory bowel diseases: next cytokine, next target. *Curr Drug Targets*. 2013;14(12):1508–21.
 123. Tsay T-B, Yang M-C, Sun J-T, Chen P-H, Lin Y-S, Shih M-H, et al. Enteric bacterial loads are associated with interleukin-6 levels in systemic inflammatory response syndrome patients. *Formos J Surg*. No longer published by Elsevier; 2016;49(6):208–16.
 124. Sturm A, Schulte C, Schatton R, Becker A, Cario E, Goebell H, et al. Transforming growth factor-beta and hepatocyte growth factor plasma levels in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2000;12(4):445–50.

125. Scherl-Mostageer M, Sommergruber W, Abseher R, Hauptmann R, Ambros P, Schweifer N. Identification of a novel gene, CDCP1, overexpressed in human colorectal cancer. *Oncogene*. 2001;20(32):4402–8.
126. Ikeda J, Oda T, Inoue M, Uekita T, Sakai R, Okumura M, et al. Expression of CUB domain containing protein (CDCP1) is correlated with prognosis and survival of patients with adenocarcinoma of lung. *Cancer Sci*. 2009;100(3):429–33.
127. Svensson MND, Andersson SEM, Erlandsson MC, Jonsson I-M, Ekwall A-KH, Andersson KME, et al. Fms-Like Tyrosine Kinase 3 Ligand Controls Formation of Regulatory T Cells in Autoimmune Arthritis. Ashour HM, editor. *PLoS One*. Public Library of Science; 2013;8(1):e54884.
128. Mao J-W, Huang Y-S, Tang H-Y, Bi J, Liu Y-F, Wang Y-D. Flt3/Flt3L Participates in the Process of Regulating Dendritic Cells and Regulatory T Cells in DSS-Induced Colitis. *Gastroenterol Res Pract*. Hindawi; 2014;2014:483578.

11. BIOGRAFIJA

Marina Panek rođena je 1986. godine u Slavonskom Brodu. Završila je studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2014. godine. Po završetku studija zaposlila se na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, Centar za translacijska i klinička istraživanja kao stručni suradnik na dvije godine, a nakon toga kao asistent. Doktorski studij upisala je na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, područje Biomedicine i zdravstva. Marina Panek stipendistica je Hrvatske zaklade za znanost u sklopu natječaja „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti" i sudjeluje na HRZZ projektu #5467 „Utvrdjivanje sastava crijevne mikrobiote, upalnih markera, prehrambenog i endokrinog statusa u pacijenata s upalnom bolesti crijeva“ od siječnja 2015. Sudjelovala je na mnogim radionicama na temu sekvenciranja nove generacije, te se usavršavala na području ljudskog mikrobioma; metagenomike, interakcije crijevne mikrobiote i domaćina, utjecaju mikrobiote na javno zdravstvo, nove metode analize mikrobiote, modeli za proučavanje povezanosti poremećaja crijevne mikrobiote i razvoja bolesti, istraživanju i razvijanju novih metoda za prikupljanje i obradu uzoraka. Aktivno sudjeluje u radu sa studentima i na znanstveno-istraživačkim projektima.