

# Usporedba sastava salivarne i crijevne mikrobiote u bolesnika s kroničnom spontanom urtikarijom i u zdravnih ispitanika

---

Ćesić, Diana

Doctoral thesis / Disertacija

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:127:922979>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

[University of Zagreb School of Dental Medicine Repository](#)





Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Diana Ćesić

**USPOREDBA SASTAVA SALIVARNE I  
CRIJEVNE MIKROBIOTE U BOLESNIKA S  
KRONIČNOM SPONTANOM URTIKARIJOM  
I U ZDRAVIH ISPITANIKA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Diana Česić

**USPOREDBA SASTAVA SALIVARNE I  
CRIJEVNE MIKROBIOTE U BOLESNIKA S  
KRONIČNOM SPONTANOM URTIKARIJOM  
I U ZDRAVIH ISPITANIKA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Prof. dr. sc. Liborija Lugović Mihić

Prof. dr.sc. Arjana Tambić Andrašević

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

School of Dental Medicine

Diana Ćesić

**COMPARISON OF SALIVARY AND GUT  
MICROBIOTA COMPOSITION BETWEEN  
PATIENTS WITH CHRONIC  
SPONTANEOUS URTICARIA AND  
HEALTHY INDIVIDUALS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Professor Liborija Lugović Mihić, PhD

Professor Arjana Tambić Andrašević, PhD

Zagreb, 2024.

Istraživanje je provedeno na Klinici za kožne i spolne bolesti Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice, Institutu Ruđer Bošković te Hrvatskom veterinarskom institutu.

**Lektor hrvatskog jezika:** Jasenka Nakić, magistra edukacije hrvatskog jezika i književnosti

**Lektor engleskog jezika:** Ana Bilandžić, magistra edukacije engleskog i njemačkog jezika i književnosti

**Sastav Povjerenstva za ocjenu doktorskog rada:**

1. akademkinja Mirna Šitum, predsjednica
2. doc. dr. sc. Tomislava Skuhala, član
3. izv. prof. dr. sc. Zrinka Bošnjak, član

**Sastav Povjerenstva za obranu doktorskog rada:**

1. akademkinja Mirna Šitum, predsjednica
2. doc. dr. sc. Tomislava Skuhala, član
3. izv. prof. dr. sc. Zrinka Bošnjak, član
4. izv. prof. dr. sc. Marija Buljan, zamjena

**Datum obrane rada:** 13. svibnja 2024.

Rad sadrži:

- 110 stranica
- 5 tablica
- 28 slika
- CD

Rad je vlastito autorsko djelo, koje je u potpunosti samostalno napisano uz naznaku izvora drugih autora i dokumenata korištenih u radu. Osim ako nije drukčije navedeno, sve ilustracije (tablice, slike i dr.) u radu su izvorni doprinos autora poslijediplomskog doktorskog rada. Autor je odgovoran za pribavljanje dopuštenja za korištenje ilustracija koje nisu njegov izvorni doprinos, kao i za sve eventualne posljedice koje mogu nastati zbog nedopuštenog preuzimanja ilustracija odnosno propusta u navođenju njihovog podrijetla.

*Mojoj Obitelji*

## ZAHVALA

*Od srca zahvaljujem svojim mentoricama.*

*Hvala prof. dr. sc. Liboriji Lugović Mihić na motivaciji, angažmanu, nesebičnom prenošenju znanja i prijateljskoj podršci svih ovih godina.*

*Zahvaljujem prof. dr.sc Arjani Tambić Andrašević na uključivanju u znanstvene projekte, na stručnom vodstvu i savjetima tijekom provođenja ovog istraživanja.*

*Osobitu zahvalnost dugujem doc. dr. sc. Petru Ozretiću s Instituta Ruđer Bošković na nesebičnoj pomoći, konstruktivnim i praktičnim savjetima i idejama koje su doprinijele ovom istraživanju.*

*Zahvaljujem doc. dr.sc. Ivani Lojkić s Hrvatskog veterinarskog instituta te Nikolini Mandušić s Klinike za kožne i spolne bolesti za sav trud i vrijednu pomoć tijekom istraživačke faze.*

*Hvala mom bratu, mami i tati, na bezuvjetnoj ljubavi, požrtvornosti i usađenim vrijednostima. Vaša neumorna podrška, od malih nogu, bila je moj najveći oslonac.*

*Hvala mojima Anti i Ani na nesebičnoj pomoći i srčanoj podršci tijekom svih ovih godina.*

*Najveće hvala mom suprugu, bez čije podrške, motivacije, strpljenja i ljubavi ovo ne bi bilo moguće.*

*I na kraju, hvala mojoj djeci, mojoj najvećoj radosti i inspiraciji. Od njih svakodnevno učim, i uz njih, nadam se, postajem bolja osoba.*

## SAŽETAK

### Usporedba sastava salivarne i crijevne mikrobiote u bolesnika sa kroničnom spontanom urtikarijom i u zdravih ispitanika

**Uvod:** Kronična spontana urtikarija (KSU) je upalna bolest kože karakterizirana izbijanjem urtika, mogućim pridruženim angioedemom te intenzivnim svrbežom u trajanju dužem od 6 tjedana. Iako etiopatogeneza još nije u potpunosti razjašnjena, većina KSU-a povezana je s poremećajima imunskog sustava, koji su u više od 50% slučajeva autoimune etiologije. Ljudska mikrobiota ima važnu ulogu u razvoju i održavanju ravnoteže imunskog sustava. Promjena u sastavu mikrobiote, to jest disbioza, može doprinijeti gubitku ravnoteže imunskog sustava i razvoju upalnih bolesti.

**Metodologija:** U 22 bolesnika s KSU-om i 23 zdrava ispitanika analizirali smo sastave salivarne i crijevne mikrobiote iz uzoraka sline i fecesa. Za detekciju mikrobnih sastava koristili smo metodu sekvenciranja nove generacije (engl. *Next Generation Sequencing*, NGS), to jest sekvenciranje gena za 16S rRNA.

**Rezultati:** Alfa raznolikost crijevne mikrobiote bila je značajno snižena u bolesnika s KSU-om ( $p < 0,05$ ), u odnosu na zdrave kontrole. Mjerenjem beta raznolikosti detektirane su značajne razlike između crijevne mikrobiote bolesnika i zdravih kontrola ( $p < 0,05$ ). Razlike u salivarnoj mikrobioti između bolesnika s KSU-om i zdravih ispitanika očitovale su se statistički značajnim razlikama u zastupljenosti pojedinih bakterijskih vrsta, rodova porodica i reda ( $p < 0,05$ ). Uočena je značajno smanjena zastupljenost bakterija koje proizvode kratkolančane masne kiseline (engl. *short-chain fatty acids*, SCFA) u crijevima ( $p < 0,05$ ). Bakterijski rodovi *Lachnospiraceae NK4A136*, *Eubacterium eligens* i *Roseburia* u crijevima te rodovi *Kingella*, *Lautropia* i vrsta *Capnocytophaga leadbetteri* u slini, pokazali su se kao potencijalni dijagnostički biomarkeri za KSU-u.

**Zaključak:** Sastavi salivarne i crijevne mikrobiote značajno se razlikuju između bolesnika s KSU-om i zdravih ispitanika. Značajne promjene u mikrobnim sastavima mogu pridonijeti poremećaju ravnoteže imunskog sustava i rezultirati pojačanim upalnim odgovorom karakterističnim za KSU-u.

**Ključne riječi:** kronična spontana urtikarija, salivarna mikrobiota, crijevna mikrobiota, NGS



## SUMMARY

### **Comparison of salivary and gut microbiota composition between patients with chronic spontaneous urticaria and healthy individuals**

**Introduction:** Chronic spontaneous urticaria (CSU) is defined as the presence of hives, angioedema, or both, accompanied by intense itch, in a duration longer than 6 weeks. CSU affects about 1% of the general population and there has been a noticeable increase in the prevalence of this condition in recent years. It is more frequently observed in young and middle-aged adults, affecting women two times more often than men. The average duration of CSU is commonly around 5 years, although, in 10–25% of patients, it persists for more than 5 years. The treatment of CSU is focused on “symptom control”, targeting mast cell mediators and activators such as histamine and autoantibodies. Second-generation non-sedating H1 antihistamines are recommended as the initial treatment (up to four-fold dose), followed by omalizumab as a second-line treatment. Other therapies include cyclosporin, glucocorticoids, and alternative treatments with limited evidence of efficacy. Debilitating symptoms and the prolonged duration of the disease significantly impact patients` quality of life. Although the precise etiopathogenesis is largely unknown, CSU is considered an immune-mediated inflammatory disease, with an autoimmune etiology in more than 50% of cases. To date, 2 autoimmune endotypes are recognized. Type I autoimmune (autoallergic) CSU is characterized by the presence of IgE antibodies against autoantigens, for example, thyroid peroxidase and IL-24. Type IIb autoimmune CSU is associated with IgG autoantibodies to IgE and or its high-affinity receptors on mast cells (FcεRI).

Human microbiota plays a crucial role in the development and maintenance of immune system balance. Gut and salivary microbiota are two major communities of microorganisms within the human body, including bacteria, fungi, and viruses. They play an important role in health maintenance, such as preventing pathogen propagation, controlling metabolism, improving epithelial integrity, and regulating the components of both innate and adaptive host immune systems. Smoking, alcohol consumption, overuse of antibiotics, poor hygiene, a diet characterized by a low fiber intake and high levels of fat and sugar, a sedentary lifestyle, pollution, and various toxins can disrupt the natural balance of gut and salivary microbiota. Changes in microbiota composition, known as dysbiosis, can contribute to dysregulation of the immune system and the development of inflammatory diseases. To date, alterations in salivary

and gut composition have been described in various diseases, including autoimmune, metabolic, allergic, psychiatric diseases, inflammatory bowel diseases, and malignant tumors.

This study aimed to compare the composition and diversity of salivary and gut microbiota between CSU patients and healthy controls.

**Methodology:** This case-control study included 22 CSU patients and 23 healthy controls. The diagnosis of CSU was established according to international guidelines for urticaria. Participants with certain conditions that could affect gut microbiota composition were excluded from further investigation. The exclusion criteria were as follows: participants who had taken systemic antibiotics and commercial probiotics in the last 3 months, patients with inflammatory bowel diseases, diabetes, obesity, psychiatric diseases or malignancy, participants who have been smoking more than 5 cigarettes per day, patients with periodontal diseases, oral ulcers, and oral inflammatory diseases and participants who were pregnant. All 45 participants were instructed to provide stool and salivary samples using commercial collection kits, according to the manufacturer's instructions. Bacterial DNA was extracted from stool and saliva samples. 16S rRNA sequencing was performed to detect the salivary and gut microbiota composition of all subjects. Furthermore, blood samples from the patient group were taken to perform routine diagnostic tests (differential blood count, ESR, CRP, IgG anti-TPO, total IgE, vitamin D). CSU patients were also asked to fill out two questionnaires: Urticaria activity score (UAS) and Chronic urticaria quality of life (CU-Q2oL), to assess the activity of the disease and its impact on quality of life.

**Results:** There were no significant differences in age or gender between the CSU group and healthy controls group. Half of the CSU patients had elevated anti-TPO antibodies, while 2/3 had vitamin D deficiency. There was a significant association between elevated anti-TPO and decreased total IgE ( $p < 0.05$ ), suggesting a type IIb autoimmune CSU.

To evaluate alterations in the gut and salivary compositions and diversities between the two groups, we examined alpha diversity (measures the diversity of microbial species within a sample) and beta diversity (measures the differences in species composition between the samples). Alpha diversity of the gut microbiota was significantly reduced in CSU patients ( $p < 0.05$ ) compared to healthy controls. Beta diversity revealed significant clustering ( $p < 0.05$ ) between the CSU patients and healthy controls. Analysis of alpha and beta diversity of salivary microbiota didn't reveal significant differences between the CSU group and healthy controls.

To explore the statistically significant differences in the relative abundance of gut and salivary bacteria between the two groups, the linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) was performed. LEfSe identified a statistically significant increased abundance of gut bacteria from the *Lachnospiraceae* family in the healthy group, including *Lachnospira*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, and *Eubacterium eligens* group ( $p < 0.05$ ). Members of the *Lachnospiraceae* family are among the major producers of short-chain fatty acids (SCFAs). These results indicated a notable decrease in the abundance of SCFAs-producing bacteria in the gastrointestinal tract of CSU patients. LEfSe analysis of salivary microbiota between CSU patients and healthy individuals showed statistically significant differences in the abundance of specific bacterial species, genera, families, and orders ( $p < 0.05$ ). Bacteria from the order *Burkholderiales*, family *Flavobacteriaceae*, and genera *Capnocytophaga*, *Kingella*, and *Lautropia* were significantly more abundant in the CSU group compared to healthy controls. On the other hand, species *Streptococcus sanguinis* and *Hemophilus pitmanii* were significantly less abundant in CSU patients compared to healthy subjects. Furthermore, the receiver operating characteristic curve (ROC) was used to analyze the potential diagnostic value of statistically significant bacteria. Bacterial genera *Lachnospiraceae* NK4A136, *Eubacterium eligens*, and *Roseburia* in the gut, as well as genera *Kingella* and *Lautropia* and species *Capnocytophaga leadbetteri* in the saliva, were identified as potential diagnostic biomarkers for CSU. Analysis of the association between salivary and gut microbiota revealed that a higher number of bacteria originating from saliva were observed in CSU patients compared to healthy individuals. This indicates that in CSU patients, a higher quantity of these bacteria might be playing a role in immune system activation within the gut. This finding suggests that in CSU patients, an increased abundance of these bacteria may be contributing to immune system activation within the gut.

**Conclusion:** Salivary and gut microbiota compositions significantly differ between CSU patients and healthy individuals. Significant changes in microbial compositions can contribute to the dysregulation of the immune system and result in an enhanced inflammatory response characteristic of CSU. These findings provide important insights into the potential role of microbiota in the development of CSU and highlight the need for continued research in this area.

**Keywords:** chronic spontaneous urticaria, NGS, salivary microbiota, gut microbiota

## SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
1.1	Kronična spontana urtikarija .....	2
1.1.1	Klasifikacija urtikarije i definicija kronične spontane urtikarije.....	2
1.1.2	Epidemiologija i tijek kronične spontane urtikarije te utjecaj na kvalitetu života .....	2
1.1.3	Patofiziologija kronične spontane urtikarije .....	3
1.1.4	Klinička slika urtikarije.....	5
1.1.5	Dijagnostički postupak kod kronične spontane urtikarije .....	7
1.1.6	Liječenje kronične spontane urtikarije .....	10
1.2	Osnovna obilježja ljudske mikrobiote.....	12
1.2.1	Oralna mikrobiota .....	15
1.2.2	Crijevna mikrobiota .....	18
1.2.3	Povezanost mikrobiote i kronične spontane urtikarije – dosadašnje spoznaje.....	21
2.	HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	24
2.1	Svrha .....	25
2.2	Hipoteze .....	25
2.3	Ciljevi.....	25
3.	ISPITANICI I POSTUPCI.....	26
3.1	Ispitanici.....	27
3.2	Uzimanje uzoraka sline .....	28
3.3	Uzimanje uzoraka fecesa .....	28
3.4	Uzimanje uzoraka krvi .....	29
3.5	Izolacija DNA .....	29
3.6	Sekvenciranje nove generacije.....	31
3.7	Bioinformatička analiza .....	33
3.8	Statistička analiza.....	33
4.	REZULTATI.....	35
4.1	Analiza sastava mikrobiote fecesa .....	37
4.1.1	Taksonomska analiza .....	37
4.1.2	Analiza alfa i beta raznolikosti.....	40
4.1.3	LEfSe analiza.....	42
4.1.4	ROC analiza.....	45
4.2	Analiza sastava salivarne mikrobiote.....	46
4.2.1	Taksonomska analiza .....	46
4.2.2	Alfa i beta raznolikost.....	49
4.2.3	LEfSe analiza.....	51
4.2.4	ROC analiza.....	53

4.3	Analiza povezanosti sastava salivarne i crijevne mikrobiote u pojedinog ispitanika .....	54
4.4	Korelacije mikrobioma i kliničkih parametara .....	55
5.	RASPRAVA .....	57
5.1	Usporedba sastava i raznolikosti mikrobiote .....	59
5.2	Razlike u zastupljenosti bakterija .....	61
5.3	Povezanost salivarne i crijevne mikrobiote .....	67
5.4	Korelacija bakterija sa težinom bolesti i kliničkim parametrima.....	68
5.5	Ograničenja i prednosti istraživanja.....	69
6.	ZAKLJUČAK .....	70
7.	LITERATURA .....	73
8.	ŽIVOTOPIS S POPISOM OBJAVLJENIH RADOVA .....	87
	PRILOZI .....	92

## POPIS SKRAĆENICA

AMP	<i>antimikrobni peptidi (engl. antimicrobial peptides)</i>
Anti-IgE	<i>antitijelo na imunoglobulin E (engl. immunoglobulin E antibody)</i>
Anti-Tg	<i>antitijelo na tireoglobulin (engl. antithyroglobulin antibody)</i>
Anti-TPO	<i>antitijela na tireoidnu peroksidazu (engl. thyroid peroxidase antibodies)</i>
ANA	<i>antinuklearna antitijela (engl. anti-nuclear antibodies)</i>
ASST	<i>autologni serumski kožni test (engl. autologous serum skin test)</i>
AUC	<i>površina ispod ROC krivulje (engl. area under the ROC curve)</i>
C3a	<i>komponenta komplementa anafilatoksin 3 (engl. complement and anaphylatoxin 3)</i>
C5a	<i>komponenta komplementa anafilatoksin 5 (engl. complement and anaphylatoxin 5)</i>
C3aR	<i>receptor komponente komplementa anafilatoksin 3 (engl. complement component and anaphylatoxin receptor 3)</i>
C5aR	<i>receptor komponente komplementa anafilatoksin 5 (engl. complement component and anaphylatoxin receptor 5)</i>
CRP	<i>C-reaktivni protein</i>
CU-Q2oL	<i>upitnik o kvaliteti života bolesnika s kroničnom urtikarijom (engl. Chronic Urticaria – Quality of Life Questionnaire)</i>
DKS	<i>diferencijalna krvna slika</i>
DNA	<i>deoksiribonukleinska kiselina (engl. deoxyribonucleic acid)</i>
FcεRI IgE	<i>receptor visokog afiniteta za IgE (engl. high-affinity IgE receptor)</i>
GPCR	<i>G- proteinski transmembranski receptori (engl. G-protein-coupled receptors)</i>
HDAC	<i>histonske deacetilaze (engl. histone deacetylases)</i>
HMP	<i>Projekt ljudskog mikrobioma (engl. Human Microbiome Project)</i>

HOMD	<i>baza podataka ljudskog oralnog mikrobioma (engl. Human Oral Microbiome Database)</i>
IFN- $\gamma$	<i>interferon-gama</i>
IgE	<i>imunoglobulin E</i>
IgG	<i>imunoglobulin G</i>
IgG-anti-TPO	<i>autoantitijelo subklase G prema tireoidnoj peroksidazi (engl. immunoglobulin G subclasses of anti-thyroid peroxidase antibody)</i>
IL	<i>interleukin</i>
KIndU	<i>kronična inducirana urtikarija (engl. chronic inducible urticaria)</i>
KKS	<i>kompletna krvna slika</i>
KSU	<i>kronična spontana urtikarija (engl. chronic spontaneous urticaria)</i>
LDA	<i>linearna diskriminantna analiza (engl. Linear discriminant analysis)</i>
LEfSe	<i>veličina učinka linearne diskriminantne analize (engl. Linear discriminant analysis Effect Size)</i>
MRGPRX2	<i>X2 receptor povezan s G-proteinom (engl. mas-related G protein– coupled receptor X2)</i>
NGS	<i>sekvenciranje nove generacije (engl. next generation sequencing)</i>
PCR	<i>lančana reakcija polimerazom (engl. polymerase chain reaction)</i>
PCoA	<i>analiza glavnih koordinata (engl. principal coordinates analysis)</i>
PRR	<i>receptor za prepoznavanje uzoraka (engl. pattern recognition receptor)</i>
RA	<i>reumatoidni artritis</i>
ROC	<i>krivulja odnosa specifičnosti i osjetljivosti klasifikatora (engl. receiver operating characteristic curve)</i>
SCFA	<i>kratkolančane masne kiseline (engl. Short-chain fatty acids)</i>
SE	<i>sedimentacija</i>
SLE	<i>sistemska eritemski lupus</i>

SS	<i>Sjögrenov sindrom</i>
TLR	<i>Toll-u slični receptori (engl. Toll-like receptors)</i>
Th	<i>pomagački T limfociti (engl. T helper cells)</i>
TNF- $\alpha$	<i>faktor tumorske nekroze-alfa (eng. tumor necrosis factor alpha)</i>
Treg	<i>regulatorni T limfociti</i>
TSH	<i>hormon koji stimulira štitnjaču (engl. thyroid stimulating hormone)</i>
UAS	<i>ocjena aktivnosti urtikarije (engl. Urticaria activity Score)</i>



## **1. UVOD**

## **1.1 Kronična spontana urtikarija**

### **1.1.1 Klasifikacija urtikarije i definicija kronične spontane urtikarije**

Urtikarija je upalna bolest kože koju karakterizira pojava urtika praćenih intenzivnim osjećajem svrbeža. Urtikama može biti pridružen i angioedem (1). Radi se vrlo često dermatološkoj bolesti; prema podacima iz literature, 20% svjetske populacije tijekom života razvije neki oblik urtikarije (2).

Prema duljini trajanja, urtikarija se klasificira na akutnu i kroničnu. Akutna urtikarija karakterizirana je pojavom urtika (samostalno ili uz pridružen angioedem), praćenih svrbežom, koje se javljaju svakodnevno ili gotovo svakodnevno u razdoblju kraćem od 6 tjedana. Radi se o najčešćem obliku urtikarije, a kao najčešći uzroci navode se infekcije gornjeg respiratornog trakta, mokraćnog sustava, uzimanje lijekova, određene namirnice te ubodi insekata (1). U većini slučajeva simptomi regrediraju unutar tjedan dana.

Kronična urtikarija definirana je svakodnevnom ili gotovo svakodnevnom izbijanjem urtika i/ili angioedema u razdoblju duljem od 6 tjedana (1). Kronična urtikarija se, s obzirom na provocirajuće čimbenike, dalje klasificira kao kronična spontana urtikarija (KSU) i kronična inducirana urtikarija (KIndU) (2). Kod KIndU-e razvoj bolesti potaknut je specifičnim provocirajućim čimbenicima kao što su hladnoća, pritisak na kožu, voda, sunčeva svjetlost, toplina, vježbanje i vibracije (1). KSU manifestira se pojavom urtika i/ili angioedema uz izražen svrbež u razdoblju duljem od 6 tjedana, bez identificiranog provocirajućeg čimbenika. KSU se javlja češće od KIndU-e, no određeni podtipovi KIndU-e, ponajprije simptomatski dermografizam, spadaju u najčešće komorbiditete bolesnika s KSU-om (3).

### **1.1.2 Epidemiologija i tijek kronične spontane urtikarije te utjecaj na kvalitetu života**

Prevalencija KSU-e varira među različitim populacijama i regijama. Podaci iz literature upućuju da trenutno oko 1% svjetske populacije boluje od KSU-e (2).

KSU se javlja i kod odraslih i kod djece. Žene obolijevaju 2 puta češće od muškaraca, a najčešće su zahvaćene ženske osobe srednjih godina (2,4,5).

KSU u prosjeku traje 2 do 5 godina (6-8); međutim, u 10 - 25% bolesnika bolest je dužeg vijeka i traje dulje od 5 godina. Nekolicina bolesnika doživi i po nekoliko epizoda KSU-e tijekom života (9,10).

Nepredvidivi tijek bolesti, izraženi simptomi, pridruženi komorbiditeti te često neuspješan odgovor na terapiju značajno narušavaju kvalitetu života, a zabilježen je i veći broj psihijatrijskih komorbiditeta (2). Štoviše, u više od 30% oboljelih prisutna je anksioznost i depresija, što pridonosi lošijoj kvaliteti života (8). Izražen subjektivan osjećaj svrbeža, nepredvidljiva pojava urtika i angioedema značajno smanjuju kvalitetu sna, aktivnost i produktivnost na poslu i u školi, narušavaju kvalitetu socijalnog života kao i odnose s partnerom i unutar obitelji (8). Prema velikom međunarodnom istraživanju ASSURE-CSU (engl. *Assessment of the Economic and Humanistic Burden of Chronic Spontaneous/Idiopathic Urticaria patients*), više od 20% bolesnika s KSU-om izostane s radnog mjesta jedan ili više sati tjedno zbog simptoma bolesti, a produktivnost na poslu smanjena je za 27% (6).

### **1.1.3 Patofiziologija kronične spontane urtikarije**

Patofiziologija KSU-e uključuje složenu interakciju između mastocita, receptora i medijatora što rezultira pojavom simptoma kod bolesnika (11,12).

Ključnu ulogu u patogenezi urtikarije imaju mastociti, stanice smještene u dermisu i subkutisu, uglavnom oko krvnih žila i senzornih živčanih vlakana (2). Pojava urtika i angioedema, popraćenih intenzivnim svrbežom, rezultat je aktivacije i degranulacije mastocita te otpuštanja brojnih medijatora.

Degranulacija mastocita može biti posljedica imunskih mehanizama (IgE posredovana) ili pak rezultat neimunskih aktivacije (13). Naime, uz visokoafinitetne receptore za IgE (FcεRI), na mastocitima se nalaze razni receptori čijom direktnom aktivacijom dolazi do degranulacije mastocita. To su receptori za C5a (C5aR), za neuropeptide (MRGPRX2), za citokine (KIT) i sl. (14). Degranulacijom mastocita oslobađa se histamin, glavni medijator odgovoran za pojavu simptoma KSU-e. Uz histamin, luče se i brojni drugi medijatori uključujući triptazu, prostaglandin D2 (PGD2), leukotrijene (C4, D4 i E4) i citokine poput TNF, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, IL-31 i drugih (11,13). Svi ovi medijatori djeluju na ciljne stanice na koži i sluznici, ali također potiču regrutaciju T limfocita, eozinofila i bazofila (2). U konačnici, dolazi do povećane vazodilatacije i vaskularne propusnosti što rezultira nastankom intersticijskog edema

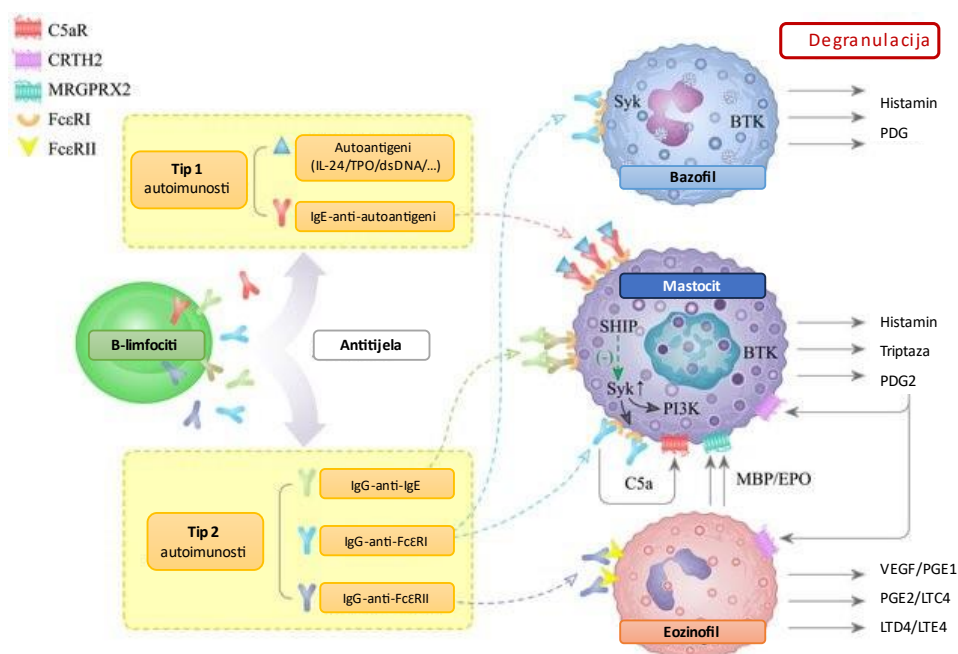
te podražajem senzornih živčanih završetaka (što je ponajprije posredovano supstancom P, neuropeptidima i IL-31) (15,16). Rezultat tih zbivanja je pojava otekline (urtike), eritema i svrbeža.

Prema dosadašnjim istraživanjima, većina slučajeva KSU-e posljedica je imunosne aktivacije mastocita (Slika 1). Autoimuna KSU je najčešći podtip KSU-e. Prema literaturi, u više od 50% slučajeva, KSU je autoimune etiologije (17). Opisuju se dva mehanizma autoimune KSU-e, a oba uključuju alfa podjedinicu visokoafinitetnog IgE receptora koja je izražena na površini mastocita i bazofila (FcεRI). Autoimuna KSU tipa I, tzv. autoalergijska KSU, posredovana je IgE protutijelima usmjerenim protiv vlastitih antigena (autoalergena), primjerice, protiv tireoidne peroksidaze (TPO) i interleukina IL-24 (1,2). Autoalergeni formiraju komplekse sa IgE protutijelima i potom se vežu na FcεRI na mastocitima te ih aktiviraju. Autoimuna KSU tipa IIb definirana je prisutnošću IgG protutijela na vlastiti IgE ili na FcεRI (1,2). Oba podtipa imaju isti mehanizam aktivacije mastocita, s posljedičnom vazodilatacijom, otpuštanjem medijatora, podražajem senzornih živčanih vlakana i regrutacijom upalnih stanica. Tip I je češći podtip autoimune KSU-e, dok bolesnici s tipom IIb imaju teži oblik bolesti, snižene vrijednosti ukupnog IgE, povišene vrijednosti anti-TPO protutijela i slabiji terapijski odgovor (2,18). Bolesnici s autoimunom KSU-om tipa IIb češće imaju pridružene druge autoimune bolesti, ponajprije Hashimotov tireoiditis i vitiligo (3).

U bolesnika s KSU-om, upalni infiltrat sastoji se od neutrofila, eozinofila, limfocita i bazofila (19,20). Ove stanice migriraju iz krvi u kožu djelovanjem kemotaktičnih faktora poput MP3, RANTES, IL-5, C3a, C5a, TNF, IL-17 i drugih (20). Bazopenija i eozinopenija nađu se u 10 - 15% bolesnika s KSU-om, a odraz su prelaska tih stanica iz krvi u kožu. Takav nalaz je u korelaciji s aktivnosti KSU-e i lošijim odgovorom na terapiju (21,22). Bazofili i eozinofili pridonose razvoju KSU-e; naime, na svojoj površini također imaju FcεRI i C5aR receptore, čijom aktivacijom dolazi do otpuštanja histamina, leukotrijena i citokina (23,24).

Th2 limfociti su dominantni T limfociti u kožnim infiltratima bolesnika s KSU-om. Uz njih, prisutni su i Th1 i Th17 limfociti (20). Th2 limfociti otpuštaju brojne citokine, stimuliraju stvaranje IgE protutijela i aktivaciju mastocita, eozinofila i bazofila. U bolesnika s KSU-om, u serumu i u kožnim biopstatima povišene su razine IFN $\gamma$ , TNF, TGF $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-4, IL-5, IL-17, IL-31, IL-33 i drugih proupalnih citokina (21). Značajno je i da degranulaciju mastocita mogu izazvati koagulacijski faktori. Primjerice, trombin i faktor Xa mogu aktivirati specifične PAR1 i PAR2 receptore na mastocitima (12,25). Nadalje, aktivirani koagulacijski faktori, faktor

Xa, faktor IIa i plazmin mogu stvarati C5a i C3a komponente komplementa, koji pritom mogu aktivirati mastocite direktnim vezanjem na C5aR i C3aR receptore (12).



**Slika 1.** Predloženi autoimuni mehanizmi kod KSU-e. Preuzeto i adaptirano prema (26).

Mnogi bolesnici s KSU-om navode određene uzročne čimbenike koje povezuju s javljanjem simptoma. To se ponajprije odnosi na stres, zatim infekcije, određenu hranu te nesteroidne protuupalne lijekove. Iako su ti provocirajući čimbenici povezani s pojačanom aktivacijom mastocita, ne smatraju se uzrocima razvoja KSU-e, ali mogu se smatrati faktorima koji dovode do pogoršanja bolesti (1).

U posljednjem desetljeću postignut je veliki napredak u istraživanju patofiziologije KSU-e; međutim s kliničkog stajališta postoji potreba za pronalaskom novih, specifičnih biomarkera koji će otvoriti put novim dijagnostičkim i terapijskim opcijama u liječenju ove kronične bolesti.

#### 1.1.4 Klinička slika urtikarije

Urtikarija je obilježena pojavom urtika i angioedema. Urtike i angioedemi mogu se javiti samostalno ili u kombinaciji. Tako se u 40% slučajeva urtike javljaju samostalno, u 10% slučajeva bolest se manifestira samo pojavom angioedema, dok u 50% bolesnika dolazi do

pojave i urtika i angioedema (7). Vodeći simptom je svrbež koji je u većini slučajeva vrlo intenzivan.

Urtika je primarna kožna morfa, oštro ograničena elevirana lezija različita oblika i veličine, često karakterizirana središnjim oticanjem i okružena eritemom (Slika 2). Nastaje kao posljedica edema u gornjem dijelu dermisa. Najčešće je okruglog, anularnog i serpinginoznog oblika te se može pojaviti bilo gdje na tijelu. Karakteristika urtika je da brzo nastaju i brzo nestaju. Najčešće se povlače 30 minuta do 24 sata nakon pojave. Nakon povlačenja urtike, zahvaćena koža ponovno poprima normalan izgled. Izbijanje urtika praćeno je osjećajem intenzivnog svrbeža ili peckanja.



**Slika 2.** Urtike

Angioedem je oticanje kože ili sluznice koje je posljedica edema dubokog dermisa, potkožnog tkiva ili sluznica (Slika 3). Češće je praćen osjećajem bolnosti, zategnutosti i peckanja nego

samim svrbežom. Najčešće zahvaća usnice, periorbitalnu regiju, obraze, genitalnu regiju i udove. Za razliku od urtika, angioedem se sporije povlači te ponekad traje i do 72 sata (1).

Svrbež je subjektivna, neugodna senzacija koja rezultira grebanjem kože. Javlja se na svim dijelovima tijela, najintenzivnije na leđima i na udovima. Češće se javlja u večernjim satima i noću. Jedan je od vodećih čimbenika koji negativno utječu na kvalitetu života bolesnika s KSU-om, uključujući smanjenu kvalitetu sna, smanjenu radnu sposobnost, manjak koncentracije kao i poteškoće u svakodnevnim aktivnostima (8).



**Slika 3.** Angioedem

### **1.1.5 Dijagnostički postupak kod kronične spontane urtikarije**

Detaljna anamneza i klinički pregled predstavljaju prvi korak u dijagnostici bolesnika s KSU-om.

Anamneza treba uključivati podatke o učestalosti izbijanja urtika, trajanju pojedinačnih urtika, njihovoj veličini, obliku i distribuciji, postojanju pridruženog angioedema, potencijalnim provocirajućim čimbenicima, učestalosti recidiva, subjektivnim simptomima (svrbež, bolnost) te pojavi općih simptoma, o obiteljskoj i osobnoj sklonosti atopijskim bolestima, postojanju psiholoških smetnji ili psihičkih poremećaja, postojanju alergija, infekcija, sustavnih bolesti, o mogućem pogoršanju urtika uslijed fizikalnih čimbenika ili vježbanja, detaljne podatke o uzimanju lijekova, funkcijama i navikama (pušenju, menstrualnom ciklusu i trudnoći).

Također, anamneza treba sadržavati i podatke o zanimanju, hobijima, nedavnim putovanjima, percepciji stresa tijekom bolesti, kao i o ukupnom utjecaju bolesti na kvalitetu života (1).

S obzirom na prirodu bolesti, vrlo često u trenutku pregleda urtike i angioedem nisu prisutni, stoga je važno kod bolesnika pregledati i fotodokumentaciju (fotografije urtika i angioedema).

Idući korak predstavljaju dijagnostičke pretrage. Aktualne smjernice Europske akademije za alergologiju i kliničku imunologiju u suradnji s tri druge organizacije (engl. *The European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Global Allergy and Asthma European Network, European Dermatology Forum i World Allergy Organization, EAACI/GA2LEN/EDF/WAO*), iz 2022. godine, sugeriraju da osnovne dijagnostičke pretrage trebaju uključivati diferencijalnu krvnu sliku (DKS), sedimentaciju (SE) ili C-reaktivni protein (CRP), razinu ukupnog IgE protutijela i razinu protutijela na tireoidnu peroksidazu (anti-TPO). Ponekad se primjenjuje i šira dijagnostička obrada bolesnika na temelju anamnestičkih podataka. Proširena dijagnostička obrada uključuje: biokemijsku obradu (ureja, kreatinin, hepatogram, glukoza, ukupni proteini, elektroforeza), analizu urina, urinokulturu, mikrobiološku analizu stolice, cervikalne briseve kod žena i briseve uretre kod muškaraca, analizu antigena *Helicobacter pylori* iz stolice, vrijednost TSH, fT4, antiTg, briseve ždrijela i nosa, parazitološku obradu, imunološku obradu - antinuklearna antitijela (ANA) i ENA (ekstraktibilni nuklearni antigeni) panel, vrijednosti komplementa C3, C4, C1q, kao i inhibitora C1-esteraze (1).

Ciljevi dijagnostičkog postupka kod KSU-e su:

- i) potvrditi dijagnozu i isključiti diferencijalne dijagnoze

Urtike i angioedemi mogu se javiti i u sklopu drugih bolesti. Najvažnije diferencijalne dijagnoze uključuju: a) *induciranu urtikariju* (u obradi je potrebna identifikacija provocirajućeg čimbenika koji uzrokuje pojavu urtika ili angioedema); b) *urtikariju vaskulitis* (ako urtike perzistiraju dulje od 24 sata, a subjektivno je više izražena bolnost u odnosu na svrbež, indicirana je biopsija promjene na koži s patohistološkom analizom i direktnom imunofluorescencijom u svrhu detekcije vaskulitisa); c) *mastocitoza*; d) *stečeni ili hereditarni angioedem*; e) *autoinflamatorne sindrome* koji uključuju Schnitzlerov sindrom, Gleichov sindrom, periodični sindrom povezan s kriopirinom (engl. *Cryopyrin-associated periodic syndrome, CAPS*) i dr. (anamnestički podaci o razvoju općih simptoma poput vrućice, umora, bolova u zglobovima i kostima); f) *prebulozni stadij buloznog pemfigoida* (1).



- ii) identificirati podležeće uzroke i faktore koji dovode do pogoršanja bolesti

Prema najnovijim saznanjima, najvažnijim uzrocima razvoja KSU-e smatraju se autoimunost tipa I (stvaranje IgE protutijela na vlastite antigene) te autoimunost tipa IIb (stvaranje IgG antitijela na vlastite IgE ili na FcεRI) (2). Rezultati osnovnih pretraga (CRP, ukupni IgE, antTPO) usmjeravaju dijagnozu u tom smjeru. Međutim, kod dijela KSU-a uzroci degranulacije mastocita ostaju nerazjašnjeni. U faktore koji mogu dovesti do pogoršanja bolesti ubrajaju se: lijekovi, hrana, stres, infekcije. Najčešći lijekovi koji dovode do egzacerbacije KSU-e su nesteroidni protuupalni lijekovi. Također, prema istraživanjima, čak 1/3 bolesnika s KSU-om navodi da stres uzrokuje pogoršanje simptoma (1).

- iii) procijeniti aktivnost, tijek i utjecaj bolesti na svakodnevne aktivnosti.

U bolesnika s KSU-om, aktivnost i težina bolesti procjenjuje se standardiziranim upitnikom koji se naziva „Urticaria Activity Score” (UAS7). Radi se o mjernom instrumentu koji prati broj urtika i intenzitet svrbeža tijekom sedam dana (27). U navedenom upitniku se tijekom jednog dana može skupiti raspon bodova od 0 do 6, koji su rezultat broja urtika i intenziteta svrbeža (Tablica 1). Maksimalan broj bodova koji se može postići nakon tjednog praćenja iznosi 42, što ukazuje na tešku kliničku sliku urtikarije (27). Istovjetna varijanta ovog upitnika postoji i za angioedem.

**Tablica 1.** Način bodovanja u upitniku „Urticaria Activity Score“ (UAS7)

Bod	Pojava urtika	Svrbež
0	bez pojave	bez svrbeža
1	mali broj (<20 u 24 sata)	blagi svrbež
2	umjeren broj (20-50 u 24 sata)	umjeren svrbež
3	veliki broj (>50 u 24 sata)	intenzivan svrbež, utječe na dnevne aktivnosti

Uz procjenu aktivnosti bolesti, vrlo je važno procijeniti kvalitetu života bolesnika, kao i kontrolu bolesti. Upitnik kvalitete života bolesnika s kroničnom urtikarijom „Chronic Urticaria Quality of life“ (CU-Q2oL) sastoji se od 23 pitanja koja pokrivaju različite aspekte kojima ova bolest utječe na kvalitetu života, a to su: svrbež, oticanje, dnevne aktivnosti, spavanje, izgled i ograničenja. Na svako pitanje bolesnik zaokružuje odgovor na ljestvici od 1 (nema utjecaj na

kvalitetu života) do 5 (značajno narušava kvalitetu života). Veći ukupni rezultat znači narušeniju kvalitetu života tih bolesnika (28-30). Inačica ovog upitnika postoji i za bolesnike s angioedemom.

Radi uvida u kontrolu bolesti koristan je „Urticaria Control Test“ (UCT). Standardizirani upitnik sastoji se od četiri pitanja koja se odnose na učestalost pojave urtika/angioedema i svrbeža, na utjecaj KSU-e na kvalitetu života, učinkovitost terapije i mišljenja bolesnika o kontroli bolesti u posljednjih mjesec dana. Odgovori se boduju vrijednostima od 0 do 4. Veći broj bodova ukazuje na bolju kontrolu bolesti (31).

U sklopu dijagnostičke obrade bolesnika s KSU-om, kao najčešći komorbiditeti nađu se KIndU-e (simptomatski dermografizam, urtikarija na hladnoću), autoimune bolesti (tireoidne bolesti, vitiligo, reumatoidni artritis (RA)) i alergijske bolesti. S druge strane, najčešće posljedice KSU-e su razvoj psihijatrijskih komorbiditeta u ovih bolesnika, ponajprije depresije i anksioznosti, zatim problemi sa spavanjem i poremećaji pažnje (1).

### **1.1.6 Liječenje kronične spontane urtikarije**

Liječenje KSU-e je simptomatsko. Cilj liječenja je eliminirati simptome bolesti, postići potpunu kontrolu bolesti i popraviti kvalitetu života bolesnika.

Prvi korak u liječenju je izbjegavanje provocirajućih čimbenika. EAACI/GA<sup>2</sup>LEN/EDF/WAO smjernice preporučuju izbjegavanje lijekova koji mogu dovesti do egzacerbacije bolesti. To se u prvom redu odnosi na nesteroidne protuupalne lijekove (1). Nadalje, različite infekcije (poput infekcije bakterijom *Helicobacter pylori*, crijevne parazitoze i sl.) mogu utjecati na aktivnost bolesti i pogoršanje simptoma, stoga ih treba liječiti. Pojedina istraživanja govore i o velikom utjecaju stresa na aktivnost KSU-e (32).

Drugi korak je farmakološko liječenje KSU-e koje uključuje ciljno djelovanje na medijatore mastocita (poput histamina) ili na aktivatore mastocita (poput antitijela). Trenutno se istražuju nove terapijske opcije koje su usmjerene na inhibiciju ili smanjenje broja mastocita (2). Prema najnovijim EAACI/GA<sup>2</sup>LEN/EDF/WAO smjericama iz 2022. godine, prvu liniju u liječenju KSU-e čine nesedirajući H<sub>1</sub>-antihistaminici druge generacije; u slučaju da nema odgovora na terapiju ili je odgovor slab, doza se podiže do četiri tablete dnevno. Ako simptomi KSU-e i dalje ne regrediraju unatoč četverostrukoj dozi, tada se, uz terapiju H<sub>1</sub>-antihistaminicima druge

generacije, u drugoj liniji dodaje omalizumab, humanizirano IgG anti-IgE protutijelo. U trećoj liniji, u bolesnika kod kojih bolest ne reagira ni na terapiju omalizumabom, daje se imunosupresivni lijek ciklosporin (1).

Iako je histamin glavni medijator koji se otpušta iz mastocita, a H1-antihistaminici predstavljaju osnovu terapije urtikarije, podaci meta-analize ukazuju da je oko 61% bolesnika rezistentno na konvencionalnu dozu antihistaminika, a kod samo 63% tih bolesnika povećane doze antihistaminika dovode do kontrole simptoma (2). Prema istraživanju Guillena i suradnika, bolesnici s autoimunom KSU-om tipa IIb rezistentniji su na terapiju antihistaminicima. Samo 30% bolesnika s povišenim razinama anti-TPO protutijela i sniženim ukupnim IgE imali su pozitivan odgovor na terapiju antihistaminicima (33).

Omalizumab je prvo IgG anti-IgE protutijelo registrirano za liječenje KSU-e. Daje se u obliku supkutane injekcije, uobičajeno u dozi od 300 mg svaka 4 tjedna (1). Omalizumab inhibira interakciju između IgE i njegovog visoko-afinitetnog receptora FcεRI čime se sprječava aktivacija mastocita i bazofila. Također, blokira vezanje IgE na receptore (CD23) na B limfocitima i stanicama koje predočavaju antigen (34). Gledajući učinak omalizumaba, bolesnici s autoimunom KSU-om tipa I (autoalergijskim tipom) koji su rezistentni na antihistaminike, u 70% slučajeva imaju pozitivan odgovor na terapiju omalizumabom (35). Međutim, značajno lošiji odgovor na omalizumab imaju bolesnici s autoimunom KSU-om tipa IIb (36). Kao prediktori slabog odgovora izdvajaju se snižene vrijednosti ukupnog IgE, povišena IgG - anti TPO protutijela, pozitivan test autolognim serumom (engl. *autologus serum skin test*, ASST) i snižena ekspresija FcεRI na bazofilima (2).

Ciklosporin je imunosupresivni lijek koji blokira otpuštanje histamina iz mastocita i bazofila. Osim toga, može inhibirati T i B limfocite što također može utjecati na smanjenu aktivaciju mastocita (37). Ciklosporin se, zbog velikog broja nuspojava, preporuča samo u liječenju bolesnika s teškim oblikom KSU-e koji su rezistentni na kombinaciju četverostruke doze neselektivnih H1-antihistaminika druge generacije i omalizumaba (1). Za razliku od omalizumaba, bolesnici s autoimunom KSU-om tipa IIb imaju dobar odgovor na terapiju ciklosporinom i duže razdoblje remisije nakon ukidanja lijeka. Međutim, između 6% i 57% bolesnika na ciklosporinu prijavljuju jednu ili više nuspojava, čak na vrlo malim ili malim dozama lijeka (38).

Nadalje, EAACI/GA2LEN/EDF/WAO smjernice ne preporučuju liječenje KSU-e sistemskom kortikosteroidnom terapijom. Pritom, „odobravaju“ vrlo kratko liječenje sistemskim kortikosteroidima kod akutnih egzacerbacija bolesti, s ciljem olakšanja simptoma (1).

Kao alternativne opcije u liječenju spominju se antidepresivi (doksepin), H2-antihistaminici (ranitidin), dapson, metotreksat, mikofenolat mofetil, dijeta bez pseudoalergena, intravenski imunoglobulini, plazmafereza, fototerapija te psihoterapija (1).

Ligelizumab je nova generacija anti-IgE monoklalnog protutijela. Trenutno je u fazi III klinčkog istraživanja, a rezultati posljednjih studija pokazuju vrlo dobar sigurnosni profil, no učinkovitost nije veća u usporedbi s omalizumabom (39). Također, u fazi istraživanju su i antitijela usmjerena na C5a i C5a receptore, Bruton inhibitori tirozin kinaze (fenebrutinib), antitijela na IL-17 i IL-23, kao i antitijela na IL-4, IL-5 i IL-13, monoklonsko anti-Siglec-8 antitijelo kao i MRGPRX2 antagonisti (2).

Slab odgovor na terapiju H1-antihistaminicima, veliki troškovi liječenja omalizumabom te brojne nuspojave ciklosporina uvelike ograničavaju terapijske mogućnosti kod bolesnika s KSU-om. Daljnja istraživanja neophodna su za bolje razumijevanje mehanizama koji doprinose razvoju KSU-e. Također, postoji potreba za pronalaskom novih tkivnih i serumskih markera koji bi doprinijeli razvoju usmjerenije i učinkovitije terapije.

## **1.2 Osnovna obilježja ljudske mikrobiote**

Ljudska mikrobiota skup je svih mikroorganizama koji žive u ili na ljudskom tijelu i u interakciji su s ljudskim organizmom. Ljudsku mikrobiotu čine bakterije, virusi, gljive i arheje. Daleko najveći dio otpada na bakterije. Čak  $10^{14}$  bakterija normalno nastanjuje organizam čovjeka i predstavlja fiziološku mikrobiotu (40). Pod pojmom mikrobiom podrazumijeva se cjelokupni genetski materijal tih mikroorganizama. Smatra se da oko 99% humanog mikrobioma čine bakterijski geni (41). Mikroorganizmi koloniziraju različite anatomske lokalizacije tijela poput kože, sluznica, gastrointestinalnog trakta, dišnog sustava i urogenitalnog trakta. Formiraju kompleksan ekosustav koji se prilagođava okolišnim uvjetima svake niše (40). Od samog rođenja počinje interakcija između ljudskog organizma i mikrobioma. Pritom, interakcija može biti komenzalna (jedan organizam ima korist od interakcije, dok drugi nema ni koristi ni štete), mutualistička (oba organizma imaju koristi od

interakcije) te patogena (jedan organizam uzrokuje štetu drugom organizmu). Ove interakcije igraju važnu ulogu u očuvanju homeostaze i zdravlja ljudskog organizma (40).

Prvi kontakt koji čovjek ima s mikrobiotom je prilikom rođenja. Pritom, način rođenja uvelike utječe na sastav mikrobiote (40,42,43). Tako je, primjerice, novorođenčad rođena vaginalnim putem kolonizirana velikim brojem vrsta *Lactobacillus* bakterija koje imaju važnu ulogu u probavi mlijeka i razvoju normalnog, uravnoteženog sastava crijevne mikrobiote te adekvatnog imunskog sustava (42). Novorođenčad rođena carskim rezom kolonizirana je mikroorganizmima s kože majke i medicinskog osoblja uključujući *Staphylococcus*, *Propionbacterium* i *Corynebacterium* (43). Sve veći broj istraživanja govori o narušenom imunskom sustavu i nedostatnoj funkciji crijeva kod djece rođene carskim rezom, naglašavajući pritom povećan rizik od razvoja pretilosti, astme i drugih alergijskih bolesti te autoimunih bolesti kasnije tijekom života (42,44).

Zajedno s rastom i razvojem ljudskog organizma, mikrobiota se aktivno prilagođava svojoj specifičnoj niši i neprestano se razvija pod utjecajem faktora koji potječu od domaćina, ali i od okoliša. Osim antimikrobne zaštitne uloge, ljudska mikrobiota ima važnu ulogu u očuvanju integriteta pojedine niše, metaboličkim funkcijama te modulaciji prirođenog i stečenog imunskog sustava (40). Faktori poput dobi, prehrane, načina života, hormonalnih promjena, naslijeđenih gena i postojećih bolesti ključni su za definiranje sastava ljudskog mikrobioma. (45,46).

Promjena u sastavu ljudske mikrobiote, bilo da se radi o smanjenju mikrobne raznolikosti, smanjenom broju korisnih organizama ili pretjeranom rastu štetnih mikroorganizama dovodi do neravnoteže mikrobioma, takozvane disbioze, koja posljedično može dovesti do poremećenog imunskog odgovora, podložnosti infekcijama i razvoja određenih bolesti. Stoga se danas veliki broj bolesti, uključujući alergijske bolesti, metaboličke bolesti, autoimune i psihijatrijske bolesti, povezuje s disbiozom mikrobioma (47-53). O važnosti mikrobiote za ljudski organizam u prilog govore i činjenice da bakterija u tijelu u prosjeku ima deset puta više nego ljudskih stanica (mikrobna zajednica čini 90% stanica ljudskog organizma, a tek 10% otpada na eukariotske stanice) (54). Nadalje, bakterijskih gena ima oko 3 milijuna, dok humani genom broji oko 23 000 funkcionalnih gena (41).

S obzirom da većina bakterijskih vrsta nije pogodna za kultivaciju u laboratorijskim uvjetima, razvojem metoda molekularne dijagnostike dolazi do velikog napretka u analizi mikrobioma. Sekvenciranje nove generacije (engl. *Next Generation Sequencing*, NGS) i istraživanje

ljudskog mikrobioma predstavljaju ključne prekretnice u biomedicinskim znanostima koje su omogućile dublje razumijevanje kompleksnih interakcija između mikroba i ljudskog organizma. NGS je revolucionarna tehnika sekvenciranja DNA koja omogućuje brže, jeftinije i preciznije određivanje niza nukleotida u genomima organizama. NGS ima brojne prednosti u odnosu na klasično Sangerovo sekvenciranje. Naziva se još i masivno paralelno sekvenciranje jer omogućuje brzo sekvenciranje velikog broja DNA fragmenata u isto vrijeme. To rezultira ogromnom količinom podataka, što omogućuje istraživačima dublje razumijevanje genoma te veću mogućnost otkrivanja novih genetskih varijacija i povezanosti. Uređaji za NGS imaju visoku preciznost u određivanju nukleotidnih slijedova, s malim brojem pogrešaka u usporedbi s drugim metodama. Nadalje, NGS omogućuje duboko sekvenciranje, što znači da se isti dio genoma može sekvencirati više puta, što povećava pouzdanost rezultata (55).

Ključne metode NGS-a uključuju: a) *sekvenciranje gena za 16S rRNA*, b) *shotgun sekvenciranje* i c) *RNA sekvenciranje* (55). Sekvenciranje gena za 16S rRNA najčešće je korištena metoda za analizu bakterijskog sastava u uzorcima. 16S rRNA strukturni je i funkcionalni dio podjedinice ribosoma u prokariotskim stanicama; stoga svaka bakterija ima barem jednu kopiju 16S rRNA gena, dok u eukariotskim stanicama ovaj gen nije prisutan. Sekvenciranjem ovog gena mogu se identificirati prisutne bakterijske vrste i analizirati njihova raznolikost u uzorku. Shotgun sekvenciranje uključuje sekvenciranje svih gena prisutnih u uzorku, bez obzira na njihovu pripadnost određenim organizmima. To omogućuje analizu kompletnog genskog sadržaja uzorka, uključujući gene bakterija, arheja, virusa i drugih mikroorganizama. To je korisno za otkrivanje novih vrsta i potencijalnih funkcija mikroorganizama u uzorku (55). RNA sekvenciranje omogućuje analizu aktivnosti gena u uzorku. To je posebno korisno za razumijevanje genske ekspresije kod mikroorganizama i njihovog utjecaja na funkciju mikrobiote i zdravlje domaćina (55).

NGS je transformirao način na koji znanstvenici pristupaju sekvenciranju genoma i omogućio masovnu analizu genetskih podataka. Prednosti NGS-a uključuju sposobnost identificiranja većeg broja vrsta u usporedbi s tradicionalnim metodama (uzgajanja na kulturi) te mogućnost istovremenog sekvenciranja više uzoraka, što ranije, pomoću starije i manje učinkovite tehnike sekvenciranja (poput Sanger sekvenciranja), nije bilo tehnički izvedivo. Ovaj napredak omogućuje dublje razumijevanje genetske raznolikosti mikroba i njihovih funkcija u ljudskom organizmu. Najpoznatiji projekt istraživanja ljudskog mikrobioma je „Human Microbiome Project“ (HMP). Projektom, koji je započeo 2007. godine, do sada je identificirano tisuće različitih mikrobnih vrsta uključujući bakterije, viruse, gljive i druge mikroorganizme.

Slijedom toga, predstavljen je prvi katalog bakterijskih gena koji pripadaju ljudskom mikrobiomu (56). HMP je istaknuo ključnu ulogu mikrobioma u održavanju zdravlja te naglasio moguće povezanosti disbioze s raznim bolestima, uključujući upalne bolesti crijeva, dijabetes, pretilost, alergije kao i maligne bolesti (56). HMP je istraživao i funkcionalni aspekt mikrobioma, uključujući metaboličke procese i genetske puteve mikroorganizama. Projekt je istaknuo da mikrobiom može biti vrlo individualan i varirati između osoba, što otvara vrata personaliziranim pristupima zdravstvenoj skrbi, temeljenima na sastavu mikrobioma (56). Ovim projektom zakoračilo se u novo, gotovo potpuno neistraženo područje u biomedicini te ne čudi što je danas veliki fokus istraživača upravo na analizi mikrobiote kod raznih bolesnih stanja.

### 1.2.1 Oralna mikrobiota

Usna šupljina predstavlja početak probavnog sustava čovjeka i ulazno mjesto u unutrašnjost ljudskog organizma. Mikrobna zajednica usne šupljine druga je po složenosti u ljudskom tijelu, odmah iza crijevnog mikrobioma. Obuhvaća različite mikrobiološke niše, poput oralne sluznice, jezika, sline, površine zuba, mekog i tvrdog nepca, koji čine bogat i raznolik ekosustav (57). Pritom svaka niša ima različit mikrobni sastav. Oralni mikrobiom sastoji se od više od 1000 vrsta bakterija, virusa, gljiva i protozoa (58). Oralne bakterije glavne su komponente oralne mikrobiote. Do danas je identificirano 774 oralnih bakterijskih vrsta u bazi podataka ljudskog oralnog mikrobioma (engl. *Human Oral Microbiome Database*, HOMD) (59), od kojih je 58% službeno imenovano, 16% je neimenovano ali se mogu kultivirati, dok preostalih 26% nije moguće kultivirati (59). Najzastupljenije bakterijske vrste pripadaju koljenima *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* i *Fusobacteria* (60). Mikroorganizmi koji naseljavaju određenu nišu usne šupljine imaju značajnu vjerojatnost širenja na susjedne epitelne površine i obližnje niše (60). Također, sposobni su proizvoditi veliki broj različitih peptida i polisaharida koji mogu međusobno djelovati s imunskim sustavom domaćina kako bi održali stabilno simbiotsko okruženje i zdravlje organizma (60). Nakon kolonizacije usne šupljine, oralni mikroorganizmi postupno stvaraju stabilne mikrobne zajednice. Međutim, na homeostazu oralnog mikrobioma utječu različiti endogeni i egzogeni čimbenici (uporaba lijekova, pušenje, zdravstveni status i životni stil domaćina, okolišni faktori) koji pritom utječu na sastav, strukturu i metaboličke funkcije oralnih mikroorganizama (61).

Slina ima ključnu ulogu u usnoj šupljini; uz brojne funkcije u probavi hrane, ima važnu ulogu u održavanju homeostaze i obrane od bolesti (62). Slina uvelike utječe na kolonizaciju i uklanjanje mikroorganizama te ima važnu ulogu u fizikalnoj, kemijskoj i imunološkoj obrani usne šupljine (62). Formira zaštitni tekući sloj, koji pomaže u mikrobnom prijanjanju i kolonizaciji (63). Također, sadrži različite obrambene proteine koji su dijelovi imunosnog sustava oralne sluznice, poput imunoglobulina, antimikrobnih peptida (AMP), lizozima,  $\alpha$ -amilaze, mucina, peroksidaze i dr. (62). Slina ima stabilan pH (6.5-7) što je pogodno za većinu bakterijskih vrsta (63). Mikrobni sastav sline uključuje mikroorganizme koji se luče iz različitih oralnih niša te se smatra konglomeratom oralne mikrobiote, odnosno „otiskom“ cijelog oralnog mikrobioma (58).

Dosadašnje studije na različitim populacijama prikazale su različite podatke o najzastupljenijim bakterijskim vrstama u slini (65-67), što sugerira da razlike mogu biti rezultat različitih genetskih, prehrambenih i okolišnih čimbenika (68). Promjene u sastavu salivarnog mikrobioma mogu se koristiti kao biomarker za praćenje prevalencije i prognoze bolesti poput karijesa, oralnog karcinoma i parodontne bolesti te kao uvid u opće zdravstveno stanje (69, 70). Mikrobiota sline ima brojne prednosti: a) relevantni je predstavnik mikrobiote usne šupljine, b) konzistentna je među pojedincima i znatno manje raznolika u odnosu na crijevnu mikrobiotu (71), što omogućava veću dubinu sekvenciranja ovih zajednica, c) uzimanje uzoraka sline predstavlja jeftin i neinvazivan postupak; slina se može brzo prikupiti od ispitanika i odmah sačuvati.

Ravnoteža bakterija i drugih mikroorganizmima koji nastanjuju usnu šupljinu ključna je za zdravlje oralne šupljine. Mikrobne zajednice imaju važnu ulogu u razvoju brojnih bolesti oralne šupljine, uključujući karijes, gingivitis, parodontitis kao i gubitak zuba. *Streptococcus mutans* važna je komponenta oralne mikrobiote; glavni je patogen karijesa (bakterijske infektivne bolesti koja ima najveću incidenciju među oralnim bolestima) (72), a također je, zbog sposobnosti migracije u mitralni zalistak, značajno povezan s endokarditisom kod bolesnika s dentalnim infekcijama i lošom higijenom usne šupljine (48). Također, prema istraživanjima, vrlo važan patogen u usnoj šupljini je *Porphyromonas gingivalis*, ključni patogen u razvoju parodontne bolesti, koji, uz kolonizaciju u parodontnim džepovima, ima mogućnost probijanja mukozne barijere i ulaska u sistemski krvotok. Uz već dobro istraženu povezanost *Porphyromonas gingivalis* sa RA-om (47,48), novija istraživanja povezuju *Porphyromonas gingivalis* sa upalnim bolestima crijeva, a kao predloženi mehanizam navode indukciju CD4+ T limfocita i proupalnih citokina (73). Veća zastupljenost ovog patogena nađena je i kod



dijabetesa, aterosklerotskih bolesti, oralnih karcinoma, karcinoma gušterače i Alzheimerove bolesti (74).

Dakle, osim jasno dokazane veze između oralne mikrobiote i oralnih infekcija (karijesa, paradontitisa, endodontskih infekcija, tonzilitisa), posljednjih godina studije ukazuju na povezanost oralne mikrobiote sa sistemskim bolestima (47,48,50,75,76). Jedan od primjera je povezanost oralne disbioze s dijabetesom. Oralna disbioza kod dijabetičara, osim *Porphyromonas gingivalis* uključuje i veću zastupljenost *Capnocytophaga* te *Tannerella forsythia* (48). Prema nedavnoj studiji, 44.7% bolesnika s dijabetesom tip I te 45-88% bolesnika s dijabetesom tip II ima pridruženu paradontalnu bolest (75). Oralna disbioza povezana je s aterosklerotskim kardiovaskularnim bolestima. Nedavne meta-analize potvrdile su prisutnost i patoloških (*Porphyromonas gingivalis*) i komenzalnih bakterija u aterosklerotskom plaku koje direktnim i indirektnim mehanizmima aktiviraju prirodni i stečeni imunosni sustav, što rezultira razvojem upale (48).

Promjene u sastavu oralne mikrobiote identificirane su i kod drugih bolesti. Li i suradnici prikazali su neravnotežu i smanjenu raznolikost oralne mikrobiote kod bolesnika sa sistemskim eritemskim lupusom (SLE-om) (49). Smanjena produkcija sline i narušena oralna mukozna barijera u bolesnika s Sjögrenovim sindromom (SS-om) rezultiraju promjenama sastava sline, što posljedično uzrokuje promjenu sastava oralnog mikrobioma (50). Kod bolesnika sa SS-om nađene su veće zastupljenosti koljena *Firmicutes*, a manjak *Sporichaeetes*, što može značiti da oralne bakterije imaju utjecaj na imunosni odgovor domaćina (50). Također, istraživanja pokazuju da se sastav oralnog mikrobioma mijenja tijekom trudnoće, što se dovodi u vezu s povećanom prevalencijom gingivitisa u trudnoći. Nedavno istraživanje ukazalo je na značajnu zastupljenost bakterijskih rodova *Neisseria*, *Porphyromonas* i *Treponema* u trudnica (77). Povećana zastupljenost *Porphyromonas gingivalis* povezuje se s preuranjenim porođajima i lošim ishodima trudnoće (78,79).

Sve veći broj studija sugerira da postoji značajna povezanost između oralnog mikrobioma i razvoja RA-a. Predloženi su brojni mehanizmi, između ostalog mehanizmi koji opisuju ulogu oralnih patogena, ponajprije *Porphyromonas gingivalis* u stvaranju citrulina te potom citruliranih proteina, s posljedičnom autoimunom reakcijom i stvaranjem protutijela na citrulinske peptide koja su često prisutna u bolesnika s RA-om (47,76,80). Uz to, oralna disbioza može utjecati na povećanu propusnost crijeva što omogućava apsorpciju u krvotok tvarima koje se obično ne bi smjele apsorbirati, uključujući i citrulin. To može potaknuti

imunوسي odgovor i upalu, što su ključni čimbenici u razvoju RA-a (47,76). Također, promijenjen sastav mikrobiote u usnoj šupljini može izazvati upalu, što može potaknuti imunوسي odgovor (47,76).

Razvoj metagenomike, metaproteomike i metabolomike pružio je sveobuhvatnije razumijevanje mikrobiote usne šupljine. Sve je veći broj dokaza koji sugeriraju da različiti unutarnji i vanjski čimbenici uzrokuju oralnu disbiozu koja značajno doprinosi razvoju oralnih i sistemskih bolesti.

### 1.2.2 Crijevna mikrobiota

Crijevna mikrobiota predstavlja najveći i najraznovrsniji rezervoar mikroorganizama među svim nišama ljudskog tijela. Crijevni mikrobiom je izrazito raznolik, s više od tisuću mikrobnih vrsta koje tvore složenu ekološku zajednicu (81) te oko 150 puta više gena u usporedbi s cijelim ljudskim genomom (82).

Zbog iznimno važne ulogu u održavanju zdravlja ljudskog organizma, crijevni mikrobiom odnedavno je klasificiran kao „vitalni organ“ (82). Među najvažnijim funkcijama crijevnog mikrobioma ističu se sudjelovanje u probavi hrane i metaboličkim procesima, održavanje integriteta crijevnog epitela, sinteza vitamina, zaštita od patogenih organizama, kao i modulacija i održavanje ravnoteže imunosnog sustava (82). Većinu crijevne mikrobiote čine bakterije iz koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, koje sačinjavaju oko 90% ukupne crijevne mikrobiote. U koljeno *Firmicutes* spadaju rodovi *Clostridium*, *Eubacterium*, *Roseburia*, *Ruminococcus* i dr., dok *Bacteroidetes* između ostalog uključuje rodove *Bacteroides* i *Prevotella*. Sljedeća po zastupljenosti su koljena *Proteobacteria* i *Actinobacteria* (83).

Crijevni mikrobiom može varirati zbog faktora poput načina rođenja pojedinca (vaginalan porod ili porod carskim rezom), dobi, okolišnih čimbenika, uporabe lijekova, konzumiranja alkohola, pušenja i sl. Nadalje, crijevni mikrobiom varira u različitim anatomskim dijelovima probavnog sustava. Na primjer, bakterije iz koljena *Proteobacteria* (poput *Enterobacteriaceae*) nalaze se u tankom crijevu, ali ne i u debelom crijevu (84), dok su bakterije iz koljena *Bacteroidetes* (poput *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae* i *Rikenellaceae*) zastupljenije u debelom crijevu. Takve varijacije posljedica su dinamike različitih niša to jest organa. U tankom crijevu protok je brz, a koncentracija žuči visoka, za razliku od debelog crijeva, gdje su brzine protoka sporije i pH vrijednosti blaže, zbog čega je u debelom crijevu veća zastupljenost mikrobnih

zajednica, posebno anaerobnih vrsta (85). Crijevni mikrobiom također varira s dobi. Tako se raznolikost mikrobiote povećava u razdoblju između djetinjstva i odrasle dobi, a smanjuje se u starijoj dobi (u starijih od 70 godina) (86). U dobi od 3 godine, mikrobiota djece postaje slična mikrobioti odraslih, s tri dominantna koljena: *Firmicutes*, *Bacteroidetes* i *Actinobacteria* (87). U mikrobioti starijih ljudi često je smanjena zastupljenost *Bifidobacterium*, a rastu zastupljenosti bakterija iz porodice *Clostridium* i *Proteobacteria* (88). Raznolikost crijevnog mikrobioma uvelike ovisi o različitim čimbenicima domaćina, uključujući genetsku predispoziciju, način života domaćina, dob i okolišne faktore. Prehrana se trenutno smatra jednim od ključnih faktora u reguliranju crijevnog mikrobioma (89).

Činjenica da se 70 - 80% stanica imunskog sustava nalazi u crijevima, govori o važnosti interakcije crijevnog mikrobioma i imunskog sustava (90). Pravilno sazrijevanje imunskog sustava neophodno je za sprječavanje abnormalnih imunskih odgovora koji mogu uzrokovati kroničnu upalu i bolesti (91). Crijevna mikrobiota pridonosi modulaciji i sazrijevanju imunskog sustava te inducira i održava imunotoleranciju (92).

Pri sagledavanju poveznice između crijevnog mikrobioma i imunskog sustava važno je imati u vidu osnovna obilježja imunskog sustava. Imunosni sustav sastoji se od prirodne i stečene imunosti. Prirodni imunski sustav pruža nespecifičnu zaštitu putem različitih obrambenih mehanizama, uključujući fizičku barijeru poput sluznice, kemijske barijere poput enzima i AMP-a te obrambene stanice poput granulocita, makrofaga i stanica prirodnih ubojica, tzv. NK stanica (engl. *natural killer cells*, NK) (93). AMP imaju protuupalno i baktericidno djelovanje, a luče stanice crijevnog epitela. Pojedini mikroorganizmi utječu na pojačano stvaranje AMP-a, stoga je sastav crijevne mikrobiote vrlo važan u održivosti prirodne imunosti (94). Također, AMP igraju važnu obrambenu ulogu u eliminaciji patogena.

Stečeni imunski sustav uključuje staničnu imunost posredovanu T limfocitima te humoralnu imunost posredovanu antitijelima koje stvaraju B limfociti. Stanice stečenog imunskog sustava, T i B limfociti, prepoznaju i reagiraju na specifične strane antigene. T limfociti prepoznaju antigene koji su ušli u stanice domaćina te igraju važnu ulogu u regulaciji funkcije B limfocita koji luče protutijela i proteine koji prepoznaju specifične antigene. Do danas, najrazrađeniji mehanizam djelovanja crijevnog mikrobioma na imunski sustav je putem T limfocita (90,91). Nedavna istraživanja su pokazala da mikrobiota gastrointestinalnog trakta regulira kretanje i ulogu neutrofila te utječe na podjelu populacija T limfocita u različite podtipove T pomoćničkih (Th) stanica (95,96). Smatra se da crijevni mikrobiom može

potaknuti diferencijaciju CD4+ T limfocita u Th1, Th2, Th17 i regulatorne T limfocite (Treg) (95,96). Ovisno o vrstama bakterija, diferencijacija CD4+ T limfocita značajno varira, što dovodi do diferencijacije u različite podtipove T limfocita i naknadnog oslobađanja citokina (90).

Važnu ulogu u održavanju imunotolerancije crijeva imaju kratkolančane masne kiseline (engl. *short-chain fatty acids*, SCFA) to jest masne kiseline koje u svojoj strukturi sadrže manje od 6 ugljikovih atoma. Navedene masne kiseline metabolički su produkti bakterija koji nastaju razgradnjom nerazgradivih prehrambenih vlakana u crijevima, poput rezistentnog škroba, topivih vlakana, fruktooligosaharida te galaktooligosaharida. Najzastupljenije SCFA u crijevima su butirrat, propionat i acetat. SCFA imaju vrlo važnu ulogu u očuvanju zdravlja crijeva; značajan su izvor energije za stanice debelog crijeva, pritom podržavajući njihovu funkciju, pridonose očuvanju integriteta crijevnih sluznica, djeluju kao antioksidansi, imaju sposobnost smanjenja upale u crijevima, mogu utjecati na regulaciju apetita i kontrolu tjelesne mase te imaju ulogu u održavanju optimalnog pH okoliša u crijevima, što može utjecati na rast i aktivnost crijevnih bakterija (97). No, jedna od najvažnijih funkcija SCFA u očuvanju ljudskog zdravlja je sudjelovanje u modulaciji crijevnog imunskog sustava i održavanju ravnoteže između protuupalnih i upalnih procesa. Smatra se da postižu ravnotežu imunskog sustava interakcijom i s prirođenom i sa stečenom imunosti (98-101).

Promjene sastava mikrobiote mogu biti jako značajne za zdravlje, to jest za razvoj bolesti. Disbioza je karakterizirana promjenama u sastavu i funkciji mikrobiote. Prekomjerna uporaba antibiotika, loša higijena, prehrana karakterizirana niskim unosom vlakana te visokim unosom masti i šećera, sjedilački način života, boravak u područjima onečišćenog zraka te različiti toksini mogu poremetiti prirodnu ravnotežu crijevnih bakterija što rezultira disbiozom (40,98). Promjene u sastavu i funkciji crijevnog mikrobioma povezuju se s velikim brojem kroničnih bolesti, uključujući gastrointestinalne, upalne bolesti, metaboličke, kardiovaskularne, autoimune te maligne bolesti (51-54,82,83,90).

Veliki broj istraživanja upućuje na snažnu ulogu disbioze crijevnih mikrobiota u razvoju upalnih bolesti crijeva. Kod bolesnika sa upalnim bolestima crijeva nađena je manja zastupljenost komezalnih bakterija *Firmicutes*, *Actinobacteria* i *Bacteroides*, uz povećanu brojnost patogenih bakterija iz koljena *Proteobacteria* (51). Nadalje, u bolesnika s RA-om smanjena je raznolikost crijevnih mikrobiota, što korelira sa pozitivnim specifičnim protutijelima u serumu tih bolesnika. U mikrobioti bolesnika s RA-om zabilježena je veća zastupljenost bakterijskog

roda *Prevotella*, dok je *Fusobacterium* snižen (103,104). Razna istraživanja povezuju disbiozu crijevnog mikrobioma s dijabetesom tipa I (52,102). U mikrobiomu tih bolesnika detektiran je veći broj bakterija iz roda *Bacteroides* te smanjen broj bakterija koje stvaraju SCFA kao što je *Faecalibacterium prausnitzii* (52,102). Nadalje, smanjena zastupljenost bakterija koje stvaraju SCFA u crijevima dovodi se u vezu s razvojem hipertenzije (53). Također, sve je veći broj istraživanja koja sugeriraju da disbioza, ili pak promjene u zastupljenosti pojedinih bakterija, igraju ulogu i u razvoju malignih bolesti, ponajprije gastrointestinalnih karcinoma (105).

Posljednjih godina postignut je značajan napredak u razumijevanju crijevne mikrobiote i njene uloge u održavanju homeostaze, uz istovremeno istraživanje uloge disbioze u patogenezi različitih bolesti. Analize mikrobiote, ne samo da su rasvijetlile složenost interakcije mikroorganizama s ljudskim organizmom, već su i identificirale nove biomarkere koji bi mogli poslužiti kao temelj za razvoj specifičnih dijagnostičkih metoda i ciljanih terapijskih pristupa. Takva istraživanja otvaraju vrata novim saznanjima o povezanosti crijevne mikrobiote s bolestima, pružajući perspektivu za razvoj personaliziranih dijagnostičkih alata i inovativnih terapija.

### **1.2.3 Povezanost mikrobiote i kronične spontane urtikarije – dosadašnje spoznaje**

U posljednje vrijeme, sve više istraživanja analizira promjene u sastavu crijevne mikrobiote kod bolesnika s upalnim kožnim bolestima, poput psorijaze, alergijskih bolesti i akni (106). Također, pojedina su istraživanja analizirala crijevni mikrobiom kod bolesnika s KSU-om (107-113). Sva navedena istraživanja karakterizira uključivanje relativno malog broja ispitanika. Većina studija koristila je sekvenciranje gena za 16S rRNA iz uzorka fecesa kao glavnu metodu analize, dok je jedna studija primijenila lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real time-polymerase chain reaction, qPCR*), za detekciju specifičnih bakterijskih vrsta (109). Iako navedena istraživanja sugeriraju promjene u sastavu i raznolikosti crijevnog mikrobioma te razlike u zastupljenosti određenih bakterija, rezultati su nekonzistentni.

S obzirom da je KSU dominantno autoimuna bolest, smatra se da bi promjene u crijevnoj mikrobioti mogle doprinijeti gubitku imunotolerancije. Moguće je da promjene u crijevnom mikrobiomu utječu na gubitak ravnoteže između Th1, Th2, Th17 citokina i supresiju Treg limfocita te na taj način pridonose razvoju upale u patogenezi KSU-e (114). Istraživanje u ovom području ukazalo je na dosad neprepoznatu ulogu proupalnih Th17 limfocita i

neravnotežu između njih i Treg limfocita. U serumu bolesnika s KSU-om nađene su snižene vrijednosti Treg limfocita i povišene vrijednosti IL-17, kojeg otpuštaju Th17 limfociti (20). Nadalje, Atwa i suradnici ukazali su da povišeni proupalni citokini, uključujući IL-17, IL-23 i TNF- $\alpha$ , igraju važnu ulogu u patogenezi KSU-e (115). Povećane razine ovih citokina povezane su s težim simptomima i većom aktivnosti bolesti. Također, terapijska važnost Th17 puta u KSU-i potvrđena je učinkovitošću inhibitora IL-17 $\alpha$  u sprječavanju degranulacije mastocita (115). Smanjen broj Treg limfocita u krvi bolesnika s KSU-om sugerira da nedostatak kontrole nad imunskim odgovorima može doprinijeti razvoju urtikarije (116,117). Međutim, točni mehanizmi ovih imunskih zbivanja do sada nisu razjašnjeni.

Liu i suradnici u svom su istraživanju pokazali sniženu alfa raznolikost (raznolikost unutar ispitivane skupine) kod bolesnika s KSU-om u usporedbi sa zdravim ispitanicima; također značajna je i raznolikost između ispitivanih skupina (beta raznolikost). Na razini koljena, zastupljenost bakterija *Firmicutes* bila je snižena, dok su *Fusobacteriae* bile relativno više zastupljene u odnosu na kontrolnu skupinu (111). Sniženu zastupljenost koljena *Firmicutes* u bolesnika s KSU-om prikazao je i Wang, koji je također identificirao i sniženu raznolikost mikrobioma među bolesnicima (108). Drugo pak istraživanje pokazalo je relativno veću zastupljenost koljena *Firmicutes* u bolesnika s KSU-om, u odnosu na zdrave ispitanike. Međutim, to istraživanje nije pokazalo smanjenu raznolikost unutar skupine bolesnika, dok je između dvije ispitivane skupine dokazana raznolikost u sastavu mikrobioma (beta raznolikost) (112). Lu i suradnici prikazali su značajno sniženu zastupljenost bakterija iz koljena *Bacteroidetes* u bolesnika s kroničnom urtikarijom, dok su bakterije iz koljena *Actinobacteria* i *Proteobacteria* bile brojnije u skupini bolesnika u odnosu na zdrave kontrole (107). Također, Zhang i suradnici ukazali su na značajno veću zastupljenost koljena *Proteobacteria* u bolesnika s KSU-om (110). Istraživanje nije evidentiralo smanjenu raznolikost u bolesnika s KSU-om, dok su razlike u beta raznolikosti između bolesnika s KSU-om i zdravih ispitanika bile značajne. Wang i suradnici u svom su istraživanju doveli u vezu smanjen broj bakterija iz roda *Ruminococcae* sa smanjenim brojem i funkcijom Treg limfocita, što upućuje da smanjen broj specifičnih bakterija u crijevima može narušiti funkciju Treg limfocita i time pridonijeti razvoju KSU-e (108). Liu i suradnici također su u svom istraživanju prikazali sniženu relativnu zastupljenost bakterija iz porodice *Ruminococcae*, uključujući *Butyricoccus* i *Faecalibacterium*, dok su *Enterobacteriaceae* nađene u većem broju u bolesnika s KSU-om u odnosu na zdrave kontrole (111). Isto tako, našli su značajno sniženu zastupljenost bakterija iz roda *Ruminococcus* i *Subdoligranulum* koje proizvode SCFA (111). Smanjen broj

*Ruminococcus* bakterija u svom su istraživanju prikazali i Wang i suradnici (112). Dosadašnja istraživanja pokazuju da SCFA potiču funkciju Treg limfocita, koji pak suprimiraju upalne odgovore posredovane Th1/Th2/Th17 limfocitima (98-101). Stoga, autori sugeriraju da je u bolesnika sa smanjenom zastupljenošću bakterija koje proizvode SCFA oslabljena funkcija Treg limfocita, što može pojačati aktivaciju Th2 stanica i stvaranje proupalnih citokina, poput IL-4, koji zajedno s proupalnim citokinima IL-5 i IL-13 potiču stvaranje IgE protutijela i aktivaciju mastocita (108,111).

Prema našim saznanjima i prema podacima dostupnima iz literature, do sada nisu izvođene analize salivarne mikrobiote kod bolesnika s KSU-om. U našem preliminarnom istraživanju na 10 bolesnika s KSU-om i 13 zdravih ispitanika, metodom terminalnog polimorfizma dužine restrikcijskih fragmenata (engl. *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*, TRLFP) nađena je smanjena raznolikost salivarne mikrobiote kod bolesnika s KSU-om u usporedbi sa zdravim ispitanicima (118). No, radi se o manje preciznoj metodi u odnosu na NGS, koja se temelji na sekvenciranju DNA koja je prethodno fragmentirana restrikcijskim enzimima.

Uvidom u istraživanja o povezanosti oralne mikrobiote i sistemskih bolesti, različita istraživanja pokazala su nekonzistentne podatke o raznolikosti oralne mikrobiote i zastupljenosti bakterija, uključujući bakterije iz koljena *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Fuscobacteria*, zatim iz roda *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Hemophilus*, *Neisseriae*, *Capnocytophaga*, *Actinobacteria*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* i sl. (47-50,71-79).

Dakle, unatoč različitim podacima o raznolikosti i zastupljenosti pojedinih bakterija, neosporna je činjenica o povezanosti disbioze mikrobioma s brojnim bolestima. Vjerojatno će buduća istraživanja identificirati pojedine bakterijske rodove ili vrste i njihove metaboličke funkcije kao važne čimbenike u etiopatogenezi određenih bolesti, neovisno o promjenama u cjelokupnoj raznolikosti mikrobiote; time će se dodatno naglasiti specifične uloge određenih bakterija u razvoju pojedinih bolesti.

## **2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA**



## **2.1 Svrha**

Utvrđiti razlike u sastavu salivarne i crijevne mikrobiote između bolesnika s KSU-om i zdravih ispitanika.

## **2.2 Hipoteze**

1. Sastav salivarne mikrobiote razlikuje se između bolesnika s KSU-om i zdravih kontrola.
2. Sastav crijevne mikrobiote razlikuje se između bolesnika s KSU-om i zdravih kontrola.

## **2.3 Ciljevi**

1. određivanje sastava salivarne i crijevne mikrobiote kod svih ispitanika
2. usporedba sastava salivarne i crijevne mikrobiote između bolesnika s KSU-om i zdravih ispitanika
3. ispitivanje povezanosti sastava salivarne i crijevne mikrobiote u bolesnika s KSU-om i u zdravih ispitanika

### **3. ISPITANICI I POSTUPCI**

Istraživanje parova (engl. *case-control*) provedeno je u razdoblju od listopada 2020. godine do ožujka 2022. godine na Klinici za kožne i spolne bolesti KBC Sestre milosrdnice, Institutu Ruđer Bošković te Hrvatskom veterinarskom institutu. Odobreno je od strane Etičkog povjerenstva KBC-a Sestre milosrdnice te od strane Etičkog povjerenstva Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

### 3.1 Ispitanici

Istraživanje je uključilo 45 ispitanika, 22 bolesnika s KSU-om i 23 zdrava ispitanika. Svi sudionici potpisali su informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju, nakon što im je detaljno objašnjena svrha i plan istraživanja. Dijagnoza KSU-e postavljena je prema EAACI/GA<sup>2</sup>LEN/EDF/WAO smjericama (kronična urtikarija koja traje duže od šest tjedana bez identificiranog uzroka) (1). Također, svi ispitanici su prije uključjenja u istraživanje pregledani od strane nadležnog doktora dentalne medicine u svrhu isključenja parodontne bolesti, oralnih infekcija i drugih upalnih procesa, oralnih ulkusa i karcinoma. Ispitanici s određenim stanjima koja bi mogla utjecati na sastav salivarne i crijevne mikrobiote isključeni su iz daljnjeg istraživanja. Kriteriji uključjenja i isključenja prikazani su u Tablici 2.

**Tablica 2.** Kriteriji uključjenja i isključenja za sudjelovanje u istraživanju

Kriteriji uključjenja	Kriteriji isključenja
<ul style="list-style-type: none"> <li>ispitanici u dobi iznad 18 godina</li> <li>potpisan informirani pristanak</li> <li>bolesnici s dijagnosticiranom kroničnom spontanom urtikarijom po EAACI/GA<sup>2</sup>LEN/EDF/WAO smjericama</li> <li>ispitanici koji tijekom prethodna 3 mjeseca nisu bili na terapiji antibioticima</li> <li>ispitanici koji puše manje od 5 cigareta dnevno</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ispitanici mlađi od 18 godina</li> <li>ispitanici koji puše 5 i više cigareta dnevno</li> <li>sudionice s potvrđenom trudnoćom</li> <li>bolesnici s Chronovom bolesti, ulceroznim kolitisom, sindromom iritabilnog kolona</li> <li>bolesnici s dijabetesom tip I i II i pretili ispitanici</li> <li>bolesnici s parodontitisom</li> <li>bolesnici s kroničnom bubrežnom insuficijencijom</li> <li>bolesnici s malignim bolestima</li> <li>bolesnici s drugim autoimunim bolestima</li> <li>bolesnici s težim psihijatrijskim bolestima i bolestima ovisnosti</li> <li>ispitanici koji su konzumirali veće doze komercijalnih probiotika u prethodnih mjesec dana</li> </ul>

Po uključenju u istraživanje, bolesnici su detaljno anamnestički ispitani i pregledani od strane dermatovenerologa - alergologa. Potom su im dodijeljena dva upitnika, za koje su dobili detaljne upute o ispunjavanju: 1) UAS7 upitnik za procjenu aktivnosti bolesti (mjerni instrument koji prati broj urtika i intenzitet svrbeža tijekom sedam dana) (27-29) te 2) CU-Q2oL upitnik za procjenu kvalitete života bolesnika s kroničnom urtikarijom (31-33). Zatim je uslijedilo uzimanje uzoraka.

### 3.2 Uzimanje uzoraka sline

Svi ispitanici dobili su pisane i usmene upute o pravilnom sakupljanju uzoraka sline. Ispitanici su zamoljeni da dva sata prije sakupljanja sline ne konzumiraju hranu te da pri sakupljanju slijede upute proizvođača komercijalnog seta za sakupljanje sline (OMNIgene ORAL OM-501, DNA Genotek, Ottawa, Kanada). Slina se sakupljala u plastične epruvete s dodatkom pufera, pri čemu proizvođač jamči očuvanje sastava mikrobiote i do 60 dana nakon uzorkovanja (Slika 4). Epruvete sa prikupljenom slinom pohranjivale su se u zamrzivaču (-80 °C) do izolacije DNA.



**Slika 4.** Komercijalni set za sakupljanje sline

### 3.3 Uzimanje uzoraka fecesa

Svi ispitanici dobili su upute o pravilnom sakupljanju uzoraka fecesa. Uzorci su prikupljeni kod kuće. Ispitanici su zamoljeni da slijede detaljne upute proizvođača komercijalnog seta za

sakupljanje fecesa i špatulom prenesu potrebnu količinu fecesa u epruvete s puferom (OMNIGene GUT OM-200, DNA Genotek, Ottawa, Kanada) (Slika 5). Proizvođač jamči očuvan sastav mikrobiote, bez utjecaja na količinu ili kvalitetu DNA, na sobnoj temperaturi i do 60 dana nakon uzorkovanja. Uzorci su nakon uzimanja pohranjeni u hladnjaku (4°C - 8°C), a potom su unutar 7 dana dostavljeni na Kliniku za kožne i spolne bolesti KBC-a Sestre milosrdnice te pohranjeni u zamrzivač (-80 °C) do izolacije DNA.



Slika 5. Komercijalni set za sakupljanje fecesa

### 3.4 Uzimanje uzoraka krvi

Kod bolesnika su uzeti uzorci krvi te su u Biokemijskom laboratoriju KBC-a Sestre milosrdnice analizirani sljedeći parametri: CRP, SE, KKS, DKS, TSH, anti-TPO, antiTg, ukupni IgE, vitamin D, ANA.

### 3.5 Izolacija DNA

Izolacija DNA izvršena je u Zavodu za Molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković. Mikrobn DNA iz fecesa i sline izolirana je koristeći komercijalni set za izolaciju DNA ZymoBIOMICS DNA Miniprep 4300 (Zymo Research, Irvine, Kalifornija, SAD). Komercijalni set se sastoji od reagensa koji su pažljivo razvijeni za razbijanje stanica (pružajući zaštitu nukleinskim kiselinama nakon razgradnje stanica) te olakšavaju izolaciju DNA iz sline i stolice. Prema uputama proizvođača, 250 µl stolice ili sline i 750 µl otopine ZymoBIOMICS Lysis Solution stavljeno je u plastične mikroeprovete (ZR Bashing Bead Lysis Tubes) i homogenizirano uređajem FastPrep FP120 Cell Disrupter (Thermo Electron

Corporation, Milford, Massachusetts, SAD) dvaput po 20 s, s pauzom od 30 s između, na brzini 4. Nakon homogenizacije, mikroeprevete su centrifugirane 1 min na 10 000 x g, nakon čega je 400 µl supernatanta prebačeno na kolonu za filtriranje (Zymo-SPIN III-F Filter) koja se nalazi u mikroeprevati za skupljanje uzoraka (Collection Tube), koja je zatim centrifugirana 1 min na 8000 x g. Kolona za filtriranje je bačena, a u mikroeprevetu za skupljanje uzorka je dodano 1200 µl pufera za vezanje DNA (Zymo Biomics DNA Binding Buffer) i potom dobro promiješano. 800 µl mješavine prebačeno je u kolonu za pročišćavanje (Zymo-Spin IICR Column) koja se nalazi u mikroepreveti za sakupljanje uzorka i centrifugirano 1 min na 10 000 x g. Nakon centrifugiranja filtrat je bačen, a kolona za pročišćavanje je vraćena u mikroeprevetu za sakupljanje uzorka te je cijeli postupak ponovljen s preostalim 800 µl mješavine prikupljene u prethodnom koraku. Nakon centrifugiranja, filtrat je bačen, a na kolonu za pročišćavanje dodano je 400 µl pufera za pročišćavanje DNA 1 (ZymoBIOMICS DNA Wash Buffer 1). Kolona je centrifugirana 1 min na 10 000 x g nakon čega je filtrat bačen, a na kolonu je dodano 700 µl pufera za pročišćavanje DNA 2 (ZymoBIOMICS DNA Wash Buffer 2). Kolona je centrifugirana 1 min na 10 000 x g, nakon čega je filtrat bačen, a na kolonu je dodano novih 200 µl pufera za pročišćavanje DNA 2 (ZymoBIOMICS DNA Wash Buffer 2) te je kolona ponovno centrifugirana 1 min na 10 000 x g. Nakon toga, kolona za pročišćavanje DNA prebačena je u čistu plastičnu mikroeprevetu te je na kolonu dodano 50 µl vode bez DNaza i RNaza (ZymoBIOMICS DNase/RNase Free Water). Kolona je centrifugirana 1 min na 10 000 x g, nakon čega je kolona bačena, a otopljenoj izoliranoj DNA određena je čistoća i koncentracija pomoću spektrofotometra NanoPhotometer N50/N60 (Implen, München, Njemačka) nakon čega je pohranjena na -20 °C do daljnjeg korištenja.

Prije pripreme biblioteke za sekvenciranje dijelova gena koji kodiraju za bakterijsku 16S rRNA, potrebno je precizno odrediti koncentraciju izolirane DNA. To je ključan korak prije postupka samog sekvenciranja budući da je optimalna količina DNA koja se koristi u pripremi biblioteke za sekvenciranje jedan od značajnijih parametara za postizanje kvalitetnih rezultata. Koncentracija DNA mjerena je na aparatu Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) koristeći komercijalni set Qubit 1X dsDNA High Sensitivity (HS) Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Na plastičnoj pločici s 96 jažica napravljene su radne otopine uzoraka DNA od 5 ng/µl što služi za pripremu biblioteke za sekvenciranje. Jažice s DNA koncentracijom od 5 ng/µl korištene su za pripremu biblioteke za sekvenciranje.

### 3.6 Sekvenciranje nove generacije

Sekvenciranje nove generacije (NGS) provedeno je u Hrvatskom veterinarskom institutu. Bakterijska DNA iz uzoraka fecesa i sline analizirana je sekvenciranjem gena za 16S rRNA na Illumina MiSeq uređaju, pri čemu je korišten komercijalni set Nextera XT Index Kit v.2 set A (Illumina, San Diego, Kalifornija, SAD).

Prvi korak predstavlja **priprema biblioteka 16S rRNA**. Za umnažanje V3-V4 varijabilnih regija gena 16S rRNA korištena je lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), pomoću početnica koje na sebi, osim dijelova koji se preklapaju s regijom V3-V4, sadrže i dijelove kompatibilne s Illumina indeksima i adapterima za sekvenciranje. To omogućuje sekvenciranja s oba kraja, a dobiveni produkt je ampikon od oko 500 parova baza. PCR umnažanje provedeno je pomoću početnica i KAPA HiFI HotStart Ready Mix polimeraze (Kapa Biosystems Inc., Wilmington, Massachusetts, SAD). U svaku jažicu PCR ploče otpipetirano je 12,5 µl KAPA HiFI HotStart Ready Mix polimeraze te dodano 5 µl svake početnice. Potom je u jažice dodano 2,5 µl izolirane DNA. U jažicu označenu H20 dodano je 1 µl sterilne ultra čiste vode (Qiagen, Düsseldorf, Njemačka) (negativna kontrola 1), u jažicu označenu TE dodano je 1 µl Tris pufera (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) (negativna kontrola 2). U jažice označene MOCK1 i MOCK 2 otpipetirano je 0,5 µl pozitivne kontrole ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard (Zymo Research, Irvine, Kalifornija, SAD). Potom je ploča prekrivena folijom i nakon centrifugiranja stavljena u termokružnik (Tprofessional Basic, Biometra) nakon čega slijede ciklusi po protokolu: 1) denaturacija, 95°C, 3 min, 2) 25 ciklusa po protokolu: 95°C, 30 s; 55°C, 30s; 72°C, 30 s, potom 3) 72°C, 5 minuta, zatim 4) zadržavanje na 4°C. Za provjeru dobivenih produkata izabrano je 12 nasumičnih uzoraka; 5 µl uzorka promiješano je sa 3 µl boje za nanošenje uzoraka. Elektroforeza je rađena na 1,5% gelu agaroze, 30 min na 100 V. Pod UV svjetlom transiluminatora provjerena je veličina fragmenata koja je iznosila oko 500 parova baza.

Nakon toga slijedi **pročišćavanje umnoženih produkata**. PCR ploča s ampikonima centrifugirana je 1 min na 1000 x g. Potom je priređen 80% -tni etanol. Brzo miješanje MagSi-NGS<sup>PREP</sup> Plus magnetnih kuglica (Magtivno, Nizozemska) izvršeno je 30 s u vortex mješalici. Pomoću multikanalne pipete, 20 µl kuglica dodano je u svaku jažicu ploče, a potom 10 puta nježno pomiješano pipetiranjem, nakon čega slijedi inkubacija na sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta. Potom se ploča stavlja na magnetni stalak i inkubira 2 min. Supernatant je odbačen, a dodano je 200 µl 80%-tnog etanola te je postupak još jednom ponavljen. Zatim je u svaku

jažicu dodano 52,5  $\mu$ l Tris pufera, 10 puta nježno promiješano pipetiranjem i inkubirano 2 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga slijedilo je prebacivanje 50  $\mu$ l sadržaja iz svake jažice u novu PCR ploču.

U sljedećem koraku, na pročišćene amplikone dodaju se Illumina index početnice I7 i I5 što rezultira stvaranjem biblioteka. Iz ploče s pročišćenim PCR produktima multikanalnom pipetom prebačeno je 5  $\mu$ l sadržaja iz svake jažice u novu PCR ploču sa 96 jažica. Zatim su dodane početnice I7 i I5, a potom je multikanalnom pipetom dodano 10  $\mu$ l vode i 25  $\mu$ l Kapa HiFi DNA polimeraze u svaku jažicu te promiješano 10 puta pipetiranjem. Ploču smo prekrili folijom i uslijedili su ciklusi u termokružniku po protokolu: 1) 95 °C, 3min, 2) 8 ciklusa po protokolu: 95°C, 30 s; 55°C, 30 s; 72°C, 30 s 3) 72°C, 5 min, 4) zadržavanje na 4 °C.

Potom slijedi pročišćavanje umnoženih produkata. Cjelokupni volumen biblioteka ponovno je pročišćen po protoklu kako je ranije opisano, a konačni volumen pročišćenih biblioteka je 25  $\mu$ l. Dobiveni produkti provjereni su PCR reakcijom na gelu agaroze (istim protokolom kako je opisano ranije); u ovom koraku veličina fragmenta je nešto veća te iznosi oko 630 parova baza.

**Koncentracije biblioteka** mjerene su korištenjem Qubit dsDNA HS assay komercijalnog kita na Qubit 4.0 uređaju (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Zatim je svaka biblioteka razrijeđena s Tris puferom na 4 mM. Od svake razrijeđene biblioteke uzeto je 5  $\mu$ l (engl. *aliquot*) i pomiješano u zajedničku, tzv. puliranu biblioteku (engl. *pooled library*).

Zadnji korak prije početka sekvenciranja je **finalno razrjeđivanje**. Pulirana biblioteka denaturirana je sa svježe pripremljenim 0,2N NaOH te je napravljeno konačno razrjeđenje (2 pikomolarna biblioteka) miješanjem 480  $\mu$ l pripravljene 20 pM biblioteke sa 480  $\mu$ l HT1. Isti postupak napravljen je s pripremljenim PhiX Control v3 (kontrolna biblioteka, unutarnja kontrola sekvenciranja) (Illumina, San Diego, Kalifornija, SAD). Prisutnost PhiX Control v3 omogućuje praćenje kvalitete sekvenciranja. U konačnici je razrijeđena biblioteka pomiješana s PhiX Control v3 te je u finalnoj biblioteci bilo 15% Phix Control v3. Kombinirana biblioteka inkubirana je na 96°C, 2 min. Nakon inkubacije sadržaj mikroeprevete je promiješan te stavljen u posudu s ledom 5 min. Potom je cjelokupan sadržaj mikroeprevete otpipetiran u spremnik reagensa (engl. *reagent cartridge*) na kojemu postoji posebna pozicija označena kao „Load Sample“, a spremnik je postavljen u MiSeq uređaj. Prije početka sekvenciranja uređaj je kalibriran kako bi se osigurala preciznost i točnost rezultata. Reakcija sekvenciranja je provedena upotrebom kompleta MiSeq Reagent Kit v3.



### 3.7 Bioinformatička analiza

Za analizu rezultata sekvenciranja gena za 16S rRNA korištena je bioinformatička platforma QIIME 2 (119). Alfa raznolikost (kompozicijska raznolikost unutar svakog uzorka, uključujući bogatstvo i ravnotežu) analizirana je pomoću indeksa raznolikosti: Chao 1, Evenness i Shannon. Za određivanje beta raznolikosti (raznolikost između uzoraka) korištena je Jaccardova udaljenost i neotežana Unifrac (engl. *Unweighted Unifrac*) mjera koje pri određivanju udaljenosti među uzorcima uzimaju u obzir zastupljenost pojedinih taksonomskih jedinica. Za identifikaciju statistički značajnih razlika u relativnoj zastupljenosti bakterija na različitim nivoima u crijevnom i salivarnom mikrobiomu između KSU bolesnika i zdravih ispitanika izvedena je analiza efekta linearnog diskriminacijskog faktora (engl. *Linear discriminant analysis*, LDA), tj. analiza LEfSe (engl. *Linear discriminant analysis Effect Size*) (120). Samo one LDA vrijednosti veće od 2 i p-vrijednosti manje od 0,05 smatrale su se statistički značajnima.

Multivarijantna analiza MaAsLin 2 korištena je za ispitivanje povezanosti mikrobiote sa kliničkim parametrima (121). Za ispitivanje korelacije sastava salivarne i crijevne mikrobiote u pojedinog ispitanika korišten je računalni program Source Tracker (122). Rezultati analize Source Trackerom prikazuju koliki je udio svakog izvora mikrobioma u ciljanom uzorku. Povezanost mikrobiote s težinom bolesti (mjerenom UAS7 upitnikom) i kvalitetom života bolesnika s KSU-om (mjerenom CU-Q2oL upitnikom) ispitana je Spearmanovom korelacijom.

### 3.8 Statistička analiza

Normalnost kontinuiranih podataka testirali smo korištenjem D'Agostino-Pearsonovog testa. Podaci koji ne slijede normalnu distribuciju prikazani su medijanom i rasponom vrijednosti. Kategorički podaci prikazani su kao broj uzoraka i postotak. Mann–Whitneyev test korišten je za testiranje razlika između dviju skupina kontinuiranih podataka, dok je hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) test korišten za testiranje povezanosti između kategoričkih varijabli. Korelacija između kontinuiranih i nominalnih vrijednosti određena je računanjem Spearmanovog koeficijenta korelacije rangova ( $\rho$ ). Dijagnostička vrijednost zastupljenosti određenih bakterija određena je računanjem površine ispod ROC (engl. *Receiver Operating Characteristic*) krivulje (engl. *Area Under Curve*, AUC) (123).

Statistička analiza izvedena je pomoću MedCalc v20.218 (MedCalc Software, Ostend, Belgija) i programskog jezika R v3.4.4 (R Foundation for Statistical Computing, Beč, Austrija). Dvosmjerne p-vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima.

## **4. REZULTATI**

Istraživanje je uključilo 45 ispitanika, među kojima su bila 22 bolesnika s dijagnozom KSU-e te 23 zdrava ispitanika. Ispitivane skupine nisu pokazale statistički značajne razlike u dobi i spolu. Osnovne informacije o demografskim i kliničkim podacima uključenih ispitanika sažete su u Tablicama 3-5. U 50% bolesnika s KSU-om nađene su povišene vrijednosti anti-TPO. Utvrdili smo statistički značajnu povezanost povišenih anti-TPO sa sniženim ukupnim Ige ( $p=0,009$ ). Također, u nešto više od 2/3 bolesnika, detektirane su snižene serumske vrijednosti vitamina D.

**Tablica 3.** Dobne i spolne karakteristike uključenih ispitanika

Varijabla	KSU bolesnici ( $N_{UKUPNO}=22$ )	Zdravi ispitanici ( $N_{UKUPNO}=23$ )	p-vrijednost
<b>Dob, medijan</b> (min-max)	42 (20 – 73)	40 (19 – 74)	0,928
<b>Spol</b>			
Muškarci	6 (27,3%)	7 (30,4%)	0,817
Žene	16 (72,7%)	16 (69,6%)	

**Tablica 4.** Klinički parametri bolesnika s KSU-om

Varijabla	KSU bolesnici ( $N_{UKUPNO}=22$ ) [N (%)]
<b>Trajanje bolesti</b>	
<i>6 tjedana – 5 mjeseci</i>	15 (68%)
<i>6 mjeseci-12 mjeseci</i>	7 (32%)
<b>Pojava urtika</b>	
<i>svakodnevno</i>	13 (59%)
<i>2-4 puta tjedno</i>	8 (36%)
<i>jednom tjedno</i>	1 (5%)
<b>Pridružen angioedem</b>	7(32%)
<b>Pridružene atopijske bolesti</b>	7(32%)
<b>UAS7 (broj urtika + intenzitet svrbeža)</b>	
<i>0-6 (dobro kontrolirana bolest)</i>	5 (23%)
<i>7-15 (blaga bolest)</i>	3 (14%)
<i>16-27 (umjerena bolest)</i>	10 (45%)
<i>28-42 (teška bolest)</i>	4 (18%)
<b>Cu-Q2oL (utjecaj urtikarije na kvalitetu života)</b>	
<i>nema utjecaj</i>	0 (0%)
<i>mali utjecaj</i>	2 (9%)
<i>umjeren utjecaj</i>	7 (32%)
<i>veliki utjecaj</i>	9 (41%)
<i>iznimno veliki utjecaj</i>	4 (18%)

**Tablica 5.** Laboratorijski parametri bolesnika s KSU-om

Varijabla	KSU bolesnici; N <sub>UKUPNO</sub> =22 [N (%)]
Povišen CRP	7 (32%)
Povišena SE	7 (32%)
Povišen anti-Tg	6 (27%)
Povišen anti-TPO	11 (50%)
Snižen vitamin D	15 (68%)
Povišen IgE	9 (41%)

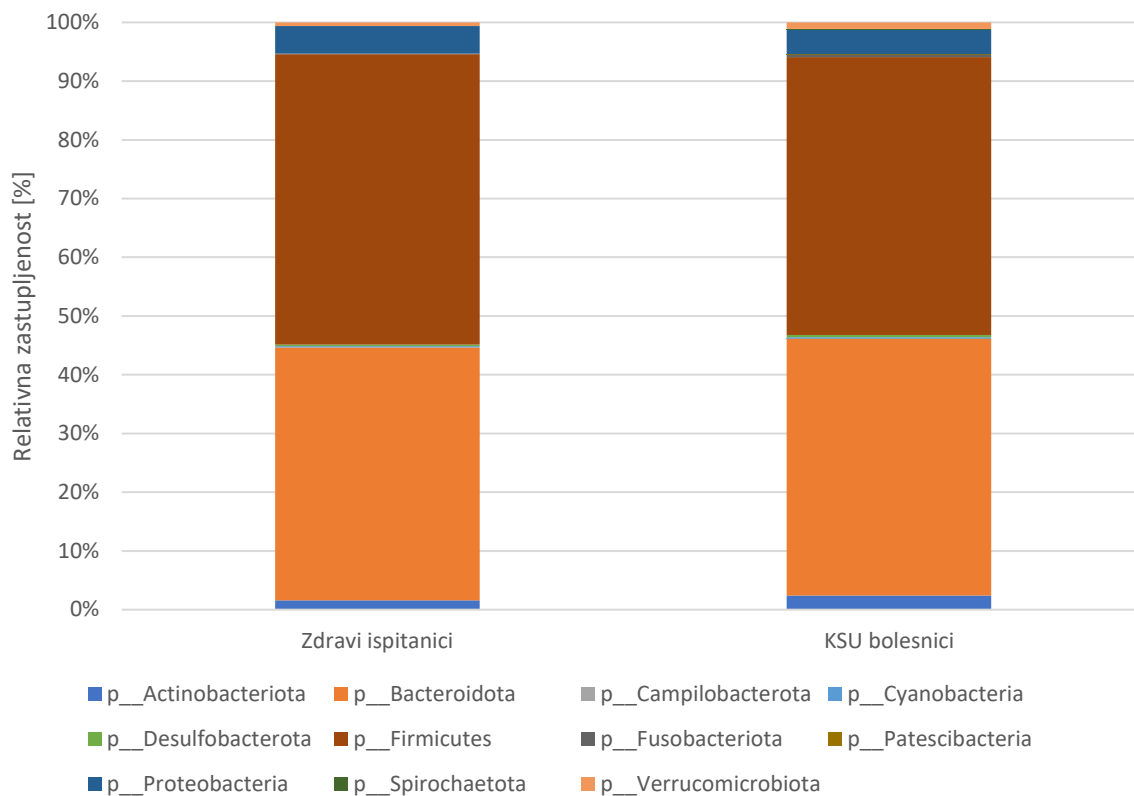
## 4.1 Analiza sastava mikrobiote fecesa

### 4.1.1 Taksonomska analiza

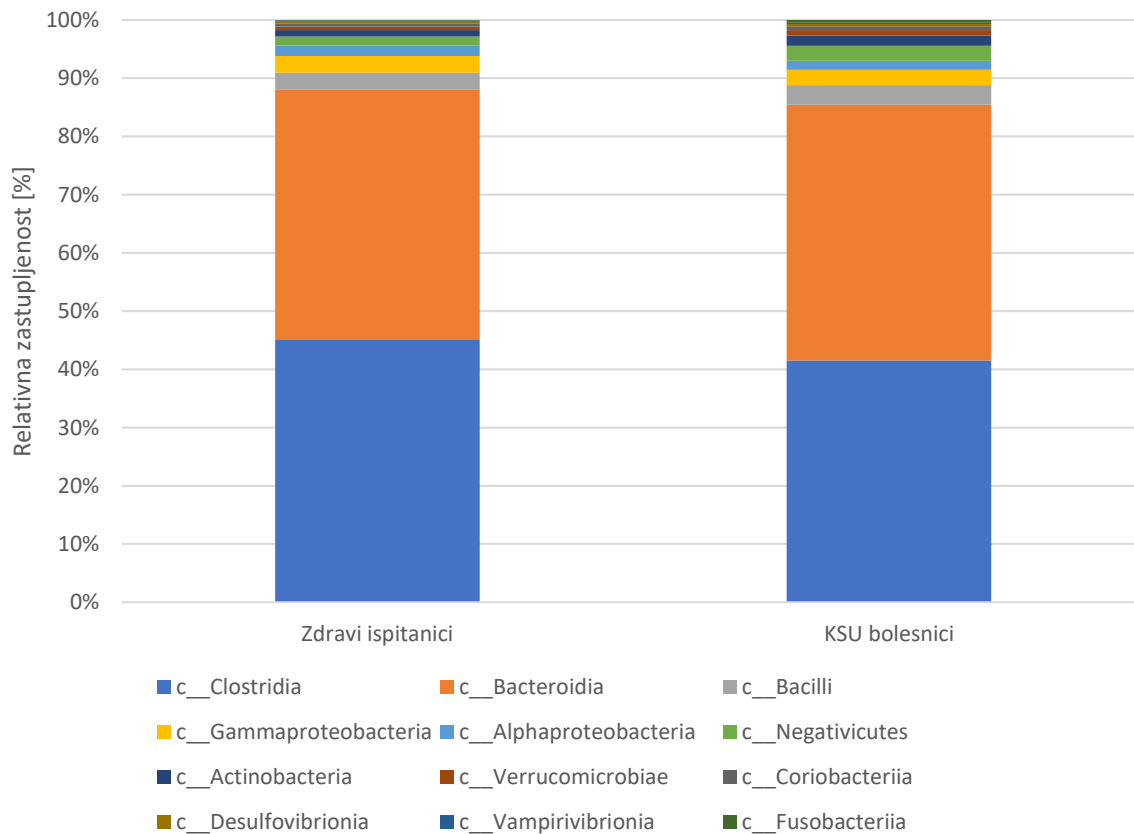
Nakon kontrole kvalitete sekvenci (produkata sekvenciranja), izolirano je ukupno 3,633,362 sekvenci iz uzoraka fecesa u 45 ispitanika, u prosjeku 80,741 sekvenca po uzorku. Analizirali smo bakterijske sastave i relativne zastupljenosti pojedinih taksonomskih vrsta na različitim taksonomskim razinama.

Na razini koljena, u obje ispitivane skupine najveću zastupljenost imala su koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes*. Bakterije iz koljena *Firmicutes* bile su zastupljenije u kontrolnoj skupini (medijan=49,4%) u odnosu na KSU skupinu (medijan=47,3%), dok su *Bacteroidetes* bile podjednako zastupljene u obje skupine (medijan=43,0% u kontrolnoj skupini, 43,7% u KSU skupini). Sljedeća po udjelu bila su koljena *Proteobacteria* i *Actinobacteria*, pri čemu su ta 4 koljena sačinjavala 98,7% crijevne mikrobiote zdravih ispitanika, odnosno 97,6% crijevne mikrobiote u bolesnika s KSU-om. Relativne zastupljenosti taksona na razini koljena, razreda, porodice i roda prikazane su pomoću stupičastih dijagrama (Slike 6-9).

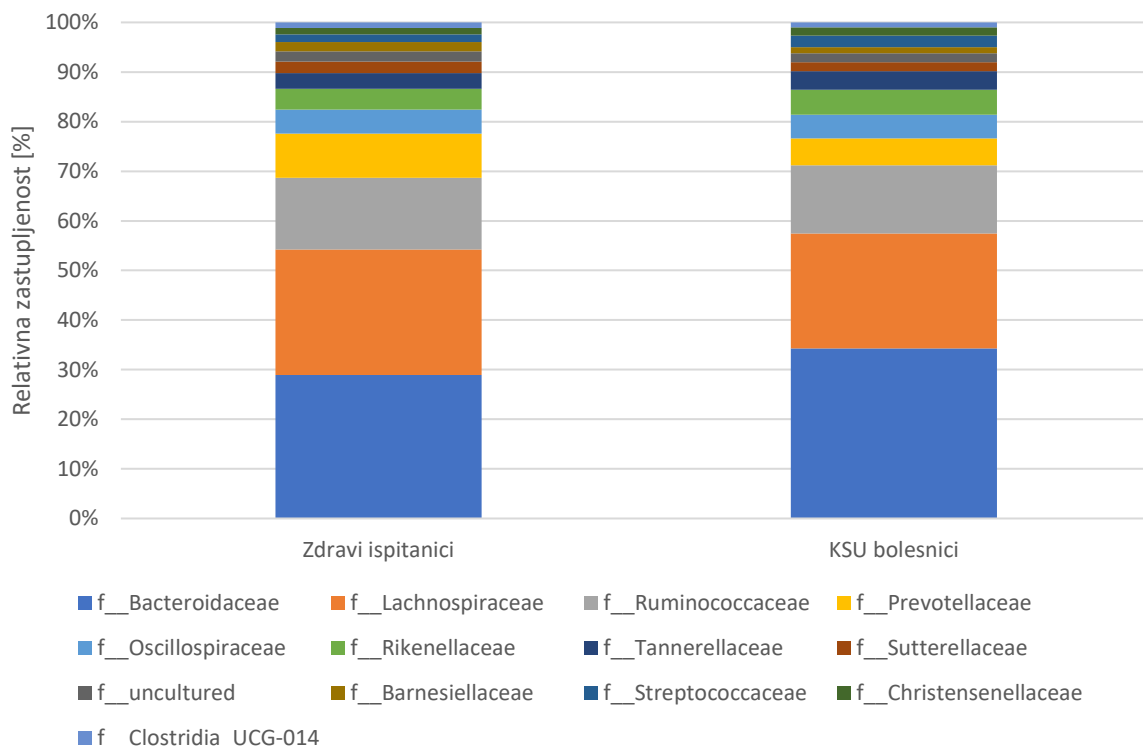
Na razini razreda, *Clostridia* je bila u većem udjelu zastupljena u skupini zdravih kontrola (medijan=45,0%), u odnosu na KSU skupinu (medijan=41,3%). Nadalje, porodice *Lachnospiraceae* i *Prevotellaceae* bile su relativno manje zastupljene u bolesnika s KSU-om (medijan=19,6%, 4,6%) u usporedbi sa zdravim ispitanicima (medijan=22,5%, 7,9%). Na razini roda, relativna zastupljenost *Bacteroides*, *Streptococcus*, *Agathobacter* bila je veća u skupini bolesnika s KSU-om, dok su rodovi *Prevotella*, *Roseburia*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Lachnospira*, *Blautia*, *Coprococcus*, *Subdoligranulum*, *Eubacterium* bili relativno manje zastupljeni u KSU skupini u odnosu na zdrave kontrole.



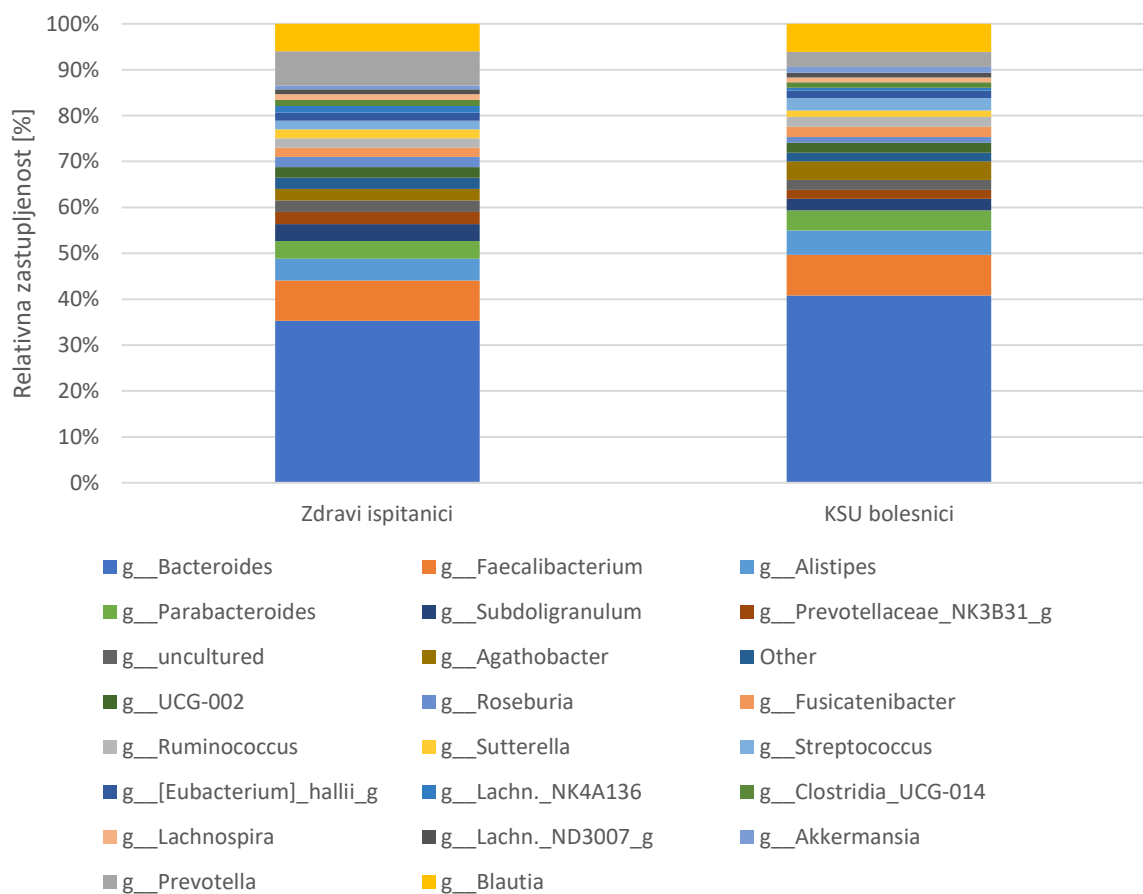
**Slika 6.** Relativna zastupljenost bakterijskih taksona na razini koljena



**Slika 7.** Relativna zastupljenost bakterijskih taksona na razini razreda



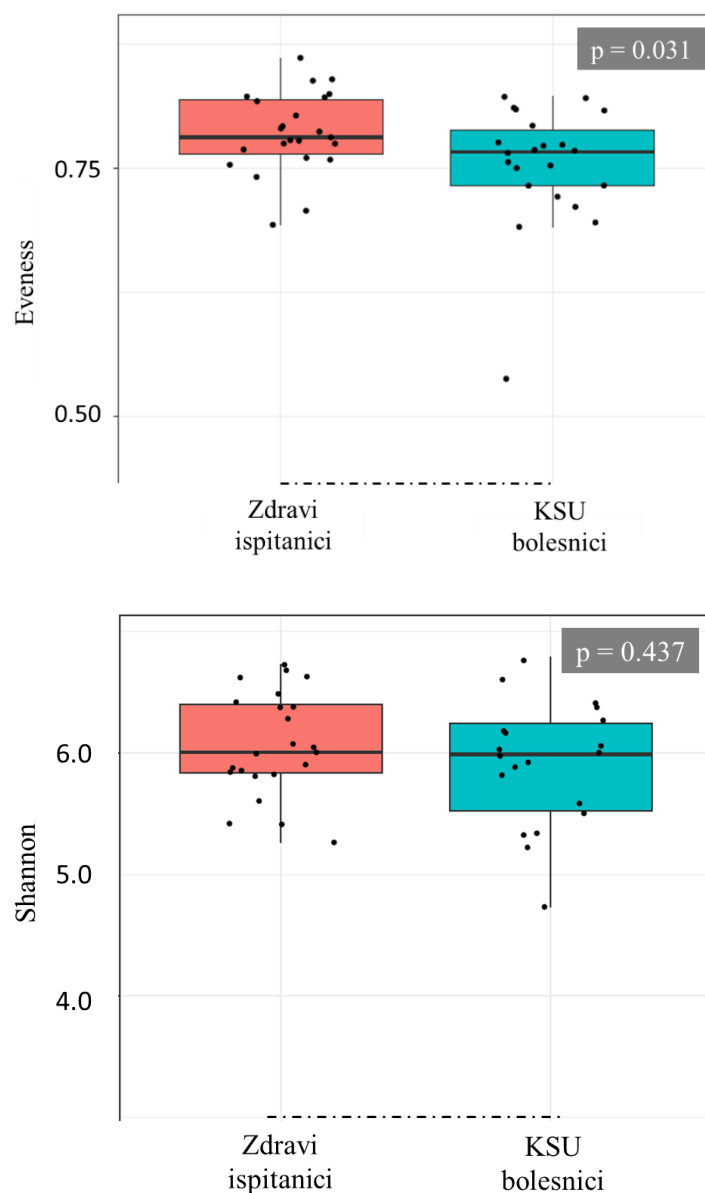
**Slika 8.** Relativna zastupljenost bakterijskih taksona na razini porodice



**Slika 9.** Relativna zastupljenost bakterijskih taksona na razini roda

#### 4.1.2 Analiza alfa i beta raznolikosti

Alfa raznolikost odnosi se na raznolikost unutar pojedinog uzorka. To je mjera broja različitih taksona prisutnih u jednom uzorku i njihove relativne zastupljenosti. Mjerenje alfa raznolikosti pomaže u procjeni koliko raznolikosti postoji unutar jednog uzorka. Raznolikost mikrobioma može se koristiti kao pokazatelj stabilnosti ili neravnoteže u mikrobiološkim zajednicama. Za mjerenje alfa raznolikosti koristili smo indekse: Chao1, Shannon i Evenness. Evenness indeks pokazao je značajno ( $p < 0,05$ ) smanjenu raznolikost u skupini bolesnika s KSU-om u odnosu na kontrolnu skupinu, dok ostali indeksi nisu pokazali statistički značajne razlike (Slika 10).

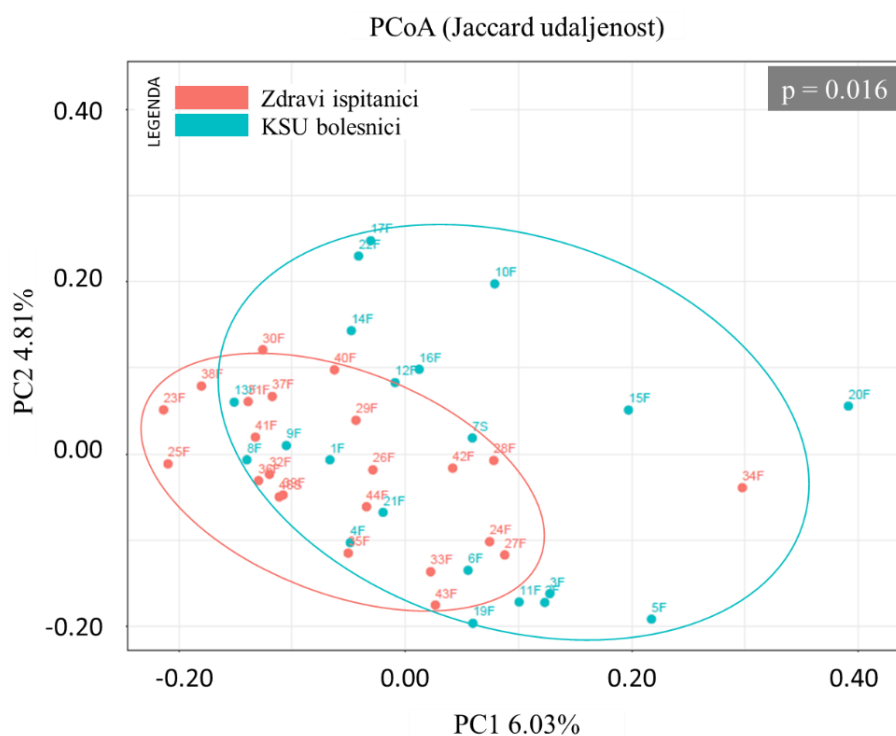


**Slika 10.** Usporedba alfa raznolikosti u crijevnoj mikrobioti bolesnika s KSU-om i zdravih ispitanika prema Evenness i Shannon indeksima

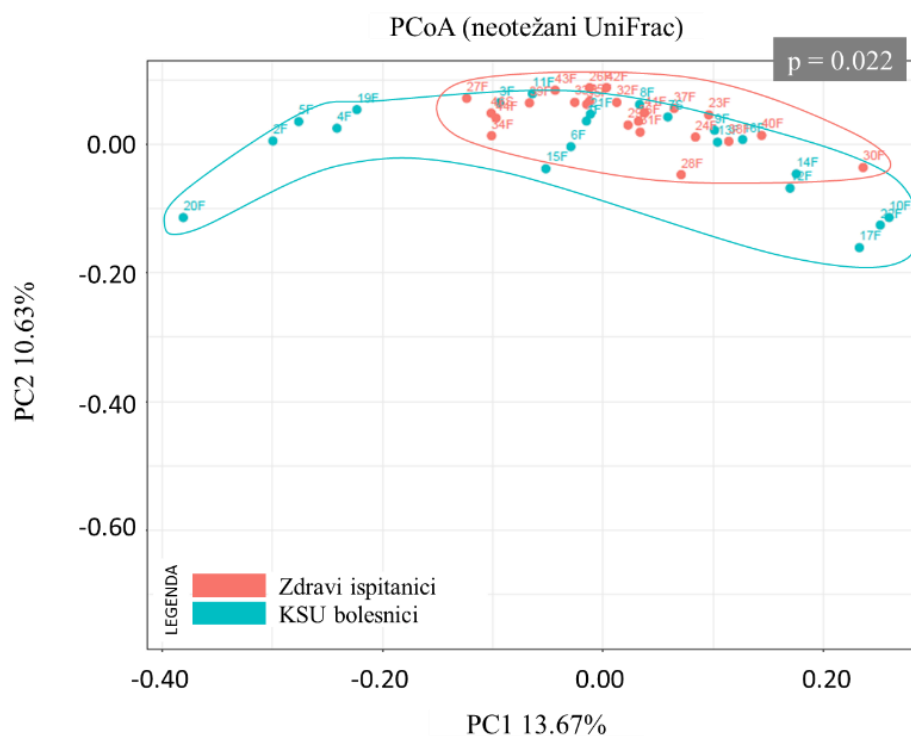


Beta raznolikost odnosi se na raznolikost između više uzoraka unutar neke grupe ili između grupa. Beta raznolikost mjeri koliko su različite mikrobiološke zajednice između različitih uzoraka. Za vizualizaciju strukture mikrobnih zajednica bolesnika s KSU-om i zdravih ispitanika koristi se analiza glavnih koordinata (engl. *Principal coordinates analysis*, PCoA). PCoA grafikon pruža vizualni prikaz različitosti među uzorcima. Udaljenost između točaka odražava raznolikost mikrobioma. U mjerenju beta raznolikosti koristili smo dvije mjere udaljenosti: 1) Jaccardova mjera udaljenosti (engl. *Jaccard distance*) koja uspoređuje prisutnost/odsutnost taksona između uzoraka te 2) neotežani UniFrac (engl. *unweighted UniFrac*) koja procjenjuje raznolikost mikrobioma na temelju evolucijskih raznolikosti unutar filogenetskih stabala. Takvo mjerenje znači da se ne gleda samo na prisutnost ili odsutnost vrsta, već se također uzima u obzir evolucijska srodnost između mikroorganizama.

Beta raznolikost, izmjerena Jaccardovom mjerom udaljenosti (Slika 11) i neotežanom UniFrac mjerom (Slika 12) pokazala je značajno grupiranje ( $p < 0,05$ ) uzoraka iz KSU skupine u odnosu na kontrolnu skupinu.



**Slika 11.** Beta raznolikost u crijevnoj mikrobioti prema PcoA analizi korištenjem Jaccardove udaljenosti



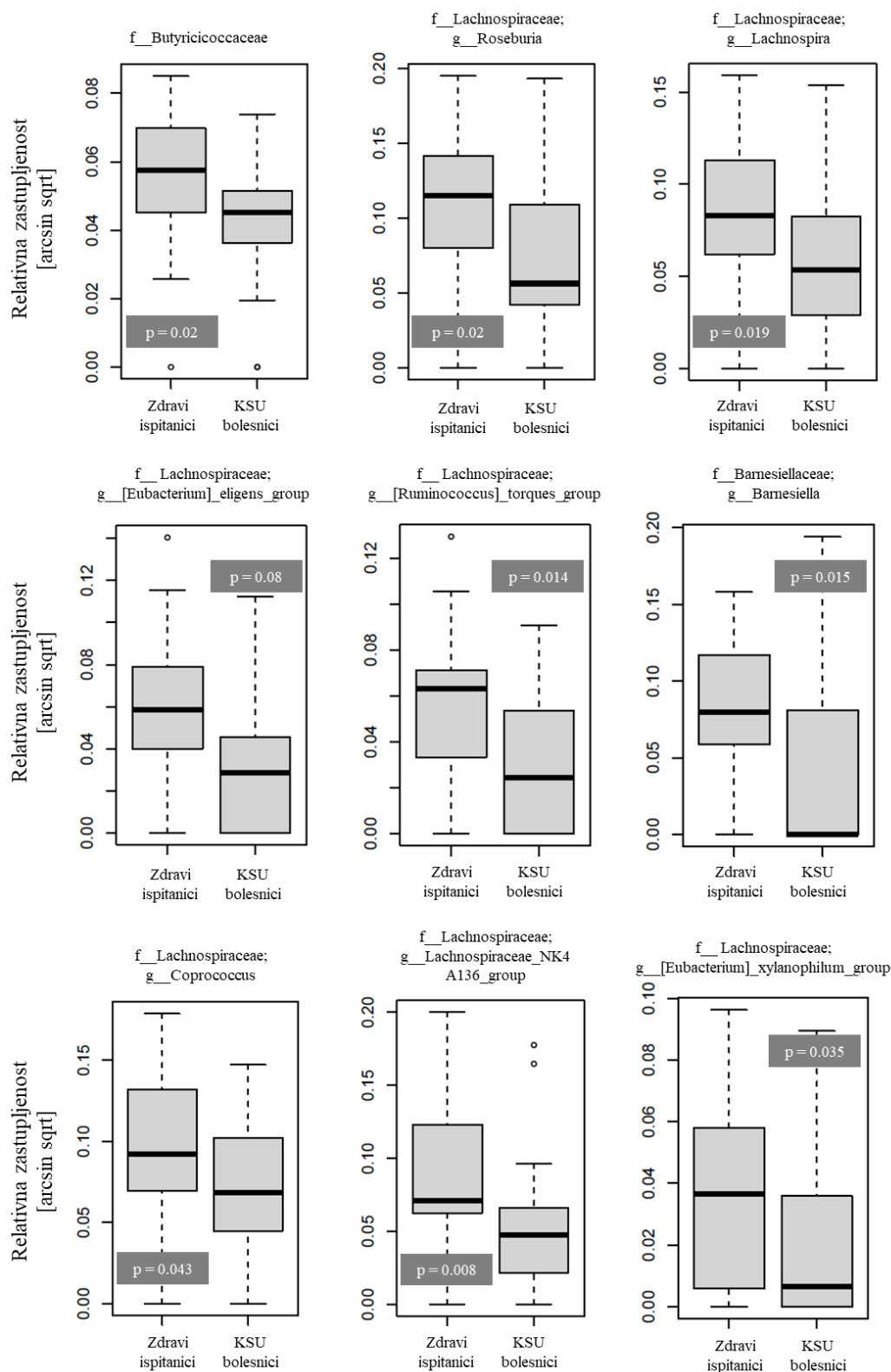
**Slika 12.** Beta raznolikost u crijevnoj mikrobioti prema PcoA analizi korištenjem neotežane UniFrac udaljenosti

#### 4.1.3 LEfSe analiza

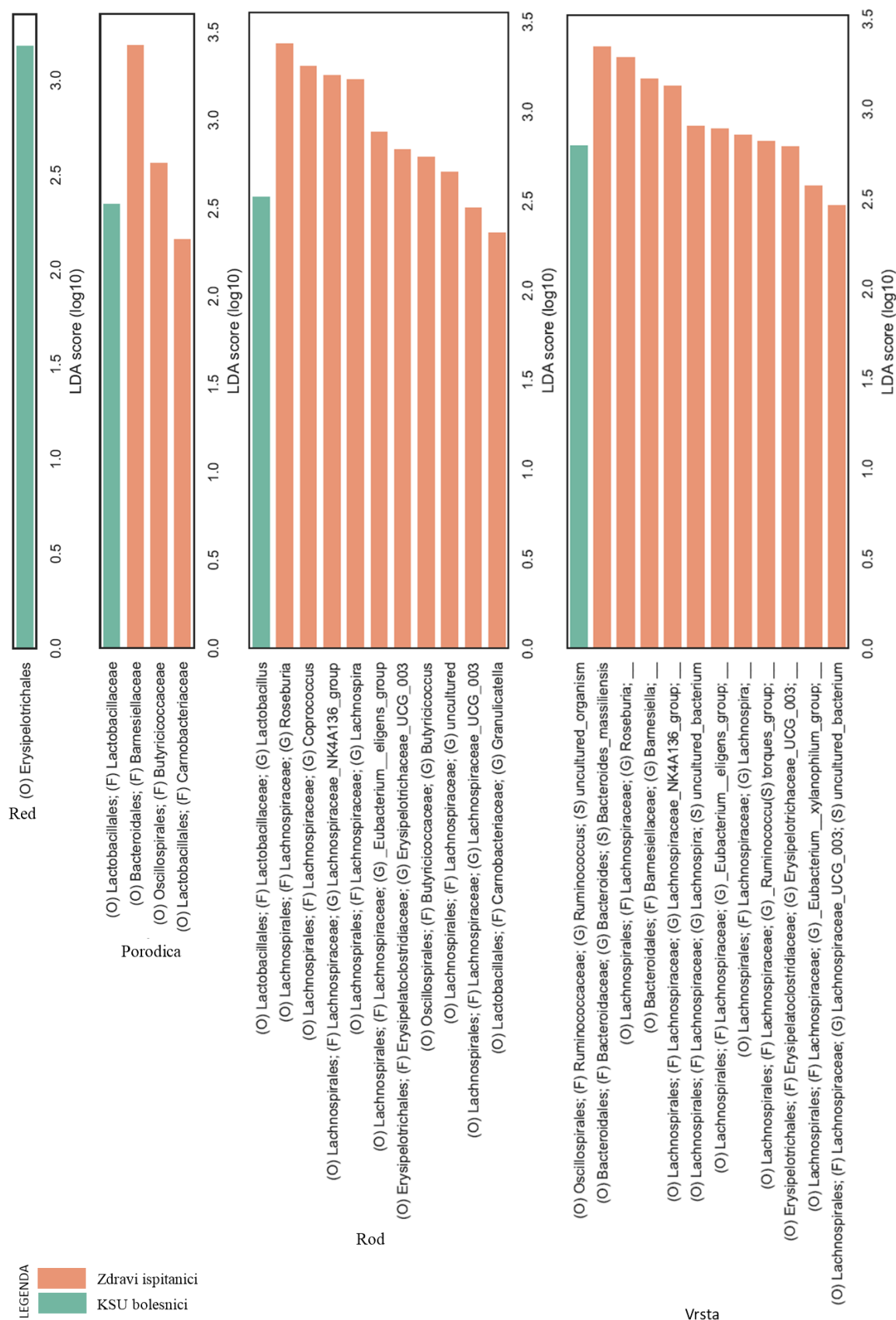
LEfSe analiza je statistička metoda koja se koristi u analizi mikrobioma kako bi se identificirali mikrobn biomarkeri ili mikrobn zajednice koje su specifične za različite skupine uzoraka. Ova metoda otkriva koji mikroorganizmi ili skupine mikroorganizama najviše doprinose varijaciji između različitih skupina uzoraka. Temelji se na linearnoj diskriminantnoj analizi (LDA) koja identificira bakterije koje značajno doprinose razlikama između ispitivanih skupina. Bakterije s LDA zbrojem većim od 2.0 ( $p < 0,05$ ) smatraju se značajno različito zastupljenim između ispitivanih skupina i ukazuju na značajne razlike između ispitivanih skupina. Identificiranje značajnih razlika u zastupljenosti bakterijskih taksona ključan je korak u analizi mikrobnih zajednica i identificiranju taksona koji najviše doprinose razlikama između skupina ispitivanih skupina. Ti taksoni mogu služiti kao potencijalni biomarkeri ili pružiti uvid u složenu interakciju i ulogu mikrobnih zajednica u razvoju određenih bolesti.

Na razini porodice, LEfSe analiza pokazala je da su *Barnesiellaceae*, *Butyricicoccaceae*, *Carnobacteriaceae* statistički značajno manje zastupljene u skupini bolesnika s KSU-om. (Slike 13 i 14). Na razini roda, LEfSe analiza je identificirala statistički značajnu osiromašenost

rodovima *Lachnospira*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Eubacterium eligens* *Butyricicoccus* u skupini bolesnika (Slike 13 i 14).



**Slika 13.** Statistički značajno zastupljene bakterije u skupini bolesnika s KSU-om i zdravih ispitanika

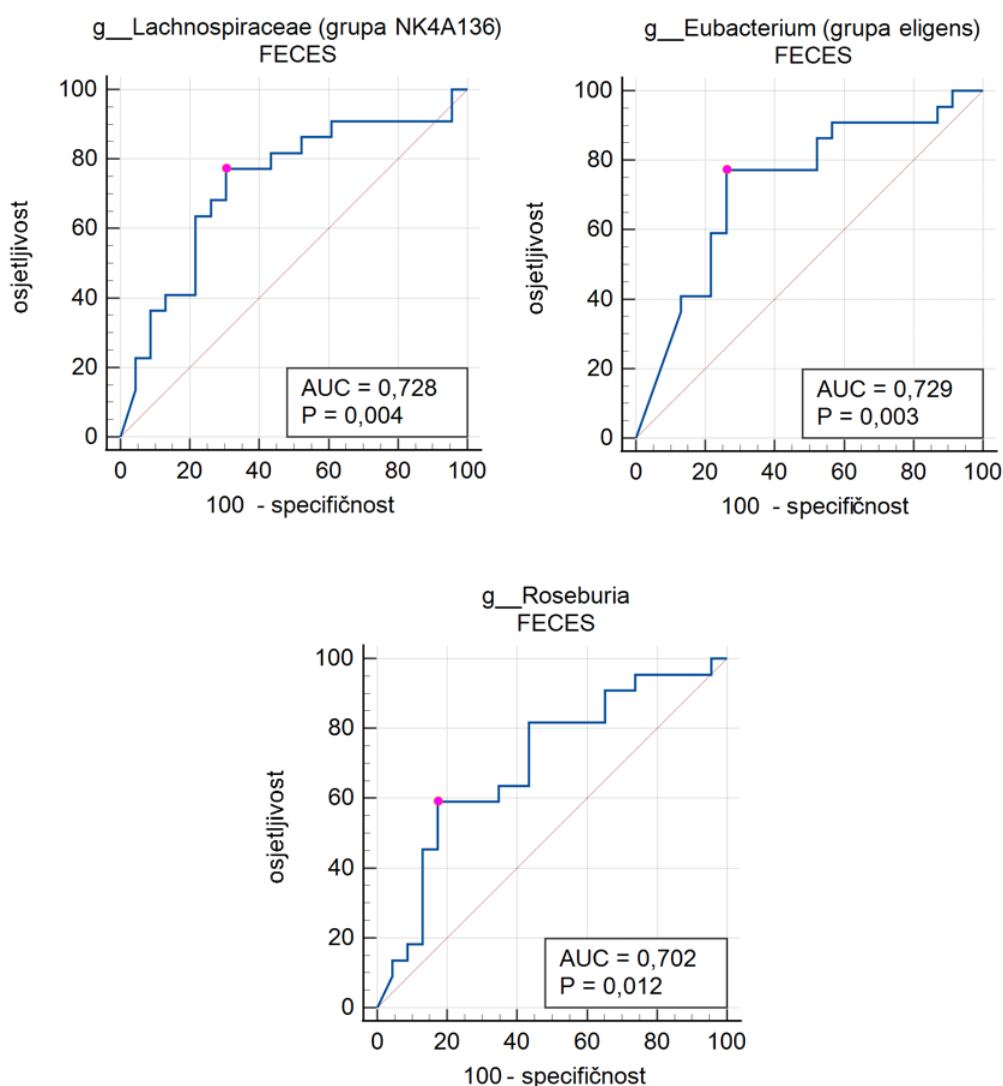


Slika 14. LEfSe analiza crijevne mikrobiote

#### 4.1.4 ROC analiza

ROC (engl. *Receiver Operating Characteristic*) analiza koristi se u analizi mikrobioma za procjenu vrijednosti određenih bakterija kao biomarkera za različite bolesti. Ova metoda može pomoći u identificiranju bakterija čije prisustvo ili odsustvo može biti povezano s određenim bolestima. ROC krivulja je graf koji prikazuje odnos između osjetljivosti i specifičnosti. AUC vrijednost (engl. *Area Under the Curve*) je mjera koja kvantificira ukupnu učinkovitost modela. Što je AUC bliže 1, to znači da je model učinkovitiji u razlikovanju između dviju skupina. AUC manji od 0.5 znači da nema diskriminacije između ispitivanih skupina.

AUC vrijednosti za bakterijske rodove *Lachnospiraceae NK4A136*, *Eubacterium eligens* i *Roseburia* iznosile su 0,728, 0,729 i 0,702 ( $p < 0,05$ ) što sugerira da ove bakterije imaju potencijalnu dijagnostičku vrijednost za KSU-u (Slika 15).



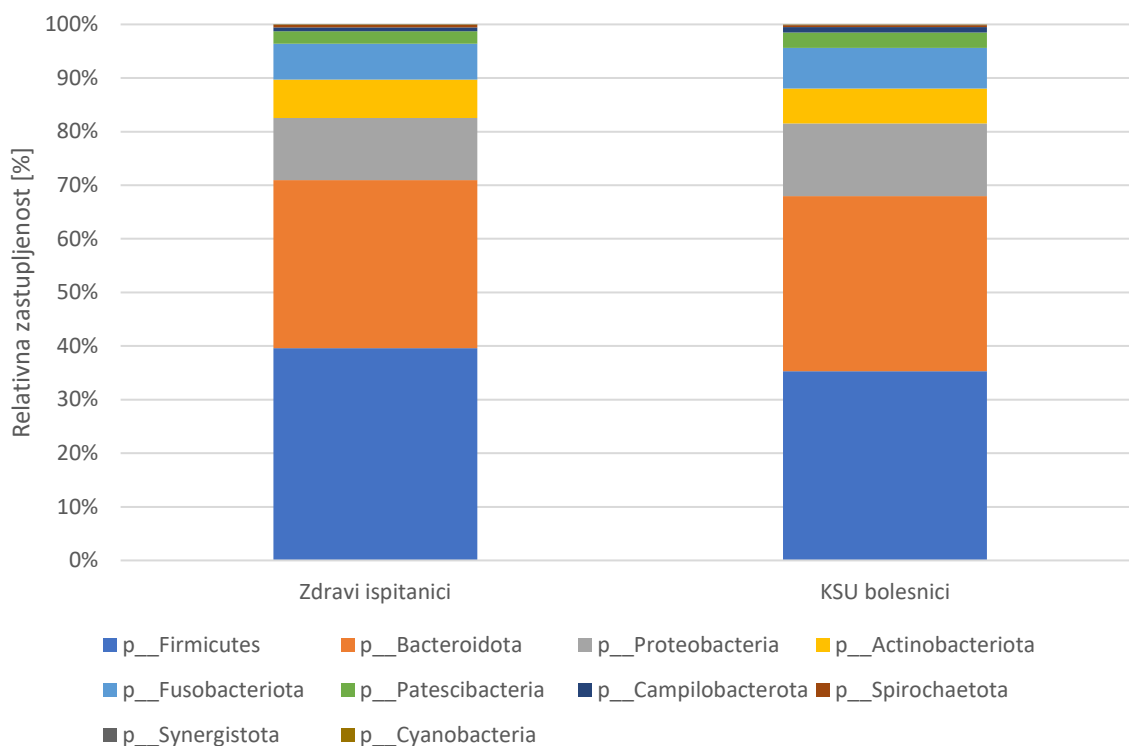
**Slika 15.** ROC krivulja za određivanje dijagnostičke vrijednosti crijevnih bakterija

## 4.2 Analiza sastava salivarne mikrobiote

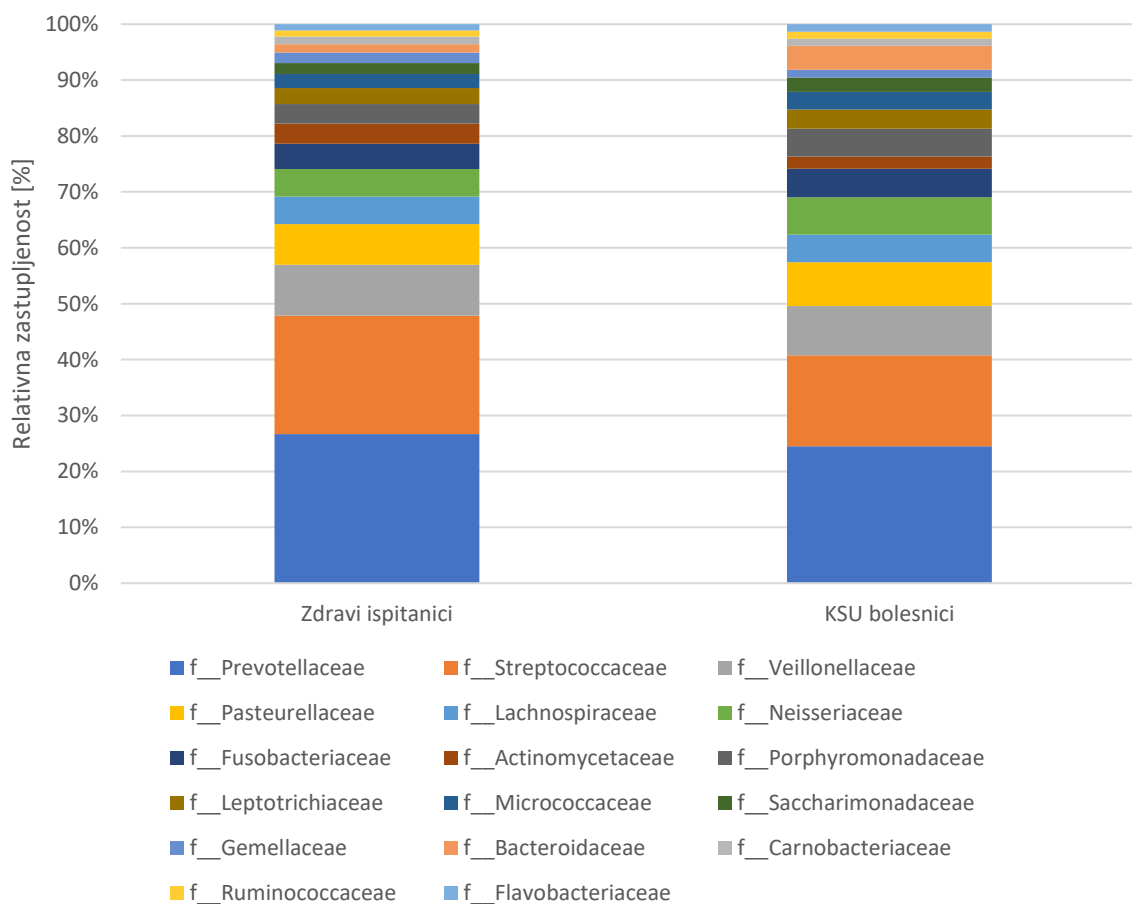
### 4.2.1 Taksonomska analiza

Najzastupljenije koljeno u salivarnoj mikrobioti kod obje ispitivane skupine bilo je koljeno *Firmicutes*, s tim da je zastupljenost bila manja u skupini bolesnika s KSU-om (medijan=35,3%), u odnosu na skupinu zdravih ispitanika (medijan=39,6%). Drugo po zastupljenosti bilo je koljeno *Bacteroidetes*, s nešto većim udjelom u KSU skupini (medijan=32,7%) u odnosu na zdrave kontrole (medijan=31,7%). Koljena *Proteobacteria* i *Fusobacteria* bila su zastupljenija u KSU skupini (medijan=13,6%, 7,6% u KSU skupini, medijan=11,6%, 6,7% u kontrolnoj skupini), dok je koljeno *Actinobacteriota* imalo relativno manji udio u KSU skupini (medijan=6,5%) u usporedbi sa zdravim kontrolama (medijan=7,1%). Slike 16-18 prikazuju relativnu zastupljenost taksonomskih jedinica na razini koljena, porodice i roda.

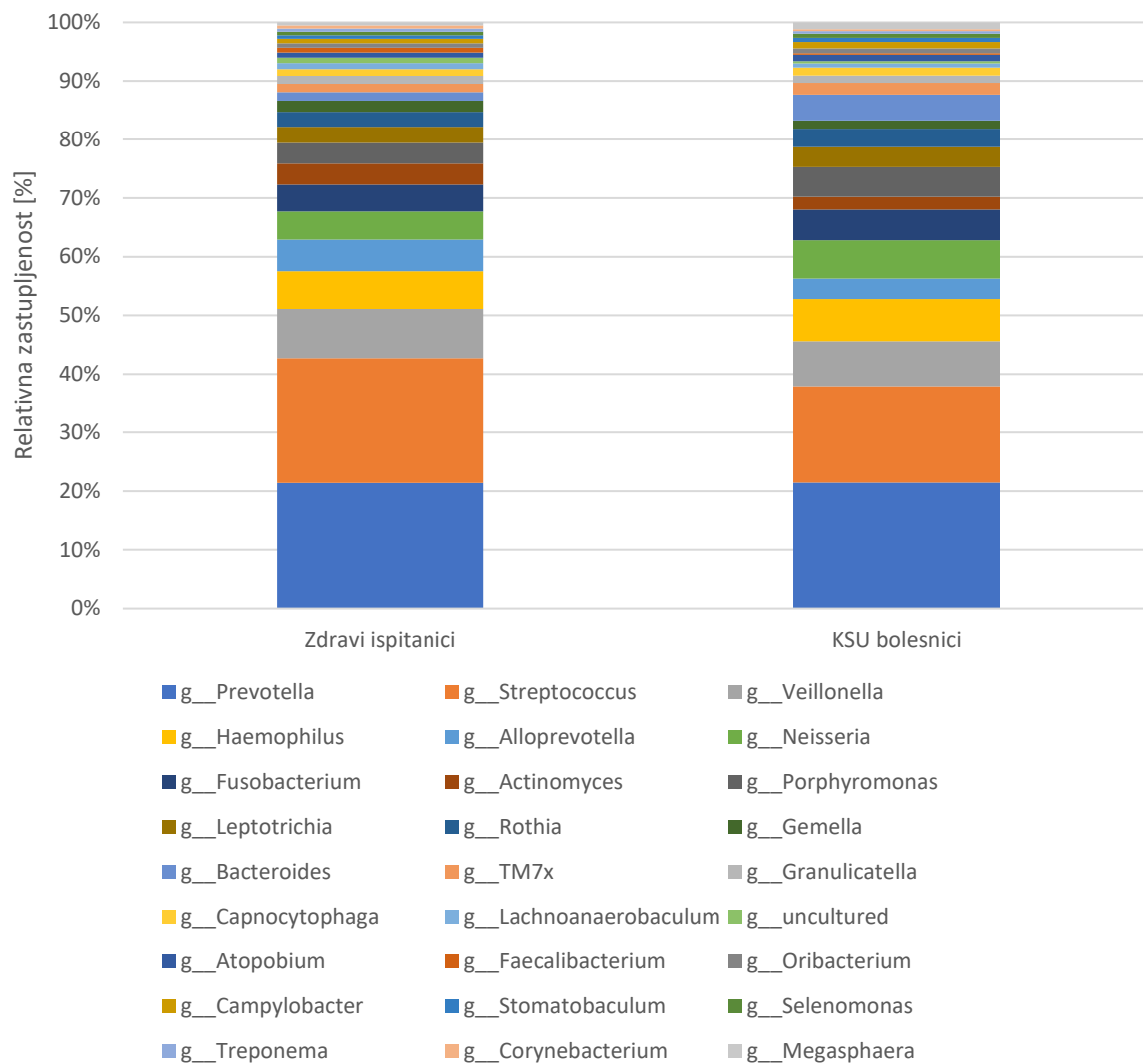
Bakterije iz reda *Lactobacillales* bile su relativno zastupljenije u KSU skupini (medijan=21,4%) u odnosu na kontrolnu skupinu (medijan=17,3%). Na razini porodice, *Prevotellaceae* i *Streptococaceae* bile su brojnije u kontrolnoj skupini (medijan=24,5%, 19,5%) u odnosu na skupinu bolesnika (medijan=21,7%, 14,4%). Porodice *Pasteurellaceae*, *Neisseriaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Bacteroidaceae* bile su relativno zastupljenije u skupini bolesnika s KSU-om (medijan=7,0%, 5,9%, 4,6%, 4,4%, 3,8% u usporedbi sa zdravim ispitanicima (medijan=6,6%, 4,5%, 4,2%, 3,2%, 1,4%). Rodovi *Prevotella*, *Streptococcus*, *Veillonella* bili su manje zastupljeni u KSU skupini, dok su *Hemophilus*, *Neisseria*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Bacteroides* bili brojniji u bolesnika s KSU-om u odnosu na zdrave kontrole.



**Slika 16.** Relativna zastupljenost bakterijskih taksona na razini koljena



**Slika 17.** Relativna zastupljenost bakterijskih taksona na razini porodice

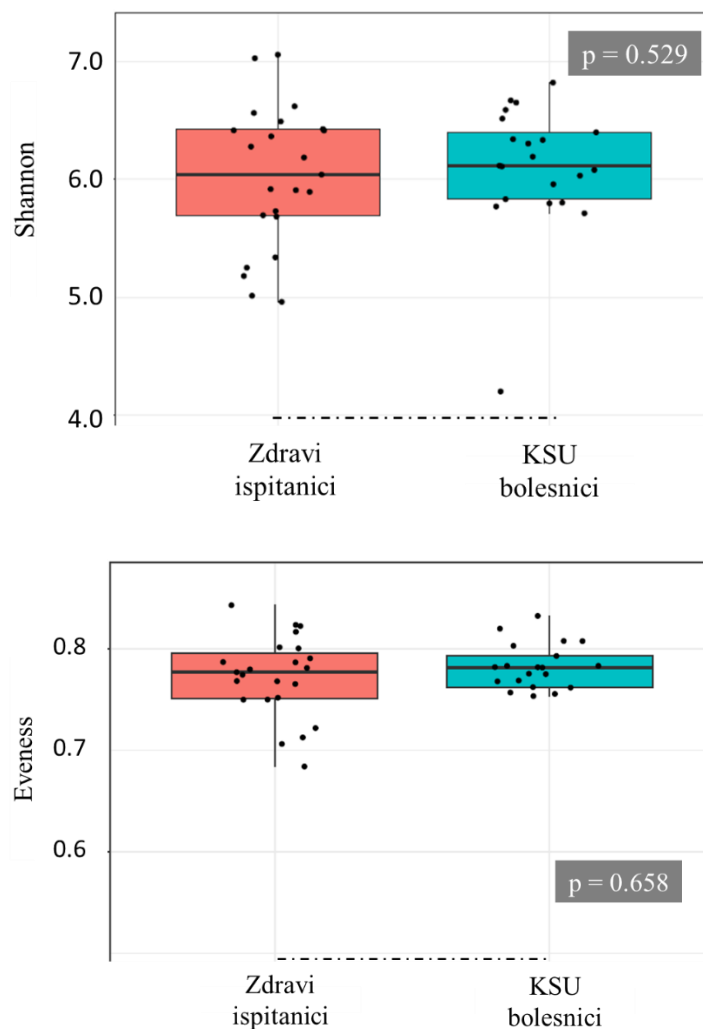


**Slika 18.** Relativna zastupljenost bakterijskih taksona na razini roda



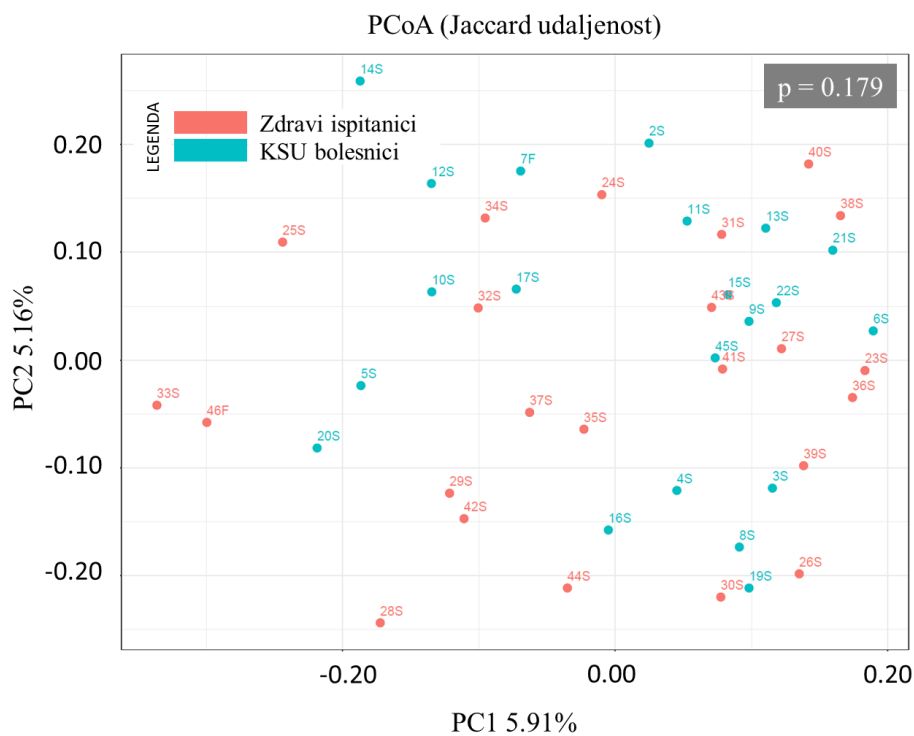
#### 4.2.2 Alfa i beta raznolikost

Za analizu alfa raznolikosti kod salivarne mikrobiote korišteni su različiti indeksi (Shannon, Eveness, Chao1) koji su pokazali nešto manju brojnost i raznolikost mikrobiote u bolesnika s KSU-om u odnosu na zdrave ispitanike, no rezultati nisu bili statistički značajni (Slika 19.).

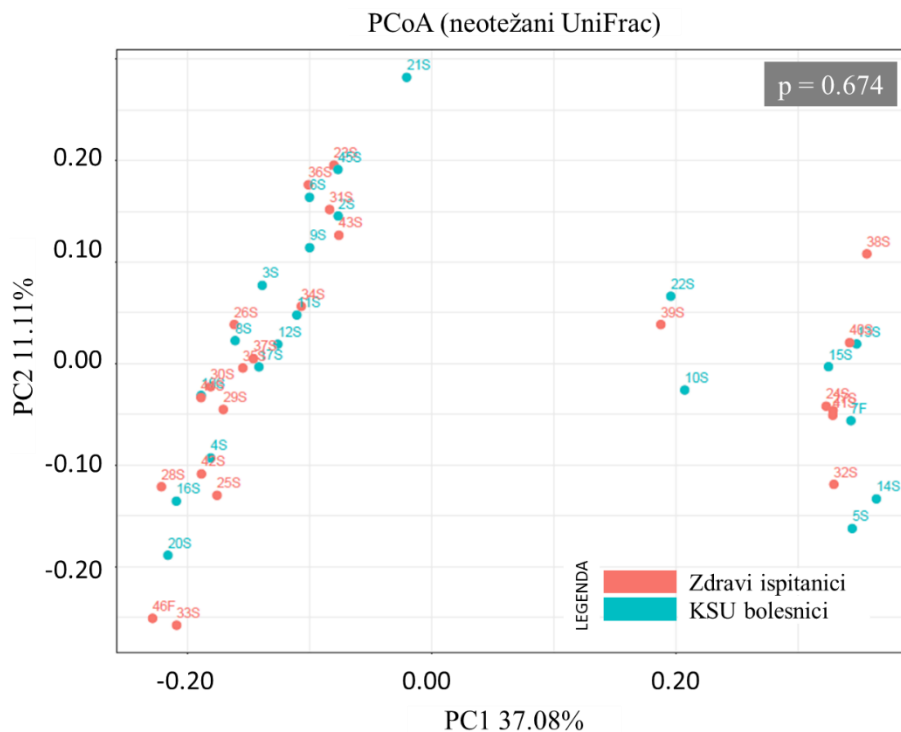


**Slika 19.** Usporedba alfa raznolikosti u salivarnoj mikrobioti bolesnika s KSU-om i zdravih ispitanika prema Eveness i Shannon indeksima

Beta raznolikost, mjerena Jaccardovom udaljenosti (Slika 20) i neotežanim UniFrac mjerenjem (Slika 21), nije pokazala značajne razlike u sastavima salivarne mikrobiote između ispitivanih skupina.



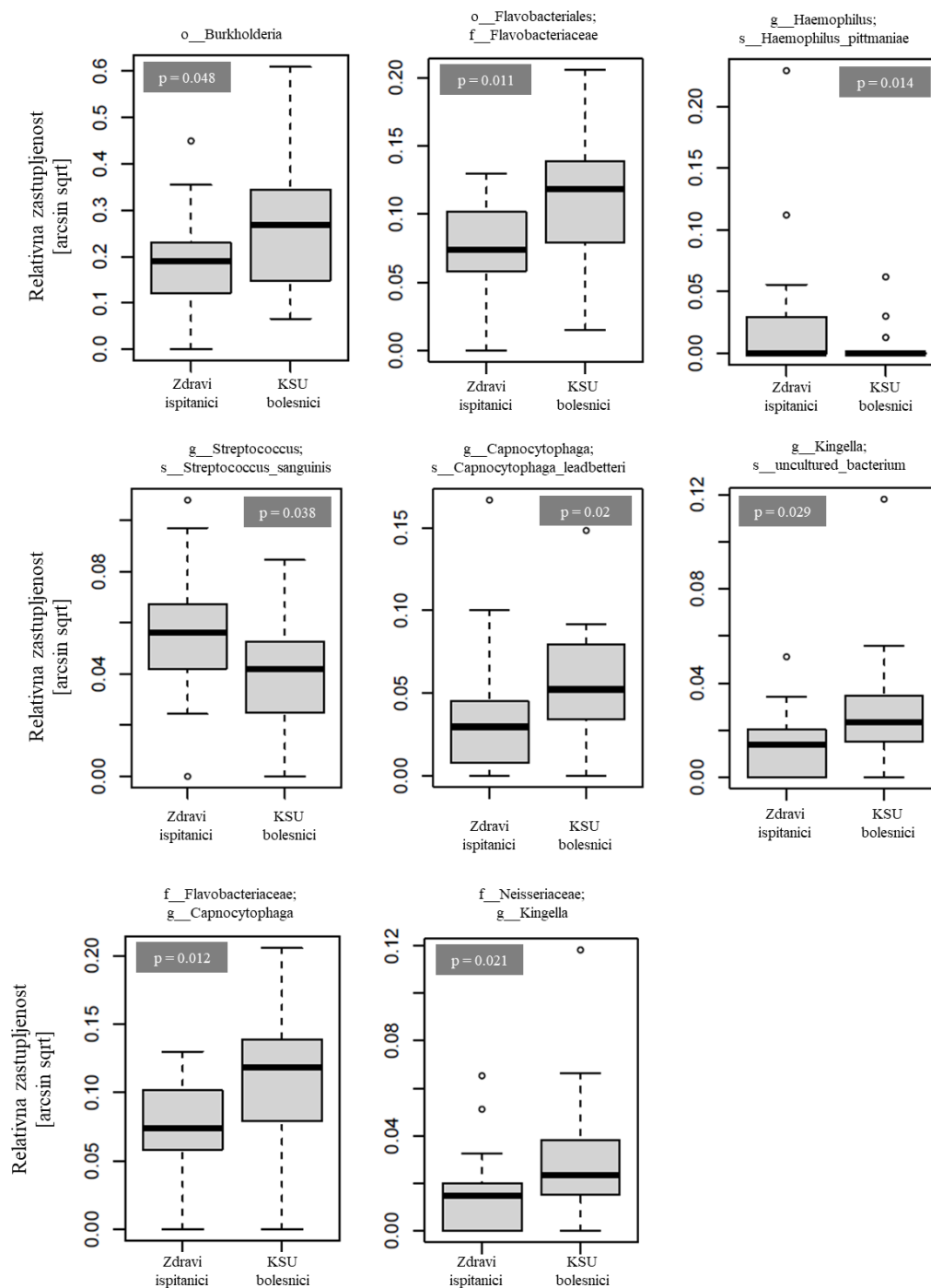
**Slika 20.** Beta raznolikost u salivarnoj mikrobioti prema PcoA analizi korištenjem Jaccardove udaljenosti



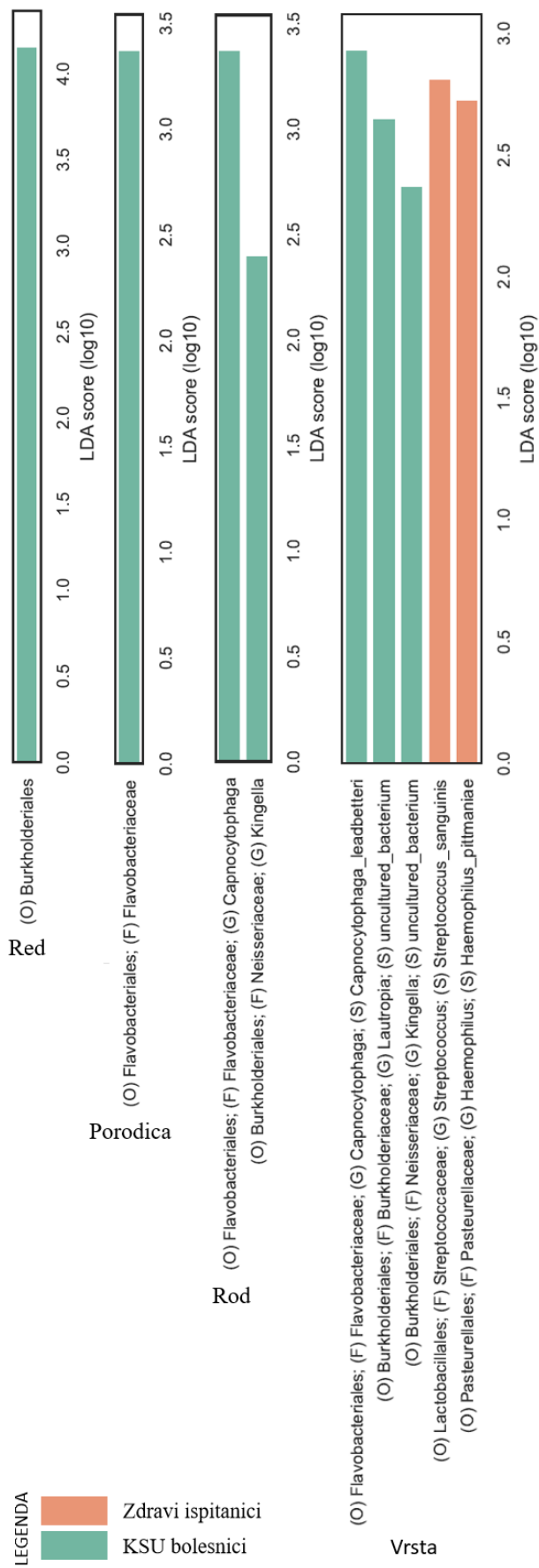
**Slika 21.** Beta raznolikost u salivarnoj mikrobioti prema PcoA analizi korištenjem neotežane UniFrac udaljenosti

### 4.2.3 LEfSe analiza

LEfSe analizom identificirali smo statistički značajne razlike u zastupljenosti salivarnih bakterija između ispitivanih skupina. U skupini bolesnika s KSU-om statistički su značajno brojnije bile bakterije iz porodice *Flavobacteriaceae* te rodova *Capnocytophaga*, *Kingella* i *Lautropia*. Vrste *Streptococcus sanguinis* i *Hemophilus pitmmaniae* bile su statistički značajno manje zastupljene u bolesnika s KSU-om u odnosu na zdrave ispitanike (Slike 22 i 23).



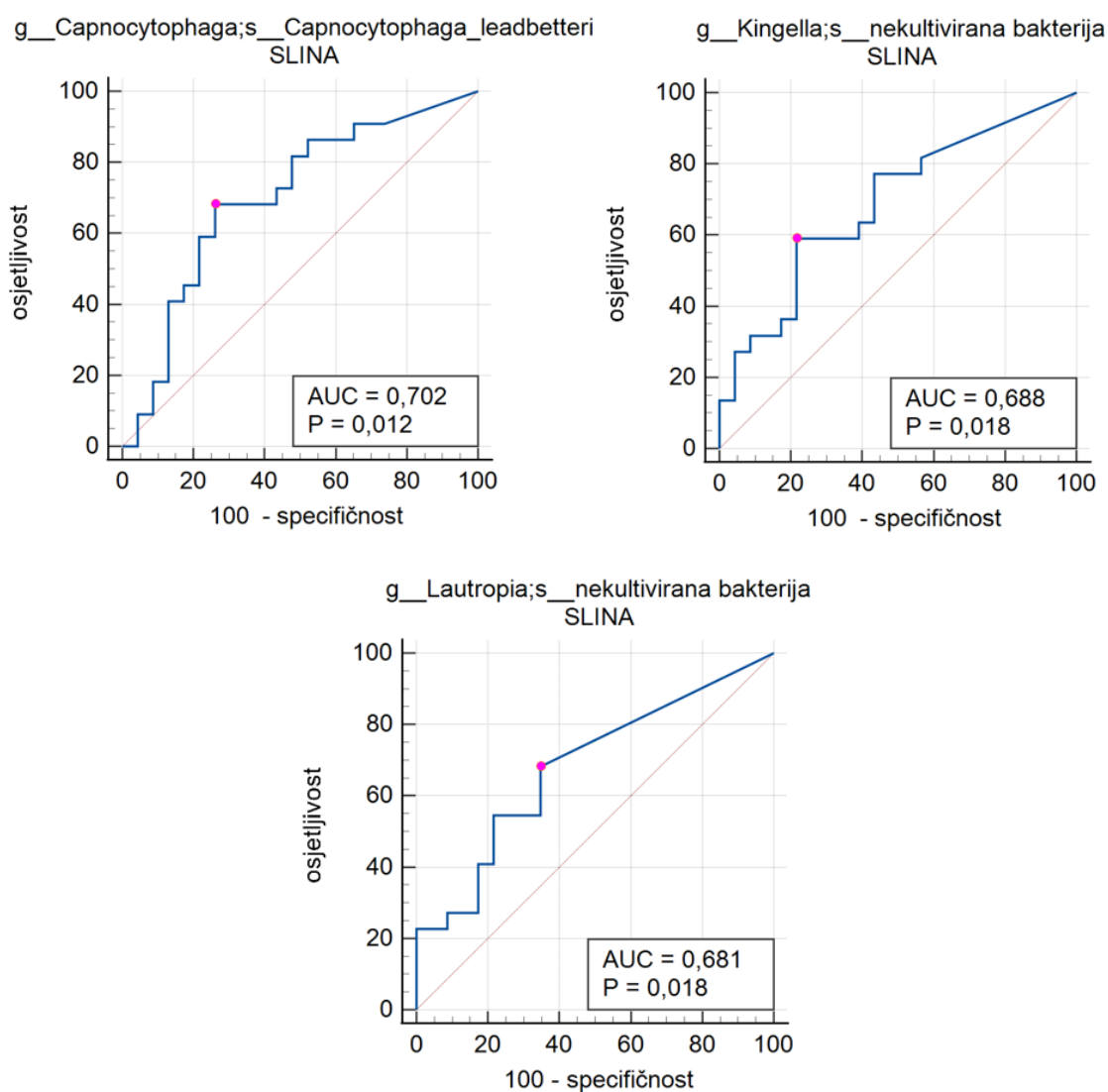
Slika 22. Statistički značajno zastupljene bakterije u bolesnika s KSU-om i zdravih ispitanika



**Slika 23.** LEfSe analiza salivarne mikrobiote

#### 4.2.4 ROC analiza

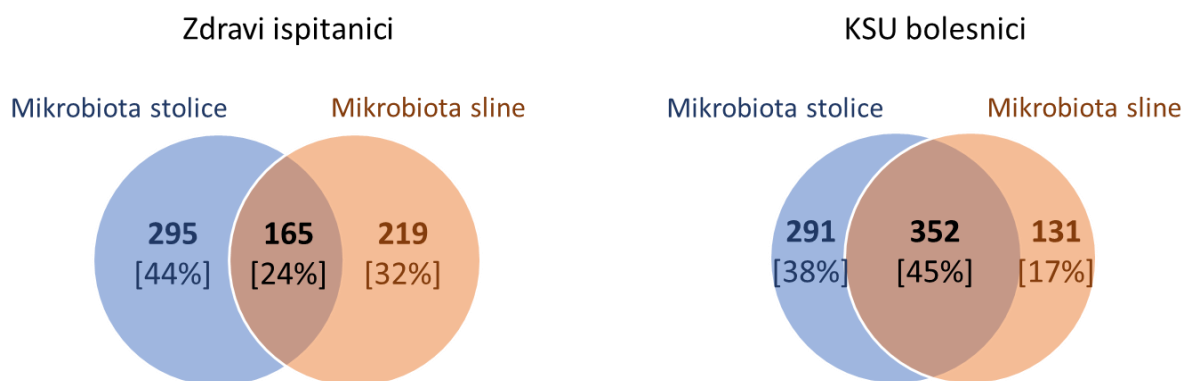
Za bakterije koje su LEfSe analizom pokazale značajnu razliku u zastupljenosti između skupine bolesnika i zdravih kontrola, primijenili smo AUC analizu pomoću ROC krivulje radi uvida u potencijalne dijagnostičke vrijednosti tih bakterija. AUC vrijednosti za vrstu *Capnocytophaga leadbetteri*, nekultiviranu vrstu roda *Kingella* te nekultiviranu vrstu roda *Lautropia* iznosile su 0,702, 0,688 i 0,681 ( $p < 0,05$ ) (Slika 24).



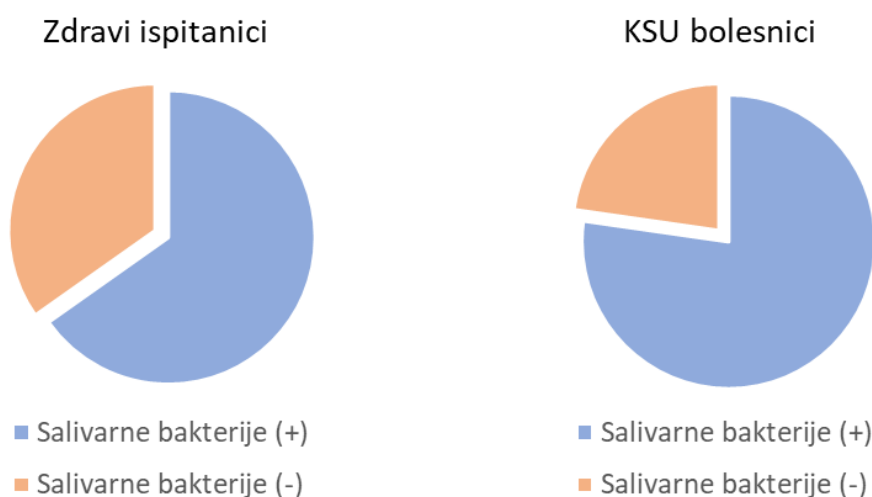
**Slika 24.** ROC krivulja za određivanje dijagnostičke vrijednosti salivarnih bakterija

### 4.3 Analiza povezanosti sastava salivarne i crijevne mikrobiote u pojedinog ispitanika

Za detekciju zajedničkih taksona u salivarnoj i crijevnoj mikrobioti koristili smo Vennov dijagram i Source Tracker analizu. Vennov dijagram pokazuje da je broj zajedničkih taksona između salivarne i crijevne mikrobiote veći u skupini bolesnika s KSU-om u odnosu na zdrave ispitanike (Slika 25). Source Tracker analiza identificirala je bakterije iz mikrobiote sline u crijevima kod 65% zdravih ispitanika te 77% bolesnika s KSU-om, što je u skladu s rezultatima Venn dijagrama (Slika 26). Rezultati Source Tracker analize dalje su pokazali da bakterije podrijetlom iz sline zdravih ispitanika čine 0,3% crijevne mikrobiote, dok je postotak salivarnih bakterija u crijevnom mikrobiomu bolesnika s KSU-om 0,6%, što nije statistički značajna razlika.



**Slika 25.** Prikaz zajedničkih taksona između mikrobiote sline i stolice u zdravih ispitanika i bolesnika s KSU-om Vennovim dijagramom



**Slika 26.** Detekcija bakterija podrijetlom iz sline u stolici ispitanika (Source Tracker analiza)

#### 4.4 Korelacije mikrobioma i kliničkih parametara

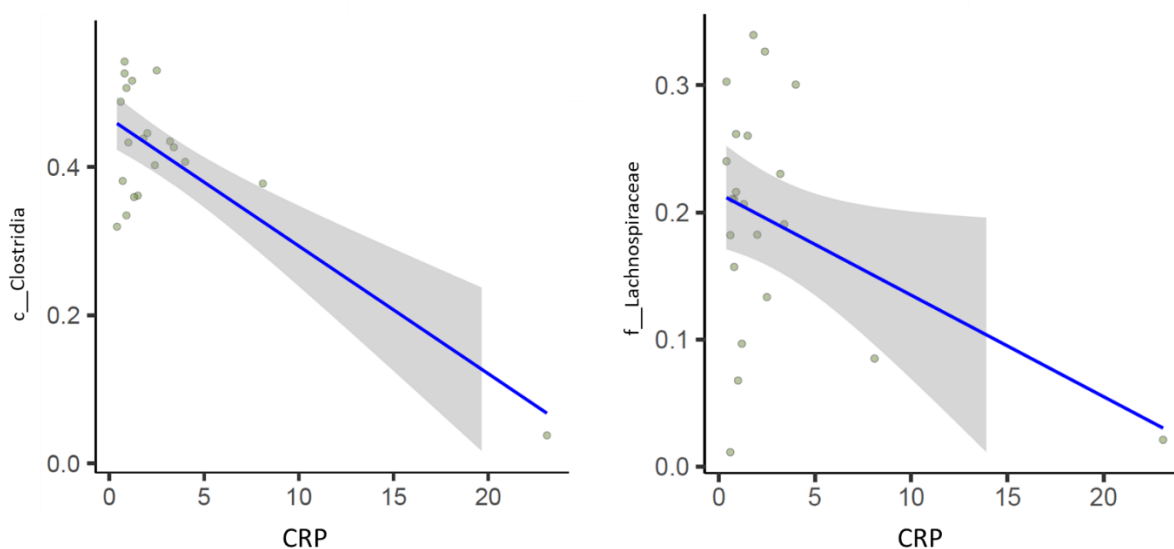
Nakon identifikacije bakterija koje pokazuju statistički značajne razlike između ispitivanih skupina, proučili smo njihovu povezanost s kliničkim parametrima.

U skupini bolesnika s KSU-om, bakterije iz reda *Clostridiales* u crijevnoj mikrobioti negativno su korelirale s CRP vrijednostima ( $p=0,004$ ), što znači da padom zastupljenosti tih bakterija, raste CRP vrijednosti (Slika 27). S druge strane, korelacija između tih bakterija i anti-TPO vrijednosti bila je pozitivna ( $p=0,003$ ) (Slika 28). Porodica *Lachnospiraceae* u crijevima također je pokazala negativnu korelaciju sa CRP vrijednostima ( $p=0,004$ ) (Slika 27). Isto tako, zastupljenost *Lachnospiraceae* u crijevima pozitivno je korelirala s anti-TPO vrijednosti ( $p=0,017$ ) (Slika 28).

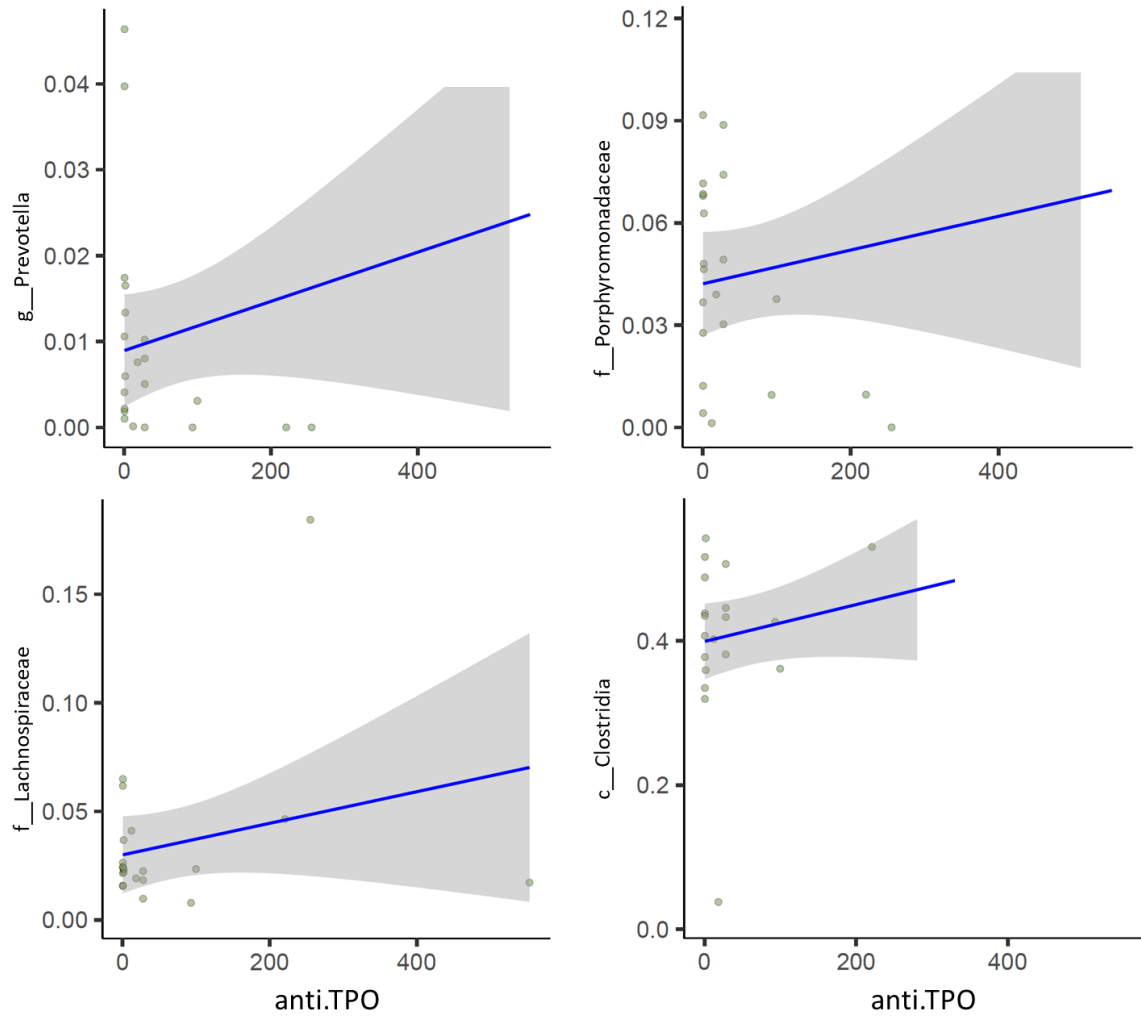
U salivarnoj mikrobioti bolesnika s KSU-om također su nađene korelacije bakterijskih taksona s protutijelima štitnjače. Porodica *Poprhyromonadaceae* ( $p=0,002$ ) te rod *Prevotella* ( $p=0,002$ ) pozitivno su korelirali s anti-TPO vrijednostima (Slika 28).

Nadalje, ispitali smo povezanost statistički značajnih bakterija s težinom bolesti (mjerenom UAS7 upitnikom), kvalitetom života bolesnika (mjerenom CU-Q2oL upitnikom) te učestalosti pojave urtika, angioedema i svrbeža.

Rod *Ruminococcus torques* (porodica *Lachnospiraceae*) negativno je korelirao s težinom bolesti (UAS7) ( $p=0,018$ ), dok ostale statistički značajne bakterije nisu pokazale povezanost s težinom bolesti (UAS7), kvalitetom života (CU-Q2oL) i učestalosti simptoma.



Slika 27. Korelacije crijevnih bakterija sa CRP vrijednosti



**Slika 28.** Korelacije salivarnih i crijevnih bakterija sa razinama anti-TPO protutijela



## **5. RASPRAVA**

Unatoč brojnim istraživanjima, do danas nisu razjašnjeni etiopatogenetski mehanizmi u razvoju KSU-e. Posljednjih godina, veliki interes istraživača usmjeren je na interakciju ljudske mikrobiote s imunim sustavom i ulogu u razvoju brojnih bolesti, uključujući i KSU-u. Prema našim saznanjima i prema dostupnoj literaturi, ovo je prvo istraživanje koje je analiziralo i uspoređivalo sastave i salivarne i crijevne mikrobiote između bolesnika s KSU-om i zdravih ispitanika.

Za analizu sastava i raznolikosti salivarne i crijevne mikrobiote, iz uzoraka slina i fecesa bolesnika s KSU-om i zdravih ispitanika, koristili smo metodu NGS, to jest sekvenciranje gena za 16S rRNA koji je prisutan u stanicama svih bakterija. Istraživanjem smo utvrdili značajne razlike u sastavu i raznolikosti salivarne i crijevne mikrobiote između ispitivanih skupina.

KSU je vrlo česta i iscrpljujuća dermatološka bolest koja zbog dugog trajanja i gotovo svakodnevne pojave simptoma uvelike utječe na kvalitetu života bolesnika. Uz pojavu urtika i/ili angioedema, karakterizirana je i intenzivnim osjećajem svrbeža što posljedično dovodi do poremećaja spavanja, lošije produktivnosti te povećane sklonosti za pojavu depresije i anksioznosti (8). Zbog uglavnom neprepoznatog uzroka i česte rezistentnosti na terapiju, predstavlja veliki terapijski izazov. Autoimuna KSU najčešći je podtip KSU-e. Prema istraživanjima, više od 50% KSU-a je autoimune etiologije (17). Značajan napredak ostvaren je u razlučivanju dvaju glavnih autoimunih mehanizama koji pokreću patogenezu KSU-e. Autoimuna KSU tipa I, tzv. autoalergijska KSU, posredovana je IgE protutijelima protiv vlastitih antigena (tzv. autoalergena), primjerice, protiv tireoidne peroksidaze (TPO) i interleukina IL-24. Autoimuna KSU tipa IIb karakterizirana je prisutnošću IgG antitijela na vlastiti IgE ili na visokospecifični receptor za IgE, FcεRI (1,2). Oba podtipa imaju isti mehanizam aktivacije mastocita, s posljedičnom vazodilatacijom, otpuštanjem medijatora, podražajem senzornih živčanih vlakana i aktivacijom upalnih stanica. Tip I je češći podtip autoimune KSU-e, dok bolesnici s autoimunim tipom IIb imaju teži oblik bolesti, snižene vrijednosti ukupnog IgE, povišene vrijednosti anti-TPO antitijela i lošiji terapijski odgovor (2,18).

Ljudska mikrobiota, ponajprije mikrobiota crijeva, igra važnu ulogu u razvoju i ravnoteži imunog sustava, uključujući i prirođenu i stečenu imunost. Smanjena mikrobna raznolikost, gubitak korisnih mikroorganizama ili prekomjeren rast štetnih mikroorganizama dovode do neravnoteže mikrobiote, tzv. disbioze. Jedna od posljedica disbioze je i narušena ravnoteža imunog sustava te poremećen imunski odgovor (40). Dosadašnja istraživanja pokazala su

snižene vrijednosti Treg limfocita kod bolesnika s KSU-om (115,116). Treg limfociti su podtip T limfocita koji imaju važnu ulogu u održavanju ravnoteže između proupalnih i protuupalnih odgovora i sprječavanju nekontroliranog imunskog odgovora. Imaju sposobnost inhibicije aktivnosti T limfocita, B limfocita i dendritičkih stanica te kontroliraju izlučivanje proupalnih citokina. Svojom supresivnom funkcijom sprječavaju pretjeranu aktivaciju Th2 stanica te na taj način pridonose ravnoteži imunskog sustava (115,116). Istraživanja crijevne mikrobiote kod bolesnika s kroničnom urtikarijom dovela su u vezu sniženu zastupljenost pojedinih bakterijskih vrsta sa smanjenim brojem Treg limfocita (108,111). Ta saznanja ukazuju da promjene u sastavu mikrobiote, bilo smanjena raznolikost ili promjena u zastupljenosti pojedinih vrsta, može dovesti do neravnoteže Th1/Th2/Treg limfocita i rezultirati pojačanim imunskim odgovorom, upalom i razvojem KSU-e.

Imajući u vidu složenost i opsežnost postupaka dobivanja podataka o sastavima i obilježjima mikrobioma, naše istraživanje uključilo je 22 bolesnika s KSU-om i 23 zdrava ispitanika, što je u skladu i s drugim inozemnim istraživanjima. Ispitivane skupine nisu pokazale statistički značajne razlike u dobi i spolu. Uz urtike, 32% bolesnika imalo je pridružen i angioedem, što je u skladu s objavljenim studijama o prevalenciji angioedema kod bolesnika s KSU-om (6, 35). Polovica bolesnika s KSU-om imala je povišen anti-TPO, koji je negativno korelirao sa sniženim ukupnim IgE, što govori u prilog autoimunom tipu II KSU-e. Povišen anti-TPO i sniženi ukupni IgE nisu pokazali povezanost s težinom bolesti (mjerenom UAS7 upitnikom) i kvalitetom života bolesnika (mjerenom CU-Q2oL upitnikom). Kod više od 2/3 ispitanika u skupini bolesnika s KSU-om nađene su snižene serumske vrijednosti vitamina D. Većina istraživanja u bolesnika s KSU-om zabilježila je deficijenciju vitamina D. Prema meta-analizi Tuchinda i suradnika, od 14 studija koje su mjerile vrijednost vitamina D iz seruma bolesnika s KSU-om, značajno snižena serumska vrijednost vitamina D zabilježena je u njih 12 (124). Međutim, autori sugeriraju da je potreban veći istraživanja koji se bave ovom tematikom kako bi se pokušao razjasniti mehanizam koji stoji iza povezanosti sniženog vitamina D i KSU-e.

## **5.1 Usporedba sastava i raznolikosti mikrobiote**

Kako bismo procijenili razlike u brojnosti i raznolikosti salivarne i crijevne mikrobiote, koristili smo različite indekse za alfa i beta raznolikost. Alfa raznolikost odnosi se na brojnost i raznolikost bakterijskih vrsta unutar pojedinog ispitanika. S druge strane, beta raznolikost

odnosi se na raznolikost bakterijskih vrsta između ispitanika to jest uzorci se grupiraju na temelju sličnosti u sastavu mikrobiote.

Za usporedbu beta raznolikosti između skupine bolesnika s KSU-om i skupine zdravih ispitanika, koristili smo mjeru Jaccardova udaljenost i neotežanu UniFrac mjeru. Obje mjere uzimaju u obzir prisutnost ili odsutnost određenih bakterijskih taksona u mikrobnoj zajednici te procjenjuju udaljenosti između mikrobnih zajednica na temelju sličnosti. Što je udaljenost veća, to su razlike mikrobioma između ispitivanih skupina veće. Analiza beta raznolikosti kod crijevne mikrobiote pokazala je da se sastav mikrobiote značajno razlikuje između ispitivanih skupina, što je vidljivo u prikazu glavnih koordinata (PCoA). Takav rezultat u skladu je s prethodno objavljenim istraživanjima o povezanosti crijevne mikrobiote i KSU-e, koji su također pokazali grupiranje bolesnika s KSU-om na temelju sličnosti u sastavu mikrobiote (108,111,112). Mjerenjem alfa raznolikosti, Eveness indeks pokazao je značajno smanjenu raznolikost crijevnog mikrobioma u skupini bolesnika s KSU-om, u odnosu na zdrave ispitanike, dok drugi indeksi nisu pokazali statistički značajne razlike. Pretpostavljamo da se takvi rezultati za alfa raznolikost mogu pripisati određenim faktorima koji mogu uzrokovati promjene u raznolikosti bakterijskog sastava kao što su: široki dobni raspon unutar ispitivanih grupa, razlike u prehranbenim navikama i demografskim podacima. Smanjenu alfa raznolikost u crijevima, to jest osiromašenje u raznolikosti i brojnosti bakterija prikazali su i Liu i Wang u svojim istraživanjima (108,111). Druga slična istraživanja nisu pokazala značajne razlike u alfa raznolikost između bolesnika s KSU-om i zdravih kontrola (110,112).

Analizom beta raznolikosti kod salivarne mikrobiote, nije bilo značajnih razlika u sastavu mikrobiote između ispitivanih skupina. Nadalje, mjerenjem alfa raznolikosti, mikrobiota slina u skupini bolesnika s KSU-om pokazala je manju raznolikost i brojnost taksona u odnosu na zdrave ispitanike, no rezultati nisu bili statistički značajni. S obzirom da do sada nije bilo istraživanja o povezanosti salivarnog mikrobioma i KSU-e, naše rezultate usporedili smo s rezultatima studija o povezanosti oralne mikrobiote s drugim autoimunim bolestima (RA, SLE, SS). Pritom su rezultati o alfa i beta raznolikosti nekonzistentni. Pregledni članak Gao-a i suradnika, koji je analizirao povezanost oralnog mikrobioma s RA-om, SLE-om i SS-om prikazao je vrlo različite rezultate među sličnim studijama između skupina bolesnika i zdravih kontrola u kontekstu alfa i beta raznolikosti, sugerirajući da trenutno ne postoje očiti obrasci u promjenama obogaćenosti i raznolikosti oralnog mikrobioma kod određenih autoimunih bolesti (125). Pri tome, 5 istraživanja o RA-u nije pokazalo razlike u alfa raznolikosti između skupina, a 5 je pokazalo veću raznolikost u skupini bolesnika (125). Od 4 istraživanja oralnog

mikrobioma kod SLE-a, jedno istraživanje nije pokazalo razlike u alfa raznolikosti, 2 su pokazala veću alfa raznolikost kod bolesnika s SLE-om, dok je jedno istraživanje pokazalo smanjenu raznolikost kod bolesnika s SLE-om u odnosu na zdrave kontrole; razlike u beta raznolikosti pokazala su 3 istraživanja (125). Ispitivanjem oralnog mikrobioma kod SS-a, u 5 od ukupno 9 studija nisu identificirane razlike u alfa i beta raznolikosti između ispitivanih skupina, 3 su pokazale sniženu alfa raznolikost kod bolesnika, dok je jedno istraživanje prikazalo veću alfa raznolikost kod bolesnika (125). Velikoj nekonzistentnosti vrlo vjerojatno doprinose i različite vrste uzoraka među istraživanjima; neka istraživanja kao uzorke uzimala su slinu, pojedina su uzorkovala slinu nakon ispiranja usta oralnim tekućinama, a nekoliko studija analiziralo je mikrobiom na temelju brisa jezika ili bukalne sluznice. Također, različiti uključujući i isključujući kriteriji u istraživanjima, mali broj ispitanika, demografske karakteristike, stil života te prehrambene navike ispitanika mogući su uzrok tolikih varijacija u rezultatima. Svakako, neophodna su daljnja istraživanja salivarnog mikrobioma kod bolesnika s KSU-om kako bi se dublje istražile potencijalne promjene u raznolikosti i bogatstvu bakterijskog sastava.

## 5.2 Razlike u zastupljenosti bakterija

### 1) Crijevna mikrobiota

U našem istraživanju, najzastupljenija koljena u crijevnoj mikrobioti i kod bolesnika s KSU-om i kod zdravih ispitanika su *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* i *Proteobacteria*, što je u skladu sa sličnim studijama (108-112). Dva koljena, *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, čine više od 90% cjelokupne crijevne mikrobiote. Relativna zastupljenost *Bacteroidetes* i *Actinobacteriota* nešto je veća u KSU skupini, dok je koljeno *Firmicutes* manje zastupljeno kod bolesnika, što su u svojim studijama prikazali i Wang (108) i Liu (111). Na razini reda, *Clostridia* je relativno više zastupljena u skupini zdravih ispitanika. *Clostridiae* su anaerobne bakterije koje sačinjavaju 95% koljena *Firmicutes* (89) te time čine značajan udio ukupne bakterijske populacije u crijevnoj mikrobioti. Osim nekoliko patogenih vrsta (*Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium difficile*) sve ostale vrste *Clostridiae* imaju komenzalni odnos s domaćinom i imaju vrlo važnu ulogu u održavanju funkcije i homeostaze crijeva (126). Brojni rodovi iz porodice *Lachnospiraceae* kao što su *Lachnospira*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, rod *Subdoligranulum* iz porodice *Ruminococcaceae* kao i rod *Butyricoccus* iz porodice *Butyricocceae* manje su zastupljeni kod bolesnika s KSU-om.

Manji udjeli bakterija iz reda *Clostridiae*, uključujući porodice *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* i *Butyricicocceae*, imaju ozbiljne posljedice na ravnotežu crijevnog sustava. Smanjenje udjela ovih bakterija dovodi do disbioze, to jest narušene crijevne homeostaze. Posljedica disbioze je narušena funkcionalnost i obrambena sposobnost crijeva te gubitak ravnoteže imunskog sustava (40). Naime, bakterijski rodovi i vrste iz porodica *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* i *Lactobacillaceae* glavni su proizvođači SCFA. SCFA su karboksilne kiseline koje u svojoj strukturi sadrže manje od 6 atoma ugljika. Nastaju anaerobnom bakterijskom fermentacijom u crijevima. Najzastupljenije SCFA su acetat, propionat i butirat. SCFA se mogu unijeti u organizam putem hrane ili stvarati u lumenu crijeva fermentacijom neprobavljivih ugljikohidrata. Hrana koja obiluje SCFA često uključuje proizvode čiji je proces proizvodnje vezan uz fermentaciju, poput sira, jogurta, ukiseljenog povrća i slično. Međutim, najveće količine SCFA proizvode komenzalne bakterije u crijevima, fermentacijom neprobavljivih ugljikohidrata, tzv. vlakana, koja dopiju u debelo crijevo bez da se hidroliziraju i apsorbiraju u tankom crijevu. Gotovo 90% neresorbiranih ugljikohidrata koji dopiju u debelo crijevo prerađuje se bakterijskom fermentacijom u SCFA (97). Najznačajniji izvori SCFA su rezistentni škrob, topiva vlakna, fruktooligosaharidi te galaktooligosaharidi, a nazivaju se još i prebiotici. SCFA spadaju među najvažnije metabolite crijevnih bakterija; najvažniji su izvor energije za stanice debelog crijeva (kolonocite), posjeduju antioksidativna i protuupalna svojstva i imaju vrlo važnu ulogu u održavanju ravnoteže probavnog i imunskog sustava (97). Pritom, najveći izvor energije za stanice predstavlja butirat. Nakon fermentacije, crijevni lumen sadrži milimolarne koncentracije SCFA koje se transportiraju u epitelne stanice putem aktivnih i pasivnih transportnih mehanizama. SCFA se zatim prenose do udaljenih organa i tkiva putem periferne cirkulacije (127).

Dva su mehanizma kojim SCFA djeluju na funkciju stanica: aktivacijom G-proteinskih transmembranskih receptora (engl. *G-protein-coupled receptors*, GPCR) i inhibicijom enzima histonskih deacetilaza (engl. *histone deacetylases*, HDAC). Receptori GPCR su klasični transmembranski receptori izraženi na različitim stanicama. SCFA se vežu za nekoliko tipova GPCR-a, poput GPR41, GPR43 i GPR109A koji su izraženi na različitim stanicama, uključujući kolonocite, adipocite, neutrofile, leukocite mastocite i dr. (99). Vezanjem SCFA na GPCR receptore, aktiviraju se signalni putevi koji igraju ključnu ulogu u regulaciji različitih staničnih odgovora, imunskih funkcija i upalnih procesa; stoga imaju važnu ulogu u regulaciji upalnog odgovora domaćina (97,99). S druge strane, inhibicija HDAC od strane SCFA, posebice butirata, ima drugačiji mehanizam djelovanja. HDAC je enzim odgovoran za

uklanjanje acetilnih skupina s histonskih proteina, što može utjecati na dostupnost gena za transkripciju (101). Inhibicija HDAC-a omogućuje povećanu acetilaciju histona, što može olakšati ili inhibirati transkripciju određenih gena. U kontekstu imunskog sustava, inhibicija HDAC-a može utjecati na diferencijaciju Treg limfocita te modulaciju funkcija drugih imunskih stanica, poput dendritičkih stanica i makrofaga (99,101). Dakle, vezanje za GPCR receptore i inhibicija HDAC-a dva su različita mehanizma kojima SCFA (metaboliti crijevnih bakterija) reguliraju imunosne odgovore, pritom djelujući na funkcije većine imunskih stanica, mijenjajući njihovu gensku ekspresiju te potičući diferencijaciju, kemotaksiju, proliferaciju i apoptozu (97).

Prirodna imunost uključuje prepoznavanje mikroba putem receptora za prepoznavanje uzoraka (engl. *pattern recognition receptors*, PRR) kao što su Toll-like receptori (TLR). Vezanjem liganda na TLR-e, SCFA potiču lučenje proupalnih citokina (IL-6, IL-18, TNF  $\alpha$ ), migraciju neutrofila te fagocitozu (97,99). SCFA utječu na dendritičke stanice i njihovu interakciju s T limfocitima. Istraživanja pokazuju da dendritičke stanice izložene butiratu i propionatu utječu na pojačanu diferencijaciju naivnih T limfocita u Treg limfocite te smanjuju efektorske funkcije Th2 limfocita (99-101). Ključna uloga SCFA u stečenoj imunosti je pojačano stvaranje Treg limfocita koji imaju ključno protuupalno djelovanje. Smanjen broj Treg limfocita uočen je kod bolesnika s KSU-om (117,128). GPCR receptori su također izraženi na mastocitima, ključnim stanicama u razvoju urtikarije. SCFA se mogu vezati za GPCR receptore na mastocitima i na taj način inhibirati aktivaciju mastocita i upalnog odgovora (106,129). Osim toga, istraživanja su pokazala da osim GPR41 i GPR43 receptora, i inhibicija HDAC-e može suprimirati aktivaciju i degranulaciju mastocita (130).

Studije pokazuju da su rodovi *Ruminococcus*, *Roseburia*, *Eubacterium*, *Lachnospira*, *Faecalibacterium* glavni proizvođači butirata (98). U ovom istraživanju, LEfSe analizom identificirali smo statistički značajno manju zastupljenost rodova *Ruminococcus*, *Roseburia* i *Eubacterium* u ispitanika s KSU-om. Protuupalni učinci butirata pripisuju se njihovoj sposobnosti inhibicije aktivnosti enzima HDAC-a, što dovodi do smanjenja proizvodnje proupalnih citokina poput TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-12, uz povećanje proizvodnje protuupalnih citokina poput IL-10 (98-101). Štoviše, utvrđeno je da butirat inhibiranjem enzima HDAC-a potiče ekspresiju gena FOXP3 u naivnim CD4<sup>+</sup> T limfocitima, koji je ključan za aktivaciju i funkciju Treg limfocita (101).

Važan faktor prirodene imunosti je i očuvan integritet crijevnog epitela. SCFA reguliraju integritet crijevne barijere lučenjem antimikrobnih peptida, mucina, IL-18 te održavanjem čvrstih veza između epitelnih stanica (101). Važan utjecaj na integritet crijevne sluznice imaju bakterije iz roda *Butyricoccus*. U našem istraživanju, *Butyricoccus* je značajno snižen u skupini bolesnika s KSU-om. Slično tome, Eeckhaut i suradnici prikazali su značajno smanjenu zastupljenost *Butyricoccus* bakterija i pojačanu propusnost crijeva u bolesnika s upalnim bolestima crijeva (131). Chang i suradnici pokazali su eksperimentom na miševima da *Butyricoccus*, aktivirajući transmembranske receptore i transportere za SCFA, poboljšava klinički ishod kolorektalnog karcinoma. Također, ukazuju na potencijal probiotika *Butyricoccus pullicaecorum* u liječenju kolorektalnog karcinoma (132).

Nadalje, prema našem istraživanju, relativna zastupljenost roda *Prevotella* snižena je i u salivarnoj i u crijevnoj mikrobioti bolesnika s KSU-om, u usporedbi s kontrolnom skupinom. *Prevotella* je gram-negativna anaerobna bakterija koja pripada koljenu *Bacteroidetes* i važna je sastavnica salivarne mikrobiote, a ima sposobnost širenja duž gastrointestinalnog trakta. Istraživanja su pokazala da se vrste salivarnih *Prevotella* bakterija mogu izolirati u mikrobiomu stolice, što sugerira da postoji izravan put prijenosa između oralne i crijevne mikrobiote (133). Unatoč velikoj zastupljenosti roda *Prevotella*, do danas je objavljeno vrlo malo istraživanja o ulozi *Prevotella* u ljudskom organizmu. Ove bakterije pokazuju pozitivnu povezanost s prehranom bogatom biljnim vlaknima i ugljikohidratima, dok su manje zastupljene u pojedinaca čija je prehrana bogata mastima i aminokiselinama. To se posebno očituje u populaciji koja se pretežno pridržava tzv. „zapadnog tipa prehrane“ (visoki udjeli rafiniranih šećera, masti i životinjskih bjelančevina) i čija mikrobiota je osiromašena bakterijama iz roda *Prevotella* (133). Rod *Prevotella* u crijevima, posebno vrsta *Prevotella copri*, povezana je s prehranom u kojoj dominira veći unos ugljikohidrata, rezistentnog škroba i vlakana (133,134). Studije su pokazale da osobe s crijevnim mikrobiomom bogatim *Prevotellom* imaju koristi u gubitku tjelesne mase te smanjenju razine kolesterola (134). Važnost *Prevotellae* u probavnom sustavu sugerira i činjenica da te bakterije također mogu proizvoditi SCFA (poput propionata) iz biljnih polisaharida, što pridonosi optimalnoj probavi i crijevnoj homeostazi. Međutim, postoje i kontradiktorne studije. Iako do danas nisu identificirane patogene vrste *Prevotellae*, pojedine vrste su identificirane u bakterijskim vaginozama, određenim metaboličkim bolestima, autoimunim bolestima kao i kod zubnog plaka, no direktna povezanost nije dokazana (133,134). Stoga, potrebna su daljnja istraživanja ovih bakterija kako bi se rasvijetlila njihova uloga u zdravlju i bolesti.



## 2) Salivarna mikrobiota

Prema našem istraživanju, dva najzastupljenija koljena u salivarnoj mikrobioti u obje ispitivane skupine su *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, nakon čega slijede *Proteobacteria*, *Fusobacteriota* i *Actinobacteriota*. U slini bolesnika s KSU-om veća je relativna zastupljenost koljena *Proteobacteria* i njegovih patogenih rodova u odnosu na zdrave ispitanike. Takav nalaz u skladu je s rezultatima našeg ranijeg istraživanja o povezanosti mikrobiote sline s KSU-om, gdje smo mikrobiotu analizirali drugačijom molekularnom metodom - TRLFP analizom (118). Istraživanja pokazuju veće udjele *Proteobacteria* kod bolesnika s astmom i alergijskim bolestima te sugeriraju da *Proteobacteriae* pojačavaju ekspresiju gena za Th17 limfocite i na taj način doprinose upalnoj kaskadi u razvoju alergijskih bolesti (20, 135). Povećan broj IL-17 i Th17 limfocita koji otpuštaju te citokine, nađene su u bolesnika s KSU-om (20), što ukazuje na dosad neprepoznatu, a potencijalno značajnu ulogu Th17 limfocita u razvoju KSU-e.

Na razini porodice, *Flavobacteriaceae* su značajno zastupljenije u KSU skupini. Dosadašnja istraživanja pokazala su veći udio ove porodice u slini bolesnika s karcinomom usne šupljine (136). Jedan od rodova ove porodice, *Capnocytophaga*, također je statistički značajno zastupljeniji u skupini bolesnika s KSU-om. Vrsta *Capnocytophaga leadbetteri* pokazala se analizom ROC krivulje kao potencijalni biomarker u dijagnostici KSU-e. Veći udio *Capnocytophaga* u oralnom mikrobiomu povezuje se s dijabetesom, no te veza nije dovoljno razjašnjena te je moguće da i drugi faktori poput spola i tjelesne mase imaju utjecaj na veću brojnost tih bakterija kod ove metaboličke bolesti (137). Nadalje, Kelsen i suradnici prikazali su veću zastupljenost *Capnocytophaga* u oralnoj mikrobioti bolesnika oboljelih od Chronove bolesti (138), a veća zastupljenost identificirana je i kod imunokompromitiranih bolesnika (137). *Capnocytophaga leadbetteri* je relativno slabo istražena bakterijska vrsta, o čijoj patogenosti se do sada malo zna. Izolirana je u većem udjelu u usnoj šupljini kod oralnih karcinoma, a zabilježen je slučaj sistemske infekcije uzrokovane ovom vrstom u imunokompromitiranih bolesnika (136,139).

Nadalje, red *Bulkholderia* (koljeno *Proteobacteria*), kao i rod *Kingella* koji pripada tom redu, značajno su zastupljeniji u skupini bolesnika s KSU-om. Rod *Kingella* obuhvaća nekoliko vrsta od kojih je *Kingella denitrificans* povezana s bakterijemijom, endokarditisom, korioamnionitisom i granulomatoznim bolestima u imunokompromitiranih bolesnika (140); *Kingella oralis* je komenzalna bakterija u usnoj šupljini, a povezana je sa zubnim plakom i parodontitisom, dok je *Kingella kingae* čest uzročnik bakterijemije u djece te vodeći uzročnik

osteomijelitisa i septičkog artritisa kod djece u dobi od 6 do 36 mjeseci (140). Iako prema našoj analizi ovaj rod pokazuje potencijalnu dijagnostičku važnost u bolesnika s KSU-om, uloga *Kingella* u etiopatogenezi KSU-e tek se treba istražiti.

Na razini roda, *Streptococcus* je relativno snižen u bolesnika s KSU-om; *Streptococcus mutans* je, sukladno dosadašnjim istraživanjima o sastavu salivarne mikrobiote kod autoimunih bolesti, relativno zastupljeniji u skupini bolesnika s KSU-om (48,49,125), dok su *Streptococcus salivarius* i *Streptococcus sanguinis* (poznati kao komenzalne bakterije usne šupljine) relativno manje zastupljeni kod bolesnika s KSU-om, a statistički značajno snižen udio *Streptococcus sanguinis* u slini bolesnika pokazala je i LEfSe analiza. *Streptococcus salivarius* ima važnu ulogu u obrani od infekcija u usnoj šupljini. Njegova sposobnost vezanja za epitelne stanice doprinosi stvaranju barijere koja sprječava ulazak patogena. *Streptococcus salivarius* može proizvoditi antimikrobne tvari, uključujući bakteriocine, koji mogu inhibirati rast drugih bakterija. Ovaj mehanizam pomaže u zaštiti usne šupljine od potencijalnih patogena (141). *Streptococcus sanguinis* jedan je od prvih mikroorganizama koji se veže za površine zuba i sudjeluje u formiranju zubnog plaka. Ukupno gledano, *Streptococcus sanguinis* ima složenu ulogu u usnoj mikrobioti. Iako neki sojevi mogu sudjelovati u procesima koji dovode do karijesa, većina je korisna i doprinosi održavanju ravnoteže mikrobioma te štiti od potencijalnih infekcija (141). *Streptococcus sanguinis* može djelovati kao antagonist prema patogenim bakterijama. Njegova prisutnost može ograničiti rast i razmnožavanje drugih bakterijskih vrsta koje uzrokuju oralne infekcije. *Streptococcus sanguinis* ima sposobnost vezanja za epitelne stanice u usnoj šupljini, što može pomoći u stvaranju barijere protiv patogena (141). Ova svojstva doprinose prirodnoj obrani od infekcija u usnoj šupljini.

*Lautropia* je bakterijski rod iz koljena *Proteobacteria* koji je značajno zastupljen u KSU skupini, s potencijalnom vrijednošću biomarkera u kontekstu promjena u salivarnoj mikrobioti ovih bolesnika. Istraživanja pokazuju potencijalnu povezanost kolonizacije roda *Lautropia* s narušenim imunskim sustavom, a značajno veća zastupljenost ovog roda identificirana je u bolesnika s oralnim lichen planusom (142).

Prema našim rezultatima, u salivarnoj mikrobioti bolesnika s KSU-om identificirane su relativno veće zastupljenosti bakterijskih rodova *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Megasphaera*, *Neisseria*. U kontekstu bolesti usne šupljine i sistemskih bolesti, jedna od najznačajnijih vrsta roda *Porphyromonas* je *Porphyromonas gingivalis*. Ta gram-negativna anaerobna bakterija, osim što je ključni je patogen u razvoju parodontitisa, ima mogućnost

probijanja mukozne barijere i ulaska u sistemski krvotok. Uz vrlo snažnu povezanost sa RA-om (47,48,76), povezuje se i s upalnim bolestima crijeva (73). Veća zastupljenost *Porphyromonasa* nađena je i kod bolesnika s dijabetesom, aterosklerotskim bolestima, oralnim karcinomima, karcinomima gušterače i Alzheimerovom bolesti (74). Istraživanja pokazuju da *Porphyromonas gingivalis* posjeduje veliki broj virulentnih faktora kojima utječe na diferencijaciju CD4<sup>+</sup> T limfocita u Th1, Th2 i Th17 limfocite te otpuštanje proupalnih citokina (73).

*Fusobacterium nucleatum*, gram-negativna anaerobna bakterija, jedna je od zastupljenijih vrsta u usnoj šupljini. U posljednjih nekoliko godina veliki broj istraživanja sugerira da je *Fusobacterium nucleatum* blisko povezan s razvojem različitih sistemskih bolesti, poput kardiovaskularnih bolesti, nepovoljnih ishoda tijekom trudnoće, upalnih bolesti crijeva, karcinoma, Alzheimerove bolesti, respiratornih infekcija, reumatoidnog artritisa itd. (143). Virulentni mehanizam ove bakterije uključuje kolonizaciju, invaziju te indukciju upale i tumorigeneze. *Fusobacterium nucleatum* posjeduje adhezine (FadA) koji, vezanjem za vaskularni endotelijalni kaderin (VE-kaderin), omogućuju prodiranje *Fusobacterium nucleatum* kroz endotelne stanice, što sugerira da bi hematogena transmisija mogla biti jedan od puteva koje bakterije koriste za širenje iz usne šupljine do udaljenih organa, pri čemu je prijelaz endotelne barijere ključan korak u tom procesu (143,144). Također, vrlo često se opisuje sinergističko djelovanje *Fusobacterium nucleatum* i *Porphyromonas gingivalis* koje se povezuje sa bolestima usne šupljine, ali i sa sistemskim bolestima (58).

### 5.3 Povezanost salivarne i crijevne mikrobiote

Ispitivanjem povezanosti salivarne i crijevne mikrobiote pokazali smo da je broj zajedničkih taksona između salivarne i crijevne mikrobiote veći u skupini bolesnika s KSU-om u odnosu na zdrave ispitanike. Takav rezultat sugerira da su sastavi te dvije mikrobiote sličnije kod bolesnika. To bi moglo značiti da kod bolesnih stanja više salivarnih bakterija različitim mehanizmima kolonizira crijeva. Source Tracker analiza pokazala je da su bakterije koje potječu iz sline prisutne u crijevima većeg broja bolesnika s KSU-om nego u zdravih ispitanika. Takav rezultat u skladu je sa rezultatima prikazanim Venn dijagramom. No, daljnjom analizom pokazano je da te bakterije neznatno utječu na cjelokupni bakterijski sastav u crijevima, što može biti i posljedica naših uključujućih i isključujućih kriterija; naime, u studiju su uključeni ispitanici bez parodontnih bolesti, oralnih infekcija i drugih upalnih procesa, a vrlo često

upravo u takvim stanjima patogene bakterije aktiviraju mehanizme koji im omogućuju prolazak kroz sluzničku barijeru i ulazak u krvotok. Također, moguće je da se putem sline transportiraju duž probavnog trakta u tanko i debelo crijevo, gdje mogu utjecati na sastav crijevnog mikrobioma. Source Tracker analiza relativno je nova metoda koja analizira povezanost između dva mikrobioma, no ne uzima u obzir varijabilnost mikrobnih sastava i značajno ovisi o metodi sekvenciranja. Stoga, određivanje sastava mikrobiote shotgun sekvenciranjem (sekvenciranjem cijelog genoma), kao i korištenje preciznijih metoda za ispitivanje korelacije, pružit će bolji i kvalitetniji uvid u povezanost bakterijskih sastava između dvije niše.

#### **5.4 Korelacija bakterija sa težinom bolesti i kliničkim parametrima**

KSU je dugotrajna iscrpljujuća bolest koja značajno ograničava bolesnike u svakodnevnim aktivnostima, smanjuje produktivnost na poslu ili u školi te u velikoj mjeri narušava kvalitetu sna. U našem istraživanju ispitali smo korelaciju statistički značajnih bakterija u skupini bolesnika s KSU-om s težinom bolesti (mjerenom UAS7 upitnikom) i kvalitetom života tih bolesnika (mjerenom CU-Q2oL upitnikom). Tako, rod *Ruminococcus torques* negativno korelira s težinom bolesti, to jest bolesnici s manjim udjelom *Ruminococcus torques* u crijevima imaju veći UAS7 zbroj, što znači veću aktivnosti i teži oblik bolesti. S obzirom da se radi o bakteriji iz porodice *Lachnospiraceae*, koja je jedna od glavnih proizvođača SCFA, za očekivati je da će manja zastupljenost ove bakterije dovesti do smanjene produkcije SCFA te posljedično manjeg broja Treg limfocita, što pridonosi razvoju upale te pojavi urtika, angioedema i svrbeža (99,100,117,128).

Nadalje, uz pomoć Maaslin analize proučavali smo povezanost bakterija s kliničkim parametrima relevantnim za KSU-u. Bakterije iz razreda *Clostridiae* i porodice *Lachnospiraceae* u crijevnoj mikrobioti negativno koreliraju sa CRP vrijednostima, odnosno bolesnici sa sniženim udjelom ovih bakterija imaju povišen upalni parametar. *Clostridiae* čine značajan udio bakterijske populacije u crijevnoj mikrobioti, imaju komenzalni odnos s domaćinom i vrlo važnu ulogu u održavanju homeostaze crijeva. S obzirom na protuupalne uloge *Lachnospiraceae* i *Clostridiae*, ovi rezultati potvrđuju važnost interakcije crijevnih bakterija sa imunskim sustavom.

Porodica *Porphyromonadaceae* relativno je zastupljenija u bolesnika s KSU-om i pozitivno korelira sa anti-TPO vrijednostima, koje su povišene u polovici bolesnika s KSU-om. S obzirom da je u salivarnoj mikrobioti bolesnika relativno zastupljeniji i rod *Porphyromonas*

*gingivalis*, čija je interakcija s imunostimulirajućim sustavom prepoznata u brojnim oralnim i sistemskim bolestima, ulogu ove bakterije u etiopatogenezi KSU-e bilo bi vrijedno istražiti.

## 5.5 Ograničenja i prednosti istraživanja

Kao ograničenje našeg istraživanja ističe se nedostatak anamnestičkih podataka o prehrambenim navikama ispitanika, o načinu kako su rođeni (vaginalno ili carskim rezom), jesu li dojeni te jesu li u djetinjstvu imali alergijske bolesti. Naime, to su faktori koji mogu utjecati na modulaciju i crijevne i salivarne mikrobiote. Također, među ispitanicima je veća dobna razlika, što bi moglo utjecati na rezultate raznolikosti mikrobiote, s obzirom da se sastav mikrobiote mijenja s godinama. Nadalje, uz uzorak sline, kod ispitanika bi se mogli uzeti i uzorci brisa usne šupljine (jezik, bukalna sluznica) kako bi se dobio precizniji bakterijski sastav. Pritom, važno je napomenuti da su visoki financijski troškovi i složenost provedbe ovog istraživanja ograničili broj sudionika.

Prema našim saznanjima, ovo je prvo istraživanje koje je ispitivalo sastav i salivarne i crijevne mikrobiote u bolesnika s KSU-om. Pritom je korištena sofisticirana metoda sekvenciranja (NGS). Naši rezultati ukazuju da bolesnici s KSU-om imaju izmijenjen sastav i salivarne i crijevne mikrobiote. Bolesnici s KSU-om imaju veći udio salivarnih bakterija u crijevima, u odnosu na zdrave ispitanike, što znači da u bolesnika veći broj bakterija iz sline kolonizira crijeva i potencijalno doprinosi aktivaciji imunostimulirajućeg sustava. Također, identificirali smo bakterije koje bi mogle imati ulogu biomarkera u dijagnostici i praćenju bolesnika s KSU-om, a prikazali smo i korelacije značajnih bakterija u slini i crijevima s upalnim parametrom (CRP) i anti-TPO antitijelima sugerirajući povezanost disbioze mikrobioma s autoimunom etiologijom KSU-e.

Rezultati našeg istraživanja mogli bi doprinijeti naporima usmjerenim prema rasvjetljavanju uloge mikrobiote u regulaciji imunostimulirajućeg sustava i etiopatogenezi KSU-e.

Daljnji integrirani pristup istraživanju iz ovog područja, analizom mikrobioma u kombinaciji s metabolomom kod bolesnika s KSU-om, pružit će bolji uvid u ulogu disbioze u razvoju KSU-e, a potencijalno i otvoriti mogućnost individualnog terapijskog pristupa usmjerenog na modulaciju mikrobiote, s ciljem ublažavanja simptoma i poboljšanja kvalitete života ovih bolesnika.

## **6. ZAKLJUČAK**

Većina slučajeva KSU-e posredovana je imunosnim mehanizmima koji dovode do degranulacije mastocita, ključnih stanica u etiopatogenezi ove bolesti. Ljudska mikrobiota ima važnu ulogu u modulaciji i ravnoteži imunskog sustava.

1) Rezultati našeg istraživanja pokazali su **značajne razlike u sastavu crijevne mikrobiote** između bolesnika s KSU-om i zdravih ispitanika.

- Kod bolesnika s KSU-om smanjena je alfa raznolikost, što ukazuje na manju raznolikost bakterijskih vrsta unutar crijevne mikrobiote bolesnika u usporedbi sa zdravim ispitanicima.
- Analiza beta raznolikost pokazala je da su sastavi crijevne mikrobiote u bolesnika s KSU-om slični i da se razlikuju od sastava crijevne mikrobiote u zdravih ispitanika, što ukazuje na drugačiji bakterijski sastav u crijevima bolesnika s KSU-om u odnosu na zdrave ispitanike.
- Identificirali smo značajan pad zastupljenosti bakterija koje proizvode SCFA, važnih čimbenika u održavanju ravnoteže imunskog sustava.
- Rodovi *Eubacterium eligens*, *Roseburia* i *Lachnospiraceae NK4A136* su potencijalni dijagnostički i prognostički biomarkeri za KSU-u.

2) **Sastav salivarne mikrobiote razlikuje se** između bolesnika s KSU-om i zdravih ispitanika.

- Razlike u salivarnoj mikrobioti između skupine bolesnika s KSU-om i zdravih ispitanika očituju se statistički značajnim razlikama u zastupljenosti pojedinih bakterijskih vrsta, rodova, porodica i reda.
- Iako je bakterijski sastav sline u skupini bolesnika manje raznolik u odnosu na zdrave ispitanike, razlike nisu statistički značajne.
- Na temelju analize beta raznolikosti, bolesnici s KSU-om i zdravi ispitanici nisu pokazali tendenciju grupiranja prema specifičnim sličnostima u sastavu salivarne mikrobiote.
- Salivarne bakterije *Capnocytophaga leadbetteri*, *Lautropia* i *Kingella* imaju potencijalnu dijagnostičku vrijednost za KSU-u, no njihovu ulogu u ovoj bolesti tek treba istražiti.

- 3) **Ispitivanjem povezanosti salivarne i crijevne mikrobiote, uočen je veći broj bakterija podrijetlom iz sline kod bolesnika s KSU-om** u odnosu na zdrave ispitanike, što može značiti da kod bolesnika s KSU-om veći broj bakterija djeluje na aktivaciju imunskog sustava u crijevima.

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem ukazuju na povezanost disbioze mikrobiote s postojanjem KSU-e. U liječenju bolesnika s KSU-om nužan je multidisciplinarni pristup, a istraživanja usmjerena na analizu sastava i modulaciju mikrobioma potencijalno će doprinijeti razvoju dodatnih dijagnostičkih i terapijskih opcija u liječenju ovih bolesnika.



## **7. LITERATURA**

1. Zuberbier T, Latiff AHA, Abuzakouk M, Aquilina S, Asero R, Baker D, et al. The International EAACI/GA2LEN/EuroGuiDerm/APAAACI Guideline for the Definition, Classification, Diagnosis and Management of Urticaria. *Allergy*. 2022;77:734-766.
2. Kolkhir P, Muñoz M, Asero R, Ferrer M, Kocatürk E, Metz M, et al. Autoimmune chronic spontaneous urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 2022;149(6):1819–1831.
3. Kolkhir P, Altrichter S, Asero R, Daschner A, Ferrer M, Giménez-Arnau A, et al. Autoimmune diseases are linked to type IIb autoimmune chronic spontaneous urticaria. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2021;13(4):545-559.
4. Maurer M, Weller K, Bindslev-Jensen C, Giménez-Arnau A, Bousquet PJ, Bousquet J, et al. Unmet clinical needs in chronic spontaneous urticaria. A GA2LEN task force report. *Allergy*. 2010;66:317–330.
5. Poddighe, D. The prevalence of chronic spontaneous urticaria (CSU) in the pediatric population. *J. Am. Acad. Dermatol*. 2019;81:e149.
6. Maurer M, Abuzakouk M, Bérard F, Canonica W, Oude Elberink H, Giménez-Arnau A, et al. The burden of chronic spontaneous urticaria is substantial: Real-world evidence from ASSURE-CSU. *Allergy*. 2017;72:2005–2016.
7. Saini SS, Kaplan AP. Chronic Spontaneous Urticaria: The Devil's Itch. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2018;6(4):1097-1106.
8. Gonçalo M, Giménez-Arnau A, Al-Ahmad M, Ben-Shoshan M, Bernstein JA, Ensina LF, et al. The global burden of chronic urticaria for the patient and society. *Br J Dermatol*. 2021;184(2):226-236.
9. Curto-Barredo L, Archilla LR, Vives GR, Pujol RM, Giménez-Arnau AM. Clinical features of chronic spontaneous urticaria that predict disease prognosis and refractoriness to standard treatment. *Acta Derm Venereol*. 2018;98(7):641-647.
10. Melé-Ninot G, Serra-Baldrich E, Curto-Barredo L, Figueras-Nart I, Spertino J, Expósito-Serrano V, et al. Definition of recurrent chronic spontaneous urticaria. *Acta Derm Venereol*. 2020;100(16):adv00267.
11. Church MK, Kolkhir P, Metz M, Maurer M. The role and relevance of mast cells in urticaria. *Immunol Rev*. 2018;282:232-247.

12. Yanase Y, Takahagi S, Ozawa K, Hide M. The role of coagulation and complement factors for mast cell activation in the pathogenesis of chronic spontaneous urticaria. *Cells*. 2021;10:1759.
13. Bologna J, et al. *Dermatology*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2018.
14. Kolkhir P, Elieh-Ali-Komi D, Metz M, Siebenhaar F, Maurer M. Understanding human mast cells: lesson from therapies for allergic and non-allergic diseases. *Nat Rev Immunol*. 2022;22(5):294-308.
15. Siiskonen H, Harvima I. Mast cells and sensory nerves contribute to neurogenic inflammation and pruritus in chronic skin inflammation. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:422.
16. Raap U, Wieczorek D, Gehring M, Pauls I, Ständer S, Kapp A, et al. Increased levels of serum IL-31 in chronic spontaneous urticaria. *Exp Dermatol*. 2010;19(5):464-466.
17. Bracken SJ, Abraham S, MacLeod AS. Autoimmune Theories of Chronic Spontaneous Urticaria. *Front Immunol*. 2019;10:627.
18. Schoepke N, Asero R, Ellrich A, Ferrer M, Gimenez-Arnau A, Grattan CEH, et al. Biomarkers and clinical characteristics of autoimmune chronic spontaneous urticaria: Results of the PURIST Study. *Allergy*. 2019;74(12):2427-2436.
19. Batista M, Calado R, Gil F, Cardoso JC, Tellechea O, Gonçalo M. Histopathology of chronic spontaneous urticaria with occasional bruising lesions is not significantly different from urticaria with typical wheals. *J Cutan Pathol*. 2021;48(8):1020-1026.
20. Giménez-Arnau AM, DeMontojoye L, Asero R, Cugno M, Kulthanan K, Yanase Y, et al. The Pathogenesis of Chronic Spontaneous Urticaria: The Role of Infiltrating Cells. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2021;9(6):2195-2208.
21. Kolkhir P, Church MK, Altrichter S, Skov PS, Hawro T, Frischbutter S, et al. Eosinopenia, in Chronic Spontaneous Urticaria, Is Associated with High Disease Activity, Autoimmunity, and Poor Response to Treatment. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020;8(1):318-325.e5.
22. MacGlashan D Jr, Saini S, Schroeder JT. Response of peripheral blood basophils in subjects with chronic spontaneous urticaria during treatment with omalizumab. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;147:2295-2304.

23. Saini SS. Basophil responsiveness in chronic urticaria. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2009;9:286.
24. Ferrer M. Immunological events in chronic spontaneous urticaria. *Clin Transl Allergy.* 2015;5:30.
25. Dugina TN, Kiseleva EV, Chistov IV, Umarova BA, Strukova SM. Receptors of the PAR family as a link between blood coagulation and inflammation. *Biochemistry.* 2002;67:65–74.
26. He L, Yi W, Huang X, Long H, Lu Q. Chronic Urticaria: Advances in Understanding of the Disease and Clinical Management. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2021;61(3):424–448.
27. Hawro T, Ohanyan T, Schoepke N, Metz M, Peveling-Oberhag A, Staubach P, et al. The Urticaria Activity Score-Validity, Reliability, and Responsiveness. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018;6(4):1185-90.e1.
28. Dortas Junior SD, Azizi GG, Moret RN, Bastos Junior RM, Valle SOR. Spiritual well-being and quality of life are impaired in chronic urticaria. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2021;53(5):221-227.
29. Baiardini I, Pasquali M, Braidò F, Fumagalli F, Guerra L, Compalati E, et al. A new tool to evaluate the impact of chronic urticaria on quality: chronic urticaria quality of life questionnaire (CU-Q2oL). *Allergy.* 2005;60:1073-1078.
30. Dias GA, Pires GV, Valle SO, et al. Cross-cultural adaptation of the Brazilian-Portuguese version of the chronic urticaria quality-of-life questionnaire - CU-Q2oL. *Allergy.* 2011;66:1487-1493.
31. Weller K, Groffik A, Church MK, Hawro T, Krause K, Metz M, et al. Development and validation of the Urticaria Control Test: a patient-reported outcome instrument for assessing urticaria control. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(5):1365-1372.e13726.
32. Varghese R, Rajappa M, Chandrashekar L, Kattimani S, Archana M, Munisamy M, et al. Association among stress, hypocortisolism, systemic inflammation, and disease severity in chronic urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2016;116(4):344-348.e1.
33. Guillen-Aguinaga S, Jauregui Presa I, Aguinaga-Ontoso E, Guillen-Grima F, Ferrer M. Updosing nonsedating antihistamines in patients with chronic spontaneous urticaria: a systematic review and meta-analysis. *Br. J. Dermatol.* 2016;175:1153–1165.

34. Schulman ES. Development of a monoclonal anti-immunoglobulin E antibody (omalizumab) for the treatment of allergic respiratory disorders. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:S6-S11.
35. Maurer M, Altrichter S, Bieber T, Biedermann T, Brautigam M, Seyfried S, et al. Efficacy and safety of omalizumab in patients with chronic urticaria who exhibit IgE against thyroperoxidase. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128:202-209.e5.
36. Gericke J, Metz M, Ohanyan T, Weller K, Altrichter S, Skov PS, et al. Serum autoreactivity predicts time to response to omalizumab therapy in chronic spontaneous urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(3):1059-1061.
37. Hannam-Harris AC, Taylor DS, Nowell PC. Cyclosporin A directly inhibits human B-cell proliferation by more than a single mechanism. *J Leukoc Biol.* 1985;38(2):231–239.
38. Kulthanan K, Chaweekulrat P, Komoltri C, Hunnangkul S, Tuchinda P, Chularojanamontri L, et al. Cyclosporine for Chronic Spontaneous Urticaria: A Meta-Analysis and Systematic Review. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018;6(2):586-599.
39. Maurer M, Ensina LF, Gimenez-Arnau AM, Sussman G, Hide M, Saini S. Efficacy and safety of ligelizumab in adults and adolescents with chronic spontaneous urticaria: results of two phase 3 randomised controlled trials. *Lancet.* 2023; S0140-6736(23)01684-7.
40. Belkaid Y, Hand T. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell.* 2014;157:121–41.
41. Qin J, Li R, Raes J, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010;464(7285):59-65.
42. Reynoso-García J, Miranda-Santiago AE, Meléndez-Vázquez NM, Velasco-Ramírez SF, Fernández-Rojas CP, Ríos-Tostado JJ, et al. A complete guide to human microbiomes: Body niches, transmission, development, dysbiosis, and restoration. *Front. Syst. Biol.* 2022;2:951403.
43. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:11971–11975.
44. Black M, Bhattacharya S, Philip S, Norman JE, McLernon DJ. Planned repeat cesarean section at term and adverse childhood health outcomes: A record-linkage study. *PLoS Med.* 2016;13:e1001973.

45. Reid T, Schloss PD. Dynamics and associations of microbial community types across the human body. *Nature*. 2014;509(7500):357–360.
46. Hoeppli RE, Wu D, Cook L, Levings MK. The environment of regulatory T cell biology: cytokines, metabolites, and the microbiome. *Front Immunol*. 2015;6:61.
47. Zhang X, Zhang D, Jia H, Feng Q, Wang D, Liang D, et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nat Med*. 2015;21:895–905.
48. Georges FM, Do NT, Seleem D. Oral dysbiosis and systemic diseases. *Front Dent Med* 2022;3: 995423
49. Li BZ, Zhou HY, Guo B, Chen WJ, Tao JH, Cao NW, et al. Dysbiosis of oral microbiota is associated with systemic lupus erythematosus. *Arch Oral Biol*. 2020;113:104708.
50. Siddiqui H, Chen T, Aliko A, Mydel PM, Jonsson R, Olsen I. Microbiological and bioinformatics analysis of primary Sjogren's Syndrome patients with normal salivation. *J Oral Microbiol*. 2016;8:31119.
51. Gubatan J, Boye TL, Temby M, Sojwal RS, Holman DR, Sinha SR, et al. Gut Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Role in Pathogenesis, Dietary Modulation, and Colitis-Associated Colon Cancer. *Microorganisms*. 2022;10(7):1371.
52. Alkanani AK, Hara N, Gottlieb PA, Ir D, Robertson CE, Wagner BD, et al. Alterations in intestinal microbiota correlate with susceptibility to type 1 diabetes. *Diabetes*. 2015;64:3510-3520.
53. Maifeld A, Bartolomaeus H, Löber U, Avery EG, Steckhan N, Markó L, et al. Fasting alters the gut microbiome reducing blood pressure and body weight in metabolic syndrome patients. *Nat Commun*. 2021;12:1970.
54. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003;361(9356):512–519.
55. Wensel CR, Pluznick JL, Salzberg SL, Sears CL. Next-generation sequencing: insights to advance clinical investigations of the microbiome. *J Clin Invest*. 2022;132(7):e154944.
56. The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function, and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486:207–14.

57. Lu Mengmeng, Suan Shuo, Wang Zheng. Oral microbiota: A new view of body health. *Food Science and Human Wellness*. 2019;8(1):8-15.
58. Ruan Xiaofen, Luo Jie, Zhang Peihua, Cui Weiwei, Huang Hongmei, Shen Xueping, et al. The salivary microbiome shows a high prevalence of core bacterial members yet variability across human populations. *npj Biofilms Microbiomes*. 2022;8:85.
59. Escapa IF, Chen T, Huang Y, Gajare P, Dewhirst FE, Lemon KP. New insights into the human nostril microbiome from the Expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD): a resource for the microbiome of the human aerodigestive tract. *mSystems*. 2018;3:e00187-18.
60. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol*. 2010;192:5002–17.
61. Li Xiaomeng, Liu Yanyan, Yang Xuchen, Li Chenglong, Song Zhiwei, Zhao Yang. The Oral Microbiota: Community Composition, Influencing Factors, Pathogenesis, and Interventions. *Frontiers in Microbiology*. 2022;13:895537.
62. Fábíán TK, Hermann P, Beck A, Fejérdy P, Fábíán G. Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity. *Int. J. Mol. Sci*. 2012;13:4295–4320.
63. Lyng Pedersen AM, Belstrøm D. The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. *J Dent*. 2019;80:3–12.
64. Lim Y, Totsika M, Morrison M, Punyadeera C. Oral microbiome: A new biomarker reservoir for oral and oropharyngeal cancers. *Theranostics*. 2017;7:4313–4321.
65. Takeshita T, Kageyama S, Furuta M, Tsuboi H, Takeuchi K, Shibata Y, et al. Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: the Hisayama Study. *Scientific reports*. 2016;6:22164.
66. Xun Z, Zhang Q, Xu T, Chen N, Chen F. Dysbiosis and ecotypes of the salivary microbiome associated with inflammatory bowel diseases and the assistance in diagnosis of diseases using oral bacterial profiles. *Front Microbiol*. 2018;9:1136.
67. Caselli E, Fabbri C, D'Accolti M, Soffritti I, Bassi C, Mazzacane S, et al. Defining the oral microbiome by whole-genome sequencing and resistome analysis: the complexity of the healthy picture. *BMC Microbiol*. 2020;20:120.

68. Shaw L, Ribeiro ALR, Levine AP, Pontikos N, Balloux F, Segal AW, et al. The human salivary microbiome is shaped by shared environment rather than genetics: evidence from a large family of closely related individuals. *mBio*. 2017;8:e01237-17.
69. Lee WH, Chen HM, Yang SF, Liang C, Peng CY, Lin FM, et al. Bacterial alterations in salivary microbiota and their association in oral cancer. *Sci Rep*. 2017;7:16540.
70. Yamashita Y, Takeshita T. The oral microbiome and human health. *J Oral Sci*. 2017;59:201–206.
71. Zaura E, Brandt BW, Teixeira de Mattos MJ, Buijs MJ, Caspers MP, et al. Same Exposure but Two Radically Different Responses to Antibiotics: Resilience of the Salivary Microbiome versus Long-Term Microbial Shifts in Feces. *mBio*. 2015;6(6):e01693-15.
72. Hujoel PP, Hujoel M, Kotsakis GA. Personal oral hygiene and dental caries: a systematic review of randomized controlled trials. *Gerodontology*. 2018;35(4):282-289.
73. Sohn J, Li L, Zhang L, Settem RP, Honma K, Sharma A, et al. *Porphyromonas gingivalis* indirectly elicits intestinal inflammation by altering the gut microbiota and disrupting epithelial barrier function through IL9-producing CD4<sup>+</sup> T cells. *Molecular oral microbiology*. 2022;37(2):42–52.
74. Peng X, Cheng L, You Y, Tang C, Ren B, Li Y. Oral microbiota in human systematic diseases. *Int J Oral Sci*. 2022;14(1):14.
75. Ahmad R, Haque M. Oral health messengers: diabetes mellitus relevance. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2021;14:3001–15.
76. Tong Y, Zheng L, Qing P, Zhao H, Li Y, Su L, Zhang Q, Zhao Y, Luo Y, Liu Y. Oral Microbiota Perturbations Are Linked to High Risk for Rheumatoid Arthritis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Jan 22;9:475.
77. Fujiwara N, Tsuruda K, Iwamoto Y, Kato F, Odaki T, Yamane N, et al. Significant increase of oral bacteria in the early pregnancy period in Japanese women. *J Investig Clin Dent*. 2017;8:3–7.
78. Chopra A, Radhakrishnan R, Sharma M. *Porphyromonas gingivalis* and adverse pregnancy outcomes: a review on its intricate pathogenic mechanisms. *Crit Rev Microbiol*. 2020;46:213–236.



79. Latorre Uriza C, Velosa-Porras J, Roa NS, Quiñones Lara SM, Silva J, Ruiz AJ, Escobar Arregoces FM. et al. Periodontal disease, inflammatory cytokines, and PGE2 in pregnant patients at risk of preterm delivery: a pilot study. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2018;7027683.
80. De Luca F, Shoenfeld Y. The microbiome in autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol.* 2019;195(1):74-85.
81. Lagier JC, Khelaifia S, Alou MT, Ndongo S, Dione N, Hugon P, et al. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nat Microbiol.* 2016;1:16203.
82. Afzaal M, Saeed F, Shah YA, Hussain M, Rabail R, Socol CT, et al. Human gut microbiota in health and disease: Unveiling the relationship. *Front Microbiol.* 2022;13:999001.
83. Jazani NH, Shahabi S. Gut Microbiota, Dysbiosis and Immune System; A Brief Review. *J Res Appl Basic Med Sci.* 2019;5(2):77-81.
84. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;9:577–589.
85. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2017;81(4):e00036-17.
86. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms.* 2019;7(1):14.
87. Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature.* 2012;486(7402):222-227.
88. Guigoz Y, Doré J, Schiffrin EJ. The inflammatory status of old age can be nurtured from the intestinal environment. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008;11:13–20.
89. Simões CD, Maganinho M, Sousa AS. FODMAPs, inflammatory bowel disease and gut microbiota: Updated overview on the current evidence. *Eur J Nutr.* 2022;61:1187–1198.
90. Wiertsema SP, van Bergenhenegouwen J, Garssen J, Knippels LMJ. The Interplay between the Gut Microbiome and the Immune System in the Context of Infectious

- Diseases throughout Life and the Role of Nutrition in Optimizing Treatment Strategies. *Nutrients*. 2021, 9;13(3):886.
91. Tibbs TN, Lopez LR, Arthur JC. The influence of the microbiota on immune development, chronic inflammation, and cancer in the context of aging. *Microb Cell*. 2019;6:324.
  92. Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, Núñez G. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev*. 2017;279:70-89.
  93. Thaiss CA, Zmora N, Levy M, Elinav E. The microbiome and innate immunity. *Nature*. 2016;535:65–74.
  94. Zong X, Fu J, Xu B, Wang Y, Jin M. Interplay between gut microbiota and antimicrobial peptides. *Anim Nutr*. 2020 Dec;6(4):389-396.
  95. Francino MP. Early development of the gut microbiota and immune health. *Pathogens*. 2014;3:769–790.
  96. Owaga E, Hsieh RH, Mugendi B, Masuku S, Shih CK, Chang JS. Th17 cells as potential probiotic therapeutic targets in inflammatory bowel diseases. *Int J Mol Sci*. 2015;16:20841–20858.
  97. Akhtar M, Chen Y, Ma Z, Zhang X, Shi D, Khan JA, et al. Gut microbiota-derived short chain fatty acids are potential mediators in gut inflammation. *Animal nutrition*. 2021;8:350-360.
  98. Vacca M, Celano G, Calabrese FM, Portincasa P, Gobbetti M, De Angelis M. The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. *Microorganisms*. 2020;8(4).
  99. Ranjbar R, Vahdati SN, Tavakoli S, Khodaie R, Behboudi H. Immunomodulatory roles of microbiota-derived short-chain fatty acids in bacterial infections. *Biomed Pharmacother*. 2021;141:111817.
  100. Asarat M, Apostolopoulos V, Vasiljevic T, Donkor O. Short-Chain Fatty Acids Regulate Cytokines and Th17/Treg Cells in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells in vitro. *Immunological investigations*. 2016;45(3):205-222.
  101. Corrêa-Oliveira R, Fachi JL, Vieira A, Sato FT, Vinolo MA. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clin Transl Immunology*. 2016;5(4):e73.

102. Maffei C, Martina A, Corradi M, Quarella S, Nori N, Torriani S, et al. Association between intestinal permeability and faecal microbiota composition in Italian children with beta cell autoimmunity at risk for type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2016;32:700-709.
103. Alpizar-Rodriguez D, Lesker TR, Gronow A, Gilbert B, Raemy E, Lamacchia C, et al. *Prevotella copri* in individuals at risk for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2019;78:590-593.
104. Wells PM, Adebayo AS, Bowyer RCE, Freidin MB, Finckh A, Strowig T, et al. Associations between gut microbiota and genetic risk for rheumatoid arthritis in the absence of disease: a cross-sectional study. *Lancet Rheumatol.* 2020;2:e418-e427.
105. Ağagündüz D, Cocozza E, Cemali Ö, Bayazıt AD, Nani MF, Cerqua I, Morgillo F, Saygılı SK, Berni Canani R, Amero P, Capasso R. Understanding the role of the gut microbiome in gastrointestinal cancer: A review. *Front Pharmacol.* 2023 Jan 24;14:1130562.
106. Widhiati S, Purnomosari D, Wibawa T, Soebono H. The role of gut microbiome in inflammatory skin disorders: A systematic review. *Dermatol Reports.* 2021 Dec 28;14(1):9188.
107. Lu T, Chen Y, Guo Y, Sun J, Shen W, Yuan M, Zhang S, He P, Jiao X. Altered Gut Microbiota Diversity and Composition in Chronic Urticaria. *Dis Markers.* 2019;2019:6417471.
108. Wang D, Guo S, He H, Gong L, Cui H. Gut Microbiome and Serum Metabolome Analyses Identify Unsaturated Fatty Acids and Butanoate Metabolism Induced by Gut Microbiota in Patients with Chronic Spontaneous Urticaria. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:24.
109. Nabizadeh E, Jazani NH, Bagheri M, Shahabi S. Association of altered gut microbiota composition with chronic urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2017;119:48-53.
110. Zhang X, Zhang J, Chu Z, Shi L, Geng S, Guo K. Gut Microbiome Alterations and Functional Prediction in Chronic Spontaneous Urticaria Patients. *J Microbiol Biotechnol.* 2021;31:747-755.
111. Liu R, Peng C, Jing D, Xiao Y, Zhu W, Zhao S, Zhang J, Chen X, Li J. Biomarkers of Gut Microbiota in Chronic Spontaneous Urticaria and Symptomatic Dermographism. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:1111.

112. Wang X, Yi W, He L, Luo S, Wang J, Jiang L, Long H, Zhao M, Lu Q. Abnormalities in Gut Microbiota and Metabolism in Patients with Chronic Spontaneous Urticaria. *Front Immunol.* 2021;12:691304.
113. Krišto M, Lugović-Mihić L, Muñoz M, Rupnik M, Mahnic A, Ozretić P, et al. Gut Microbiome Composition in Patients with Chronic Urticaria: A Review of Current Evidence and Data. *Life (Basel, Switzerland).* 2023;13(1):152.
114. Al Bander Z, Nitert MD, Mousa A, Naderpoor N. The gut microbiota and inflammation: An overview. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17:7618.
115. Atwa M, Emara A, Youssef N, Bayoumy N. Serum concentration of IL-17, IL-23 and TNF- $\alpha$  among patients with chronic spontaneous urticaria: Association with disease activity and autologous serum skin test. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2014;28:469–474.
116. Sun RS, Sui JF, Chen XH, Ran XZ, Yang ZF, Guan WJ, et al. Detection of CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells in peripheral blood of patients with chronic autoimmune urticaria. *Aust J Dermatol.* 2011;52:e15–e18.
117. Arshi S, Babaie D, Nabavi M, Tebianian M, Ghalehbaghi B, Jalali F, et al. Circulating level of CD4+ CD25+ FOXP3+ T cells in patients with chronic urticaria. *Int J Dermatol.* 2014;53:e561–e566.
118. Ćesić D, Lugović-Mihić L, Ferček I, Grginić AG, Jelić M, Bešlić I, et al. Salivary Microbiota Is Significantly Less Diverse in Patients with Chronic Spontaneous Urticaria Compared to Healthy Controls: Preliminary Results. *Life.* 2021; 11(12):1329.
119. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol.* 2019 Aug;37(8):852-857.
120. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011;12(6):R60.
121. Mallick H, Rahnavard A, McIver LJ, Ma S, Zhang Y, Nguyen LH, et al. Multivariable association discovery in population-scale meta-omics studies. *PLoS Comput Biol.* 2021;17(11):e1009442.
122. Knights D, Kuczynski J, Charlson ES, Zaneveld J, Mozer MC, Collman RG, et al. Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking. *Nat Methods.* 2011;8(9):761-3.

123. Hajian-Tilaki K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian J Intern Med.* 2013;4(2):627-35
124. Tuchinda P, Kulthanan K, Chularojanamontri L, Arunkajohnsak S, Sriussadaporn S. Relationship between vitamin D and chronic spontaneous urticaria: a systematic review. *Clin Transl Allergy.* 2018;8:51.
125. Gao L, Cheng Z, Zhu F, Bi C, Shi Q, Chen X. The Oral Microbiome and Its Role in Systemic Autoimmune Diseases: A Systematic Review of Big Data Analysis. *Frontiers in big data.* 2022;5:927520.
126. Lopetuso LR, Scaldaferri F, Petito V, Gasbarrini A. Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut pathogens.* 2013;5(1):23.
127. Hee BVD, Wells JM. Microbial regulation of host physiology by short-chain fatty acids. *Trends in Microbiology.* 2021;29:700–712.
128. Chen WC, Chiang BL, Liu HE, Leu SJ, Lee YL. Defective functions of circulating CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells in patients with chronic ordinary urticaria. *J Dermatol Sci.* 2008;51(2):121–130.
129. Folkerts J, Redegeld F, Folkerts G, Blokhuis B, van den Berg MPM, de Bruijn MJW, et al. Butyrate Inhibits Human Mast Cell Activation via Epigenetic Regulation of FcεRI-Mediated Signaling. *Allergy.* 2020;75:1966–1978.
130. Theiler A, Bärnthaler T, Platzer W, Richtig G, Peinhaupt M, Rittchen S, et al. Butyrate ameliorates allergic airway inflammation by limiting eosinophil trafficking and survival. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;144(3):764–776.
131. Eeckhaut V, Machiels K, Perrier C, Romero C, Maes S, Flahou B, et al. Butyricococcus pullicaecorum in Inflammatory Bowel Disease. *Gut.* 2013;62:1745–1752.
132. Chang SC, Shen MH, Liu CY, Pu CM, Hu JM, Huang CJ. A gut butyrate-producing bacterium *Butyricococcus pullicaecorum* regulates short-chain fatty acid transporter and receptor to reduce the progression of 1,2-dimethylhydrazine-associated colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2020;20(6):327.
133. Tett A, Pasolli E, Masetti G, Ercolini D, Segata N. Prevootella diversity, niches and interactions with the human host. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(9):585–599.

134. Precup G, Vodnar DC. Gut Prevotella as a possible biomarker of diet and its eubiotic versus dysbiotic roles: a comprehensive literature review. *Br J Nutr.* 2019;122(2):131–140.
135. Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS ONE.* 2010;5:e8578.
136. Zhang L, Liu Y, Zheng HJ, Zhang CP. The Oral Microbiota May Have Influence on Oral Cancer. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:476.
137. Jolivet-Gougeon A, Bonnaure-Mallet M. Screening for prevalence and abundance of Capnocytophaga spp by analyzing NGS data: A scoping review. *Oral Diseases.* 2021;27(7):1621-1630.
138. Kelsen J, Bittinger K, Pauly-Hubbard H, Posivak L, Grunberg S, Baldassano R, et al. Alterations of the Subgingival Microbiota in Pediatric Crohn's Disease Studied Longitudinally in Discovery and Validation Cohorts. *Inflammatory bowel diseases.* 2015;21(12):2797-2805.
139. Fossé Q, Flateau C, Gomart C, Decousser JW, Gallien S. Severe community-acquired Capnocytophaga leadbetteri pneumonia in an HIV-infected patient. *Medecine et maladies infectieuses.* 2018;48(2):155-157.
140. Yagupsky P. Kingella kingae: carriage, transmission, and disease. *Clinical microbiology reviews.* 2015;28(1):54-79.
141. Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, Palmer SR, Chakraborty B, Wen ZT, et al. Biology of Oral Streptococci. *Microbiol Spectr.* 2018;6(5):GPP3-0042-2018.
142. He Y, Gong D, Shi C, Shao F, Shi J, Fei J. Dysbiosis of oral buccal mucosa microbiota in patients with oral lichen planus. *Oral diseases.* 2017;23(5):674-682.
143. Zixin Fan, Pengzhou Tang, Cheng Li, Qi Yang, Yan Xu, Chuan Su et al.. Fusobacterium nucleatum and its associated systemic diseases: epidemiologic studies and possible mechanisms. *Journal of Oral Microbiology.* 2023;15(1).
144. Han YW, Ikegami A, Rajanna C, et al. Identification and characterization of a novel adhesin unique to oral fusobacteria. *J Bacteriol.* 2005;187(15):5330-5340.

## **8. ŽIVOTOPIS S POPISOM OBJAVLJENIH RADOVA**

Diana Ćesić rođena je 11. listopada 1989. godine u Sinju. Nakon završene opće gimnazije 2008. godine upisala je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, a 2014. stekla je zvanje doktora medicine. Specijalizaciju iz dermatovenerologije započela je 2016. godine u Klinici za kožne i spolne bolesti Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice. Tijekom specijalizacije završila je poslijediplomski stručni studij iz dermatovenerologije pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a 2022. godine položila je specijalistički ispit. 2017. godine upisala je poslijediplomski doktorski studij iz područja Biomedicine i zdravstva na Stomatološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom dokorskog studija aktivno je sudjelovala u znanstveno-istraživačkim projektima Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu: „Obilježja mikrobioma i kvaliteta života bolesnika s upalnim bolestima kože“ i „Ispitivanje mikrobioma kože kod bolesnika s periorificijalnim dermatitisom“. Autor je i koautor više znanstvenih članaka objavljenih u visoko indeksiranim znanstvenim časopisima, kongresnih sažetaka i poglavlja u knjigama. Aktivno sudjeluje u stručnim usavršavanjima i simpozijima iz područja dermatovenerologije. Članica je Europskog dermatovenerološkog društva (EADV) i Hrvatskog dermatovenerološkog društva. Majka je dvoje djece, Roka i Mie.



Popis objavljenih radova:

**Publikacije:**

- **Ćesić D**, Lugović Mihić L, Ozretić P, Lojkić I, Buljan M, Šitum M, Zovak M, Vidović D, Mijić A, Galić N, Tambić Andrašević A. Association of Gut Lachnospiraceae and Chronic Spontaneous Urticaria. *Life*. 2023;13(6):1280. Q2 (rad proizašao iz doktorskog rada)
- **Ćesić D**, Lugović Mihić L, Ferček I, Gverić Grginić A, Jelić M, Bešlić I, Tambić Andrašević A. Salivary Microbiota Is Significantly Less Diverse in Patients with Chronic Spontaneous Urticaria Compared to Healthy Controls: Preliminary Results. *Life*. 2021;11(12):1329. Q2 (rad proizašao iz doktorskog rada)
- Krišto M, Lugović Mihić L, Muñoz M, Rupnik M, Mahnic A, Ozretić P, Jaganjac M, **Ćesić D**, Kuna M. Gut Microbiome Composition in Patients with Chronic Urticaria: A Review of Current Evidence and Data. *Life*. 2023;13(1):152. Q2
- Ferček I, Lugović Mihić L, Tambić-Andrašević A, **Ćesić D**, Grginić AG, Bešlić I, Mravak-Stipetić M, Mihatrov-Štefanović I, Buntić AM, Čivljak R. Features of the Skin Microbiota in Common Inflammatory Skin Diseases. *Life*. 2021;11(9):962. Q2
- Lugović Mihić L, **Ćesić D**, Vuković P, Novak Bilić G, Šitum M, Špoljar S. Melanoma development: current knowledge on melanoma pathogenesis. *Acta Dermatovenerol Croat*. 2019;27(3):163-16. Q4
- Lugović-Mihić L, Duvančić T, Ferček I, Vuković P, Japundžić I, **Ćesić D**. Drug-photosensitivity: a continuing diagnostic challenge. *Acta Clin Croat*. 2017;56(2):277-283. Q4
- Jerković H, Bešlić I, **Ćesić D**, Šitum M. The psychosocial burden of urticaria RAD CASA – Medical Sciences. 548=56-57 (2021): 98-103.

### Kongresni sažeci:

- **Ćesić D**, Lugović Mihić L, Ozretić P. Some of the main producers of short-chain fatty acids are decreased in patients with chronic spontaneous urticaria. Simpozij iz kontaktnog dermatitisa, atopijskog dermatitisa, profesionalnih bolesti kože, urtikarije i reakcija preosjetljivosti na lijekove, International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG), Split, 31.03.-02.04.2023.
- Lugović Mihić L, **Ćesić D**. Altered gut microbiota composition in patients in patients with chronic urticaria."8th Conference on Innovations in nutrition and food science". Rim, Italija , 07.-08.09. 2023.
- **Ćesić D**, Tambić -Andrašević A, Ferček I, Bešlić I, Ilić I, Delaš Aždajić M, Lugović Mihić L. Association between salivary microbiota and chronic spontaneous urticaria: our results. 7. kongres hrvatskih dermatovenerologa s međunarodnim sudjelovanjem, Vodice, 05.-08.05.2022.
- Ferček I, Tambić Andrašević A, **Ćesić D**, Ferara N, Gverić Grginić A, Bešlić I, Čivljak R, Lugović Mihić L. Changes in the microbiome in patients with common inflammatory skin diseases. 7. kongres hrvatskih dermatovenerologa s međunarodnim sudjelovanjem, Vodice, 05.-08.05.2022.
- Delaš Aždajić M, Kosanović Ličina ML, Bešlić I, Ilić I, Novak Hlebar I, **Ćesić D**, Lugović Mihić L. The trend of increased scabies occurrence – epidemiological data from Croatia. 7. kongres hrvatskih dermatovenerologa s međunarodnim sudjelovanjem, Vodice, 05.-08.05.2022.
- **Ćesić D**, Lugović -Mihić L: Chronic urticaria - impact on quality of life. 5th Croatian Congress of psychodermatology, Zagreb, 02.-05.09.2021
- Lugović Mihić L, Pondeljak I, Bukvić I, Bulat, V Ferček I, **Ćesić D**. Influence of associated diseases on skin disease outcomes in patients with chronic urticaria and nummular eczema. 29th EADV Congress (virtual). Beč, 29.-31.10.2020.

- Bolanča Ž, **Ćesić D.** Kako spriječiti starenje kože? Bolesti kože s promjenama na licu i usnoj šupljini. Zagreb, 15.02. 2019.
- Prkačin I, **Ćesić D**, Šitum M, Dediol I. Eritrodermija-izazov za postavljanje dijagnoze. Prosinački simpozij. Zagreb, 07. 12. 2018.
- Lugović-Mihić L, Duvančić T, Bulat V, Krišto M, Bukvić I, **Ćesić D.** Omalizumab in our chronic urticaria/angioedema patients - how did it change their quality of life? 6. kongres hrvatskih dermatovenerologa s međunarodnim sudjelovanjem. Pula, 04.-07.10.2018.
- Bolanča Ž, **Ćesić D.** Najčešći estetski zahvati pomlađivanja lica. Bolesti kože s promjenama na licu i usnoj šupljini, Zagreb, 19. 05. 2017.

#### **Poglavlja u knjigama:**

- Bolanča Ž, **Ćesić D.** Estetski zahvati u dermatologiji. Lugović Mihić L, Šitum M, suradnici. Bolesti kože s promjenama na licu i usnoj šupljini. Medicinska naklada; 2017.
- Jerković H, Bešlić I, **Ćesić D**, Šitum M. Psihološki aspekti i kvaliteta života oboljelih od urtikarije. Lugović Mihić L, suradnici. Urtikarije i egzemi/dermatitisi. Medicinska naklada; 2021.

**PRILOZI**

## Prilog 1.

### Upitnik za mjerenje aktivnosti i težine urtikarije (UAS7)

#### Urticaria Activity Score (UAS7)

DATUM:	DNEVNI BROJ URTIKA + DNEVNI INTENZITET SVRBEŽA = UAS									
_____	0	1	2	3	+	0	1	2	3	
_____	0	1	2	3	+	0	1	2	3	
_____	0	1	2	3	+	0	1	2	3	
_____	0	1	2	3	+	0	1	2	3	
_____	0	1	2	3	+	0	1	2	3	
_____	0	1	2	3	+	0	1	2	3	
_____	0	1	2	3	+	0	1	2	3	

0=bez pojave urtika / bez svrbeža

1=mali broj urtika (<20 u 24 sata) / blagi svrbež

2=umjeren broj urtika (20 -50 u 24 sata) / umjeren svrbež

3=veliki broj urtika (>50 u 24 sata) / intenzivan svrbež, utječe na dnevne aktivnosti

## Prilog 2.

### Upitnik o kvaliteti života bolesnika sa kroničnom urtikarijom ( CU-Q2oL upitnik)

Molim Vas da ispunite ovaj upitnik. Vaši odgovori će pomoći Vašem liječniku dermatologu da uvidi koliko Vaša bolest utječe na Vašu kvalitetu života. Molim Vas da zaokružite odgovor koji najbolje opisuje svaku od sljedećih stvari. Svaka tvrdnja u upitniku je bodovana od 1 do 5, gdje 1 označuje UOPĆE NE, dok 5 označuje VRLO MNOGO.

*U sljedećim pitanjima odgovorite u kojoj mjeri su Vam smetali sljedeći simptomi. Ukoliko vas nisu uopće smetali, zaokružite 1, a ukoliko su vas smetali vrlo često zaokružite 5.*

1. Svrbež  
1 2 3 4 5
2. Urtike  
1 2 3 4 5
3. Oticanje očiju  
1 2 3 4 5
4. Oticanje usana  
1 2 3 4 5

*U sljedećim pitanjima odgovorite u kojoj mjeri Vas urtikarija remeti u pojedinim životnim aspektima:*

5. Urtikarija remeti moj posao  
1 2 3 4 5
6. Urtikarija remeti moju fizičku aktivnost  
1 2 3 4 5
7. Urtikarija remeti moj san  
1 2 3 4 5
8. Urtikarija remeti moje slobodno vrijeme  
1 2 3 4 5
9. Urtikarija remeti moje društvene odnose  
1 2 3 4 5
10. Urtikarija remeti moju prehranu  
1 2 3 4 5

*U sljedećim pitanjima odgovorite u kojoj mjeri su simptomi urtikarije povezani sa određenim poteškoćama i ograničenjima:*

11. Imate li problema s usnivanjem?

1 2 3 4 5

12. Budite li se tijekom noći?

1 2 3 4 5

13. Osjećate li se loše tijekom dana jer ste loše spavali?

1 2 3 4 5

14. Imate li problem s koncentracijom?

1 2 3 4 5

15. Osjećate li se nervozno?

1 2 3 4 5

16. Jeste li loše raspoloženi?

1 2 3 4 5

17. Jeste li ograničili odabir hrane?

1 2 3 4 5

18. Remeti li urtikarija vaše sportske aktivnosti?

1 2 3 4 5

19. Imate li problema s nuspojavama lijekova?

1 2 3 4 5

20. Jeste li se ikada osramotili zbog simptoma urtikarije?

1 2 3 4 5

21. Osjećate li sram kad idete na javna mjesta?

1 2 3 4 5

22. Imate li ikakvih problema prilikom korištenja kozmetike?

1 2 3 4 5

23. Imate li ograničenja prilikom kupovine odjeće, s obzirom na odabir vrste materijala?

1 2 3 4 5

***Ukupni CU-Q2oL zbroj:***