

# Uloga mikrobiote u bolestima jetre

---

Kutija, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:728191>

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

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



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Lucija Kutija**

**Uloga mikrobiote u bolestima jetre**

**Diplomski rad**



**Zagreb, 2021.**

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Anne Mrzljak, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2020/2021.

# POPIS KRATICA I NJIHOVO OBJAŠNENJE

ALD – alkoholna bolest jetre (eng. *alcoholic liver disease*)

ALP – alkalna fosfataza (eng. *alkaline phosphatase*)

ASCA – anti-Saccharomyces cerevisiae IgG antitijela

AST – aspartat aminotransferaza

DMA – dimetilamin

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (eng. *deoxyribonucleic acid*)

FXR – farnezoid X receptor

GLP-1 – peptida 1 nalik glukagonu (eng. *glucagon-like peptide-1*)

GWAS – cjelogenomske asocijacijske studije (eng. *genome-wide association study*)

HCC – hepatocelularni karcinom (eng. *hepatocellular carcinoma*)

PAMP – eng. *pathogen-associated molecular patterns*

PBC – primarni bilijarni kolangitis (eng. *primary biliary cholangitis*)

PSC – primarni sklerozirajući kolangitis kolangitis (eng. *primary sclerosing cholangitis*)

RNA – ribonukleinska kiselina (eng. *ribonucleic acid*)

IBD – upalne bolesti crijeva (eng. *inflammatory bowel disease*)

IL – interleukin

LCFA – dugolančane masne kiseline (eng. *long chain fatty acids*)

MELD – zbroj za procjenu terminalnog jetrenog zatajenja (eng. *Model for End-Stage Liver Disease*)

MMA – monometilamin

MyD88 – mijeloidni diferencijacijski primarni odgovor 88 (eng. *myeloid differentiation primary response 88*)

NAFLD – nealkoholna bolest jetre (eng. *nonalcoholic fatty liver disease*)

NASH – nealkoholni steatohepatitis (eng. *non-alcoholic steatohepatitis*)

NF- $\kappa$ B – jezgrin čimbenik kappa beta (engl. *nuclear factor kappa B*)

ROS – reaktivne vrste kisika (eng. *reactive oxygen species*)

SAM – S-adenozil metionin (eng. *S-adenosyl methionine*)

SCFA – kratkolančane masne kiseline (engl. *short-chainfattyacids*)

TGF $\beta$  – transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  (eng. *transforming growth factor- $\beta$* )

TGR5 – Takeda protein G povezan s  
receptorom 5 (eng. *Takeda G-protein-  
coupled receptor 5*)

TLR – receptor sličan tolu (eng. *toll-like  
receptor*)

TMA – trimetilamini

TNF $\alpha$  – tumor nekrotični faktor  $\alpha$

VLDL – lipoprotein vrlo male gustoće (eng.  
*very low-density lipoprotein*)

# SAŽETAK

## Uloga mikrobiote u bolestima jetre, Lucija Kutija

Crijevna mikrobiota ima više različitih uloga u ljudskom organizmu, prvenstveno sudjelujući u metaboličkim procesima. Njezini metaboliti imaju važnu ulogu u regulaciji homeostaze u tijelu i interferiraju s raznim staničnim putevima.

Postoji velika varijabilnost između pojedinaca u sastavu mikrobiote. Promjena u raznolikosti i funkcionalnosti mikrobiote naziva se disbiozom. Određene bakterije mogu uzrokovati oštećenje crijevne barijere. Ukoliko je crijevna barijera oštećena, metabolički produkti, hormoni, stanične komponente dolaze do jetre gdje se odvija imunološki odgovor. Disbioza utječe i na metabolizam tvari koje sudjeluju kao signalne molekule u organizmu te remeti njihovu ravnotežu. Pretpostavlja se da su navedeni mehanizmi u patogenezi jetrenih bolesti, poput primarnog sklerozirajućeg kolangitisa, nealkoholne bolesti jetre i alkoholne bolesti jetre. Terapija usmjerena na mikrobiotu i njezine produkte predstavlja novu nadu u razvoju terapijskih mogućnosti koje bi mogle utjecati na prirodni tijek jetrenih bolesti.

Danas se sve više primjećuje važnost mikrobiote u patofiziologiji različitih bolesti gotovo svih organskih sustava, stoga je u ovom radu dan pregled rezultata istraživanja o mikrobioti i njezinoj ulozi u patogenezi jetrenih bolesti kao što su primarni sklerozirajući kolangitis, nealkoholna bolest jetre, alkoholna bolest jetre i druge te mogućim budućim terapijskim postupcima usmjerenima na manipulaciju crijevne mikrobiote.

Ključne riječi: crijevna mikrobiota, disbioza, jetrene bolesti.

# **SUMMARY**

## **The role of microbiota in liver diseases, Lucija Kutija**

Gut microbiota has a lot of different roles in the human body. Firstly, it is included in metabolic processes. Metabolites of microbiota have an important role in the regulation of homeostasis in the human body, and they interfere with several cell signaling pathways.

There is a high variability in the composition of microbiota between people. Change in the diversity and functionality of microbiota is called dysbiosis. Moreover, some bacteria can disrupt the intestinal barrier. If the intestinal barrier is disrupted, metabolic products, hormones and cell components reach the liver, where the immune response occurs. Dysbiosis has an impact on the metabolism of substances, which act as signal molecules in the organism and disturb its balance. Therefore, these are suggested mechanisms in the pathogenesis of liver diseases like primary sclerosing cholangitis, non-alcoholic fatty liver disease, or alcoholic liver disease. Treatment targeted on microbiota and its products represents new hope in the development of therapeutic possibilities that could impact liver disease progression.

Nowadays, science has just started to notice the importance of the microbiota in the pathophysiology of diseases in several different organ systems. Furthermore, this paper reviews articles about microbiota and provides the latest information on its role in the pathogenesis of liver diseases like primary sclerosing cholangitis, non-alcoholic fatty liver disease, alcoholic fatty liver disease, and others. Also, it provides information about future therapeutic possibilities directed towards the manipulation of gut microbiota.

Key words: gut microbiota, dysbiosis, liver diseases

# SADRŽAJ

UVOD .....	1
PRIMARNI SKLEROZIRAJUĆI KOLANGITIS .....	2
Patofiziologija.....	2
Uloga crijevne mikrobiote u primarnom sklerozirajućem kolangitisu .....	3
Crijevna disbioza u upalnoj bolesti crijeva i primarnom sklerozirajućem kolangitisu .....	4
Crijevna propusnost i translokacija bakterija.....	6
Utjecaj mikrobiote na upalu hepatobilijarnog sustava.....	7
Uloga mikrobiote u terapijskom pristupu primarnog sklerozirajućeg kolangitisa .....	9
NEALKOHOLNA MASNA BOLEST JETRE .....	10
Patofiziologija.....	10
Crijevna disbioza u nealkoholnoj masnoj bolesti jetre .....	11
Utjecaj metabolita mikrobiote u nealkoholnoj masnoj bolesti jetre .....	12
Kratkolančane masne kiseline.....	12
Žučne kiseline .....	13
Kolin .....	13
Aminokiseline .....	14
Tryptofan .....	14
Endogeni etanol .....	15
Crijevna mikrobiota inducira upalne procese u jetri .....	15
Uloga mikrobioma u terapijskom pristupu nealkoholne masne bolesti jetre .....	17
ALKOHOLNA BOLEST JETRE .....	19
Patofiziologija.....	19
Uloga crijevne disbioze u alkoholnoj bolesti jetre .....	20
Uloga metabolita crijevne mikrobiote u alkoholnoj bolesti jetre .....	21
Uloga mikrobiote u terapijskom pristupu alkoholne bolesti jetre .....	22
OSTALE BOLESTI JETRE POVEZANE S MIKROBIOTOM .....	24
Hepatocelularni karcinom.....	24
Primarni bilijarni kolangitis.....	25
ZAKLJUČAK .....	26
ZAHVALE .....	27
LITERATURA.....	28
ŽIVOTOPIS .....	34



# UVOD

Mikrobiota je sveukupna populacija mikroorganizama koji koloniziraju određeno mjesto, a uključuje bakterije, gljive, arheje, viruse i protozoe (Ortigao, 2020).

Distribucija mikrobiote je heterogena te je najveći dio smješten u tankom crijevu, gdje se dominantno odvija proces fermentacije (de Oca, 2020). U zdravog čovjeka, mikrobiota ima ulogu u imunološkim i metaboličkim funkcijama (Ortigao, 2020). Debelo crijevo opskrbljuje enzimima koji su potrebni za fermentaciju ugljikohidrata, proizvodeći kratkolančane masne kiseline (engl. *short-chain fatty acids* - SCFA ) kao što je butirat. Takve kiseline su odgovorne za produkciju 70% energije kolonocita, pojačavaju intestinalnu barijeru te protuupalna i antikarcinogena svojstva (Ortigao, 2020). Metaboliti iz crijeva, stanične komponente, hormoni i drugi translocirani su u jetru putem portalne cirkulacije gdje aktivno sudjeluju u interakciji s imunskim stanicama (Kanmani, 2020).

Crijevni mikrobiom razlikuje se između pojedinaca i dijelova probavne cijevi (Ortigao, 2020). Ovisi o brojnim faktorima kao što je okoliš, dijeta i genetika domaćina (Kwong, 2021). U zdravih pojedinaca u gastrointestinalnom sustavu najzastupljenije su bakterije koljena Bacteroidetes, Firmicutes, potom nešto rjeđe Proteobacteria i Actinobacteria (Kanmani, 2020). Iako je teško odrediti eubiozni status zbog velike raznolikosti između zdravih pojedinaca, smatra se prema većini studija, da se komenzalne bakterije kao što su *Roseburia*, *Akkermansia*, *Bifidobacterium* i *Faecalibacterium prausnitzii* mogu povezati sa zdravim crijevom. Narušavanje ravnoteže između domaćina i crijevnih mikrobiota te pojava promjena unutar sastava i funkcije naziva se disbiozom. Značajke disbioze su gubitak komenzala, pretjeran rast potencijalno štetnih organizama i redukcija sveukupne raznolikosti (Ortigao, 2020).

Nekoliko se patogenetskih mehanizama, iako nisu u potpunosti razjašnjeni, povezuje s jetrenim bolestima (Kanmani, 2020), kao što su nealkoholna bolest jetre (engl. *nonalcoholic fatty liver disease* - NAFLD), alkoholna bolest jetre (engl. *alcoholic liver disease* - ALD), primarni sklerozirajući kolangitis (engl. *primary sclerosing cholangitis* - PSC) i dr.

# PRIMARNI SKLEROZIRAJUĆI KOLANGITIS

Primarni sklerozirajući kolangitis kronična je jetrena bolest koja je karakterizirana upalom i fibrozom intrahepatičkih i ekstrahepatičkih žučnih vodova što dovodi do stvaranja striktura i fibrozne promjene žučnih vodova. Jetrena fibroza može dovesti do ciroze jetre i zatajivanja jetrene funkcije (*Shah, 2020*). PSC povezuje se s konkomitantnom upalnom bolesti crijeva (eng. *inflammatory bowel disease – IBD*), češće s ulceroznim kolitisom nego li s Crohnovom bolešću (*Dean, 2020*). PSC predstavlja povećani rizik za razvoj kolorektalnog i hepatobilijarnog malignoma, osobito kolangiokarcinoma (*Little, 2020*).

Smatra se da postoji povezanost između PSC-a i upalnih bolesti crijeva budući da skoro 75% djece i odraslih sa PSC-om imaju dijagnosticiranu upalnu bolest crijeva (*Little, 2020*), a između 2,5 i 7,5% oboljelih od IBD-a razvit će PSC (*Shah, 2020*). Razvoj PSC-a ne korelira s aktivnošću bolesti IBD-a (*Dean, 2020*).

## Patofiziologija

Primarni sklerozirajući kolangitis smatra se kompleksnom bolešću koja nastaje kao rezultat interakcije genetike i okolišnih faktora među kojima se ističe crijevna mikrobiota (*Ali, 2016*). Smatra se da se PSC javlja u genetski predisponiranih pojedinaca koji su bili izloženi nekakvom okolišnom čimbeniku čiji je utjecaj potaknuo razvoj bolesti (*Shah, 2020*). Činjenica da PSC može recidivirati u bolesnika s transplantiranom jetrom govori u prilog da bi mogli postojati faktori izvan same jetre koji bi potaknuli razvoj bolesti (*Dean, 2020*).

Cjelogenomske asocijacijske studije (eng. *genome-wide association study - GWAS*) velikih kohorti pokazale su povezanost PSC-a i HLA. Pronađeno je barem 23 genska lokusa koja se povezuju s rizikom razvoja bolesti (*Dyson, 2018*). Učestala pojavnost PSC-a i IBD-a govori u prilog o mogućem utjecaju autoimunosti u razvoju bolesti (*Shah, 2020*). Unatoč opaženoj povezanosti s genetskom predispozicijom, PSC rijetko je obiteljska bolest što ponovno ukazuje na važan utjecaj okolišnih čimbenika (*Dyson, 2018*), osobito crijevne mikrobiote koja dolazi sve više u fokus istraživanja.

Mikrobiota može se smatrati zasebnim okolišnim čimbenikom, ali je i ona sama podložna utjecaju drugih okolišnih faktora kao što su dijeta, lijekovi, higijena ili čak

raspoloženje (Little, 2020). Njezin utjecaj mogao bi razjasniti kompleksnu isprepletenost između intestinuma i hepatobilijarnog sustava te njegovu ulogu u razvoju PSC-a, kao i ponuditi objašnjenje poveznice između crijevne upale u IBD-u i razvoja PSC-a (Dean, 2020). Osnovna hipoteza je da se crijevni mikrobiom ili njegovi produkti translociraju kroz tzv. „leaky gut“ barijeru (zbog upale) i putuju portalnom cirkulacijom do jetre gdje induciraju upalu i posljedično fibrozne procese (Little, 2020). „Leaky – gut“ naziv je za stanje u kojem dolazi do povećane propusnosti crijeva uslijed narušavanja integriteta crijevne barijere (Jadhav, 2020).

## Uloga crijevne mikrobiote u primarnom sklerozirajućem kolangitisu

Mikrobiota kao komenzal u intestinumu ima važne fiziološke uloge poput konjugacije žučnih kiselina, proizvodnja vitamina i olakšavanje probavljanja nutrijenata. Općenito, velika raznolikost mikrobiote smatra se obilježjem zdravog probavnog sustava budući da se kompeticija između komenzalnih bakterija povezuje s populacijskom stabilnošću (Biedermann, 2015). Gastrointestinalne mikroorganizme teško je izolirati u kulturi pa se njihovo proučavanje temelji na metodama sekvencioniranja deoksiribonukleinske kiseline (eng. *deoxyribonucleic acid* - DNA). Većina tehnika proučava 16S ribosomsku ribonukleinsku kiselinu (eng. *ribonucleic acid* – RNA) koja je sačuvana između različitih vrsta bakterija (Ortigao, 2020). 16SrRNA sekvencijska tehnika ne ulazi u povezanost između bakterijskih vrsta i njihovog funkcionalnog kapaciteta, ali je jeftina i lako dostupna što ju čini dominantnom metodom (Rojo, 2017). Uzorke koje koristimo u analizi mogu biti porijeklom fekalni ili uzorci sluznice dobiveni biopsijom pri čemu treba uzeti u obzir veću varijabilnost mikrobiote sluznice zbog različite mogućnosti uzorkovanja i drugih proceduralnih čimbenika (Little, 2020).

Pretpostavljaju se 3 ključna patogenetska mehanizma kojima bi se objasnio utjecaj intestinuma i hepatobilijarnog sustava, a to su promjena crijevne mikroflore tzv. intestinalna disbioza u IBD-u i PSC-u koja uzrokuje proizvodnju potencijalno toksičnih i imunostimulirajućih nusprodukata, prisutnost konkomitatnog IBD-a koji može povećati intestinalnu propusnost zbog upale sluznice, dopuštajući pri tom translokaciju bakterija i toksina do hepatobilijarnog sustava i pokrećući aktivaciju imunskog sustava protiv hepatocita i kolangiocita te posljedično rezultirajući ozljedom bilijarnog sustava, remodelacijom i fibrozom (Dean, 2020).

## Crijevna disbioza u upalnoj bolesti crijeva i primarnom sklerozirajućem kolangitisu

Značajno smanjena raznolikost mikrobioma ili promjena u prevalenciji bakterijskih vrsta naziva se disbiozom. U životinjskim modelima, porast bakterijske populacije u tankom crijevu može dovesti do nekroze hepatocita i upale malih žučnih vodova kakve nalazimo u ranom stadiju PSC-a. Uistinu, zabilježena je smanjena mikrobiološka raznolikost i promjene specifičnih vrsta bakterija u PSC-u, s ili bez IBD-a kao komorbiditeta (Dean, 2020).

Studije fekalnog mikrobioma u PSC-u pokazale su da je smanjena ukupna bioraznolikost (alfa raznolikost) u PSC-u nego li u zdravih kontrola, kao i raznolikost u sastavu te bogatstvu vrsta između uzoraka pojedinaca (beta raznolikost). Studije koje su promatrale mikrobiom iz uzorka mukoze u zdravih pojedinaca i PSC-u, pronašle su isto smanjenu alfa i beta raznolikost, no ovi rezultati nisu bili konzistentni (Dean, 2020).

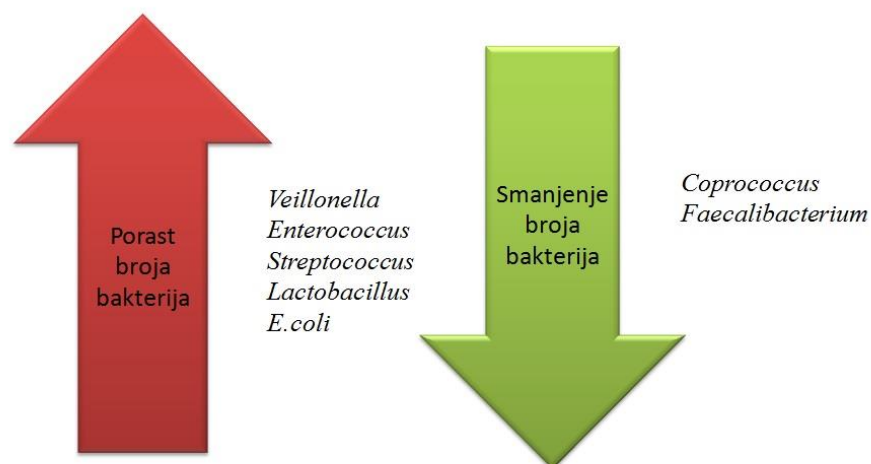
Nekoliko je bakterijskih taksonomskih skupina gotovo uvijek promijenjeno u stolici ispitanika sa PSC-om nasuprot zdravih kontrola (Slika 1.). Ističe se osobito porast bakterija roda *Veillonella*, a često je zabilježen rast bakterija roda *Enterococcus*, *Streptococcus* i *Lactobacillus*, kao i članova Proteobacteria koljena, poput *E. Coli*. Nekoliko studija pokazalo je relativnu depleciju kratkolančanih masnih kiselina (SCFA) koje proizvodi koljeno Firmicutes, kojem pripadaju bakterije *Coprococcus* i *Faecalibacterium* (Little, 2020).

Rod *Veillonella* nije specifičan za PSC pa se povezuje i s fibroznim stanjima kao što su jetrena fibroza, plućna fibroza ili cistična fibroza, ali i s drugim jetrenima bolestima poput primarne bilijarne ciroze, ciroze hepatitisa B, hepatičke encefalopatije kao komplikacije ciroze jetre, što sve može biti rezultat refleksije zajedničkog krajnjeg stadija multiple jetrene patologije (Little, 2020; Torres, 2018).

Prema studiji Sabina i ostalih pronađeno je da *Enterococcus* doprinosi remećenju intestinalne barijere i upali intestinuma pomoću metaloproteinaze koja cijepa epitelne kaderine. Uočena je pozitivna korelacija roda *Enterococcus* i razine alkalne fosfataze (eng. *alkaline phosphatase-ALP*) koja se može koristiti kao prediktor prognoze u PSC-u i ukazivati na bilijarnu patologiju, dok se prema novijem istraživanju, *Fusobacterium* povezuje s težinom upale crijeva (Sabino, 2016; Vieira-Silva, 2019), što potvrđuje povećana zastupljenost roda *Fusobacterium* u stolici u ispitanika s Crohnovom bolesti ili sa PSC-om i Crohnovom bolešću (Little, 2020).

Istraživanje Rühlemanna i ostalih nije zabilježilo nikakve značajne razlike u beta raznolikosti između pacijenata s izoliranim PSC-om te pacijenata sa PSC-om i konkomitantnom upalnom bolesti crijeva, sugerirajući da su promjene u mikrobiomu u PSC-u sasvim neovisne od povezanog kolitisa (Rühlemann, 2019). Slična istraživanja podupiru te rezultate ukazujući da su nalazi mikrobioma u PSC-u neovisni o IBD-u, stoga bi pronalazak specifičnog mikrobioma u PSC-u mogao objasniti etiologiju PSC-a, ali i u budućnosti postati dijagnostički ili prognostički marker PSC-a (Little, 2020), no potrebna su daljnja istraživanja.

Dosadašnja literatura ne obuhvaća veliki broj istraživanja mikrobiote sluznice, a ona provedena nisu konzistentna. Neka istraživanja javljaju rezultate slične onima fekalne mikrobiote, dok druga ne pronalaze ili pronalaze malu razliku u mikrobiomu PSC-a i zdravih kontrola. Ipak, ističe se novija studija mikrobiote sluznice Quraishija i suradnika, koja je usmjerena na zajedničko proučavanje crijevne mikrobiote, intestinalne genske ekspresije i odgovora imunskih stanica. U istraživanju uočene su promjene u mikrobiomu PSC-IBD-a u odnosu na ulcerozni kolitis. Točnije, zabilježen je porast bakterija s enzimom amino oksidazom, poput *Sphingomonas sp.*, u osoba sa PSC-IBD-om naspram osoba s ulceroznim kolitisom. Ovaj enzim povezuje se s aberantnim smještajem crijevnih limfocita u jetri što se pretpostavlja kao jedan od mehanizama u patogenezi PSC-a (Little, 2020; Quraishi, 2020).

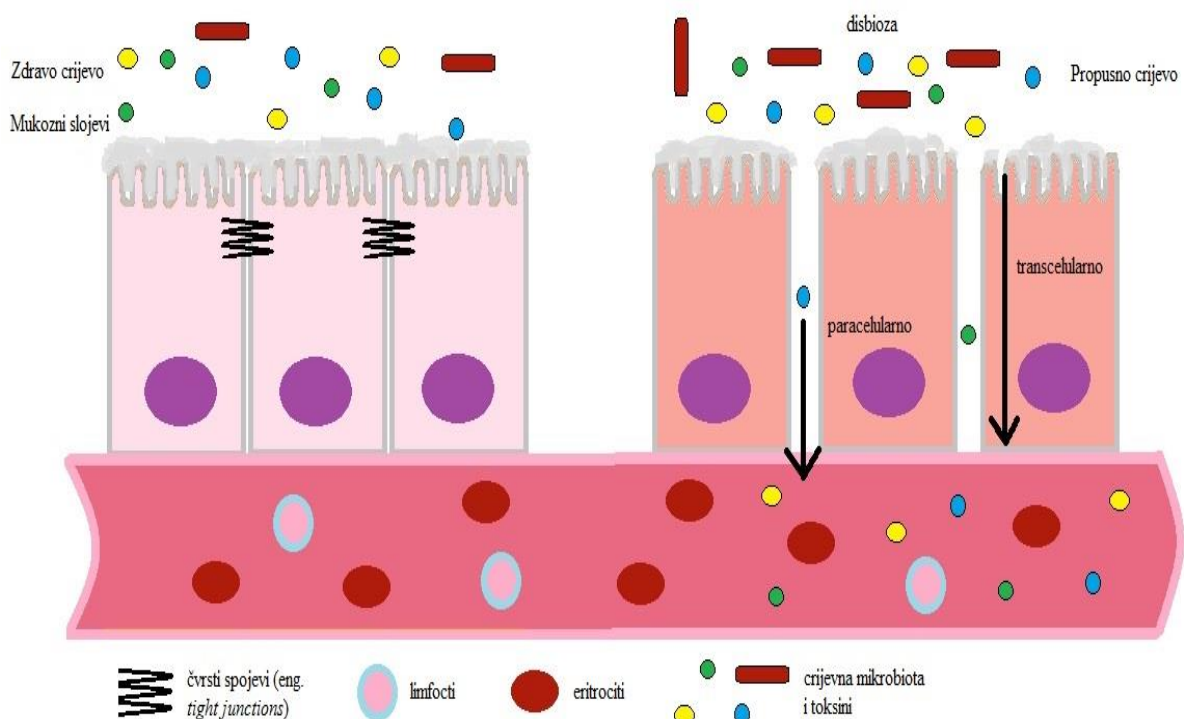


Slika 1. Promjena sastava bakterija mikrobiote u PSC-u (prema Little, 2020)

Iako su istraživanja uglavnom usmjerena na proučavanje bakterija, postoje saznanja o fungalnoj disbiozi u PSC-u koja je karakterizirana promjenom sastava i povećanom bio raznolikosti (alfa bioraznolikost) u odnosu na zdrave kontrole i pacijente s izoliranom upalnom bolešću crijeva. Točnije, zabilježen je porast roda *Exophiala*, a smanjen je udio *Saccharomyces cerevisiae* (Little, 2020). Fungalna disbioza još je slabo istražena.

## Crijevna propusnost i translokacija bakterija

Netaknuti crijevni epitel pruža kompleksne antimikrobne mukozne slojeve i međustanične čvrste spojeve (eng. *tight junction*) koje služe kao prva linija obrane od invazije patogena i komenzalnih bakterija. U slučaju oštećenja intestinalne barijere, bakterije i njihovi toksini mogu se paracelularno translocirati kroz oštećene čvrste međustanične spojeve u portalnu cirkulaciju ili transcelularno, kroz stanice (Slika 2.). Crijevna disbioza može poremetiti cjelovitost intestinalne barijere i pogoršati niz funkcija obrane intestinuma, stvarajući predispoziciju za razvoj raznih bolesti, zbog čega su integritet crijevne barijere i njegova mikrobiota potrebni za očuvanje zdravlja probavnog sustava (Dean, 2020; Nagpal, 2017).



Slika 2. Crijevna propusnost u disbiozi (prema Nagpal, 2017)

Studija koju su proveli Nakamoto i ostali na modelu tzv. germ-free miša, tj. miša na kojem ne nalazimo kolonizirane mikroorganizme, pokazala je moguću vezu između intestinalne disbioze, propusnosti crijeva i bakterijske translokacije. Naime, nakon što su germ-free miša kolonizirali bakterijama iz fecesa pacijenata sa PSC-om i konkomitantnim ulceroznim kolitisom, porasle su mu razine serumskog endotoksina. Bakterije koje su bile prisutne u fecesu pacijenata kao što su *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* i *Enterococcus gallinarum*, pronađene su u mezenteričnim limfnim čvorovima miša. Nadalje, pokazalo se da soj *Klebsiella pneumoniae* oštećuje epitelnu barijeru, omogućavajući bakterijsku translokaciju drugih

patobiona i izazivajući odgovor  $T_H17$  i njihov prvi doticaj s antigenom u mezenterijalnim limfnim čvorovima i jetri (*Lemoinne, 2020; Nakamoto, 2019*).

Bakterijska translokacija i/ili apsorpcija endotoksina poput lipopolisaharida, lipoteikoične kiseline i bakterijskih DNA/RNA fragmenata u portalnu cirkulaciju kroz kronično upaljeno, propusno crijevo, kombinirano s aktivacijom Kupfferovih stanica, može biti ključno za razvoj PSC-a izazivajući proupalni, profibrozni hepatobilijarni odgovor (*Shah, 2020*).

## Utjecaj mikrobiote na upalu hepatobilijarnog sustava

Jetra je kontinuirano fiziološki izložena djelovanju brojnih potencijalnih toksina porijeklom iz crijeva pa stoga ima dobro izbalansiran imunski odgovor između protektivnog djelovanja i tolerancije kako bi izbjegla ozljedu tkiva. Disbioza i povećana propusnost crijeva dovodi do translokacije mikroba i njihovih produkata, tj. PAMP-ova (eng. *pathogen-associated molecular patterns*) u koje ubrajamo lipopolisaharide, DNA fragmenete i sl., a koje zatim prepoznaju imunski receptori na jetrenim stanicama poput Kupfferovih stanica, hepatičkih stielatnih stanica te lamine proprie koju čini sloj vezivnog tkiva ispod epitela bogat imunskim stanicama. Aktiviraju se pri tom proupalni kaskadni sustavi, otpuštaju se citokinski medijatori, dovodeći do kemotaksije perifernih i jetrenih imunskih stanica do žučnog stabla te posljedično proliferacije i diferencijacije miofibroblasta, starenja kolangiocita i njihove apoptoze. Kronična aktivacija imunskog sustava dovodi do remodeliranja, fibroze i moguće obliteracije žučnih vodova (*Dean, 2020; Giordano, 2018; Tripathi, 2018*).  $T_H17$  limfociti, karakterizirani svojim citokinom interleukinom 17A (IL-17A), imaju važnu ulogu u obrani protiv ekstracelularnih bakterija i gljiva, osobito na mukoznim i epitelnim površinama. Iako se  $T_H17$  povezuje s patogenezom IBD-a, pronađen je pojačan odgovor  $T_H1$  i  $T_H17$  na stimulaciju patogena u pacijenata sa PSC-om, neovisno o prisutnosti konkomitatnog IBD-a (*Katt, 2013*) što sugerira i već spomenuto Nakamotovo istraživanje (*Nakamoto, 2019*). Zanimljivo je da su zabilježene visoke razine IL-17A nakon stimulacije određenih patogena, kao što je *C. albicans*, koja se povezuje s progresijom PSC-a (*Katt, 2013*), i *Lactobacillus gasseri*, koja je rezistentna na žuč i pH (*Little, 2020*).

Crijevna mikrobiota doprinosi razvoju PSC-a putem enterohepatičke cirkulacije žuči, za koju se smatra da ima važnu ulogu u imunskom odgovoru. Primarne žučne kiseline, kolna i ksenodeoksikolna kiselina, sintetiziraju se u jetri iz kolesterola i izlučuju u probavni trakt, gdje se u terminalnom ileumu ponovno aktivno apsorbira oko 95% žučnih kiselina i transportira

natrag do jetre. Ostalih 5%, koje izbjegnu aktivnu apsorpciju i dospiju u kolon, crijevna mikrobiota dekonjugira, dehidrogenira, dehidroksilira čineći sekundarne žučne kiseline. Mikrobiota posjeduje solnu hidrolazu koja sudjeluje u procesu dekonjugacije, a prisutna je u velikog broja bakterija probavnog sustava poput članova koljena Firmicutes, Bacteroidetes i Actinobacteria, kao što su *Clostridium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Enterococcus*. Nakon sinteze sekundarnih žučnih kiselina, one su pasivno apsorbirane i putem portalne cirkulacije dopijevaju do jetre, gdje su reciklirane i ponovno se izlučuju u bilijarni sustav. Najčešće sekundarne žučne kiseline su litokolna i deoksikolna kiselina (Dean, 2020; Little, 2020; Tripathi, 2018).

Važnu ulogu u metabolizmu žučnih kiselina kao signalnih molekula ima nekoliko receptora, od kojih se ističu nuklearni receptor farnezoid X (FXR) i membranski receptor TGR5 (eng. *Takeda G-protein-coupled receptor 5*) koji djeluju na crijeva i jetru. Sekundarne žučne kiseline, litokolna i deoksikolna kiselina, najpotentniji su ligandi TGR5 receptora. Agonizam TGR5 receptora povezan je s kolangioprotektivnim i protuupalnim djelovanjem. TGR5 na makrofage djeluje smanjujući aktivnost transkripcije jezgrinog čimbenika kappa beta (engl. nuclear factor kappa B - NF- $\kappa$ B) što uzrokuje smanjenu proizvodnju upalnih citokina. Sekundarne kiseline stimuliraju TGR5-cAMP protein kinazu A koja inhibira aktivaciju NLRP3 inflamasoma za kojeg se sumnja da sudjeluje u patogenezi PSC-a. Drugi važan receptor žučnih kiselina je FXR. Njegovom aktivacijom u lamini propriji dolazi represije NF- $\kappa$ B i smanjenog odgovora proupalnih citokina (Little, 2020). Vežući se za FXR, žučne kiseline započinju produkciju antimikrobnih peptida, kao što je angiogenin 1, koji su direktno uključeni u sprječavanju prekomjernog rasta mikrobiote i posljedično disregulacije crijevne barijere (Tripathi, 2018).

Intestinalna disbioza mijenja ravnotežu između primarnih i sekundarnih žučnih kiselina i njihovu enterohepatičku cirkulaciju. Različiti afinitet ovih dviju vrsta žučnih kiselina za receptor FXR uzrokuje da se promjene u njihovoj koncentraciji povezuju s povišenom sintezom žučnih kiselina u jetri i metaboličkim stresom. Neravnoteža žučnih kiselina i crijevne mikrobiote pokreće kaskadu imunskog odgovora domaćina što je relevantno za progresiju jetrenih bolesti (Tripathi, 2018).

Derivati litokolne kiseline, osim što djeluju na navedene receptore, sudjeluju u regulaciji imunskih odgovora domaćina direktno modulirajući T<sub>H</sub>17/Treg odgovor (Little, 2020).

Kratkolančane masne kiseline, kao što su butirrat, acetat i propionat, predstavljaju jedne od metabolita mikrobiote, a nastaju kao rezultat fermentacije koju provodi mikrobiota od tvari



koje unese domaćin, poput kompleksnih ugljikohidrata. Iako je zabilježena deplecija bakterija koljena Firmicutes koji su odgovorni za produkciju SCFA u PSC-u, njihova stvarna uloga u patogenezi PSC-a tek se istražuje. Budući da SCFA utječe na urođene i stečene imunosne odgovore, uključujući diferencijaciju regulatornih T stanica i proizvodnju proupalnih citokina, otvara se mogućnost razjašnjenja utjecaja SCFA na patogenezu PSC-a (*Little, 2020*).

## Uloga mikrobiote u terapijskom pristupu primarnog sklerozirajućeg kolangitisa

Trenutno, niti jedan lijek poput imunosupresiva, protuupalnih lijekova, ursodeoksikolne kiseline, nije doveo do sprječavanja pogoršanja PSC-a, stoga su novija istraživanja usmjerena na manipulaciju mikrobiotom, crijevnu propusnost i upalni odgovor na mikrobiom kako bi se poboljšao ishod PSC-a, tj. odgodila progresija same bolesti (*Dean, 2020*).

Provedene su kliničke studije koje su promatrale utjecaj antibiotika vankomicina i metronidazola na PSC, pokazale su dobre kliničke rezultate. Smanjeni su klinički simptomi poput pruritusa i smanjen je ALP, marker progresije PSC-a. Točan mehanizam djelovanja antibiotika u PSC-u još se ne zna (*Dean, 2020; Little, 2020*).

Proučavane su alternativne metode poput fekalne mikrobne transplantacije u liječenju PSC-a. Riječ je o prijenosu crijevne mikrobiote iz zdravog davaoca u primaoca s ciljem mijenjanja njegove mikrobiote. Fekalna transplantacija u istraživanju dovela je do smanjena ALP za 30% i povećanja mikrobne bioraznolikosti što budi nadu za novu terapijsku mogućnost (*Dean, 2020; Little, 2020; Shah, 2020*).

S obzirom na utjecaj metabolizma žučnih kiselina na razvoj PSC-a, one postaju predmet istraživanja u novom terapijskom pristupu. Trenutno je rasprostranjena upotreba ursodeoksikolne kiseline u terapiji, no ona dugotrajno ne utječe na klinički ishod, tj. transplantaciju jetre ili smrt, a u visokim dozama povezana je s nuspojavama zbog čega se ne savjetuje u terapiji novodijagnosticiranih odraslih osoba sa PSC-om. Ispituje se primjena njezinog derivata, norursodeoksikolne kiseline čiji rezultati u studijama su obećavajući. Farmakološki agonisti FXR receptora predstavljaju još jednu buduću terapijsku mogućnost, od kojih se ističu obetokolna kiselina i cilofeksor (*Little, 2020*).

# NEALKOHOLNA MASNA BOLEST JETRE

Nealkoholna masna bolest jetre (eng. *nonalcoholic fatty liver disease* - NAFLD) najčešća je jetrena bolest u razvijenim zemljama (Kwong, 2021). Termin NAFLD obuhvaća niz stanja, varirajući od jednostavne nealkoholne masne jetre bez znakova upale, što čini većinu kliničkih prezentacija, do nealkoholnog steatohepatitisa (eng. *non-alcoholic steatohepatitis* - NASH) koji može progredirati do ciroze jetre (Di Ciaula, 2020) i hepatocelularnog karcinoma (Di Ciaula, 2020; Kwong, 2021; Leung, 2016). NAFLD povezuje se s mnogobrojnim rizičnim faktorima kao što su metabolički sindrom, pretilost, inzulinska rezistencija i dislipidemija (Di Ciaula, 2020; Kwong, 2021; Leung, 2016).

## Patofiziologija

Patofiziologija NAFLD-a je kompleksna, multifaktorijalna i još uvijek se ne razumije u potpunosti (Di Ciaula, 2020). Smatra se da u razvoju bolesti dolazi do kompleksne interakcije između genetički predisponiranih osoba, okolišnih čimbenika, inzulinske rezistencije i promjena u crijevnoj mikrobioti. Njihov međusobni utjecaj dovodi do promijenjenog metabolizma masti i posljedičnog nakupljanja u hepatocitima, kulminirajući razvojem NAFLD-a (Kolodziejczyk, 2019). Postoji sumnja da mikrobiom može imati učinak na druge procese povezane s NAFLD-om, inzulinsku rezistenciju, metabolizam žučnih kiselina i kolina (Houttu, 2020).

Progresija NAFLD-a u novije vrijeme može se objasniti hipotezom o multiplim udarcima. Prvim udarcem smatra se razvoj masne jetre. Sekundarni udarci u progresiji bolesti odnose se na kompleksne procese koji reflektiraju niz metaboličkih disfunkcija koje su u interakciji i s drugim sudionicima u metabolizmu tvari poput masnog tkiva, pankreasa i crijevne mikrobiote (Jadhav, 2020), stoga se istraživanja sve više usmjeravaju na ulogu mikrobiote u razvoju bolesti budući da sudjeluje u mijenjaju ravnoteže između proupalnih i protuupalnih signala, pridonoseći tako upali koja bi mogla dovesti do razvoja steatohepatitisa (Kolodziejczyk, 2019).

## Crijevna disbioza u nealkoholnoj masnoj bolesti jetre

Disbioza nastaje kao rezultat djelovanja niza različitih faktora, od okolišnih, imunoloških do faktora domaćina poput promjena u protoku žuči, pH želuca, dismotiliteta crijeva. Budući da se NAFLD javlja često uz pretilost i nezdrave prehrambene navike, teško je razlučiti koliki su efekti dijete i pratećih metaboličkih promjena u jetrenim bolestima, od efekata promijenjenog mikrobioma u istim stanjima. Istraživanje Wigg i ostalih jedan je od najranijih dokaza o utjecaju disbioze na jetrene bolesti, a utvrdilo je povezanost između NASH-a i prerastanja bakterija u tankom crijevu koristeći kombinirani <sup>14</sup>C d-ksiloza i laktuloza izdisajni test (Wigg, 2001). Iako većina istraživanja proučava bakterije u sastavu crijevne mikrobiote, pretpostavlja se da i ostali mikroorganizmi poput praživotinja, gljiva i virusa, mogu imati važnu ulogu zbog interakcija s ostatkom mikrobioma (Leung, 2016).

Nealkoholna masna bolest jetre karakterizirana je smanjenom raznolikošću i bogatstvom crijevnog mikrobioma u odnosu na zdrave kontrole (Houttu, 2020). Neke se vrste bakterija povezuju s razvojem NAFLD-a, a to su bakterije koljena Proteobacteria, Enterobacteria i roda *Escherichia* ili *Bacteroides* koje su bile povišene u odnosu na zdrave kontrole (Kolodziejczyk, 2019). Porast broja pripadnika koljena Proteobacteria najčešće je zabilježen u istraživanjima, a zanimljivo je da se pripadnici tog koljena povezuju s upalom i nose u svojoj vanjskoj membrani lipopolisaharide za koje se smatra da mogu biti važni u patogenezi NAFLD-a (Houttu, 2020). Njihov porast primijećen je u progresiji od blagog, umjerenog oblika NAFLD-a do uznapredovale fibroze, dok se istodobno smanjila zastupljenost bakterija koljena Firmicutes, sugerirajući na nestabilnost mikrobioma u disbiozi tijekom progresije bolesti (Loomba, 2017). Obogaćenje flore s razredom Gammaproteobacteria i rodnom *Prevotella* u NAFLD-u, zabilježeno je u studiji koja je proučavala mikrobiom iz stolice djece oboljele od NAFLD-a i mikrobiom stolice pretile djece koja nisu bolovala od NAFLD-a (Michail, 2015).

*Helicobacter pylori* može u nekim slučajevima pridonijeti razvoju NAFLD-a. Riječ je o bakteriji koju nalazimo u osoba s teškim oblikom pretilosti, a povezuje se još s inzulinskom rezistencijom koja može biti pokretač NAFLD-a te s uznapredovanim stadijima NASH-a. Pretpostavlja se da joj je mehanizam djelovanja putem inhibicije otpuštanja leptina iz bijelog masnog tkiva, poticanja jetrene stearoil-CoA desaturaze 1 i povećavanja nakupljanja masti u jetri. Utjecaj *H. pylori* na NAFLD može jednako tako biti potaknut učincima bakterije na crijevnu disbiozu, endotoksemiju i dislipidemiju (Houttu, 2020).

Crijevna disbioza, kao što je već spomenuto, dovodi do disfunkcije intestinalne barijere, omogućavajući povećanu propusnost intestinuma za bakterijske komponente, promovirajući metaboličku endotoksemiju i doprinoseći upalnim procesima u jetri (*de Oca, 2020*).

## Utjecaj metabolita mikrobiote u nealkoholnoj masnoj bolesti jetre

Crijevna mikrobiota ima utjecaj na apsorpciju masti pa se smatra faktorom koji doprinosi razvoju jetrene steatoze (*Kolodziejczyk, 2019*), što potvrđuju brojne studije provedene na animalnim modelima (*Houttu, 2020*). Nekoliko se molekula povezuje s ovim učincima, kao što su SCFA, žučne kiseline, kolin, fenilacetat i dr. (*Kolodziejczyk, 2019*).

### Kratkolančane masne kiseline

Crijevne bakterije, uključujući bakterije roda *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Salmonella*, *Blautia*, *Eubacterium*, *Anaerostipes*, *Coprococcus*, *Faecalibacterium*, *Marvinbryantia* i *Megasphaera spp.*, tijekom probave kompleksnih ugljikohidrata stvaraju SCFA (*Y. H. Chen, 2020*), kao što su acetat, propionat, butirat i valerinska kiselina (*Kolodziejczyk, 2019*). Vrsta i količina sintetiziranih SCFA u probavnom traktu je promjenjiva, a ovisi o količini konzumiranih ugljikohidrata i o disbiozi. Utjecaj SCFA zabilježen je u staničnom metabolizmu, imunosti i povećanju masnog tkiva (*Leung, 2016*). Iako se većina SCFA iskoristi u crijevima, dio odlazi u portalnu cirkulaciju i dopire do jetre (*Kolodziejczyk, 2019*). SCFA u jetri može služiti kao izvor energije, ali ima važnu ulogu u jetrenoj lipogenezi i glukoneogenezi (*Leung, 2016*). Budući da su SCFA potentne signalne molekule koje se vežu za receptore povezane s G proteinom, većina njihovog djelovanja je posredovana vezanjem za te receptore na endokrinim stanicama crijeva, adipocitima i u imunološkom sustavu (*Kolodziejczyk, 2019; Leung, 2016*).

Butirat, ali djelomično i propionat, mogu djelovati kao inhibitori histonske deacetilaze kako bi pozitivno regulirali gensku ekspresiju (*Kolodziejczyk, 2019*), a upravo se neke histonske deacetilaze smatraju važnima u patogenezi NAFLD-a (*Houttu, 2020*). Smatra se da butirat sudjeluje u imunološkim procesima budući da se na animalnim modelima pokazalo da promovira diferencijaciju CD4<sup>+</sup> T limfocita u T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>22 ili regulatorne T limfocite, dok inhibira diferencijaciju CD4<sup>+</sup> T limfocita u T<sub>H</sub>1 i T<sub>H</sub>17, sprječavajući tako daljnje upalne procese u jetri (*Y. H. Chen, 2020*).

## Žučne kiseline

Pacijenti s NAFLD-om imaju povišene razine žučnih kiselina u jetrenom tkivu, serumu i urinu sa značajno povišenim hidrofobnim i citotoksičnim vrstama žučne kiseline (Kolodziejczyk, 2019). Istraživanje Adams i suradnika sugerira da se sekundarna žučna kiselina, deoksikolna kiselina, povezuje s relativnom većom zastupljenošću specifičnih bakterija, poput *Bacteroidaceae* i *Lachnospiraceae spp.*, ali i s uznapredovanom fibrozom u NAFLD-u (Adams, 2020).

Sastav žuči utječe na apsorpciju lipida i na potentnost aktivacije receptora FXR i TGR5 (Kolodziejczyk, 2019). Smatra se da FXR receptor ima ulogu u reduciranju jetrene steatoze. Njegovom aktivacijom smanjuje se *de novo* lipogeneza, povećava se oksidacija masnih kiselina i klirens triglicerida (Jadhav, 2020). FXR regulira glukoneogenezu preko fosfoenolpiruvat karboksikinaze koja još prevenira upalu i poboljšava metabolizam glukoze i lipida (Fukui, 2019). Ključna uloga TGR5 receptora je u olakšavanju sekrecije inkretinskog hormona, peptida 1 nalik glukagonu (eng. *glucagon-like peptide-1* - GLP-1), iz enteroendokrinih stanica (Jadhav, 2020). Osim što povećava lučenje inzulina iz beta stanica pankreasa, primjena GLP-1 u miševa pokazala je značajno smanjenje jetrene steatoze, smanjivanje *de novo* lipogeneze i povećavanje oksidacije masnih kiselina (Ding, 2006).

## Kolin

Jetra je važno skladište kolina u čovjekovom tijelu. Molekule kolina se u jetri većinom koriste za biosintezu fosfatidilkolina ili za održavanje S-adenozil metionin ciklusa (eng. *S-adenosyl methionine* - SAM) (Kolodziejczyk, 2019), koji je bitan za normalnu funkciju jetre sudjelujući u transmetilaciji (Mato, 2013). Delecija gena povezanih s metabolizmom kolina i njegove raspoloživosti S-adenozil metionin ciklusu ili delecija gena S-adenozin metionin ciklusa, dovodi do razvoja NAFLD-a (Kolodziejczyk, 2019). Fosfatidilkolin esencijalan je u proizvodnji lipoproteina vrlo male gustoće (eng. *very low-density lipoprotein* - VLDL) i jetrenom prijenosu lipida (Y. H. Chen, 2020). Budući da je on potreban u VLDL sintezi/sekreciji, njegova deficijencija sprječava sintezu i sekreciju VLDL-a pa posljedično dovodi do nakupljanja triglicerida u jetri (Fukui, 2019; Sherriff, 2016).

Molekula kolina može nastati iz dva prekursora, egzogenog i endogenog. Dijetom se može unijeti 70% kolina, dok se ostatak sintetizira u tijelu, stoga količina kolina ovisi o količini unesenoj hranom i crijevnoj mikrobioti koja ga metabolizira. Bakterije u tankom crijevu

iskorištavaju fosfatidilkolin kao sastavnicu membrane za daljnju diobu i rast, zbog čega mogu doprinijeti razvoju deficijencije kolina u domaćina i razvoju NAFLD-a i NASH-a. Komenzalne bakterije, npr. *E. coli*, *Desulfovibrio desulfuricans*, mogu prevesti kolin do metilamina kao što su trimetilamini (TMA), dimetilamini (DMA) i monometilamini (MMA). Povišene razine TMA, kao i smanjena razina fosfatidilkolina, povezuje se s NAFLD-om, što ukazuje na ulogu mikrobiote u neravnoteži metabolizma kolina. Upravo disbioznu mikrobiotu karakterizira povećana konverzija kolina do metilamina, što potencijalno ponovno može dovesti do deficijencije kolina i doprinijeti razvoju NASH-a. Vrste bakterija koje su se *in vitro* pokazale da metaboliziraju kolin do TMA su *Anaerococcus hydrogenalis*, *Clostridium asparagiforme*, *Clostridium hathewayi*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia fergusonii*, *Proteus penneri*, *Providencia rettgeri* i *Edwardsiella tarda*. (Kolodziejczyk, 2019). TMA se metabolizira dalje u trimetilamin-N-oksid čije su visoke koncentracije povezane s povišenim rizikom ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti, a u novijim studijama se povezuje s patološkim napretkom NAFLD-a (Y. H. Chen, 2020).

## Aminokiseline

Neravnoteža aminokiselina čest je nalaz u pacijenata s NAFLD-om. Omjer razgranatih aminokiselina (npr. esencijalne aminokiseline valin, leucin, izoleucin) naspram aromatičnih aminokiselina dijagnostički je marker težine disfunkcije jetre. Niži omjer implicira na težu jetrenu disfunkciju. Provedene kohortne studije sugeriraju na pozitivnu korelaciju između razgranatih aminokiselina te steatoze i inzulinske rezistencije (Y. H. Chen, 2020). Nadalje, studije na mišjem modelu pokazale su da vrste *Prevotella copri* i *Bacteroides vulgatus* su odgovorne za vezu između biosinteze razgranatih aminokiselina i inzulinske rezistencije (Pedersen, 2016). Feniloctena kiselina derivat je aromatskih aminokiselina kojeg je proizvela crijevna mikrobiota. Pronađeno je da potiče steatozu jetre smanjujući fosforilaciju protein kinaze B i utječući na metabolizam razgranatih aminokiselina (Hoyles, 2018).

## Triptofan

Novije studije sugeriraju na utjecaj metabolita triptofana u razvoju NAFLD-a. Indol i njegovi derivati su glavni produkti porijeklom od triptofana koje proizvode crijevne bakterije, kao što su *Bacteroides*, *Eubacterium* i *Clostridium spp* (Canfora, 2019). Neki derivati poput indol-3-propionske kiseline, pokazali su se na animalnim modelima crijevne disbioze učinkovitim u smanjenju tjelesne mase te poboljšanju funkcije intestinalne barijere preko

pregnanskog X receptora koji inhibira endotoksinom induciranu signalizaciju receptora 4 sličnog tolu (eng. *toll-like receptor 4* – TLR4) i poboljšava upalu tkiva, što otvara mogućnost terapijske primjene metabolita triptofana (Y. H. Chen, 2020).

## Endogeni etanol

U istraživanju koje je proučavalo NASH pacijente i animalne modele pretilosti koji nisu konzumirali alkohol, pronađene su povišene razine etanola u krvi i izdah, popraćene s povišenom razinom jetrene alkohol dehidrogenaze, aldehid dehidrogenaze i CYP2E1, sugerirajući utjecaj endogenog etanola u patogenezi bolesti. Endogeni etanol proizvode crijevne bakterije fermentacijom ugljikohidrata, a on stimulira oksidativni stres i pogoršava upalne procese jetre u NAFLD-u jer ima direktni toksični utjecaj na jetru povećavajući intestinalnu propusnost, koja zatim rezultira endotoksemijom te dalje potiče upalne odgovore doprinoseći ozljedi jetre. Etanol se može metabolizirati u acetaldehid koji isto potiče ozljedu jetre. Količina alkohola koja je proizvedena ovisi o dostupnosti ugljikohidrata iz dijeta i povećana je u pretilih miševa. Bakterije odgovorne za proizvodnju endogenog etanola, *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae spp.* i *Klebsiella pneumonia*, nađene su u povišenom broju u NAFLD pacijenata (Y. H. Chen, 2020; Kolodziejczyk, 2019).

## Crijevna mikrobiota inducira upalne procese u jetri

Signali crijevne mikrobiote putuju kroz ljudsko tijelo preko jetre. Nutrijenti, zajedno s molekulama porijeklom od mikrobiote, iz intestinalnog lumena dopijevaju u jetru putem portalne cirkulacije. Modulacija crijevne propusnosti omogućuje ulazak tih molekula iz crijeva u jetru. Neke od tih molekula mogu uzrokovati upalne procese u jetri i izazvati patološke procese koje vidimo u NASH-u (Y. H. Chen, 2020). Interakcija PAMP-ova (lipopolisaharidi, DNA fragmenti, peptidoglikani, lipopeptidi) i TLR-a, aktivira intracelularne molekularne putove koji aktiviraju NF- $\kappa$ B i upalne citokine. Upalni procesi u jetri dalje su pojačani regrutiranjem sistemskih leukocita, indukcijom apoptoze i nekroze hepatocita, aktivacijom i proliferacijom hepatičkih stielatnih stanica i produkcijom transformirajućeg čimbenika rasta  $\beta$  (eng. *transforming growth factor- $\beta$* -TGF  $\beta$ ) s aktivacijom fibroze (Di Ciaula, 2020). Studije na animalnim modelima disfunkcije crijevne barijere i upalom pogođenog crijeva, pokazuju da pri dijetama s povišenim udjelom masti i fruktoze te pri kolesterolskim dijetama, povećava se

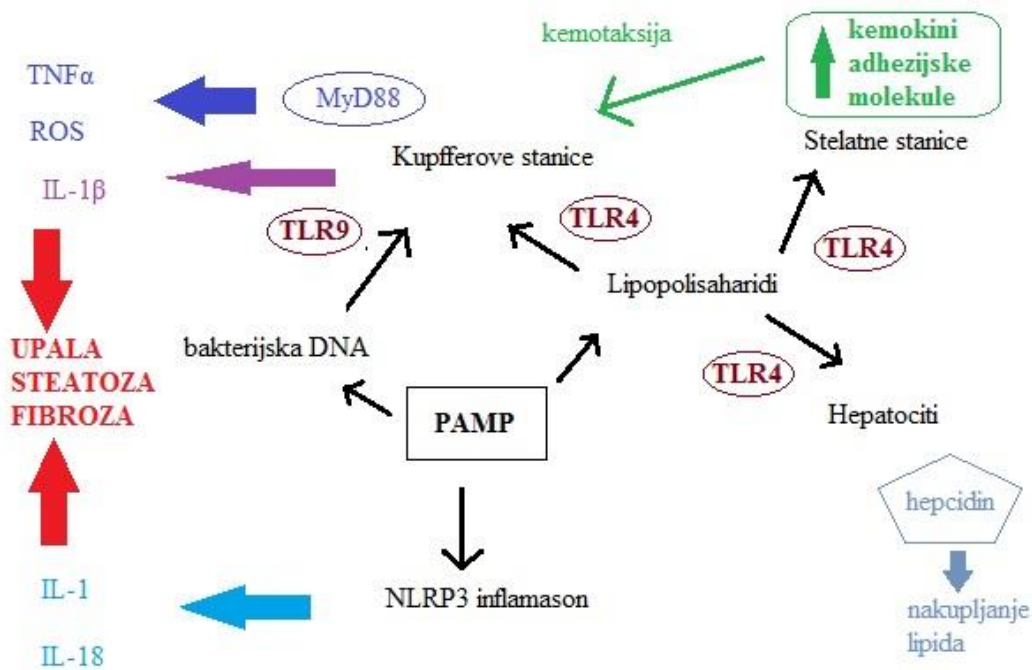
translokacija lipopolisaharida i težina NASH-a u odnosu na zdrave kontrole (*Gäbele, 2011; Rahman, 2016*).

Lipopolisaharidi potiču upalne procese u jetri aktivacijom TLR4 u nekoliko različitih vrsta stanica što uključuje Kupfferove stanice, jetrene stelatne stanice, hepatocite i jetrene sinusoidalne endotelne stanice. Aktivacija TLR4 na jetrenim stelatnim stanicama potiče proizvodnju raznih kemokina i adhezijskih molekula što inducira kemotaksiju Kupfferovih stanica, dok u Kupfferovim stanicama TLR4 signal, putem mijeloidnog diferencijacijskog primarnog odgovora 88 (eng.*myeloid differentiation primary response 88 - MyD88*), inducira tumor nekrotični faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) i reaktivne vrste kisika (eng.*reactive oxygen species - ROS*), pojačavajući nadalje upalne procese u jetri. TLR4 aktivacija na hepatocitima izaziva proizvodnju hepcidina, ključnog regulatornog proteina željeza, koji se povezuje s nakupljanjem lipida u jetri (*Kolodziejczyk, 2019*). Provedena istraživanja dokazuju povećan nivo antitijela na lipopolisaharide koje proizvode gram-negativne bakterije u osoba s NASH-om nego u zdravih kontrola te se razina antitijela povećava sukladno s težinom bolesti (*Y. H. Chen, 2020*).

Osim lipopolisaharida, i drugi PAMP-ovi dolaze do jetre zbog povećane propusnosti u crijevima i potiču upalne procese, a to su peptidoglikani, flagelini, bakterijska RNA i DNA i sl. Bakterijska DNA može aktivirati TLR9 na Kupfferovim stanicama uzrokujući proizvodnju interleukina 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) te posljedično steatozu, upalu i fibrozu (*Y. H. Chen, 2020*).

U patogenezi upale važnu ulogu imaju inflamasoni poput NLRP3, koji prepoznaju PAMP-ove i stimuliraju proizvodnju IL-1 i IL-18. Pokazalo se da pacijenti s NASH-om imaju značajno povišenu razinu NLRP3 u odnosu pojedince bez NASH-a i s NAFLD-om (*Y. H. Chen, 2020*).





Slika 3. Utjecaj mikrobiote na upalne procese u NAFLD-u (prema Y. H. Chen, 2020 )

## Uloga mikrobioma u terapijskom pristupu nealkoholne masne bolesti jetre

Prvi korak u liječenju NAFLD pacijenata je promjena životnog stila što uključuje restrikcije dijete i povećanu fizičku aktivnost. Akumulacija masti u jetri, upala i nekroza su značajno poboljšane tek nakon što se izgubi 10% tjelesne mase, zbog čega promjena životnog stila nije dovoljna za liječenje NASH-a (Y. H. Chen, 2020). Ispituju se novi pristupi liječenju NAFLD-a koji su usmjereni na mikrobiotu i njene metabolite.

Primjena antibiotika, probiotika i prebiotika u liječenju NAFLD-a se istražuje. Studije na mišjem modelu pokazale su da antibiotici kod kronične oralne primjene, smanjuju razine sekundarnih žučnih kiselina, nakupljanje lipida u jetri te smanjuju upalu u jetrenom tkivu i fibrozu mijenjajući sastav crijevne mikrobiote, ali postoji zabrinutost da bi djelovanje antibiotika moglo eliminirati „zdravu“ mikrobiotu i utjecati na pojavu rezistencije na antibiotike, što bi smanjilo njihovu efikasnost u terapijskoj primjeni (Y. H. Chen, 2020; Ortigao, 2020).

Prebiotici su hranjive tvari koje djeluju selektivno, potičući rast korisnih bakterija u crijevima. Pokazalo se da primjena prebiotika poput oligofruktoze, smanjuje razinu upalnih markera jetre te je njihova terapijska primjena rezultirala reduciranjem nakupljanja triglicerida u jetri (Y. H. Chen, 2020; Ortigao, 2020).

Probioticima nazivamo žive organizme koji djeluju poticajno na zdravlje domaćina kada se primjenjuju u adekvatnim dozama. Najčešće primjenjivani probiotici su *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.* i *Saccharomyces boulardii*. Bakterije *Lactobacillus* i *Bifidobacterium spp.* u istraživanjima smanjile su upalu crijeva i poboljšale funkciju crijevne barijere mijenjajući crijevnu mikrobiotu. Nadalje, probiotici *Lactobacillus acidophilus* i *rhamnosis*, *Bifidobacterium lactis* i *bifidum* u istraživanju djece s NAFLD-om, snizili su jetrene enzime, kolesterol i trigliceride te su pokazali poboljšanje ultrazvučnog nalaza stetaoze jetre, u usporedbi s placebo grupom. Primjena sinbiotika, mješavine probiotika i prebiotika, tj. *Bifidobacterium longum* s frukto-oligosaharidima, značajno je smanjila razinu TNF $\alpha$ , C-reaktivnog proteina, serumske razine AST-a, inzulinsku rezistenciju, serumski endotoksin i biopsijom potvrđenu steatozu. Ipak, nekakvo dugoročno pozitivno djelovanje još nije zabilježeno (Y. H. Chen, 2020; Ortigao, 2020).

Terapijsko djelovanje fekalne mikrobne transplantacije u NAFLD-u se tek počinje istraživati, nakon uspjeha u liječenju refraktorne infekcije *C.difficile*. Animalni model na dijete bogatoj mastima, pokazao je smanjenje akumulacije masti i razine proupalnih citokina u jetri nakon transplantacije. Zabilježen je još relativan porast korisnih bakterija poput *Christensenellaceae* i *Lactobacillus*, poboljšana funkcija intestinalne barijere i povećana proizvodnja butirata. Daljnja istraživanja su potrebna i zbog mogućeg razvijanja drugih patoloških infekcija nakon fekalne mikrobne transplantacije (Y. H. Chen, 2020).

Trenutno se istražuje terapijska djelovanja butirata za kojeg se smatra da smanjuje nakupljanje lipida u jetri, farmatika koji djeluju u metabolizmu žučnih kiselina, anti-lipopolisaharidnog imunoglobulina i terapija povezana s metabolitima koje proizvodi mikrobiota (Kolodziejczyk, 2019).

# ALKOHOLNA BOLEST JETRE

Alkoholna bolest jetre jedan je od najčešćih uzroka transplantacije jetre (*Kwong, 2021*). Riječ je o oštećenju jetre i njezine funkcije koja nastaje uslijed pretjerane konzumacije alkohola (*Kong, 2019*). Poput NAFLD-a, ALD obuhvaća spektar različitih jetrenih patologija od hepatičke steatoze do steatohepatitisa, fibroze, ciroze i potencijalno hepatocelularnog karcinoma (*Cassard, 2018; Kong, 2019*). Neki pacijenti s ALD-om razvit će teški alkoholni hepatitis koji je karakteriziran akutnom hepatocelularnom insuficijencijom, visokom smrtnosti, kao i jednomjesečnim preživljenjem između 50 – 65% (*Cassard, 2018*).

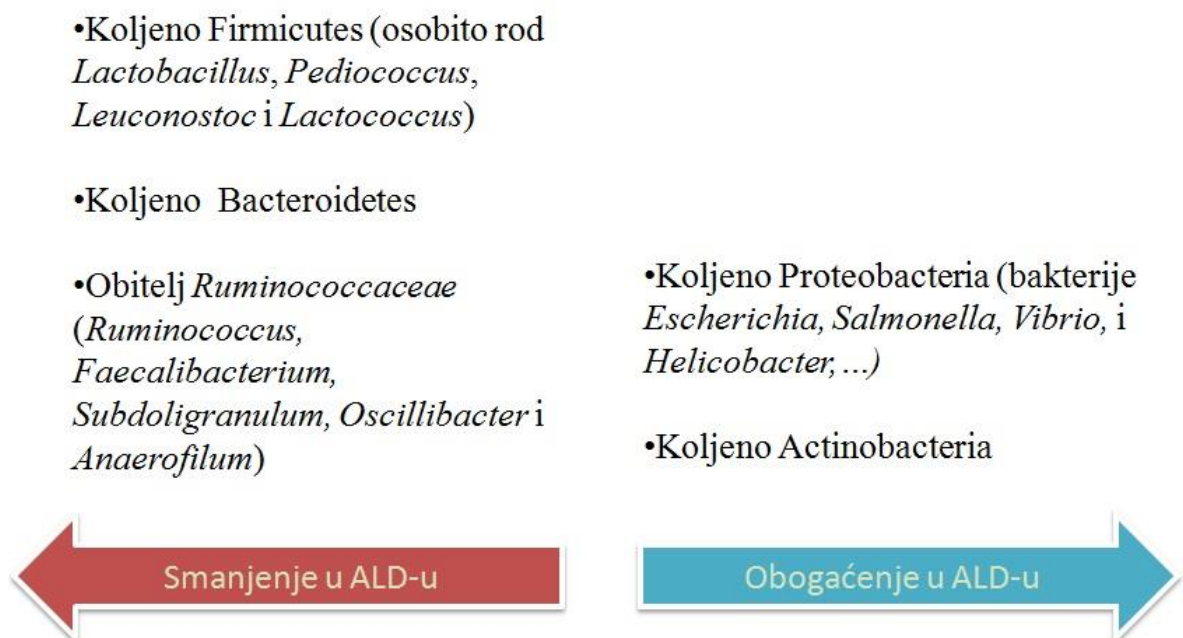
## Patofiziologija

Razvoj bolesti nije još u potpunosti razjašnjen (*Kong, 2019*). Porast razine alkohola u krvi povezuje se sa smanjenom ekspresijom glasničke RNA molekule proteina čvrstih spojeva koji se nalaze između epitelnih stanica kolona. Zajedno s utjecajem njegovog metabolita acetaldehida koji oštećuje čvrste spojeve epitelnih stanica, pridonosi povećanoj crijevnoj propusnosti (*Szabo, 2015*). Budući da svi kronični konzumenti alkohola ne razviju oštećenje jetre, razmatra se utjecaj drugih faktora u razvoju ALD-a osim konzumirane količine alkohola. GWAS studije povezale su nekoliko genskih lokusa s razvojem ciroze jetre i teškog alkoholnog hepatitisa. Iako na nasljedni rizik razvoja ciroze utječe nekoliko čimbenika okoliša modulacijom poligenskih i kompleksnih nasljeđa, još nije objašnjena u potpunosti razlika između pacijenata koji obole od ALD-a i onih koji ne obole. Nedavno se pokazalo da mikrobiota može doprinijeti razvoju ALD-a, zbog čega bi mogla postati nova meta terapijskog djelovanja u ALD pacijenata (*Cassard, 2018*).

Glavni ključni patološki mehanizmi mikrobiote u razvoju ALD-a uključuju prekomjerni rast bakterija u tankom crijevu i promjena sastava mikrobioma, promijenjenu funkciju crijevne barijere i intestinalnu propusnost, mnoštvo metabolita povezanih s mikrobiotom te bliska interakcija žučnih kiselina s domaćinom i mikrobiotom što posljedično modulira mikrobiotu, njene metabolite te mijenja odnos primarnih i sekundarnih žučnih kiselina (*Kwong, 2021*).

## Uloga crijevne disbioze u alkoholnoj bolesti jetre

Kronična i akutna konzumacija alkohola dovodi do disbioze u tankom i debelom crijevu. Osobito uzrokuje prerast gram-negativnih bakterija i promijene u raznolikosti bakterija (Li, 2019). Povećana propusnost crijeva i disbioza u pacijenata alkoholičara povezuje se s depresijom, anksioznošću i žudnjom za alkoholom (Leclercq, 2014). Pacijenti alkoholičari s povišenom propusnošću crijeva imali su smanjeno obilje bakterija obitelji *Ruminococcaceae* (*Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, *Subdoligranulum*, *Oscillibacter* i *Anaerofilum*) (Slika 4.) (Cassard, 2018). Studije provedene na kroničnim konzumentima alkohola, pokazale su da je bakterijski prekomjerni rast ključan u progresiji bolesti k alkoholnom hepatitisu i cirozi (Kwong, 2021). Glodavci izloženi alkoholu imali su smanjenu razinu obilja bakterija koljena Firmicutes, osobito onih roda *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* i *Lactococcus* (Yan, 2011), a u miševa koji su hranjeni alkoholom pronađen je porast koljena Proteobacteria i Actinobacteria te smanjenje zastupljenosti Bacteroidetes i Firmicutes koljena. Širenje bakterija koljena Proteobacteria značajno je budući da uključuje gram-negativne bakterije od kojih su razne patogene poput bakterija *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio* i *Helicobacter* (Bull-Otterson, 2013). Disbioza kolona uočena je u teških alkoholičara bez ciroze jetre te je zabilježeno smanjenje zastupljenosti Bacteroidetes i povišenje zastupljenosti Proteobacteria (Mutlu, 2012).



Slika 4. Promjena sastava bakterija mikrobiote zabilježena u istraživanjima ALD-a (prema Cassard, 2018)

Novija istraživanja proučavaju sastav gljiva u intestinumu, što se naziva mikrobiom, i njegove asocijacije s drugim bolestima (Cassard, 2018). U animalnim modelima ALD-a, zabilježen je porast u mikobioznoj populaciji i translokacija fungalnog  $\beta$ -glukana u sistemsku cirkulaciju.  $\beta$ -glukan je polisaharidi koji čini komponentu staničnog zida gljiva, a inducira upalne procese u jetri preko receptora na Kupfferovim stanicama. U ljudi koji kronično konzumiraju alkohol, zabilježena je smanjena fungalna raznolikost, prerast *Candide*, kao i povišenje anti-Saccharomyces cerevisiae IgG antitijela (ASCA), čiji je važan imunogen *Candida*, te translokacija fungalnih produkata. Razine ASCA koreliraju s mortalitetom, sugerirajući na utjecaj crijevnog mikrobioma na klinički tijek alkoholne ciroze uz mikrobiom (Yang, 2017). Postoji studija na malom uzorku koja upućuje na mogućnost predviđanja 90-dnevne hospitalizacije cirotičnih pacijenata na temelju mjere kombinirane bakterijske i fungalne disbioze, kao što je omjer Bacteroidetes i Ascomycota (Bajaj, 2018).

Suprotno od bakterijske i fungalne raznolikosti, virusna raznolikost je povišena u pacijenata koji su konzumirali alkohol te je najviše naglašena u pacijenata s alkoholnim hepatitisom. Pripisuje se to inkorporaciji genetskog materijala bakterijofaga u bakterijske domaćine. Virom u pacijenata s NAFLD-om ne pokazuje obogaćenje eukariotskim virusima, zbog čega se čini da je specifičan za alkoholni hepatitis. Pacijenti s alkoholnim hepatitisom imali su veće koncentracije *Parvoviridae* i *Herpesviridae*. Obitelj *Herpesviridae* isključivo je povezana s alkoholnim hepatitisom, od kojih je najzastupljeniji bio Epstein-Barr virus, koji je već opisan kao jetreni patogen. *Herpesviridae*, kao i *Staphylococcus* fagi povezani su s većim MELD (eng. *Model for End-Stage Liver Disease*) rezultatom i povišenom smrtnošću. Drugi bakterijofagi su nađeni u obilju isto u grupi s alkoholnim hepatitisom, uključujući *Escherichia*-, *Enterobacteria*- i *Enterococcus* fage (Fairfield, 2021; Jiang, 2020).

## Uloga metabolita crijevne mikrobiote u alkoholnoj bolesti jetre

Disbioza povezana s alkoholom u miševa može reducirati sintezu zasićenih dugolančanih masnih kiselina (eng. *long chain fatty acids* - LCFA) koje metabolizira *Lactobacillus* i čiji rast potiče LCFA, dok suplementacija LCFA može obnoviti eubiozni status (P. Chen, 2015). Osim LCFA, kronična konzumacija alkohola slabi čvrste veze enterocita direktnim učinkom i posredovano putem disbioze, što se očituje smanjenjem komezala odgovornih za očuvanje integriteta crijevne barijere koji proizvode SCFA. SCFA može smanjiti jetrenu adipoznost i upalu, stoga ne iznenađuje zabilježena redukcija u pacijenata svih stadija

ALD-a u mikrobiomu bakterija koje proizvode SCFA, kao što su bakterije roda *Lachnospiraceae* i obitelji *Ruminococcaceae*. Ipak, bakterija *Veillonella*, koja proizvodi SCFA, često je raširena među pacijentima s ALD-om. Unatoč promjenama u mikrobiomu, pacijenti s alkoholnim hepatitisom imaju smanjene koncentracije SCFA u stolici u usporedbi s teškim alkoholičarima kao kontrolama (Fairfield, 2021). Smatra se da smanjenje proizvodnje SCFA uzrokuje propustljiviju crijevnu membranu i doprinosi upali jetre, što dokazuje primjena butirata u obliku tributirina, koja je ublažila alkoholom inducirano oštećenje jetre u miševa (Fairfield, 2021; Kwong, 2021).

Sastav žučnih kiselina u crijevima povezuje se s progresijom ALD-a. Pokazalo se da kronični konzumenti alkohola imaju promjene u sintezi žučnih kiselina i sastavu žučnog bazena. Žučne kiseline mogu inducirati upalne procese u jetri i promovirati fibrozu jetre preko aktivacije stelatnih stanica. Alkohol se pokazao da inducira sintezu žučnih kiselina u ljudi pa pacijenti s cirozom jetre koji aktivno konzumiraju alkohol, pokazuju veće koncentracije ukupnih žučnih kiselina, povišene sekundarne žučne kiseline u duodenalnom soku i stolici. Promjena profila žučnih kiselina prema potencijalno toksičnim sekundarnim žučnim kiselinama povezana je s pojačanom ekspresijom upalnih citokina u sluznici kolona i može dovesti do crijevne i sistemske upale (Fukui, 2019; Kwong, 2021).

## Uloga mikrobiote u terapijskom pristupu alkoholne bolesti jetre

Postoje razna istraživanja o novim metodama kojima bi se moglo utjecati na prirodu bolesti, a koje se temelje na modulaciji crijevne mikrobiote putem različitih mehanizama kako bi se spriječio napredak bolesti. Primjer za to je primjena antibiotika, prebiotika, probiotika i sinbiotika te fekalna mikrobna transplantacija (Huang, 2021).

Antibiotici se trebaju koristiti oprezno budući da mogu uzrokovati eliminaciju korisnih bakterija u intestinumu i posljedičnu disbiozu (Huang, 2021). Primjena antibiotika polimiksina B i neomicina u animalnim modelima ALD-a, reducirala je endotoksemiju i razinu aspartat aminotransferaze (AST) (Bluemel, 2016). Iako je primjena antibiotika na animalnim modelima rezultirala pozitivnim ishodom, treba razmotriti njihovu primjenu u ljudi zbog navedenih mogućih nuspojava (Huang, 2021).

Nekoliko probiotika testirano je u kliničkim studijama i na animalnim modelima kako bi usporili progresiju ALD-a. Prvi put su probiotici korišteni u ALD-u na modelu glodavca

koristeći *Lactobacillus* GG koji je poboljšao propusnost crijeva i upalne procese u jetri. Dodatak vlakna zobi i supernatanta *Lactobacillus* GG imalo je slične rezultate, sugerirajući da su bakterijski produkti parcijalno uključeni u protektivne mehanizme. Mješavina 8 vrsta probiotika, uglavnom sastavljena od *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, isto je poboljšala jetrene lezije u ljudi i glodavaca. Nedavna studija pokazala je da je primjena *A. muciniphila* prevenirala oštećenje jetre, steatozu i neutrofilnu infiltraciju u mišjem modelu ALD-a. Ovi se efekti pripisuju poboljšanju crijevne propusnosti, poboljšanju debljine sluznice i povećanoj ekspresiji proteina čvrstih spojeva. *A. muciniphila* pokazala je poboljšanje oštećenja jetre i infiltracije neutrofila u već postojećeg ALD-a (Cassard, 2018).

Primjena prebiotika se ispituje i pokazalo se da su frukto-oligosaharidi poboljšali oštećenje jetre potaknuto alkoholom u mišjim modelima ALD-a (Yan, 2011). Novija istraživanja se usredotočuju na preventivnu ulogu pektina u ALD-u jer je njegova primjena u glodavcima hranjenima alkoholom rezultirala obnavljanjem prvotne razine *Bacteroides* i potpunim prevenirala razvoj jetrene ozljede (Cassard, 2018).

Osjetljivost prema razvoju alkoholom potaknute lezije jetre, povezano je sa specifičnom disbiozom i niskom razinom bakterija *Bacteroides*. Modifikacija crijevne mikrobiote u alkohol osjetljivim miševima pomoću metode fekalne mikrobne transplantacije, prevenirala je razvoj jetrenih lezija. Pilot studija u Indiji koja je testirala transplantaciju fekalne mikrobiote u osoba s teškim oblikom alkoholnog hepatitisa koji nisu kandidati za kortikosteroidnu terapiju, pokazala je obećavajuće rezultate, no napravljena je na malom uzorku (Cassard, 2018).

# OSTALE BOLESTI JETRE POVEZANE S MIKROBIOTOM

## Hepatocelularni karcinom

Etiologija nevirusnog hepatocelularnog karcinoma (eng. *hepatocellular carcinoma* – HCC) se pripisuje patogenezi „multiplih udarača“, gdje jetrenu steatozu slijedi oksidativni stres, stres endoplazmatskog retikuluma zajedno s intestinalnom disbiozom i upalom koje doprinose manifestaciji karcinoma (Tripathi, 2018). Informacije o utjecaju crijevne mikrobiote u hepatokarcinogenezi uglavnom dolaze iz životinjskih eksperimenata, gdje se sugerira važnost interakcije lipopolisaharida i TLR4 kao promotora u razvoju hepatocelularnog karcinoma (Fukui, 2019).

Sastav crijevne mikrobiote dramatično je promijenjen u osoba s HCC-om. Obogaćenje bakterijama *Clostridium spp.* pronađeno je u animalnih modela HCC-a potaknutih pretilošću, a kliničke studije pacijenata s HCC-om uočile su prekomjerni rast intestinalne *E.coli*. Animalni modeli, kao i studije na pacijentima, ukazuju na migraciju *Helicobacter spp.* do tumorskog tkiva HCC-a (Tripathi, 2018). Prisutnost bakterijske DNA *H. hepaticusa* zabilježena je u jetrenim biopsijama s hepatocelularnim karcinomom, a odsutna je bila u zdravih kontrola (Shen, 2018). Pripadnici ovog roda promoviraju razvoj tumora interferirajući se u imunološke procese i supresiju tumora, što može imati potencijalnu ulogu u razvoju HCC-a (Tripathi, 2018). *E. coli* i *Atopodium* nađene su u većem broju u mišjem modelu gdje je razvoj HCC-a potaknut karcinogenom dietilnitrozaminom, dok su benigne bakterije poput *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* nađene u značajno sniženom broju (Shen, 2018; Tripathi, 2018).

Sve više dokaza govori u prilog kako je disbioza povezana s HCC-om i popraćena disfunkcijom crijevne barijere, bakterijskom translokacijom, sistemskom cirkulacijom njihovih tumor promotorskih metabolita te aktivacijom proupalnih i onkogenih signalnih putova. Primjena antibiotika širokog spektra pokazala je da atenuira upalne procese u jetri i razvoj HCC-a u miševa, zbog čega se pretpostavlja uloga mikrobiote u jetrenoj tumorogenezi (Tripathi, 2018).

Bolje razumijevanje uloge crijevne mikrobiote, omogućuje istraživanje raznih potencijalnih načina liječenja usmjerenih na mikrobiotu, kao što je primjena sintetičkih žučnih kiselina u smanjenju rizika razvoja HCC-a u NAFLD pacijenata, primjena neselektivnih beta



blokatora u intestinalnoj mukozii kako bi se prevenirala bakterijska translokacija i upalni procesi u jetri te primjena probiotika u animalnim modelima HCC-a kako bi se usporio rast tumora i reducirala veličina tumora (*Tripathi, 2018*).

## Primarni bilijarni kolangitis

Klinička istraživanja i podaci govore o istaknutoj ulozi promijenjene crijevne mikrobiote u kolestatskim bolestima poput PSC-a i primarnog bilijarnog kolangitisa (*Giordano, 2018*). Primarni bilijarni kolangitis (eng. *primary biliary cholangitis* - PBC) je hepatobilijarni poremećaj koji je posredovan imunološkim sustavu, a karakteriziran je progresivnim oštećenjem malih žučnih vodova, što posljedično rezultira intrahepatalnom kolestazom, fibrozom, cirozom i posljedičnom terminalnim jetrenim zatajenjem. PBC uglavnom zahvaća žene u srednjim godinama, klinički sa simptomima vrtoglavice i pruritusa te s kronično povišenim vrijednostima ALP. Trenutno liječenje je ursodeoksikolnom kiselinom (*Fukui, 2019*).

U prvoj studiji slučaj-kontrola pronađeno je u stolici ispitanika s ranim stadijem PBC-a povišene razine oportunističkih patogena, kao što su *gamma-Proteobacteria*, *Enterobacteriaceae*, *Neisseriaceae*, *Spirochaetaceae*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Anaeroglobus geminatus*, *Enterobacter asburiae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Megasphaera micronuciformis* i *Paraprevotella clara*, a smanjene razine potencijalno korisnih bakterija, *Acidobacteria*, *Lachnobacterium sp.*, *Bacteroides eggerthii* i *Ruminococcus bromii* u usporedbi sa zdravim kontrolama (*Fukui, 2019*)

# ZAKLJUČAK

Crijevnu mikrobiotu čine različiti mikroorganizmi što uključuje gljive, bakterije, prabakterije, praživotinje i viruse. Mikrobiota ima više uloga u organizmu, poput sudjelovanja u metabolizmu tvari i imunom sustavu. Iako je teško utvrditi eubiozni status, određene vrste bakterija poput *Roseburia*, *Bifidobacterium* i sličnih, povezuju se sa zdravim organizmom.

Promjena u sastavu mikrobioma i njegove funkcije, tzv. disbioza, nosi ulogu u razvoju raznih jetrenih bolesti, prvenstveno PSC-a, NAFLD-a, ALD-a i dr. Smanjuje se prisutnost korisnih bakterija koje sudjeluju i reguliraju metabolizam tvari, kao što su žučne kiseline, kolin i sl., dovodeći do narušavanja njihove ravnoteže u organizmu i posredno do pokretanja patoloških procesa. Disbioza uzrokuje narušavanje crijevne barijere, što rezultira povećanom propusnosti crijeva za mikrobiom, poput bakterija, njihovih komponenata i metabolita, koji potom dopijevaju u portalnu cirkulaciju. Putem portalne cirkulacije, mikrobiota i njezini produkti dolaze do jetre gdje sudjeluju u interakciji sa stanicama u jetri, kao što su Kupfferove stanice i jetrene stelatne stanice, gdje potiču upalni odgovor. Crijevna disbioza direktno ili putem svojih metabolita narušava homeostazu u tijelu, dovodeći na kraju do patoloških promjena kakve su karakteristične za jetrene bolesti.

Terapija usmjerena prema manipuliranju mikrobiote koristeći antibiotike, probiotike, prebiotike, sinbiotike i fekalnu mikrobnu transplantaciju pokazuje obećavajuće rezultate u trenutnim studijama, kao i primjena metabolita mikrobiote, od kojih se već neki koriste u terapijama jetrenih bolesti, poput ursodeoksikolne kiseline, derivata sekundarne žučne kiseline. Uspjeh terapije bazirane na mikrobioti omogućio bi preveniranje napredovanja određenih jetrenih bolesti, za čiji je krajnji stadij zasad jedina terapija izbora transplantacija jetre. Osim terapije, karakteristična promjena sastava mikrobiote povezuje se s određenim jetrenim bolestima i njihovim stadijima, što bi se moglo koristiti kao dijagnostički marker i marker napredovanja bolesti.

Mikrobiota se tek počela pomnije istraživati, zbog čega se očekuju nova saznanja u njezinoj ulozi u patogenezi i terapijskom pristupu u jetrenim bolestima.

## **ZAHVALE**

Zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Anni Mrzljak, na ukazanom povjerenju i podršci prilikom pisanja ovog rada.

Zahvaljujem svojim roditeljima Vinki i Branku, sestrama Martini i Katarini, Jakovu i prijateljima na neizmjerne podršci prilikom studiranja i savjetima prilikom izrade ovog diplomskog.

# LITERATURA

- Adams, L. A., Wang, Z., Liddle, C., Melton, P. E., Ariff, A., Chandraratna, H., ... Jeffrey, G. P. (2020). "Bile acids associate with specific gut microbiota, low-level alcohol consumption and liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease." *Liver International*, 40(6). <https://doi.org/10.1111/liv.14453>
- Ali, A. H., Carey, E. J., & Lindor, K. D. (2016). "The Microbiome and Primary Sclerosing Cholangitis." *Seminars in Liver Disease*, 36(4). <https://doi.org/10.1055/s-0036-1594007>
- Bajaj, J. S., Liu, E. J., Kheradman, R., Fagan, A., Heuman, D. M., White, M., ... Gillevet, P. M. (2018). "Fungal dysbiosis in cirrhosis." *Gut*, 67(6). <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313170>
- Biedermann, L., & Rogler, G. (2015). "The intestinal microbiota: its role in health and disease." *European Journal of Pediatrics*. <https://doi.org/10.1007/s00431-014-2476-2>
- Bluemel, S., Williams, B., Knight, R., & Schnabl, B. (2016). "Precision medicine in alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease via modulating the gut microbiota." *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00245.2016>
- Bull-Otterson, L., Feng, W., Kirpich, I., Wang, Y., Qin, X., Liu, Y., ... Barve, S. (2013). "Metagenomic Analyses of Alcohol Induced Pathogenic Alterations in the Intestinal Microbiome and the Effect of Lactobacillus rhamnosus GG Treatment." *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053028>
- Canfora, E. E., Meex, R. C. R., Venema, K., & Blaak, E. E. (2019). "Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM." *Nature Reviews Endocrinology*. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0156-z>
- Cassard, A. M., & Ciocan, D. (2018). "Microbiota, a key player in alcoholic liver disease." *Clinical and Molecular Hepatology*. <https://doi.org/10.3350/cmh.2017.0067>
- Chen, P., Torralba, M., Tan, J., Embree, M., Zengler, K., Stärkel, P., ... Schnabl, B. (2015). "Supplementation of saturated long-chain fatty acids maintains intestinal eubiosis and reduces ethanol-induced liver injury in mice." *Gastroenterology*, 148(1). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.09.014>
- Chen, Y. H., Wu, W. K., & Wu, M. S. (2020). "Microbiota-associated therapy for non-alcoholic steatohepatitis-induced liver cancer: A review." *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms21175999>
- de Oca, A. P. M., Julián, M. T., Ramos, A., Puig-Domingo, M., & Alonso, N. (2020).

- “Microbiota, fiber, and NAFLD: Is there any connection?” *Nutrients*.  
<https://doi.org/10.3390/nu12103100>
- Dean, G., Hanauer, S., & Levitsky, J. (2020). “The Role of the Intestine in the Pathogenesis of Primary Sclerosing Cholangitis: Evidence and Therapeutic Implications.” *Hepatology*.  
<https://doi.org/10.1002/hep.31311>
- Di Ciaula, A., Baj, J., Garruti, G., Celano, G., De Angelis, M., Wang, H. H., ... Portincasa, P. (2020). “Liver Steatosis, Gut-Liver Axis, Microbiome and Environmental Factors. A Never-Ending Bidirectional Cross-Talk.” *Journal of Clinical Medicine*, 9(8).  
<https://doi.org/10.3390/jcm9082648>
- Ding, X., Saxena, N. K., Lin, S., Gupta, N., & Anania, F. A. (2006). “Exendin-4, a glucagon-like protein-1 (GLP-1) receptor agonist, reverses hepatic steatosis in ob/ob mice.” *Hepatology*, 43(1). <https://doi.org/10.1002/hep.21006>
- Dyson, J. K., Beuers, U., Jones, D. E. J., Lohse, A. W., & Hudson, M. (2018). “Primary sclerosing cholangitis.” *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30300-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30300-3)
- Fairfield, B., & Schnabl, B. (2021). “Gut dysbiosis as a driver in alcohol-induced liver injury.” *JHEP Reports*, 3(2). <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100220>
- Fukui, H. (2019). “Role of Gut Dysbiosis in Liver Diseases: What Have We Learned So Far?” *Diseases*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/diseases7040058>
- Gäbele, E., Dostert, K., Hofmann, C., Wiest, R., Schölmerich, J., Hellerbrand, C., & Obermeier, F. (2011). “DSS induced colitis increases portal LPS levels and enhances hepatic inflammation and fibrogenesis in experimental NASH.” *Journal of Hepatology*, 55(6). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.02.035>
- Giordano, D. M., Pinto, C., Maroni, L., Benedetti, A., & Marzioni, M. (2018). “Inflammation and the gut-liver axis in the pathophysiology of cholangiopathies.” *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms19103003>
- Houttu, V., Boulund, U., Grefhorst, A., Soeters, M. R., Pinto-Sietsma, S. J., Nieuwdorp, M., & Holleboom, A. G. (2020). “The role of the gut microbiome and exercise in non-alcoholic fatty liver disease.” *Therapeutic Advances in Gastroenterology*.  
<https://doi.org/10.1177/1756284820941745>
- Hoyles, L., Fernández-Real, J. M., Federici, M., Serino, M., Abbott, J., Charpentier, J., ... Dumas, M. E. (2018). “Molecular phenomics and metagenomics of hepatic steatosis in non-diabetic obese women.” *Nature Medicine*, 24(7). <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0061-3>
- Huang, W., & Kong, D. (2021). “The intestinal microbiota as a therapeutic target in the

- treatment of NAFLD and ALD.” *Biomedicine and Pharmacotherapy*.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111235>
- Jadhav, K., & Cohen, T. S. (2020). “Can You Trust Your Gut? Implicating a Disrupted Intestinal Microbiome in the Progression of NAFLD/NASH.” *Frontiers in Endocrinology*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.592157>
- Jiang, L., Lang, S., Duan, Y., Zhang, X., Gao, B., Chopyk, J., ... Schnabl, B. (2020). “Intestinal Virome in Patients With Alcoholic Hepatitis.” *Hepatology*, 72(6).  
<https://doi.org/10.1002/hep.31459>
- Kanmani, P., Suganya, K., & Kim, H. (2020). “The gut microbiota: How does it influence the development and progression of liver diseases.” *Biomedicines*, 8(11).  
<https://doi.org/10.3390/biomedicines8110501>
- Katt, J., Schwinge, D., Schoknecht, T., Quaas, A., Sobottka, I., Burandt, E., ... Schramm, C. (2013). “Increased T helper type 17 response to pathogen stimulation in patients with primary sclerosing cholangitis.” *Hepatology*, 58(3). <https://doi.org/10.1002/hep.26447>
- Kolodziejczyk, A. A., Zheng, D., Shibolet, O., & Elinav, E. (2019). “The role of the microbiome in NAFLD and NASH.” *EMBO Molecular Medicine*, 11(2).  
<https://doi.org/10.15252/emmm.201809302>
- Kong, L. Z., Chandimali, N., Han, Y. H., Lee, D. H., Kim, J. S., Kim, S. U., ... Kwon, T. (2019). “Pathogenesis, early diagnosis, and therapeutic management of alcoholic liver disease.” *International Journal of Molecular Sciences*.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20112712>
- Kwong, E. K., & Puri, P. (2021). “Gut microbiome changes in nonalcoholic fatty liver disease & alcoholic liver disease.” *Translational Gastroenterology and Hepatology*.  
<https://doi.org/10.21037/TGH.2020.02.18>
- Leclercq, S., Matamoros, S., Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Jamar, F., Stärkel, P., ... Delzenne, N. M. (2014). “Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(42). <https://doi.org/10.1073/pnas.1415174111>
- Lemoine, S., Sabino, J., & Sokol, H. (2020). “Gut microbiota in PSC : From association to possible causality. Commentary to ‘Gut pathobionts underlie intestinal barrier dysfunction and liver T helper 17 cell immune response in primary sclerosing cholangitis’ by Nakamoto et al., *Nature Microbiology*, January 2019.” *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.clinre.2019.06.005>

- Leung, C., Rivera, L., Furness, J. B., & Angus, P. W. (2016). "The role of the gut microbiota in NAFLD." *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*.  
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.85>
- Li, F., McClain, C. J., & Feng, W. (2019). "Microbiome dysbiosis and alcoholic liver disease." *Liver Research*. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2019.09.001>
- Little, R., Wine, E., Kamath, B. M., Griffiths, A. M., & Ricciuto, A. (2020). "Gut microbiome in primary sclerosing cholangitis: A review." *World Journal of Gastroenterology*.  
<https://doi.org/10.3748/WJG.V26.I21.2768>
- Loomba, R., Seguritan, V., Li, W., Long, T., Klitgord, N., Bhatt, A., ... Nelson, K. E. (2017). "Gut Microbiome-Based Metagenomic Signature for Non-invasive Detection of Advanced Fibrosis in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Cell Metabolism*, 25(5). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.001>
- Mato, J. M., Martínez-Chantar, M. L., & Lu, S. C. (2013). "S-adenosylmethionine metabolism and liver disease." *Annals of Hepatology*. [https://doi.org/10.1016/s1665-2681\(19\)31355-9](https://doi.org/10.1016/s1665-2681(19)31355-9)
- Michail, S., Lin, M., Frey, M. R., Fanter, R., Paliy, O., Hilbush, B., & Reo, N. V. (2015). "Altered gut microbial energy and metabolism in children with non-alcoholic fatty liver disease." *FEMS Microbiology Ecology*, 91(2). <https://doi.org/10.1093/femsec/iu002>
- Mutlu, E. A., Gillevet, P. M., Rangwala, H., Sikaroodi, M., Naqvi, A., Engen, P. A., ... Keshavarzian, A. (2012). "Colonic microbiome is altered in alcoholism." *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 302(9).  
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00380.2011>
- Nagpal, R., & Yadav, H. (2017). "Bacterial translocation from the gut to the distant organs: An overview." *Annals of Nutrition and Metabolism*. <https://doi.org/10.1159/000479918>
- Nakamoto, N., Sasaki, N., Aoki, R., Miyamoto, K., Suda, W., Teratani, T., ... Kanai, T. (2019). "Gut pathobionts underlie intestinal barrier dysfunction and liver T helper 17 cell immune response in primary sclerosing cholangitis." *Nature Microbiology*, 4(3).  
<https://doi.org/10.1038/s41564-018-0333-1>
- Ortigao, R., Pimentel-Nunes, P., Dinis-Ribeiro, M., & Libanio, D. (2020). "Gastrointestinal Microbiome - What We Need to Know in Clinical Practice." *GE Portuguese Journal of Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1159/000505036>
- Pedersen, H. K., Gudmundsdottir, V., Nielsen, H. B., Hyotylainen, T., Nielsen, T., Jensen, B. A. H., ... Pedersen, O. (2016). "Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity." *Nature*, 535(7612). <https://doi.org/10.1038/nature18646>

- Quraishi, M. N., Acharjee, A., Beggs, A. D., Horniblow, R., Tselepis, C., Gkoutos, G., ... Iqbal, T. H. (2020). "A Pilot Integrative Analysis of Colonic Gene Expression, Gut Microbiota, and Immune Infiltration in Primary Sclerosing Cholangitis-Inflammatory Bowel Disease: Association of Disease with Bile Acid Pathways." *Journal of Crohn's and Colitis*, 14(7). <https://doi.org/10.1093/ECCO-JCC/JJAA021>
- Rahman, K., Desai, C., Iyer, S. S., Thorn, N. E., Kumar, P., Liu, Y., ... Anania, F. A. (2016). "Loss of Junctional Adhesion Molecule A Promotes Severe Steatohepatitis in Mice on a Diet High in Saturated Fat, Fructose, and Cholesterol." *Gastroenterology*, 151(4). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.06.022>
- Rojo, D., Méndez-García, C., Raczowska, B. A., Bargiela, R., Moya, A., Ferrer, M., & Barbas, C. (2017). "Exploring the human microbiome from multiple perspectives: Factors altering its composition and function." *FEMS Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw046>
- Rühlemann, M., Liwinski, T., Heinsen, F. A., Bang, C., Zenouzi, R., Kummen, M., ... Franke, A. (2019). "Consistent alterations in faecal microbiomes of patients with primary sclerosing cholangitis independent of associated colitis." *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 50(5). <https://doi.org/10.1111/apt.15375>
- Sabino, J., Vieira-Silva, S., Machiels, K., Joossens, M., Falony, G., Ballet, V., ... Raes, J. (2016). "Primary sclerosing cholangitis is characterised by intestinal dysbiosis independent from IBD." *Gut*, 65(10). <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-311004>
- Shah, A., MacDonald, G. A., Morrison, M., & Holtmann, G. (2020). "Targeting the Gut Microbiome as a Treatment for Primary Sclerosing Cholangitis: A Conceptual Framework." *American Journal of Gastroenterology*. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000604>
- Shen, T. C. D., Pysopoulos, N., & Rustgi, V. K. (2018, April 1). "Microbiota and the liver." *Liver Transplantation*. John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/lt.25008>
- Sherriff, J. L., O'Sullivan, T. A., Properzi, C., Oddo, J. L., & Adams, L. A. (2016). "Choline, its potential role in nonalcoholic fatty liver disease, and the case for human and bacterial genes." *Advances in Nutrition*. <https://doi.org/10.3945/an.114.007955>
- Szabo, G. (2015). "Gut-liver axis in alcoholic liver disease." *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.10.042>
- Torres, J., Palmela, C., Brito, H., Bao, X., Ruiqi, H., Moura-Santos, P., ... Hu, J. (2018). "The gut microbiota, bile acids and their correlation in primary sclerosing cholangitis associated with inflammatory bowel disease." *United European Gastroenterology*



Journal, 6(1). <https://doi.org/10.1177/2050640617708953>

- Tripathi, A., Debelius, J., Brenner, D. A., Karin, M., Loomba, R., Schnabl, B., & Knight, R. (2018). "The gut-liver axis and the intersection with the microbiome." *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0011-z>
- Vieira-Silva, S., Sabino, J., Valles-Colomer, M., Falony, G., Kathagen, G., Caenepeel, C., ... Raes, J. (2019). "Quantitative microbiome profiling disentangles inflammation- and bile duct obstruction-associated microbiota alterations across PSC/IBD diagnoses." *Nature Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0483-9>
- Wigg, A. J., Roberts-Thomson, I. C., Grose, R. H., Cummins, A. G., Dymock, R. B., & McCarthy, P. J. (2001). "The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor  $\alpha$  in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis." *Gut*, 48(2). <https://doi.org/10.1136/gut.48.2.206>
- Yan, A. W., Fouts, D. E., Brandl, J., Stärkel, P., Torralba, M., Schott, E., ... Schnabl, B. (2011). "Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease." *Hepatology*, 53(1). <https://doi.org/10.1002/hep.24018>
- Yang, A. M., Inamine, T., Hochrath, K., Chen, P., Wang, L., Llorente, C., ... Schnabl, B. (2017). "Intestinal fungi contribute to development of alcoholic liver disease." *Journal of Clinical Investigation*, 127(7). <https://doi.org/10.1172/JCI90562>

# ŽIVOTOPIS

Rođena u Zadru 1996.g. gdje pohađa srednju školu „Gimnazija Jurja Barakovića“, prirodoslovno-matematički smjer. 2015.g. upisuje Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Akadske godine 2017./2018. demonstrator je na Zavodu za histologiju i embriologiju. Sudionik je „*ESMO-ESO Course on Medical Oncology for Medical Students*“ u Napulju 2019.g. Sudionik je jednomjesečne studentske razmjene u organizaciji IFMSA-e na Klinici za pulmologiju Sveučilišne bolnice Hradec Králové (2019.g.).

Član je pjevačkog zbora Medicinskog fakulteta „*Lege artis*“ nagrađenog Posebnom dekanovom nagradom za društveno korisni doprinos Medicinskom fakultetu (2017.g) i studentske udruge „*CroMSIC*“ od 2015.-2021.g. Sudjelovanjem u projektu promicanja mentalnog zdravlja mladih „*Pogled u sebe*“ nagrađena je Rektorovom nagradom za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici 2019.g.

Tečno govori engleski jezik, a poznaje osnove talijanskog jezika.