

# Važnost bifidobakterija u dječjoj imunizaciji

---

**Prskalo, Ana Marija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:749629>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-05**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Ana Marija Prskalo**

7705/BT

**VAŽNOST BIFIDOBAKTERIJA U DJEČJOJ IMUNIZACIJI**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biologija

**Mentor:** doc. dr. sc. Tomislav Vladušić

**Zagreb, 2020.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija**

**Zavod za biokemijsko inženjerstvo**  
**Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**  
**Znanstveno polje: Biotehnologija**

### VAŽNOST BIFIDOBAKTERIJA U DJEČJOJ IMUNIZACIJI

**Ana Marija Prskalo, 0058213665**

**Sažetak:** Bifidobakterije su dominantna skupina bakterija u gastrointestinalnom traktu novorođenčadi, a u odrasloj dobi smanjuje im se brojnost. Prijenos bakterija s majke na dijete, pa tako i bifidobakterija, moguć je preko majčine kože, rodnice, djetetove usne šupljine, ali važan izvor je i majčino mlijeko koje je osim za nutritivni razvoj zaslužno i za imunosni razvoj djeteta. Oligosaharidi su nakon lipida i laktoze najzastupljenija komponenta majčinog mlijeka te funkcioniraju kao prebiotici potičući rast određenih bakterija u crijevima novorođenčadi i štiteći od kolonizacije patogenim bakterijama. Kolonizacija crijeva novorođenčadi ovisi o načinu poroda, prehrani i mikroorganizmima prisutnim u okolišu. Prve bakterije koje koloniziraju crijeva novorođenčadi su fakultativni anaerobi koji omogućuju rast striktnih anaeroba kao što su bifidobakterije. Adhezija bakterija na crijevnu sluznicu potrebna je kako bi se ostvarili zdravstveni učinci bifidobakterija kao što je smanjenje trajanje dijareje.

**Ključne riječi:** Bifidobakterije, majčino mlijeko, oligosaharidi,

**Rad sadrži:** 24 stranice, 6 slika, 1 tablicu, 46 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** doc. dr. sc. Tomislav Vladušić

**Datum obrane:** rujan 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Biotechnology**

**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for Biology and Microbial Genetics**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

### THE IMPORTANCE OF BIFIDOBACTERIA IN CHILD IMMUNIZATION

**Ana Marija Prskalo, 0058213665**

**Abstract:** *Bifidobacterium* are the dominant genus of bacteria in the gastrointestinal tract of newborns, and their number decreases in adulthood. Transmission of bacteria from mother to child, including bifidobacteria, is possible through the mother's skin, vagina, the child's oral cavity, but an important source is also breast milk. In addition to nutritional development, breast milk is also responsible for the immune development of the child. Oligosaccharides are after lactose and lipids the third most abundant component of human milk acting as prebiotics, which encourage the growth of certain bacteria within the infant gastrointestinal tract, and protecting the infant from colonisation by pathogenic bacteria. Colonization of the intestines of newborns depends on the mode of delivery, diet and microorganisms present in the environment. The first bacteria to colonize the intestines of newborns are facultative anaerobes that allow the growth of strict anaerobes such as bifidobacteria. Adhesion of bacteria to the intestinal mucosa is required to achieve the health effects of bifidobacteria such as reducing the duration of diarrhea.

**Keywords:** Bifidobacteria, Breast milk, Oligosaccharides

**Thesis contains:** 24 pages, 6 figures, 1 table, 46 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** PhD Tomislav Vladušić, Assist. prof.

**Defence date:** September 2020.

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. PRIRODNA IMUNIZACIJA.....	2
2.1.1 Bifidobakterije.....	2
2.1.2. Opće karakteristike majčinog mlijeka .....	4
2.1.3. Bifidobakterije u majčinom mlijeku.....	6
2.1.4. Kolonizacija bifidobakterija.....	7
2.2. INTERAKCIJA BIFIDOBAKTERIJA U DJEČJEM PROBAVNOM SUSTAVU.....	10
2.3. BIFIDOBAKTERIJE U TRETMANU I PREVENCIJI DJEČJIH BOLESTI .....	13
2.3.1. Akutna dijareja .....	13
2.3.2. Nekrotizirajući enterokolitis.....	15
2.3.3. Dječji kolik.....	16
2.3.4. Alergije .....	17
3. ZAKLJUČAK.....	19
4. POPIS LITERATURE.....	20

## 1. UVOD

Imunosni sustav čine molekule, stanice, tkiva i organi odgovorni za imunost, odnosno otpornost ka stranome, a usklađeni i udruženi odgovor na strane tvari naziva se imunosni odgovor. Fiziološka funkcija imunosnog sustava je obrana protiv zaraznih mikroorganizama i promijenjenih stanica samog organizma domaćina, ali čak i nezarazne strane tvari mogu izazvati imunosni odgovor. Imunosni odgovor je reakcija na sastavnice mikroorganizama, makromolekule kao što su bjelančevine i ugljikohidrati, tvari koje se prepoznaju kao strane. Moguće je da i vlastite molekule izazovu imunosni odgovor što se naziva autoimunskim odgovorom. Urođena imunost je skup ranijih mehanizama obrane od stranog, a glavne sastavnice su fizičke i kemijske zapreke kao što su epitel i antimikrobne tvari koje se stvaraju na epitelnim površinama, fagocitne stanice, dedritične stanice, prirodno ubilačke stanice i druge urođene limfoidne stanice te bjelančevine krvi, uključujući članove sustava komplementa i druge posrednike upale. Adaptivna imunost je oblik imunosti koji se razvija kao specifični odgovor na strano i prilagođava se uzročniku imunosne reakcije te prepoznaje i reagira na velik broj mikrobnih i nemikrobnih tvari. Jedinstvene sastavnice adaptivne imunosti su limfociti i njihovi izlučeni proizvodi, kao što su protutijela (Abbas i sur., 2018).

Bakterije su jednostanični organizmi prosječnog promjera 1  $\mu\text{m}$  i prokariotske građe stanice. Imaju dvolančanu najčešće kružnu DNA koja nije obavijena jezgri i ovojnicom. Carstvo prokariota podjeljeno je u dvije skupine: arheobakterije i eubakterije. Arheobakterije se od eubakterija razlikuju prema građi stanične membrane i strukturi genoma, metabolizmu, ekološkim parametrima, a RNA u ribosomima razlikuje se slijedom baza od RNA u ribosomima eubakterija. Arheobakterije mogu se podjeliti u tri skupine: metanogene, ekstremno halofilne i termoacidofile. Osnovni kriteriji za svrstavanje bakterija u skupine su: prema obliku (morfologiji), bojanju po Gramu (Gram-pozitivne i Gram-negativne), odnosu prema kisiku (anaerobne ili aerobne), sposobnosti stvaranja spora (sporigene i nesporogene) te prema slijedovima baza u njihovim nukleinskim kiselinama (primjerice 16S rRNA) (Hrvatska enciklopedija, 2020).

Rod *Bifidobacterium* uključen je u koljeno *Actinobacteria*, razred *Actinobacteria*, red Bifidobacteriales i porodicu Bifidobacteriaceae. U rodu *Bifidobacterium* opisano je više od 50 vrsta, ali taj broj mijenja se novim spoznajama. Bifidobakterije karakteriziraju se kao Gram-pozitivne, nesporogene, nepokretne i katalaza-negativne anaerobne bakterije. Bifidobakterije su među dominantnim populacijama bakterija u gastrointestinalnom traktu ljudi i među

prvim bakterijama koje koloniziraju crijeva novorođenčadi te su najbrojnije bakterije u prvih nekoliko mjeseci života (Hidalgo-Cantabrana i sur., 2017).

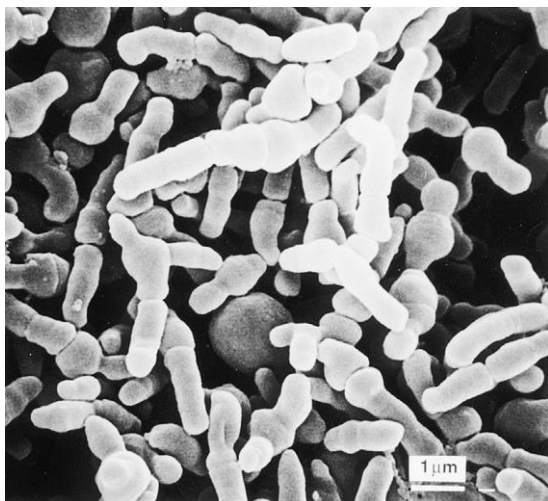
## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. PRIRODNA IMUNIZACIJA

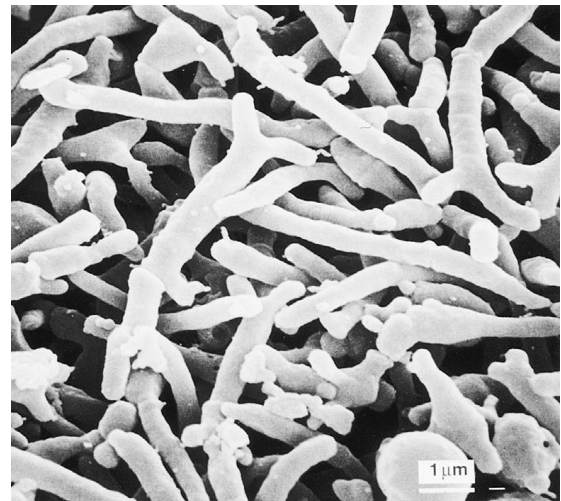
#### 2.1.1 Bifidobakterije

Bifidobakterije su Gram-pozitivne, anaerobne i nesporigene bakterije. Optimalna temperatura rasta je između 37°C i 41°C, a optimalno pH područje je između 6,5 i 7,5 (Roy, D., 2011.). Bifidobakterije imaju štapičastu građu sa prepoznatljivom bifid morfologijom odnosno oblikom slova X ili Y. Prvi ih je izolirao Tissier 1899. godine iz stolice dojenčeta i opisao kao štapičaste i anaerobne mikroorganizme koje ne proizvode plin te ih je označio kao *Bacillus bifidus*. Bakterija je zatim smještena u rod *Lactobacillus* kao *L. bifidus*, ali kasnije je priznata kao član posebnog roda bakterija *Bifidobacterium*. Neke vrste bifidobakterija pokazuju probiotička svojstva u probavnom sustavu, pri čemu se probiotici karakteriziraju kao „živi mikroorganizmi koji domaćinu donose zdravstvenu korist kada se daju u odgovarajućim količinama“. Neke vrste bifidobakterija stoga imaju GRAS status (eng. *Generally Recognised As Safe*, opće priznato kao sigurno) među kojima je *Bifidobacterium animalis*. Dominantno ih se u probavnom sustavu čovjeka, ali moguće ih je izolirati i iz rodnice te usne šupljine. Kod čovjeka je dominantno prisutno 8 - 12 vrsta iz roda *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium gallicum*, *Bifidobacterium inopinatum*, *Bifidobacterium dentium* i *Bifidobacterium denticolens*. *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. bifidum* i *B. adolescentis* koloniziraju probavni trakt dojenčadi nekoliko dana nakon poroda i time prosječan broj bifidobakterija u izmetu naraste do 10<sup>10</sup> CFU/g. *B. longum* i *B. adolescentis* su dominantne bifidobakterije u probavnom traktu odraslih ljudi i ukupan prosječan broj bifidobakterija je 10<sup>8</sup> CFU/g izmeta (Cheikhoussef i sur., 2008; Ghoddusi i Tamime, 2014; Picard i sur., 2005). Promjenom prehrane odnosno prelaskom na čvrstu hranu pada broj bifidobakterija u probavnom sustavu jer se uspostavlja stabilna mikroflora karakteristična za zdravu odraslu osobu. U odrasloj dobi znatno je niži broj bifidobakterija, ali ostaje stabilan (Arbolea i sur., 2016). Bifidobakterije pokazuju saharolitičko ponašanje što znači da su ugljikohidrati jedini

izvor ugljika i energije. Složene ugljikohidrate koji su uneseni preko prehrane ili su izravno izvedeni iz domaćina kao što su mucin i oligosaharidi iz ljudskog mlijeka, bifidobakterije razgrađuju jer nisu probavljivi od strane domaćina. Mucini su glikani koje proizvodi domaćin i luče ih crijevne vrčaste stanice. Mucini čine sloj sluzi koji prekriva sluznicu crijeva i sojevi *B. bifidum* pokazuju veliku učinkovitost u njihovoj razgradnji. Aktivnost unakrsnog hranjenja kod bifidobakterija nedavno je otkrivena i ima ulogu dijeljenja nutrijenata međusobno ili s drugim mikroorganizmima iz crijeva. Polisaharidi koji dođu netaknuti do crijeva mogu proći izvanstaničnu hidrolizu od strane bifidobakterija i tako se stvaraju jednostavni glikani kao što su monosaharidi ili oligosaharidi koji su hrana za druge mikroorganizme, ali i same bifidobakterije (Milani i sur., 2015). U bifidobakterijama produkti razgradnje ugljikohidrata mogu biti organske kiseline koje su inhibitorne prema nekim vrstama invazivnih bakterija jer ne mogu sve preživjeti u uvjetima sniženog pH uzrokovanog proizvedenim kiselinama. Bifidobakterije snižavanjem pH vrijednosti u crijevima tako određuju koje bakterije mogu kolonizirati jer određuju uvjete u kojima samo neke mogu preživjeti, a bakterije koje ne mogu brzo se uklanjaju iz crijeva. Teoretski omjer razgradnje ugljikohidrata pomoću bifidobakterija predviđa nastanak 3 acetata i 2 laktata iz dvije heksoze. Konstanta disocijacije ( $pK_a$ ) i koncentracija kiseline pri određenom pH određuju inhibitornu aktivnost kiseline, stoga organska kiselina koja ima veću  $pK_a$  vrijednost ima i jaču antimikrobnu aktivnost. Neke organske kiseline antimikrobnu aktivnost ispoljavaju i na druge načine, primjerice remećenjem strukture membrana (Ghoddusi i Tamime, 2014).



Slika 1. Stanična morfologija *B. infantis* (preuzeto Ghoddusi i Tamime, 2014).



Slika 2. Stanična morfologija *B. longum* (preuzeto Ghoddusi i Tamime, 2014).



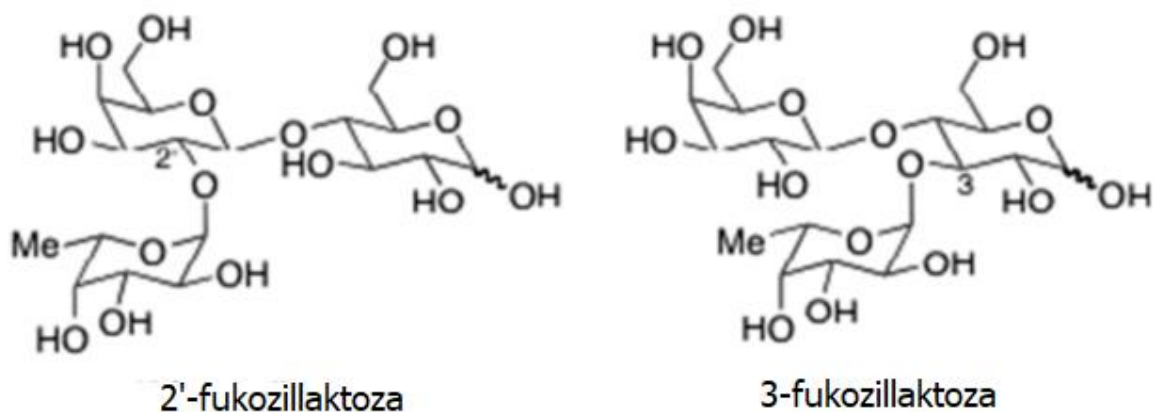
### 2.1.2. Opće karakteristike majčinog mlijeka

Kolostrum je prvo mlijeko koje je posebnog izgleda i sastava. Primarna funkcija kolostruma nije samo nutritivni nego i imunosni razvoj novorođenčeta zbog velike koncentracije imunskih komponenti kao što je imunoglobulin A, a manje koncentracije laktoze. Nakon nekoliko dana, povećanjem koncentracije laktoze i soli u kolostrumu, nastaje prijelazno mlijeko, a stabilizacijom sastava mlijeka, 4 do 6 tjedana nakon poroda, nastaje zrelo mlijeko (Ballard i Morrow, 2013). Ljudsko mlijeko zadovoljava potrebe brzog rasta novorođenčeta, ali uz to modulira imunski sustav djeteta i pruža određeni stupanj zaštite od patogena. Dojenče tijekom dana konzumira približno 800 mL majčinog mlijeka koje je bogato bakterijama, što znači da tako unosi  $10^5$  ili  $10^7$  bakterija (Fernández, L., 2013). Kolostrum ponajviše, ali i zrelo mlijeko sadrži visoke koncentracije faktora protiv infekcije kao što su enzimi lizozim i laktoferin, imunoglobulini, citokinini, leukociti, oligosaharidi, nukleotidi, lipidi i hormoni koji djeluju međusobno, ali i na sluznicu crijeva i gornjih dišnih puteva (Palmeira i Carneiro-Sampaio, 2016).

Tablica 1. Bioaktivni faktori kolostruma i majčinog mlijeka (preuzeto iz Palmeira i Carneiro-Sampaio, 2016)

Topive komponente	Stanične komponente	Mikroflora
antitijela (najviše izlučeno IgA)	( $10^4$ do $10^6$ stanica/mL kolostruma)	( $8 \times 10^4$ do $8 \times 10^6$ bakterija/800 mL/dan)
slobodni sekretorni faktori	( $10^5$ stanica/mL zrelog mlijeka)	Glavne vrste:
lizozimi	neutrofili	<i>Lactobacillus</i>
laktoferin	makrofagi	<i>Staphylococcus</i>
laktoperoksidaze	CD4+ T stanice	<i>Streptococcus</i>
κ-kazein	CD8+ T stanice	<i>Enterococcus</i>
α-Laktoglobulin	T <sub>γδ</sub> stanice	<i>Bifidobacterium</i>
haptokorin	B stanice	<i>Kocuria</i>
osteoprotegerin	NK stanice	<i>Lactococcus</i>
sCD14	epitelne stanice	<i>Leuconostoc</i>
hormoni		<i>Pediococcus</i>
faktori rasta		<i>Propionibacterium</i>
citokini i kemokini		<i>Rothia</i>
lipidi		<i>Weissella</i>
nukleinske kiseline		
oligosaharidi		
antioksidativni faktori		

Nutritivne komponente majčinog mlijeka su proteini, dijelom neproteinski dušik, lipidi, ugljikohidrati, vitamini i minerali. Proteini koji su najviše prisutni u majčinu mlijeku su  $\alpha$ -laktalbumin, laktoferrin, IgA, serumski albumin i lizozim, a kazein je prisutan u malim koncentracijama. Neproteinski dušik dolazi iz slobodnih aminokiselina, nukleotida, peptida, ali i nenutritivnih tvari poput uree i kreatinina te čini 25% ukupnog dušika prisutnog u mlijeku, a slobodne aminokiseline, peptidi i nukleotidi spadaju pod važne nutritivne komponente majčinog mlijeka. Nukleotidi su esencijalni nutrijenti tijekom ranog života i nužni su za razne stanične procese poput enzimske aktivnosti, regulacije metabolizma i biosinteze molekula. Također, nukleotidi mogu imati djelotvoran učinak u razvoju i popravku gastrointestinalnog trakta, kao i u razvoju mikroflore te u imunskim funkcijama. Većina izlučenih lipida su triacilgliceridi, a prisutni su i diacilgliceridi, monoacilgliceridi, slobodne masne kiseline, fosfolipidi i kolesterol. Od ugljikohidrata najvažnija je laktoza, ali u značajnim količinama prisutni su oligosaharidi koju novorođenčad ne može probaviti, ali služe kao hrana mikroflori probavnog sustava novorođenčeta. Osim nutritivne uloge za mikrofloru, primijećeno je da moduliraju reakcije epitelnih stanica crijeva, djeluju kao stanični modulatori tako što mijenjaju okoliš crijeva smanjenjem rasta stanica i induciranjem diferencijacije i apoptoze te kao imunološki modulatori potencijalno prebacujući odgovore T-stanica na uravnoteženu proizvodnju Th1/Th2-citokina. Oligosaharidi iz ljudskog mlijeka treća su najzastupljenija komponenta majčinog mlijeka, nakon lipida i laktoze, s prosječnom koncentracijom 20,9 g/L u kolostrumu i 12,9 g/L u zrelom mlijeku. To su raznoliki glikani koje minimalno hidroliziraju ljudski enzimi pa služe i kao izvor energije za mikrobiotu crijeva dojenčadi. U njihov sastav ulaze L-fruktoza, D-glukoza, D-galaktoza, N-acetilglukozamin i N-acetilmuraminska kiselina. Oligosaharidi iz ljudskog mlijeka funkcioniraju kao prebiotici tako što potiču rast bakterija, kao što je *Bifidobacterium infantis*, u crijevima dojenčadi i štite od koloniziranja patogenim bakterijama. Vezanje patogena na ugljikohidrate prisutne na stanicama crijevnog epitela ključan je korak u inicijaciji infekcije. Oligosaharidi iz mlijeka oblika su analognih ugljikohidratima na površinskim stanicama crijeva čovjeka i zbog toga se patogene bakterije u sluznici crijeva vežu za oligosaharide iz mlijeka koji tako sprječavaju prijanjanje bakterija na epitelne stanice (Andreas i sur., 2015; Sanz, 2016).



Slika 3. strukture oligosaharida 2'-fukozillaktoze i 3'-fukozilaktoze (preuzeto iz Andreas i sur., 2015).

### 2.1.3. Bifidobakterije u majčinom mlijeku

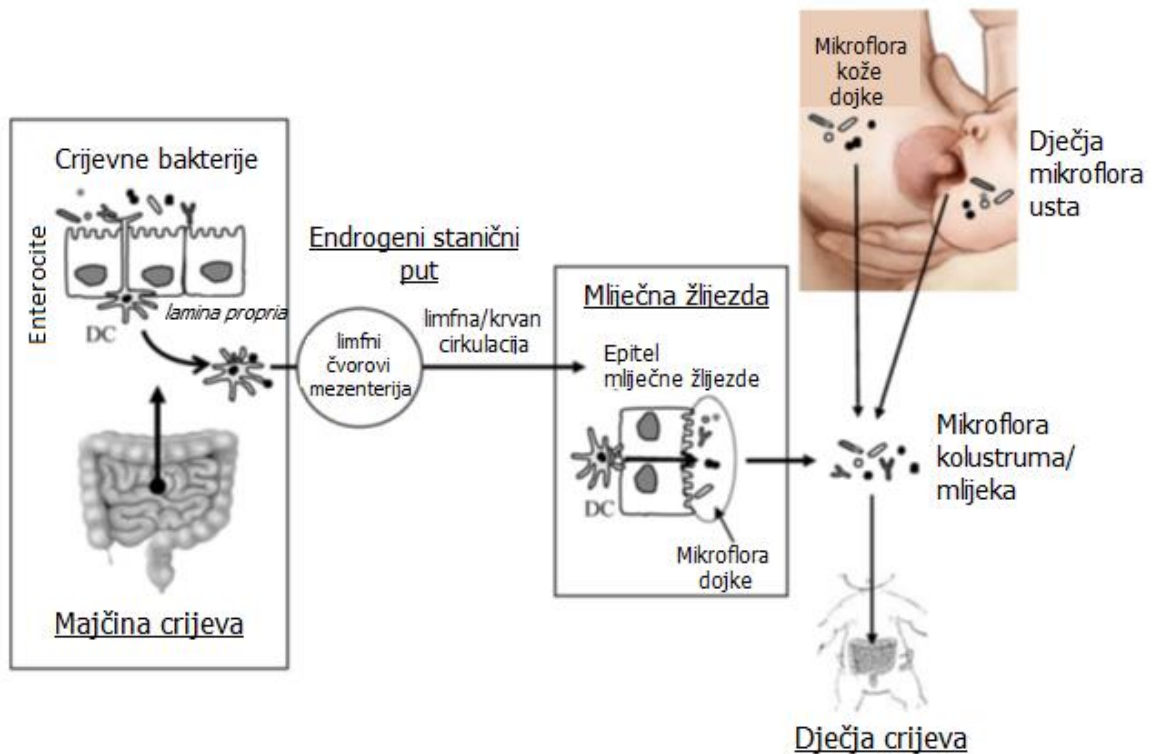
Kako su bifidobakterije dominantan rod bakterija u crijevima dojenčadi, provedena su razna istraživanja o sastavu bifidobakterija i u majčinom mlijeku, ali i u izmetu dojenčadi. U istraživanju koje su proveli Martin i sur. (2008.) dvadeset i tri žene dale su uzorak mlijeka 4 do 7 dana nakon poroda te su uzeti uzorci stolice svakog djeteta. U 8 uzoraka mlijeka identificirane su *Bifidobacterium breve*, *B. adolescentis* i *B. bifidum*, a u 21 uzorku stolice uz bifidobakterije izolirane iz mlijeka prisutne su još *B. longum* i *B. pseudocatenulatum*. Analiza 16S rRNA gena PCR-DGGE metodom bila je uspješna u 22 od 23 uzorka mlijeka i otkrila je prisutnost bifidobakterija. DNA bifidobakterija činila je manje od 16% od ukupnog DNA bakterija prisutnih u uzorcima mlijeka, ali rezultati jasno ukazuju da je ljudsko mlijeko izvor bifidobakterija. Dojenje ili hranjenje djece formulom ima utjecaj na bakterijske populacije i razvoj probavnog trakta djece te razvoj imunskog sustava. Bifidobakterije su dominantne u crijevima dojene djece, dok djeca hranjena formulom imaju manju prisutnost bifidobakterija nasuprot vrsta iz rodova *Clostridium* i *Bacteroides*. Za povećanje koncentracije bifidobakterija kod djece hranjene dječjom formulom moguć pristup je dodavanje oligosaharida u formulu, ali dodani oligosaharidi razlikuju se drastično od kompleksnih oligosaharida prirodno prisutnih u majčinom mlijeku. Bifidobakterije su također dodatak formulama za djecu jer prevladavaju kod mikroflore crijeva zdrave dojene djece. *Bifidobacterium breve*, *B. bifidum*, *B. longum ssp. longum* i *B. longum spp. infantis* prisutne su kako kod dojene djece, tako i djece hranjene formulom. *B. longum ssp. infantis* više je prisutan kod dojene djece, *B. adolescentis*, koji je prisutan kod odraslih, nalazi se i kod djece hranjene s formulom te je *B.*

*longum* ssp. *longum* izraženije prisutan kod djece hranjene formulom (*Arboleya* i sur., 2016.; Sanz, 2016.; Gueimonde i sur., 2007). Mikroflora majčinog mlijeka pokazuje veliku promjenjivost među ženama, ali malo se zna o faktorima koji utječu na te promjene. Postoje dokazi da geografska lokacija kao i način prehrane, genetika, zdravlje majke, način rađanja i okoliš nakon poroda utječu na promjenjivu mikrofloru majčinog mlijeka. Također hormonalne promjene, prekomjerna težina majke i stres mogu biti faktori koji utječu na mikrofloru majčinog mlijeka. Provelo se istraživanje majčinog mlijeka pretilih i normalno teških majki i njihove tek rođene djece te se pokazalo da je manja prisutnost roda *Bifidobacterium*, a veća prisutnost skupine *Staphylococcus* u mlijeku pretilih majki (Collado i sur., 2012). Također, žene koje su koristile antibiotike tijekom trudnoće ili dojenja imaju manju koncentraciju bifidobakterija i laktobacila. Žene koje rode prijevremeno imaju manje bifidobakterija u mlijeku nego žene koje rode djecu u terminu. Kemoterapija je također povezana s promjenom mikroflora u majčinom mlijeku i smanjuje prisutnost vrsta iz roda *Acinetobacter* i porodice *Xanthomonadaceae* te vrsta iz rodova *Bifidobacterium* i *Eubacterium*. Smanjena koncentracija bifidobakterija u mlijeku prisutna je i kod žena koje boluju od celijakije (McGuire, M. K. i McGuire, M. A, 2015). Uspoređivanjem majčinog mlijeka žena koje su zdrave i onih koje imaju alergiju ustanovljeno je da majke s alergijom imaju manju koncentraciju bifidobakterija u mlijeku od zdravih majki (Grönlund i sur., 2007).

#### 2.1.4. Kolonizacija bifidobakterijama

Za kolonizaciju bakterijama u crijevima djece potreban je prijenos bakterija s majke na dijete. U početku vjerovalo se da sve bakterije koje se prenesu na dijete potječu s majčine kože, djetetove usne šupljine ili iz rodnice tijekom rađanja, ali ustanovljeno je da postoje i drugi izvori bakterija kod djece kao što je majčino mlijeko. Daljnjim istraživanjem otkriveno je da bakterije majčinog mlijeka imaju više sličnosti s bakterijama probavnog sustava majke, nego s bakterijama na koži i u rodnici majke. Neke bakterije koje su prisutne u crijevima novorođenčeta, kao što su bifidobakterije, su striktni anaerobi i one zbog toga ne mogu ni biti izolirane s majčine kože. Veliki broj istraživanja prijenosa bakterija s majke na dijete odnosi se na endogeni stanični put, odnosno prijenos crijevnih bakterija majke do mliječnih žlijezda i mlijeka te na dijete. Jedan od mogućih puteva je pomoću dendritičnih stanica. Dendritične stanice mogu otvoriti međustanične spojeve između stanica epitela bez narušavanja integriteta epitelne barijere, pokupiti nepatogene bakterije iz lumena crijeva i izaći izvan epitela. Crijevne dendritične stanice mogu zadržati mali broj živih komenzalnih

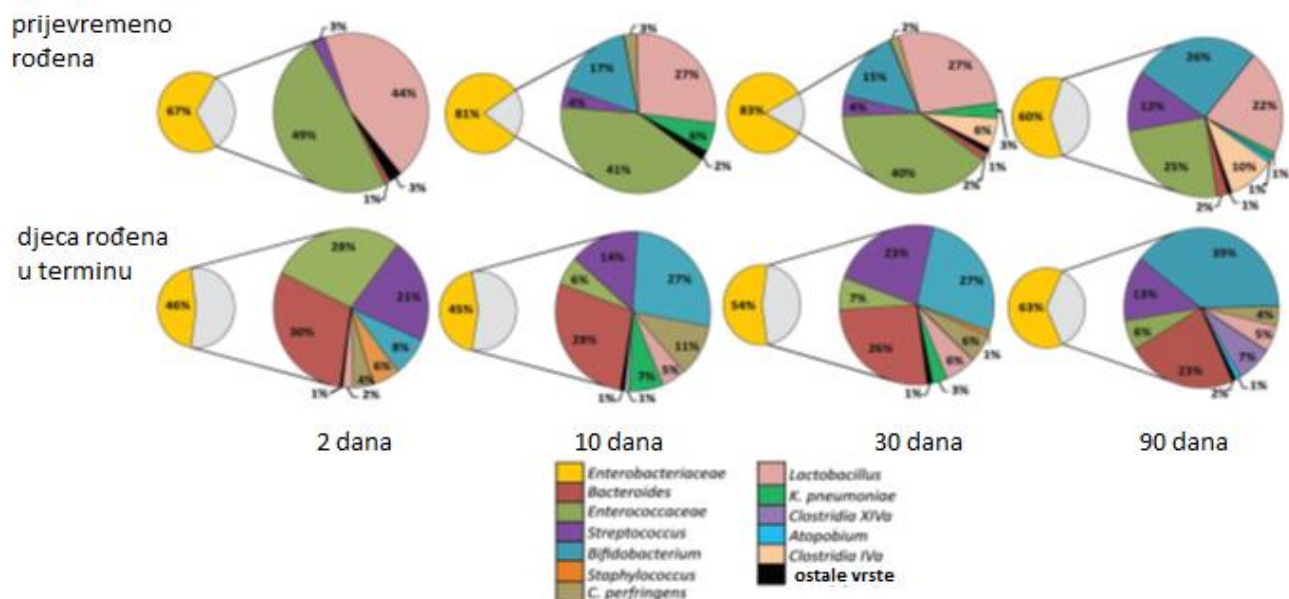
bakterija u limfnim čvorovima mezenterija te cirkulacijom limfocita unutar limfoidnog sustava povezanog sa sluznicom prenose se bakterije kako bi kolonizirale druga područja kao što su mliječne žlijezde. Slična bakterijska DNA sekvenca pronađena je u mlijeku i u majčinim perifernim krvnim mononuklearnim stanicama što bi moglo ukazivati na to da se bakterije iz crijeva majke mogu transportirati u dojke trudnice pomoću mononuklearnih stanica (Bergmann i sur., 2014.; Fernández i sur., 2013).



Slika 4. Potencijalan izvor bakterija iz kolostruma i mlijeka. DC: dendritične stanice (preuzeto iz Fernández i sur., 2012)

Kolonizacija crijeva novorođenčeta ovisi o načinu poroda, načinu prehrane djeteta i o mikroorganizmima prisutnim u okolišu (npr. bolnicama). Za određivanje vrsta i brojnosti bakterija koje su se kolonizirale analizira se izmet novorođenčeta. Prve bakterije koje koloniziraju crijeva novorođenčeta rođenog prirodnim putem većinom su fakultativni anaerobi koji omogućavaju rast striktnih anaeroba koji se obično u prvim tjednima života pojavljuju u većim brojevima. Prve glavne vrste izoliranih fakultativnih anaeroba su iz rodova *Staphylococcus*, *Streptococcus* i porodice Enterobacteriaceae, a prvi striktni anaerobi su iz roda *Bifidobacterium*. Vrste iz roda *Clostridium* također su prisutne, ali ne odmah nakon rođenja i s manjom brojnošću. Još neke vrste koje su prisutne u dječjim crijevima su iz

rodova *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella* i *Fusobacterium*. Način hranjenja također utječe na kolonizaciju bakterijama i pokazano je kako dojena djeca imaju veći broj koloniziranih bakterija. Djecu hranjenu formulom više koloniziraju fakultativni anaerobi, dok kolonizacija s *Bifidobacterium* sp. kasni nekoliko dana. Prve bakterije koje koloniziraju crijeva novorođenčadi rođenih prirodnim putem su majčinog podrijetla i većinom anaerobne, a kod djece rođene carskim rezom nedostaju anaerobne bakterije jer zbog kontakta sa zrakom (bez mogućnosti naseljavanja vaginalne flore) anaerobne bakterije ne mogu preživjeti. Crijeva djece rođenih carskim rezom većinom koloniziraju mikroaerofilni mikroorganizmi, fakultativni anaerobi i sporulativni oblici bakterija kao što su vrste iz roda *Clostridium*. Djeci rođenoj carskim rezom prvi kontakt s bakterijama čine bakterije iz bolnice i s medicinskog osoblja. Te bakterije imaju manju sposobnost koloniziranja u prvih nekoliko dana života (Bezirtzoglou, 1997). U prvih mjesec dana života broj klostridija i laktobacila jednaka je kod djece rođene prirodnim putem i carskim rezom, međutim broj bifidobakterija znatno je veći kod djece rođene prirodnim putem i zbog toga je ukupan broj bakterija veći. Već u šestom mjesecu života te razlike više nisu prisutne (Huurre i sur., 2007). Osim načina rođenja, načina prehrane i majčine mikrobiote moguće je da higijena, klima i dostupnost hrane ima ulogu u kolonizaciji crijeva djece. Grzeškowiak i sur. (2012.) u svojem su istraživanju uspoređivali crijevnu mikofloru šestomjesečne djece u finskom gradu i ruralnom području u Malaviju u Africi. Proučavalo se kako način prehrane majke i dostupnost hrane utječe na crijevnu mikrofloru djece imajući na umu da se u ruralnom području tijekom godine mijenja način prehrane zbog sezonskih promjena hrane što nije slučaj u gradu. Rezultati su pokazali da su broj *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Prevotella* i *C. histolyticum* te ukupan broj bakterija znatno veći u ruralnom području Malavija nego u gradu u Finskoj. Razlika u kolonizaciji crijeva djece iz ruralnih i razvijenih područja može imati posljedicu na razvijanje imuniteta i prisutnost bolesti koje su tipične za područje u kojem djeca odrastaju. Također, postoje razlike u kolonizaciji prijevremeno rođene djece i djece rođene u terminu. Vrste iz porodice Enterobacteriaceae u većoj mjeri čine mikrofloru crijeva prijevremeno rođene djece, a djeca rođena u terminu imaju veću raznolikost mikroflore crijeva i vrste iz rodova *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* i *Streptococcus* najviše su prisutne (Turroni i sur., 2017). Striktni anaerobi, kao što su bifidobakterije, značajno su manje prisutni kod prijevremeno rođene djece iz čega bi se moglo pretpostaviti da prijevremeno rođena djeca imaju unutar crijeva drugačije faktore koji pogoduju takvoj mikroflori i s time drugačiji način obrane od patogena. Prijevremeno rođena djeca imaju veću tendenciju nastanka bolesti crijeva koje se mogu povezati s manjim brojem bifidobakterija čija kolonizacija kasni u odnosu na djecu rođenu u terminu (Arboleja i sur., 2012).



Slika 5. Postotak različitih vrsta bakterija u stolici prijevremenoj i djeci rođenoj u terminu sa 2, 10, 30 i 90 dana života (preuzeto iz Arboleya i sur., 2012).

Terapija antibioticima ima učinak na kolonizaciju crijeva djece. Veći udio enterobakterija i enterokoka, a manji udio bifidobakterija nađe se nakon terapije antibioticima i neke od promjena crijevne mikroflore moguće je vidjeti i mjesec dana nakon uzimanja terapije. Terapija antibioticima rezultira promjenama u razvoju probavne mikroflore i podudara se sa smanjenjem njene taksonomske raznolikosti (Matamoros, 2013).

## 2.2. INTERAKCIJA BIFIDOBAKTERIJA U DJEČJEM PROBAVNOM SUSTAVU

Adhezija bakterija na crijevnu sluznicu potrebna je kako bi bakterije ostvarile većinu svojih zdravstvenih učinaka u domaćinu. Mehanizama adhezije bakterija na crijevnu sluznicu ima više i još se istražuju. Istraživanja pokazuju da su mogući mehanizmi adhezije bakterija na crijevnu sluznicu preko specifičnih interakcija lektina, lipoproteina, adhezijskih molekula, pila ili egzopolisaharida. Sekvencioniranjem genoma bifidobakterija moguće je identificirati i predvidjeti gene koji kodiraju za čimbenike adhezije. Prianjanje *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 na crijevne stanice HT-29 i Caco2 moguće je zbog višestrukih čimbenika

adhezije. Poznato je da glikolitički enzimi posreduju u međusobnoj interakciji između ljudskog plazminogena i *B. bifidum* S16, *B. breve* BBSF, *B. longum* S123 i *B. lactis* BI07 (Sarkar i Mandal, 2016). Oligosaharidi iz ljudskog mlijeka, osim što služe kao supstrat za metabolizam bifidobakterija, imaju ključnu ulogu u adheziji i kolonizaciji bifidobakterijama. Oni povećavaju stopu preživljavanja bifidobakterija u gastrointestinalnom traktu te potiču rast i aktivnost unesenih probiotika iz hrane zajedno s ostalim vrstama koje su prisutne u crijevnoj mikroflori (Sarkar i Mandal, 2016).

Egzopolisaharidi (EPS) su ugljikohidratni polimeri koji su prisutni kao izvanstanični sloj na površini većine Gram-pozitivnih bakterija. Bakterijski EPS može biti faktor virulencije u nekim bolestima, ali može imati i pozitivan učinak na ljudsko zdravlje zbog imunomodulacijskog efekta na domaćinu, kao i poboljšati toleranciju bakterija na nepovoljne uvjete u crijevima odnosno povećati adheziju bakterijskih stanica na crijevni epitel. Može djelovati kao supstrat za rast ostalih bakterija. EPS sintetiziran od Gram-pozitivnih bakterija može se podijeliti u dvije strukturne grupe: homopolisaharidni EPS sastavljen od ponavljajućih monosaharida i heteropolisaharidni EPS sastavljen od ponavljajućih oligosaharida. EPS sintetiziran od bifidobakterija sastavljen je od različitih monosaharida kao što su D-glukoza, D-galaktoza i L-ramnoza te se stoga klasificira kao heteropolisaharid. Nekoliko istraživanja pokazalo je kako EPS modulira imunski odgovor domaćina te utječe na aktivnost i sastav crijevne mikroflore. To je pokazano u istraživanju EPS-a proizvedenog od *B. breve* UCC2003 gdje je EPS pozitivno djelovao na upalne bolesti crijeva i smanjivao apoptotičku signalizaciju u epitelu. Analiza EPS-a proizvedenog od *B. longum* subsp. *longum* 35624 potvrdila je imunomodulacijsku funkciju bifidobakterijske kapsule jer se pokazalo kako EPS-a ovog soja sprječava indukciju snažnog upalnog odgovora usmjerenog ka domaćinu.

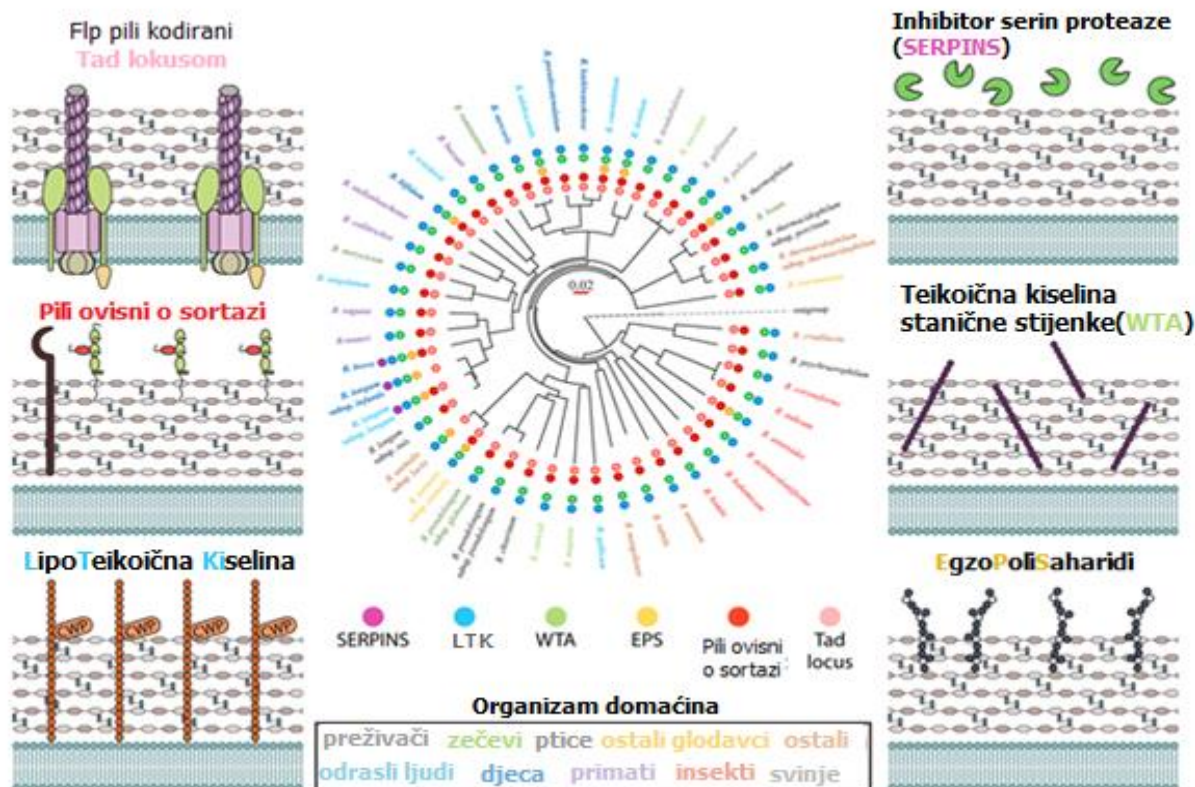
Pili bakterija sudjeluju kako u interakciji bakterije i domaćina prilikom adhezije, tako i u međusobnoj interakciji bakterija što dovodi do njihove agregacije. U raznim vrstama bifidobakterija postoje dva tipa pila, Tad pili (eng. *tight-adherence*, čvrsto prijanjajući) te pili koji ovise o enzimu sortazi. Genski lokus koji kodira za Tad pile u bifidobakterijama izvorno je pronađen u genomu *B. breve* UCC2003. Bifidobakterije imaju jedan *Tad* gen koji je izdvojen od glavnog *Tad* lokusa. Glavni *Tad* lokus identificiran je analizom transkriptoma *B. breve* UCC2003 koja je pokazala da se kolonizacija miša inducira transkripcijom tog genskog klastera, ali se taj klaster gena ne transkribira u laboratorijskim uvjetima. To može značiti da takva izvanstranična struktura može biti proizvedena samo kada je bakterija u prirodnom okruženju. Glavni *Tad* lokus *B. breve* UCC2003 obuhvaća gene koji kodiraju za proteine TadA, TadB, TadC i TadZ koji sudjeluju u sastavljanju i lokalizaciji pilusa, Flp je prepilin koji



se aktivira u pilin koji izgrađuje same pile, te TadE i TadF koji su tzv. pseudopilini. Flp prepilin (eng. *fimbrial low-molecular weight protein*, fimbrijski protein male molekulske mase) prevodi se u pilin koji izgrađuje fimbrije, pile koji sudjeluju u adheziji bakterija. Značajka karakteristična za Flp prepilin je prisutnost N-terminalnog konzerviranog „Flp-motiva“. Flp prepilini cijepaju se prepilin peptidazom TadV (Angelov i sur., 2015) kodiranom genom na ranije spomenutom izdvojenom lokusu. *Tad* lokus je konzerviran u bifidobakterija što podržava hipotezu da takve strukture posreduju pri kolonizaciji bifidobakterija u crijevima ljudi. Sortaza-ovisni pili imaju strukturu koja pomaže adheziju bifidobakterija na ljudske enterocite preko proteina vanstaničnog matriksa i interakciju s imunskim sustavom ljudi osiguravajući tako lokalni protuupalni odgovor. Bakterije *B. bifidum* PRL2010 s pilima stupaju u međusobne interakcije te dolazi do agregacije na mjestu adhezije, čime se potpomaže kolonizacija bifidobakterijama na crijevnoj sluznici. Interakcija s imunskim sustavom ljudi može biti ključna u prvim stadijima života djeteta, štoviše imunski sustav prerano rođene djece je nezreo i prisutnost podražaja koje vrše bifidobakterijski pili može biti presudna u razvoju imunskog memorije. Smanjena izloženost antigenima ima negativan utjecaj na imunski sustav koji je još u razvoju i zbog toga može doći do atopijskih poremećaja.

Još jedan protein koji ima ulogu u interakciji bifidobakterija i domaćina je inhibitor serin proteaze (serpin) koji djeluje kao inhibitor ljudske neutrofilne i gušterične elastaze. U vrstama *B. breve*, *B. longum* i *B. dentium* prisutni su geni koji kodiraju za serpin. Transkripcija gena za serpin povećava se kada su kulture *B. breve* izložene proteazama iz domaćina kao što su gušterične ili neutrofilne elastaze, a takvih se proteaza nađe u ljudskim crijevima. Prisutnost inhibitora proteaza može osigurati prednost bifidobakterijama jer ih aktivnost serpina štiti od proteaza domaćina.

Bifidobakterije sintetiziraju i kvorum signalnu molekulu AI-2, sintezu koje modulira enzim LuxS, dio metilacijskog sustava u citoplazmi bakterije, uključen u recikliranje S-adenozilhomocisteina. LuxS molekularno je karakteriziran u *B. breve* UCC2003. Usporedbom *B. breve* UCC2003 mutirane za LuxS s divljim tipom pokazano je kako mutant ne može kolonizirati gastrointestinalni trakt miša i pruža manju zaštitu od zaraze bakterijama iz roda *Salmonella* (Milani i sur., 2017.; Bottacini i sur., 2017).



Slika 6. Izvanstanične strukture identificirane u članova roda *Bifidobacterium*. Bifidobakterijsko filogenetsko stablo temelji se na sekvencama DNA očuvanih u svakoj bifidobakterijskoj (pod)vrsti. Točke u boji pokazuju prisutnost različitih izvanstaničnih struktura prisutnih u vrsta roda *Bifidobacterium*. Organizam domaćin svake bifidobakterijske (pod)vrste prikazan je različitom bojom naziva bakterijske vrste (preuzeto iz Milani i sur., 2017).

## 2.3. BIFIDOBakterIJE U TRETManU I PREVENCIJI DJEČJIH BOLESTI

### 2.3.1. Akutna dijareja

Infektivna dijareja je svjetski zdravstveni problem, pogotovo u zemljama u razvoju gdje je dijareja jedan od glavnih uzroka smrti novorođenčadi i djece. U razvijenim zemljama bolnički stečena dijareja može produžiti boravak u bolnici (Saavedra, 2000). U većini slučajeva kod djece do pojave dijareje dolazi zbog zaraznog gastroenteritisa i većinom se definira kao smanjenje konzistencije stolice i učestala evakuacija (Floch, 2018). Česti uzročnici dječjeg gastroenteritisa su virusi i bakterije, ali raširene su i parazitske infekcije. U ranim mjesecima života većinom su prisutne bakterijske infekcije, dok u dobi od 6 mjeseci do 2 godine uzročnici su većinom rotavirusi, adenovirusi i norovirusi. Dijareja izazvana

rotavirusom ili bakterijom nema istu kliničku sliku, infekcije rotavirusom češće su, teže i s većim komplikacijama (Wiegering i sur., 2011). Bakterije kao što su *Salmonella* spp. i *E. coli* ili paraziti kao što su *Cryptosporidium* spp. identificirani su kao važni uzročnici dijareje u ljudi. *E. coli* inače je prisutna u probavnom traktu kao dio kolonizirane mikrobiote, ali postaje patogena stjecanjem genskih odrednica koje mogu povećavati adhezivnost i toksičnost, te tako postaje jedna od najvećih uzročnika dječje dijareje u razvijenim zemljama. Danas je prihvaćeno korištenje različitih probiotičkih vrsta u opravljaju od dijareje te se provode razna istraživanja koja uključuju razne vrste bifidobakterija i laktobacila. Najviše korištene vrste su *B. animalis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus rhamnosus* LGG i *Lactobacillus reuteri*. U istraživanjima probiotici su se davali kao dodatak prehrani na početku pojave bolesti pri čemu je najčešći efekt bio smanjenje trajanja dijareje. Rezultati istraživanja koje su proveli Vandenplas i De Hert (2011.) pokazali su da su djeca koja su dobivala probiotike *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium infantis* i *Bifidobacterium lactis* kao dodatak prehrani ranije normalizirala stolicu, odnosno kraće su trajali simptomi dijareje. Liječnici su nakon 4 dana bili zadovoljniji s napretkom liječenja djece tretirane s probioticima nego s napretkom liječenja kod djece koja nisu dobivala probiotike. U istraživanju liječenja dijareje uzrokovane rotavirusom korišten je soj *B. longum* susp. *infantis* CECT 7210 koji je pokazao izravni učinak *in vitro* na rotavirusnu infekciju epitelnih stanica crijeva, a u *in vivo* ispitivanjima na pokusnim životinjama pokazao je antivirusne učinke i tendenciju poboljšanja stanja (Muñoz i sur., 2011). Također učinjena su i klinička istraživanja s djecom hospitaliziranom zbog akutne dijareje izazvane rotavirusom. Za ta istraživanja korišteni su sojevi vrsta *B. longum* i *B. animalis* u kombinaciji s drugim probiotičkim sojevima te su rezultati pokazali smanjeno trajanje i manju težinu dijareje (Grandy i sur., 2010; Vandenplas i De Hert, 2011). Bifidobakterije kao suplementi daju se djeci koja su na bolničkom liječenju kako bi se spriječio nastanak bolničkih dijareja i gastrointestinalnih bolesti, a kao primjer *B. breve* soj Yakult dokazao se koristan kod djece koja se liječe kemoterapijom te im je imunostanovni sustav slab. Djeca u istraživanju bolovala su od infektivnih komplikacija tijekom primanja kemoterapije te se korištenjem probiotika smanjila upotreba antibiotika u liječenju infektivnih bolesti uz porast brojnosti anaerobne mikroflore crijeva (Wada i sur., 2010; Di Gioia i sur., 2013). Nekoliko sojeva bifidobakterija izoliranih iz stolice dojenčadi, a najčešće sojevi vrste *B. breve*, potencijali su kandidati za prevenciju ili liječenje bakterijske dijareje jer su uspjeli smanjiti rast patogenih bakterija koje to stanje izazivaju kod djece (Aloisio i sur., 2012).

### 2.3.2. Nekrotizirajući enterokolitis

Nekrotizirajući enterokolitis drugi je najčešći uzrok smrti prerano rođene djece i zahtjeva intenzivnu njegu kroz duže vrijeme. Simptomi bakterijske infekcije koja rezultira tom bolešću javljaju se unutar dva do tri dana po infekciji i uključuju oticanje trbuha, netoleranciju na hranu i pojavu krvi u stolici. Ako se bolest ne liječi, nakon 12 do 36 sati moguća je i pojava respiratornih bolesti, acidoze, sistemskog šoka, a u težim slučajevima čak i intravaskularne koagulacije krvi. Važno je pratiti svako prijevremeno rođeno dijete koje ima rizik od razvoja ove bolesti u prvim tjednima života i početi s agresivnom terapijom ako se pojave bilo koje indikacije vezane za ovu bolest. Za liječenje djece najvažnije je rano otkrivanje bolesti i agresivna terapija te stalni nadzor. U početku, svakih 4 do 6 sati, potrebni su pregledi i radiološka analiza abdomena te sveukupna procjena stanja djeteta. Krvna slika, acido-bazna ravnoteža i stanje elektrolita moraju se kontrolirati i korigirati ako je potrebno. Stabilno stanje moguće je očekivati unutar 24 do 48 sati po početku liječenja, nakon čega kontrole ne moraju biti toliko česte kao u početku. Ako nema poboljšanja u stanju bolesti potrebna je procjena pri kojoj se utvrđuje mogućnost operacije, s obzirom da se većinom radi o prerano rođenoj djeci za koju je opća anestezija riskantna. Razvojem medicine povećala se i stopa preživljenja te su moguće preventivne mjere poput korištenja probiotika (Panigrahi, 2006). Kao što je prethodno spomenuto, kolonizacija bakterijama prijevremeno rođene djece i djece rođene u terminu nije jednaka. Kod prijevremeno rođene djece enterobakterije i enterokoki dominantni su u prvih 20 dana života i potencijalno su patogeni, a anaerobne bakterije se razvijaju 8 do 9 dana nakon rođenja, kada se i javljaju prvi simptomi bolesti. Zbog tih činjenica postoji velika vjerojatnost da korištenje probiotika u obogaćivanju mikroflore crijeva djece može biti prevencija razvoju bolesti. Neka istraživanja pokazala su kako veću učestalost pojave ove bolesti imaju djeca hranjena formulom u usporedbi s dojenom djecom, zbog manjka čimbenika pasivnog imuniteta kao što je IgA i učinka bifidobakterija koje se nalaze u majčinom mlijeku te pomažu sazrijevanju crijeva i štite od razvoja bolesti. Mnoga istraživanja dokazala su ulogu probiotika u prevenciji i smanjenju pojavnosti ove bolesti. Neki od rezultata tih istraživanja ukazuju kako uporaba *B. breve* na novorođenčadi manje porođajne težine smanjuje proizvodnju maslačne kiseline, što može biti dobro za prevenciju nastajanja nekrotizirajućeg enterokolitisa (Di Gioia, 2013). U istraživanju koje je proveo Hoyos (1999.) korištene su probiotičke kulture *B. infantis* i *L. acidophilus* kod prijevremeno rođene djece koja su ili već bila na bolničkom liječenju, ili su na bolničko liječenje naknadno prebačena, pri čemu kontrolna grupa nije primala probiotičke kulture. Samo je jedna trećina prethodno hospitalizirane djece koja je primala probiotičku

kulturu oboljela od nekrotizirajućeg enterokolitisa u odnosu na kontrolnu grupu, dok je kod djece naknadno prebačene na bolničko liječenje upola manje djece oboljelo od nekrotizirajućeg enterokolitisa. Smrtnost je smanjena u obje grupe koje su primale probiotičke kulture i nisu uočene komplikacije vezane za uzimanje samih kultura. Samo dojenje neće eliminirati pojavu nekrotizirajućeg enterokolitisa zbog nedostatka interleukina 10, ali oralno uzimanje probiotika koji sadrže *B. bifidum* i *L. acidophilus* smanjuje učestalost razvoja i smrtnost od nekrotizirajućeg enterokolitisa kod prerano rođene djece s jako malom porođajnom težinom. Uzimanjem tih probiotika smanjuje se i ozbiljnost nekrotizirajućeg enterokolitisa ukoliko i dođe do pojave te bolesti (Lin i sur., 2008).

### 2.3.3. Dječji kolik

Kolik je široko rasprostranjeno kliničko stanje simptomi kojeg su neutješno plakanje, nervoza i razdražljivost u inače zdravom novorođenom djetetu tijekom prva tri mjeseca života. Djeca koja imaju kolik pretjerano i uporno plaču, najčešće po noći, a stanje je više izraženo u šestom tjednu života. Dijete zbog kolika privlači noge tijelu, napreže tijelo, zacrveni mu se lice i trbuh mu se izboči. Dijagnoza je klinička, ali se pri određivanju u obzir uzima i da dijete ima neobjašnjene epizode karakterističnog plača više od 3 sata po danu, 3 dana u tjednu i tijekom najmanje 3 tjedna. Stanje se može okarakterizirati kao blago, srednje jako ili ozbiljno, ali nema opće suglasnosti oko podjele. Dijete plakanjem pokazuje postojanje problema, a uzrok može biti različit: od benignih stvari do čak po život opasnih problema, te je zbog toga potrebno obaviti liječnički pregled kako bi se ustanovilo ima li ozbiljnijih problema koje treba tretirati. Hospitalizacija djeteta s kolikom najčešće nije potrebna jer se simptomi do trećeg mjeseca života najčešće ublaže. Tijekom godina provedena su mnoga istraživanja o uzrocima kolika. Koncept nenormalne mikroflore crijeva u dojenčadi predstavljen je kao uzrok pojave ovog kliničkog stanja i sugerira da mikroflora utječe na motoričku funkciju crijeva što izaziva upalno stanje (Savino i Tarasco, 2010). Istraživanje koje su proveli Pärty i sur. (2012.) pokazalo je da se od sedmog tjedna života do pola godine života smanjuje vrijeme ukupnog plakanja djece. Koncentracija bifidobakterija je obrnuto proporcionalna vremenu pojavnosti plakanja pa je u šestom mjesecu života primijećeno najmanje plakanja djece, a u stolici je identificiran najveći broj bifidobakterija. Bifidobakterije smatraju se glavnim biološkim biljegom zdrave crijevne mikroflore dojene djece i prema podacima iz ovog istraživanja mali broj bifidobakterija i laktobacila pokazao se kao rizični faktor za pojavu dječjeg plača i nervoze. *Bifidobacterium longum* potencijalno je bitna jer je se nalazi u najvećem broju, a brojnost joj vremenom

raste, dok se pojavnost plača kod djeteta smanjuje. S druge strane *Bifidobacterium breve* implicira najveći rizik za pojavu dječje nervoze jer je jedino ta vrsta bifidobakterija pokazivala porast brojnosti u vremenu kada je dijete pokazivalo najveće stanje nervoze i plača, a pad brojnosti kada se dijete smirivalo. U ovom istraživanju gledao se plač kao općenito stanje nervoze djece tj. nije bio fokusiran samo na plač djece zbog kolika, a stolica djece analizirala se pomoću PCR, FISH i PCR-DGGE metoda koje su preciznije od metoda temeljenih na uzgoju u kulturi.

#### 2.3.4. Alergije

U zadnjem desetljeću povećana je pojavnost alergija na hranu, atopijskog dermatitisa i astme u razvijenim zemljama, a postaje i velikim zdravstvenim problemom širom svijeta. Atopija je genski uvjetovana sklonost razvoju reakcije imunosti preosjetljivosti na uobičajene tvari iz okoliša (Hrvatska enciklopedija, 2020). Jedna od hipoteza zašto je tome tako uključuje relativni nedostatak imunostimulacije i imunoregulacije zbog niske izloženosti dječjeg imunostnog sustava crijeva bezopasnim mikroorganizmima prisutnima u okolišu. Alergijske bolesti karakterizira pomak ravnoteže Th1/Th2 odgovora zbog prekomjernog javljanja Th2 odgovora, a uz to alergični bolesnici obično pokazuju smanjeni broj T regulatornih stanica. Kao novi način za prevenciju navedenih poremećaja počinju se istraživati probiotičke bifidobakterije. U zadnjih nekoliko godina pokušava se otkriti utjecaj mikroflore na alergijske procese i vjeruje se da bi utjecaj mogao biti posredovan preko interakcija mikroorganizama s imunostnim sustavom sluznica. Mikroflora djece s atopijskim bolestima pokazuje više razine klostridija, a niže razine bifidobakterija, dok je kod crijevne mikroflore zdrave djece stanje obrnuto, što moguće korelira sa zaštitom djece od atopije. Osim manjeg broja bifidobakterija, novorođenčad koja pati od atopijskih bolesti ima i vrste bifidobakterija sličnije onima prisutnima kod odraslih kao što je *B. adolescentis*. Također, vrste bifidobakterija kod djece s alergijama imaju smanjenu mogućnost adhezije na ljudsku crijevnu sluznicu zbog čega su moguće promjene u interakciji domaćina i mikroflore u prvih nekoliko mjeseci života. Neka su istraživanja pokazala da kod djece koja razviju alergiju postoji veća vjerojatnost rane kolonizacije crijeva s patogenima nego kod zdrave djece. Provedena su istraživanja na ljudima gdje su kao tretmane za alergiju koristili probiotike (Hidalgo-Cantabrana i sur., 2017.; Di Gioia i sur., 2013). Tretiranjem alergije kod djece s probiotičkim kulturama *Lactobacillus rhamnosus* i *Bifidobacterium lactis* kroz period od 12 tjedana smanjila se ozbiljnost atopijskog dermatitisa kod djece alergične na hranu, ali

tretman nije imao utjecaja na djecu preosjetljivu na okolišne alergene (Sistek i sur., 2006). Gerasimov i sur., (2010) proveli su istraživanje na predškolskoj djeci alergičnoj samo na kravlje mlijeko i jaja, a za tretman jednoj su grupi djece dane probiotičke kulture *L. acidophilus* DDS-1, *B. lactis* UABLA12 i frukto-oligosaharidi. Kod grupe s atopijskim dermatitisom tretirane s probiotičkim kulturama rezultati su pokazali značajno kliničko poboljšanje i smanjilo se korištenje kortikosteroida u periodu od 8 tjedana, koliko je i trajalo istraživanje. Primjena *B. bifidum* u kombinaciji s drugim bakterijama mliječne kiseline u liječenju atopijskog dermatitisa kod djece pokazala je dobre rezultate u reduciranju tegoba, a primjena soja *B. breve* M-16V u kombinaciji sa smjesom prebiotika također daje zadovoljavajuće rezultate. Tijekom trudnoće i dojenja primjena *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 i *L. rhamnosus* GG rezultirala je smanjenjem senzibilnosti dojenčadi kod majki s atopijama, a uz to primjenom soja *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 u pred- ili postnatalnom razdoblju smanjila se učestalost ekcema u slučajevima atopijskog dermatitisa. Soj *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 također pokazuje učinak na smanjenje učestalosti atopijskog ekcema primjenom u pred- ili postnatalnom razdoblju. Sva istraživanja upotrebe probiotika u prevenciji nastanka alergija nisu bila uspješna. Svjetska zdravstvena organizacija u osvrću koji je dala za korištenje probiotika u prevenciji alergija stoga navodi kako nema značajnih dokaza koji podupiru činjenicu da tretman probioticima smanjuje rizik od pojave alergije kod djece. Međutim, u slučaju kada djeca imaju predispoziciju za nastanak alergije zbog obiteljske povijesti bolesti, preporučuje se uporaba probiotika kod trudnica, dojilja i te djece (Hidalgo-Cantabrana i sur., 2017).

### 3. ZAKLJUČAK

Dominacija bifidobakterija u crijevima novorođenčadi potaknula je znanstvenike na istraživanje mogućnosti tih bakterija te su otkrivene poveznice između njih i imunskog sustava. Bifidobakterije utječu na mikrofloru gastrointestinalnog trakta i time sprječavaju kolonizaciju crijevne sluznice novorođenčadi patogenim mikroorganizmima. Smanjeni broj bifidobakterija u majčinom mlijeku izravno utječe i na smanjeni broj bifidobakterija u crijevima djece što može potencijalno utjecati na pojavu gastrointestinalnih bolesti. Zdravlje majke, mjesto, vrijeme i način rođenja te način hranjenja utječu na kolonizaciju bifidobakterijama i pokazalo se da njihov smanjeni broj u probavnom sustavu djece može dovesti do pojave određenih problema kao što su alergije, dijareja, dječji kolik ili nekrotizirajući enterokolitis. Dojena djeca imaju viši broj bifidobakterija od djece hranjene formulom pa se dodatno istražuju načini poboljšanja i obogaćivanja formula oligosaharidima kako bi se izjednačila razlika u brojnosti bakterija. Mehanizmi prijenosa bifidobakterija s majke na dijete, kao i interakcije bifidobakterija u probavnom sustavu, još nisu dovoljno istražene i temelje se na pretpostavkama. To ostavlja dovoljno mjesta za otkrivanje potencijalnih prednosti kolonizacije bifidobakterijama u dječjem probavnom sustavu.



#### 4. POPIS LITERATURE

Abbas A.K., Lichtman A.H., Pilai S., (2018). Stanična i molekularna imunologija, 8.izd., Medicinska naklada, str. 1-2

Aloisio I., Santini C., Biavati B., Dinelli G., Cencič A., Chingwaru W., Mogna L., Di Gioia D. (2012). Characterization of Bifidobacterium spp. strains for the treatment of enteric disorders in newborns. *Applied Microbiology and Biotechnology* **96**(6): 1561–1576.

Andreas N. J., Kampmann B., Mehring Le-Doare K. (2015). Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development* **91**(11): 629–635.

Angelov A., Bergen P., Nadler F., Hornburg P., Lichev A., Übelacker M., Pachl F., Kuster B., Liebl W. (2015). Novel Flp pilus biogenesis-dependent natural transformation. *Frontiers in Microbiology* **6**(84).

Arboleya S., Solís G., Fernández N., de los Reyes-Gavilán C. G., Gueimonde M. (2012). Facultative to strict anaerobes ratio in the preterm infant microbiota. *Gut Microbes* **3**(6): 583–588.

Arboleya S., Watkins C., Stanton C., & Ross, R. P. (2016). Gut Bifidobacteria Populations in Human Health and Aging. *Frontiers in Microbiology* **7**.

Ballard O., Morrow A. L. (2013). Human Milk Composition. *Pediatric Clinics of North America* **60**(1): 49–74.

Bergmann H., Rodríguez J. M., Salminen S., Szajewska H. (2014). Probiotics in human milk and probiotic supplementation in infant nutrition: a workshop report. *British Journal of Nutrition* **112**(7): 1119–1128.

Bezirtzoglou E. (1997). The Intestinal Microflora During the First Weeks of Life. *Anaerobe* **3**(2-3): 173–177.

Bottacini F., van Sinderen D., Ventura M. (2017). Omics of bifidobacteria: research and insights into their health-promoting activities. *Biochemical Journal* **474**(24): 4137–4152.

Cheikhoussef A., Pogori N., Chen W., Zhang H. (2008). Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: From production to their application. *International Journal of Food Microbiology* **125**(3): 215–222.

- Collado M. C., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E. (2012). Maternal weight and excessive weight gain during pregnancy modify the immunomodulatory potential of breast milk. *Pediatric Research* **72**(1): 77-85
- Di Gioia D., Aloisio I., Mazzola G., Biavati B. (2013). Bifidobacteria: their impact on gut microbiota composition and their applications as probiotics in infants. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**(2): 563–577.
- Fernández L., Langa S., Martín V., Maldonado A., Jiménez E., Martín R., Rodríguez J. M. (2013). The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research* **69**(1): 1–10.
- Floch M. H. (2018). The Role of Prebiotics and Probiotics in Gastrointestinal Disease. *Gastroenterology Clinics of North America* **47**(1): 179–191.
- Gerasimov S. V., Vasjuta V. V., Myhovych O. O., Bondarchuk L. I. (2010). Probiotic Supplement Reduces Atopic Dermatitis in Preschool Children. *American Journal of Clinical Dermatology* **11**(5): 351–361.
- Ghoddusi H. B., Tamime A. Y. (2014). MICROFLORA OF THE INTESTINE | Biology of Bifidobacteria. U: Encyclopedia of Food Microbiology, 2.izd., Batt C. A., Tortorello M. L., ur., Elsevier Ltd., Academic Press, str. 639–645.
- Grandy G., Medina M., Soria R., Terán C. G., Araya M. (2010). Probiotics in the treatment of acute rotavirus diarrhoea. A randomized, double-blind, controlled trial using two different probiotic preparations in Bolivian children. *BMC Infectious Diseases* **10**.
- Grönlund M.-M., Gueimonde M., Laitinen K., Kociubinski G., Grönroos T., Salminen S., Isolauri E. (2007). Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the Bifidobacterium microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clinical & Experimental Allergy* **37**(12): 1764–1772.
- Grześkowiak Ł., Collado M. C., Mangani C., Maleta K., Laitinen K., Ashorn P., Isolauri E., Salminen S. (2012). Distinct Gut Microbiota in Southeastern African and Northern European Infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **54**(6): 812–816.
- Gueimonde M., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E. (2007). Breast Milk: A Source of Bifidobacteria for Infant Gut Development and Maturation? *Neonatology* **92**(1): 64–66.

Hidalgo-Cantabrana C., Delgado S., Ruiz L., Ruas-Madiedo P., Sánchez B., Margolles A. (2017). Bifidobacteria and Their Health-Promoting Effects. *Microbiology Spectrum* **5**(3).

Hoyos A. B. (1999). Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* to neonates in an intensive care unit. *International Journal of Infectious Diseases* **3**(4): 197–202.

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2020. <<https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=5395>>Pristupljeno 25.8.2020.

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2020. <<https://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=4500>> Pristupljeno 8. 9. 2020.

Huurre A., Kalliomäki M., Rautava S., Rinne M., Salminen S., Isolauri E. (2007). Mode of Delivery – Effects on Gut Microbiota and Humoral Immunity. *Neonatology* **93**(4): 236–240.

Lin H.-C., Hsu C.-H., Chen H.-L., Chung M.-Y., Hsu J.-F., Lien R.-i., Tsao L.-Y., Chen C.-H., Su B.-H. (2008). Oral Probiotics Prevent Necrotizing Enterocolitis in Very Low Birth Weight Preterm Infants: A Multicenter, Randomized, Controlled Trial. *Pediatrics* **122**(4): 693–700.

Martin R., Jimenez E., Heilig H., Fernandez L., Marin M. L., Zoetendal E. G., Rodriguez J. M. (2008). Isolation of Bifidobacteria from Breast Milk and Assessment of the Bifidobacterial Population by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Quantitative Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **75**(4): 965–969

Matamoros S., Gras-Leguen C., Le Vacon F., Potel G., de La Cochetiere M.-F. (2013). Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends in Microbiology* **21**(4): 167–173.

McGuire M. K., McGuire M. A. (2015). Human Milk: Mother Nature's Prototypical Probiotic Food? *Advances in Nutrition* **6**(1): 112–123.

Milani C., Duranti S., Bottacini F., Casey E., Turrone F., Mahony J., Belzer C., Delgado Palacio S., Arboleya Montes S., Mancabelli L., Lugli G. A., Rodriguez J. M., Bode L., Vos W., Gueimonde M., Margolles A., Sinderen D., Ventura M. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **81**(4).

- Milani C., Turrone F., Duranti S., Lugli G. A., Mancabelli L., Ferrario C., van Sinderen D., Ventura M. (2015). Genomics of the Genus *Bifidobacterium* Reveals Species-Specific Adaptation to the Glycan-Rich Gut Environment. *Applied and Environmental Microbiology* **82**(4): 980–991.
- Moreno Muñoz J. A., Chenoll E., Casinos B., Bataller E., Ramón D., Genovés S., Montava R., Ribes J. M., Buesa J., Fàbrega J., Rivero M. (2011). Novel Probiotic *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 Strain Active against Rotavirus Infections. *Applied and Environmental Microbiology* **77**(24): 8775–8783.
- Palmeira P., Carneiro-Sampaio M. (2016). Immunology of breast milk. *Revista Da Associação Médica Brasileira* **62**(6): 584–593
- Panigrahi P. (2006). Necrotizing Enterocolitis. *Pediatric Drugs* **8**(3): 151–165.
- Pärty A., Kalliomäki M., Endo A., Salminen S., Isolauri E. (2012). Compositional Development of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* Microbiota Is Linked with Crying and Fussing in Early Infancy. *PLoS ONE* **7**(3).
- Picard C., Fioranonti J., Francois A., Robinson T., Neant F. Mathuchansky C. (2005). Review article: bifidobacteria as probiotic agents - physiological effects and clinical benefits. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **22**(6): 495–512.
- Roy D. (2011). Probiotics. U: *Comprehensive Biotechnology*, 2.izd., Moo-Young M., ur., Pergamon, Pergamon, str. 591–602.
- Saavedra J. (2000). Probiotics and infectious diarrhea. *The American Journal of Gastroenterology* **95**(1): S16–S18.
- Sanz Y. (2016). Bifidobacteria in Foods: Health Effects. U: *Encyclopedia of Food and Health*, Caballero B., Finglas P. M., Toldrà F., ur., Elsevier Ltd., Academic Press, str. 388–394.
- Sarkar A., Mandal S. (2016). Bifidobacteria—Insight into clinical outcomes and mechanisms of its probiotic action. *Microbiological Research* **192**: 159–171.
- Savino F., Tarasco V. (2010). New treatments for infant colic. *Current Opinion in Pediatrics* **22**(6): 791–797.

Sistek D., Kelly R., Wickens K., Stanley T., Fitzharris P., Crane J. (2006). Is the effect of probiotics on atopic dermatitis confined to food sensitized children? *Clinical Experimental Allergy* **36**(5): 629–633.

Turroni F., Peano C., Pass D. A., Foroni E., Severgnini M., Claesson M. J., Kerr C., Hourihane J., Murray D., Fuligni F., Gueimonde M., Margolles A., De Bellis G., O'Toole P. W., van Sinderen D., Marchesi J. R., Ventura M (2017). Bifidobacteria and the infant gut: an example of co-evolution and natural selection. *Cellular and Molecular Life Sciences* **75**(1): 103–118.

Vandenplas Y., De Hert S. G. (2011). Randomised clinical trial: the synbiotic food supplement Probiotal vs. placebo for acute gastroenteritis in children. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **34**(8): 862–867.

Wiegering V., Kaiser J., Tappe D., Weißbrich B., Morbach H., Girschick H. J. (2011). Gastroenteritis in childhood: a retrospective study of 650 hospitalized pediatric patients. *International Journal of Infectious Diseases* **15**(6).

## Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

*Ana Marija Prskalo*

---

Ana Marija Prskalo