

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

MAGISTRSKO DELO
PREVERJANJE VPLIVA DODAJANJA
PROBIOTIKA (*Lactobacillus rhamnosus* GG)
NA RAVEN STRESA

DOROTEJA KUCHAR

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Magistrsko delo

Preverjanje vpliva dodajanja probiotika (*Lactobacillus rhamnosus GG*) na raven stresa

Checking the effect of probiotic supplementation (*Lactobacillus rhamnosus GG*) on stress levels

Ime in priimek: Doroteja Kuhar
Študijski program: Biopsihologija, 2. stopnja
Mentor: prof. dr. Gaj Vidmar
Somentor: asist. dr. Tina Tinkara Peternej

Koper, julij 2021

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Doroteja KUHAR

Naslov magistrskega dela: Preverjanje vpliva dodajanja probiotika (*Lactobacillus rhamnosus* GG) na raven stresa

Kraj: Koper

Leto: 2021

Število listov: 90

Število slik: 16

Število tabel: 9

Število prilog: 5

Št. strani prilog: 8

Število referenc: 147

Mentor: prof. dr. Gaj Vidmar

Somentor: asist. dr. Tina Tinkara Peternelj

UDK: 159.944.4:612.39(043.2)

Ključne besede: stres, kortizol, probiotiki, povezava črevesje-možgani

Izvleček:

Človeška mikrobiota je celotna zbirka različnih mikroorganizmov, ki živijo na in v človeškem telesu. Njena sestava se razlikuje med posamezniki, primarno funkcijo pa naj bi imela pri prebavljanju hrane in absorpciji hranil. Novejša znanstvena dognanja kažejo, da je pomembno vpletena tudi pri reguliranju imunskega odziva, v sintezo vitaminov in določenih nevrottransmitterjev ter pri komunikaciji z različnimi sistemi v telesu (npr. komunikacija z možgani preko osi črevesje-mikrobiom-možgani in hipotalamično-hipofizno-nadledvično os). Na mikrobioto vplivajo številni dejavniki (npr. prehrana, telesna aktivnost in IIlacob), zato v sodobnem svetu, v katerem smo podvrženi številnim stresorjem, večkrat pride do njenega neravnovesja. To se lahko izraža v obliki različnih motenj in bolezni (vnetna črevesna bolezen, rakava obolenja, anksioznost ipd.). Vzpostavitev zdrave mikrobiote je pomembna za ohranjanje zdravja ter dobrega počutja in ker je slednje s sodobnim načinom življenja težje dosegljivo, skušajo raziskovalci odkriti različne alternativne načine vplivanja na njeno optimalno in uravnovešeno sestavo. Namen predstavljene študije je bil raziskati vpliv 26-dnevnega uživanja prehranskega dopolnila v obliki probiotičnih kapsul ali placebo na stresni odziv pri 81 zdravih posameznikih. Predpostavke, da uživanje probiotika vpliva na zmanjšanje ravni kortizola v slini ter na nižje dosežne rezultate na vprašalniku DASS-21,

nismo potrdili, ugotovili pa smo statistično značilno spremembo doživljanja stresa pri udeležencih, ki so verjeli, da uživajo probiotike. Raziskava potrjuje pomembnost učinka placeba ter predstavlja izhodišče za nadaljnje raziskovanje vplivanja na homeostazo mikrobioma preko vnosa probiotikov.

Key words documentation

Name and SURNAME: Doroteja KUHAR

Title of the thesis: Checking the effect of probiotic supplementation (*Lactobacillus rhamnosus* GG) on stress levels

Place: Koper

Year: 2021

Number of pages: 90

Number of figures: 16

Number of tables: 9

Number of appendix: 5

Number of appendix pages: 8

Number of references: 147

Mentor: Prof. Gaj Vidmar, PhD

Co-Mentor: Assist. Tina Tinkara Peternelj, PhD

UDC: 159.944.4:612.39(043.2)

Keywords: stress, cortisol, probiotics, gut-brain axis

Abstract:

Human microbiota is the entire collection of different microorganisms that live on and in the human body. Its composition varies between individuals and its primary function is associated with food digestion and absorption of nutrients. Newer scientific findings indicate that the microbiome is also importantly involved in the immune response regulation, in the synthesis of vitamins and certain neurotransmitters, and in communication between different nervous systems (e.g., gut-brain axis and hypothalamic-pituitary-adrenal axis). The microbiota is influenced by many factors (e. g., diet, physical activity and stress), thus in the modern world, where we are subjected to numerous stressors, its dysregulation can occur. The latter can be manifested in the form of disorders and diseases (e.g., inflammatory bowel disease, cancer, anxiety). Establishing a healthy microbiota is important for the maintenance of health and well-being, so researchers are trying to develop new methods to influence the optimal and balanced composition of the microbiome. The purpose of the presented study was to investigate the effects of 26 days of probiotic or placebo supplementation on the stress response in 81 healthy individuals. The assumption that probiotic supplementation influences the cortisol levels in saliva and lower depression and anxiety questionnaire scores was not confirmed, however, a statistically significant change in the stress experience by individuals convinced that they were taking probiotic supplements was observed. The study

confirms the importance of the placebo effect and represents a basis for further research into the effect on microbiome homeostasis through probiotic intake.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	MIKROBIOTA ČLOVEKA	1
1.1.1	Enterični živčni sistem	2
1.1.2	Os črevesje-mikrobiom-možgani	3
1.1.3	Kratkoverižne maščobne kisline	4
1.1.4	Povezava z vagusom in vpliv na živčni sistem	6
1.1.5	Regulacija imunskega odziva.....	7
1.1.6	Vpliv mikroorganizmov na črevesne celice in izločanje hormonov	8
1.1.7	Disbioza mikrobiote	9
1.2	STRES.....	10
1.2.1	HPA os	11
1.2.2	Kortizol	13
1.2.3	Stres v povezavi z zdravjem in boleznijo.....	16
1.2.4	Stres v vsakdanjem življenju.....	20
1.3	PROBIOTIKI	21
1.3.1	Probiotiki <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (LGG).....	23
1.3.2	Prehrana.....	23
1.4	NAMEN IN CILJI.....	24
1.5	RAZISKOVALNA VPRAŠANJA IN HIPOTEZE	25
2	METODA.....	26
2.1	UDELEŽENCI.....	26
2.2	PRIPOMOČKI	27
2.2.1	Vprašalniki	27
2.2.2	Pripomočki za merjenje koncentracije kortizola v slini	27
2.2.3	Probiotiki WAYA in placebo kapsule.....	27
2.3	POSTOPEK.....	28
2.3.1	Protokol raziskave	28
2.3.2	Vprašalniki	29
2.3.2.1	Demografski vprašalnik	29
2.3.2.2	Splošni vprašalnik 1	29
2.3.2.3	Vprašalnik depresije, anksioznosti in stresa (DASS-21)	30
2.3.2.4	Splošni vprašalnik 2	30
2.3.3	Odvzem in shranjevanje vzorcev	30
2.3.4	Priprava vzorcev in meritev koncentracije kortizola.....	31
2.3.5	Kakovost vzorcev sline	32
2.3.6	Statistična analiza.....	32
2.3.7	Morebitno nasprotje interesov.....	35

3	REZULTATI.....	36
3.1	VREDNOSTI KORTIZOLA	36
3.2	UČINEK PLACEBA ALI PROBIOTIKA	37
3.3	SUBJEKTIVNO ZAZNANE SPREMEMBE PO JEMANJU KAPSUL	39
3.4	OCENE BLAGOSTANJA IN STRESA PRED IN PO JEMANJU KAPSUL....	41
4	RAZPRAVA.....	44
5	SKLEPI.....	48
6	LITERATURA	50

KAZALO TABEL

Tabela 1 Pregled meritev kortizola v slini (nmol/L) v različnih raziskavah.....	15
Tabela 2 Opisne statistike za meritve kortizola pred in po jemanju kapsul za vse udeležence z razpoložljivimi podatki za ustrezno meritev.....	36
Tabela 3 Opisne statistike izvedenih mer kortizola pred in po jemanju kapsul za utežene podatke	37
Tabela 4 Povzetek enosmernih analiz kovariance za ugotavljanje učinka peobiotikov oziroma placeba na raven kortizola v slini.....	38
Tabela 5 Zaznane spremembe in mnenje o zmanjšanju stresa po jemanju probiotične ali placebo kapsule	40
Tabela 6 Zaznane spremembe in mnenje o zmanjšanju sresa glede na mnenje udeleženca, v kateri skupini je bil.....	41
Tabela 7 Korelacije razlik med vrednostmi pred in po jemanju kapsul za oceno stresa in blagostanja, lestvice DASS-21 in izvedene mere kortizola (Pearsonov r in Spearmanov ro; uteženi podatki	42
Tabela 8 Primerjava skupin glede na spremembe subjektivnih ocen po jemanju kapsul (neuteženi podatki).....	42
Tabela 9 Primerjava spremembe izvedenih mer kortizola, dosežkov na lestvicah DASS-21 in subjektivnih ocen blagostanja in stresa po jemanju kapsul glede na mnenje udeleženca, v kateri skupini se je nahajal (uteženi podatki, razen pri subjektivnih ocenah).....	43

KAZALO SLIK IN GRAFIKONOV

Slika 1 Os črevesje-mikrobiom-možgani (Gonzales-Santana in Diaz Hejtz, 2020).....	3
Slika 2 Nastanek in poti delovanja KVMK (Dalile, Oudenhove, Vervliet in Verbeke, 2019)	5
Slika 3 HPA os (Stephens in Wand, 2012).....	12
Slika 4 Hevristični model spreminjanja koncentracij kortizola v slini tekom dneva (prirejeno po Choen, Gianaros in Manuck, 2016; bela črta označuje povprečje, sivo območje predstavlja \pm standardni odklon).....	14
Slika 5 Cirkadiana variacija kortizola v slini pri 20 zdravih udeležencih (osenčen del) in 10 pacientih s Cushingovim sindromom (črne pike) (Laudat idr., 1988).....	16
Slika 6 Hevristični model procesa pri stres (prirejeno po Cohen, Gianaros in Manuck, 2016).....	18
Slika 7 Struktura udeležencev po spolu in starosti	26
Slika 8 Postopek pridobivanja podatkov.....	29
Slika 9 Potek odvzema vzorcev sline z zbiralnikom sline Salivette [®] Cortisol (povzeto po Sarstedt, 2020)	31
Slika 10 IDS-iSYS (Sarstedt), naprava za merjenje kortizola v slini (povzeto po Sarstedt, 2020).....	32
Slika 11 Prikaz manjkajočih podatkov, izločanja udeležencev in uteževanja podatkov	34
Slika 12 Povprečne vrednosti kortizola (s 95% intervalom zaupanja) pred jemanjem kapsul za udeležence z vsemi meritvami kortizola za neutežene (levo; N=36) in utežene (desno; N=29) (debela vodoravna črta označuje skupno povprečje).....	36
Slika 13 Ocene robnih povprečij (s 95% intervalom zaupanja) po jemanju probiotičnih ali placebo kapsul za izvedene mere kortizola.....	38
Slika 14 Ocene robnih povprečij (95% interval zaupanja) po jemanju probiotičnih ali placebo kapsul za lestvice vprašalnika DASS-21	39
Slika 15 Delež zaznanih sprememb in mnenja o zmanjšanju stresa pri jemanju probiotične ali placebo kapsule.....	40
Slika 16 Delež zaznanih sprememb in mnenja o zmanjšanju stresa glede na mnenje udeleženca, v kateri skupini je	41

KAZALO PRILOG

PRILOGA A *Mnenje komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko*

PRILOGA B *Soglasje za sodelovanje pri raziskavi*

PRILOGA C *Brošura za udeležence*

PRILOGA D *Evidenčna tabela za udeležence*

PRILOGA E *Letak za udeležence*

SEZNAM KRATIC

- ACTH – ang. adrenocorticotropic hormone, slo. adrenokorikotropni hormon
AVP – ang. arginine vasopressin slo. arginin vazopresin
CBG – ang. corticosteroid-binding globulin, slo. kortikosteroid vezujoči globulin
CCK – ang. cholecystokinin, slo. holecistokinin
CŽS – slo. centralni živčni sistem
CRH – ang. corticotropin-releasing hormone, slo. kortikotropin sproščujoči hormon
FSC – ang. free serum cortisol, slo. prosti serumski kortizol
GABA – ang. γ -aminobutyric acid, slo. γ -aminobutirična kislina
GBA – ang. gut-brain axis, slo. os črevesje-možgani
GMBA – ang. gut-microbiome-brain axis, slo. os črevesje-mikrobiom-možgani
GIP – ang. glucose-dependent insulintropic peptide, slo. od glukoze odvisen inzulinotropni peptid
GLP1 – ang. glucagon-like peptide 1, slo. glukagonu podoben peptid 1
HPA os – ang. hypothalamic-pituitary-adrenal axis, slo. hipotalamično-hipofizna-nadledvična os
ILC – ang. innate lymphoid cells, slo. limfoidne celice
KVMK – ang. short - chain fatty acids, slo. kratkoverižne maščobne kisline
MAPK – ang. mitogen-activated protein kinase, slo. z mitogenom aktivirana proteinska kinaza (MAP-kinaza)
NF- κ B – ang. nuclear factor κ B, slo. jedrni faktor κ B
NPY – ang. neuropeptide Y, slo. neuropeptid Y
PP – ang. pancreatic polypeptide, slo. polipeptid trebušne slinavke
PVN – ang. paraventricular nucleus, slo. paraventrikularno jedro
PYY – ang. peptide tyrosine-tyrosine, slo. peptid tirozin tirozin
SAM – ang. sympatho-adrenal-medullary mediators, slo. simpatični adrenomedularni tokokrogi
TNF – ang. tumor necrosis factor, slo. tumor nekrotizirajoči faktor
TSC – ang. total serum cortisol, slo. celokupni serumski kortizol
5-HT – ang. serotonin, slo. serotonin

ZAHVALA

Somentorici dr. Tini Tinkari Peternej se zahvaljujem za ves vložen čas, trud, potrpežljivost, nasvete, vzpodbudo in pripravljenost pomagati pri vsaki nalogi in oviri, ki nam je prekrizala pot. Tvoje znanje in občutek za delo z ljudmi sta neprecenljiva.

Mentorju dr. Gaju Vidmarju se zahvaljujem za sodelovanje, nasvete in veliko pomoč pri analizi podatkov in interpretaciji rezultatov.

Dr. Simoni Kralj Fišer se zahvaljujem za znanje in navdušenje o raziskovanju sveta mikrobiote in za pomoč pri pridobivanju probiotikov in placeba.

Dr. Urši Mars Bitenc se zahvaljujem za pomoč pri iskanju primernega vprašalnika za stres in za spodbujanje pri izvedbi raziskave.

Deanu Lipovcu in dr. Michaelu Burnardu se zahvaljujem za pomoč in nasvete pri zbiranju in analizi vzorcev za analizo kortizola.

Vsem sodelujočim v raziskavi: hvala za izkazano pripravljenost in vložen čas. Hvala tudi podjetjema InnoRenew CoE in Medis, ki sta prispevali pripomočke za izvedbo raziskave.

Mojemu možu in hčerki, ki se nama je med pisanjem naloge pridružila, hvala, da sta verjela vame in mi omogočila, da se je raziskava izvedla.

V delo je bilo vpletenih veliko ljudi in vloženega veliko časa in dela. Prav vsak izmed vas je pripomogel, da se je magistrska naloga lahko izvedla in zaključila. Hvala vam, za vse nasvete, vprašanja, namige, za vso potrpežljivost in za izkazano pripravljenost za sodelovanje. Vse to mi je dalo zagon in upanje za nadaljnje raziskovanje.

If you want to go fast, go alone.
If you want to go far, go together.
(*afriški pregovor*)

1 UVOD

1.1 MIKROBIOTA ČLOVEKA

Mikrobiom je dinamičen in interaktiven mikro-ekosistem, opredeljen kot mikrobná skupnost, ki zavzema habitat, ki ima različne fizio-kemične lastnosti in ne vsebuje samo različnih mikroorganizmov temveč zajema tudi njihove dejavnosti in posledično oblikovanje različnih ekoloških niš. Poleg mikrobiote ga sestavljajo še metaboliti (produkti matabolne aktivnosti), pripadajoči geni in ekosistem, ki ga tvori mikrobiota (Berg idr., 2020). Človeško mikrobioto sestavlja veliko različnih mikroorganizmov (bakterije, arheje, kvasovke, enocelični evkarionti in paraziti), ki so prisotni tako na koži kot v notranjih organih, predvsem pa v prebavnem traktu, kjer daleč najvišje koncentracije najdemo v črevesju (Rea, Dinan in Cryan, 2016). Raziskave kažejo, da je pri odraslem človeku razmerje med telesnimi celicami in številom bakterij v telesu 1:1; skupna masa bakterij znaša okvirno 0,2 kg (Sender, Fuchs in Milo, 2016).

Črevesna mikrobiota je porazdeljena po človeškem prebavnem traktu in čeprav je profil mikrobiote vsake osebe drugačen, je relativna številčnost in porazdelitev bakterij med zdravimi ljudmi podobna. Pri odraslem človeku mikrobiota vsebuje približno 1000 vrst in več kot 7000 sevov bakterij (Ley, Peterson in Gordon, 2006). V večji meri jo sestavljata debli bakterij *Firmicutes* in *Bacteroides*, ki imata pomembno vlogo pri presnovi in fizioloških funkcijah gostitelja, sledita pa jima debli *Actinobacteria* in *Verrucomicrobia* (Hollister, Gao in Versalovic, 2014).

Mikrobiota človeka je odvisna od različnih dejavnikov, kot so: način rojstva, uživanje materinega ali adaptiranega mleka, način prehranjevanja, stik z naravo, fizična aktivnost, spalna higiena, uživanje zdravil, izpostavljenost infekcijam ali stresu, izrazito sterilno okolje oz. pretiravanje pri osebni higieni ter kronične bolezni (Rea, Dinan in Cryan, 2016). Od otroštva naprej se stabilizira in postane bolj raznolika, čemur lahko botrujejo različni dejavniki iz okolja, kot so patogeni, zdravila in razni onesnaževalci (Rajilic-Stojanovic idr., 2012). Razvoj mikrobiote in naselitev pomembnih bakterij v črevesju se odvija vzporedno z rastjo in zorenjem nevronov v mladih možganih. S starostjo upada raznovrstnost bakterij v črevesju, prav tako pa se zmanjšuje kompleksnost nevronske povezave (Biagi idr., 2012 in Borre idr., 2014).

Črevesni mikroorganizmi igrajo številne pomembne vloge v našem telesu: vpleteni so v prebavo in presnovo hrane, signaliziranje občutka lakote in sitosti, pomagajo pri detoksifikaciji, sodelujejo v sintezi vitaminov ter so nezamenljiv del imunskega sistema. Črevesne bakterije vplivajo na delovanje enteroendokrinih celic v prebavnem traktu, ki

sproščajo nevrnske prenašalce in hormone, ki preko različnih signalnih poti komunicirajo z možgani (Perlmutter, 2017).

1.1.1 Enterični živčni sistem

V črevesju se nahaja enterični živčni sistem (EŽS), ki mu nekateri rečejo kar drugi možgani. Sestavljen je iz nevronov in celic glija ter zazna in se odziva na dinamični ekosistem prebavil s prenosom živčnih signalov, ki potujejo po celotnem črevesju in v druge organe ter v centralni živčni sistem (CŽS) (Yoo in Mazmanian, 2017). Ključen je za urejanje gibljivosti črevesja in izločanje ter pretok krvi vzdolž celih prebavil, s čimer posredno vpliva tudi na prebavo, absorpcijo in prehajanje vsebine črevesja ter na vzdrževanje homeostaze telesne tekočine, pomembno vlogo pa ima tudi pri obrambi (Fung in Vanden Berghe, 2020). Celice EŽS proizvajajo citokine, ki lahko modulirajo nevrnsko aktivnost in imunski odziv (Yoo in Mazmanian, 2017).

Večina serotonina (5-HT) nastane v črevesju in ne v možganih, saj ga kar 95 % proizvedejo enterokromafinske celice, ki prebivajo v epitelju. 5-HT ima v črevesju pomembno vlogo kot neurotransmiter oz. živčni prenašalec, ki lahko z aktiviranjem vagusa spodbudi peristaltiko (ter s tem lahko povzroči slabost in bruhanje), poleg tega uravnava apetit in spanje ter prispeva k dobremu počutju. 5-HT iz črevesja ne prehaja krvno-možganske bariere, vendar raziskave kažejo, da črevesne bakterije (*Escherichia coli* (K-12), *Lactobacillus plantarum* (FI8595) ipd.) preko fermentacije vlaknin proizvajajo metabolite 5-HT, ki pa lahko prehajajo v možgane (Strandwitz, 2018). 5-HT, ki nastaja v možganih ima vlogo pri uravnavanju počutja, razpoloženja in spomina. Zdravila, ki ciljajo na serotoninske receptorje pa se pogosto uporablja v psihiatriji in nevrologiji (npr. za zdravljenje depresije, posttravmatske stresne motnje, anksioznosti, panične motnje ipd.) (Bamalan in Al Khalili, 2020). Ko se 5-HT sprošča, aktivira receptorje 5-HT₃ na vagusu, ki povečajo glutamatergični sinaptični prenos znotraj možganskega debla. Interakcija med vagusom in serotoninskim sistemom v črevesju in možganih ima pomembno vlogo pri zdravljenju psihiatričnih stanj (Breit, Kupferberg, Rogler in Hasler, 2018).

Vedno bolj postaja jasno, da imajo bakterije v našem črevesju vpliv ne samo na prebavljanje zaužite hrane, temveč tudi na razpoloženje in vedenje (Perlmutter, 2017). Vključenost mikrobiote v os črevesje-možgani (GBA) (ang. *gut-brain axis*) je velika, saj ne komunicira le z lokalnimi celicami in živčnim sistemom v črevesju, ampak komunicira direktno s CŽS preko nevroendokrine in metabolične poti (Carabotti, Scirocco, Maselli in Severi, 2015).

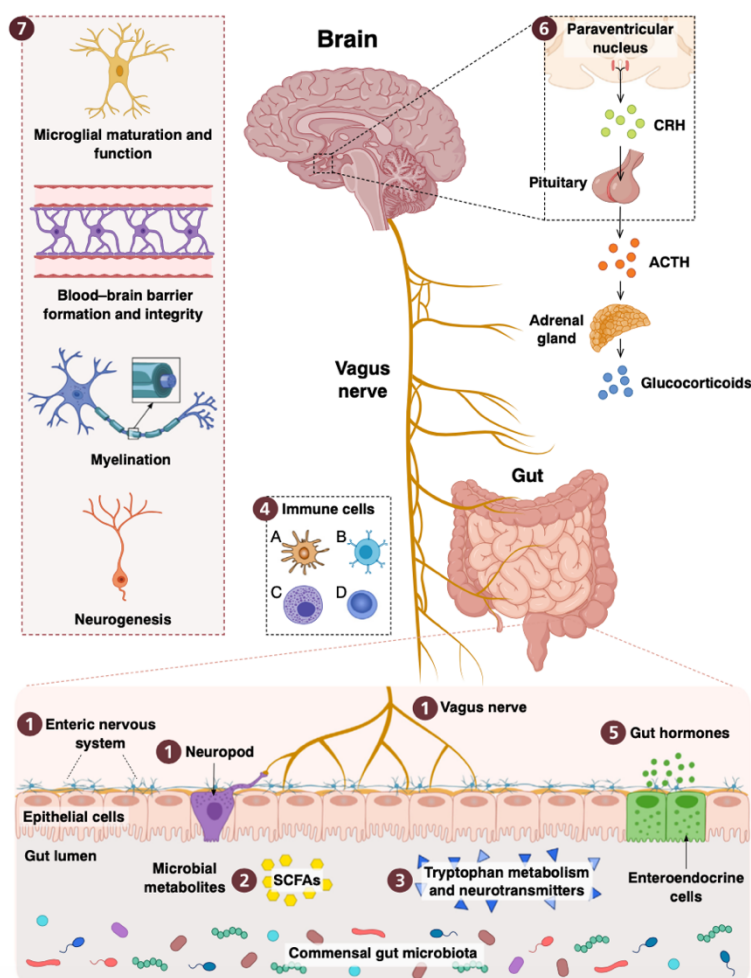
1.1.2 Os črevesje-mikrobiom-možgani

Danes je znano, da so črevesni mikroorganizmi del kompleksnega omrežja, poimenovanega os črevesje-mikrobiom-možgani (GMBA).

Kot že omenjeno, je pomembna vloga GMBA osi spremljanje in opazovanje črevesnih funkcij, kakor tudi odzivanje nanje. Os povezuje čustvene in kognitivne centre v možganih s perifernimi črevesnimi funkcijami in mehanizmi, kot so aktivacija imunskega sistema, prepustnost črevesja, enterični refleksi in entero-endokrini signalizacija. Mehanizmi, na katerih temelji komunikacija GMBA, vključujejo nevro-immuno-endokrine mediatorje (Carabotti, Scirocco, Maselli in Severi, 2015).

Slika 1

Os črevesje-mikrobiom-možgani (Gonzalez-Santana in Diaz Heijtz, 2020)



Med črevesjem in možgani poteka komunikacija, ki vključuje centralni živčni sistem, možgane in hrbtenjačo, avtonomni živčni sistem (AŽS) in hipotalamično-hipofizno-nadledvično os (HPA os, ang. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*) (Carabotti, Scirocco,

Maselli in Severi, 2015). Slika 1 prikazuje mehanizme delovanja GMBA osi (Gonzalez-Santana in Diaz Heijtz, 2020). GMBA os preko več neposrednih in posrednih poti vpliva na možgane: (1) preko signalov, ki jih prenašajo nevronske tokokrogi (npr. dvosmerna komunikacija med možgani in vagusom, enterični živčni sistem ali nevropodi), (2) preko stranskih produktov bakterij pri fermentaciji (kratkoverižne maščobne kisline (KVMK) (ang. *short-chain fatty acids*): propionat, butirat in acetat), (3) preko presnovkov triptofana in neurotransmiterjev, (4) preko citokinov, ki jih izločajo imunske celice (dendritična celica, celica B, mastociti, celica T) in (5) preko delovanja črevesnih hormonov. Nekatere od teh molekul lahko aktivirajo vagusni živec ali dosežejo možgane preko sistemske cirkulacije in neposredno vplivajo na možganske funkcije.

Za aktivacijo HPA osi je značilno sproščanje kortikotropin sproščujočega hormona (CRH) iz paraventricularnega jedra hipotalamusa, kar spodbudi sproščanje adrenokortikotropnega hormona (ACTH) iz sprednje hipofize. ACTH deluje na skorjo nadledvične žleze tako, da stimulira proizvodnjo in sproščanje glukokortikoidov (npr. kortizol pri ljudeh), kar lahko vpliva na fiziologijo črevesja (npr. na modulacijo črevesne pregrade in imunski odziv) ter na sestavo črevesne mikrobiote. Črevesna mikrobiota vpliva na različne nevrorazvojne procese, kot so npr. zorenje in delovanje mikroglije, tvorba in celovitost možganske krvne bariere ter mielinizacija in nevrogeneza (Gonzalez-Santana in Diaz Heijtz, 2020).

Vagus je deseti možganski živec, ki se razteza od možganskega debla preko prsnega koša vse do trebuha. Nadzira široko paleto ključnih telesnih funkcij, kot so nadzor razpoloženja, imunski odziv, prebava in srčni utrip. Preko vagusa poteka neposredna povezava, ki omogoča komunikacijo črevesne mikrobiote z možgani po endokrini in imunski poti. Prek aferentnih (senzoričnih) vlaken pošilja možganom informacije o stanju notranjih organov, zaradi česar je pogosto tarča pri zdravljenju prebavnih in psihiatričnih bolezni (npr. depresija, posttravmatska stresna motnja, vnetna črevesna bolezen) (Breit, Kupferberg, Rogler in Hasler, 2018). Vagus tonično prenaša informacijo iz notranjih organov v možgane in obratno ter kot del parasimpatične veje AŽS sodeluje pri vzdrževanju telesne homeostaze. Z možgani preko vagusa komunicirajo tudi določeni sevi bakterij in tako lahko spreminjajo naše vedenje (Fülling, Dinan in Cryan, 2019).

1.1.3 **Kratkoverižne maščobne kisline**

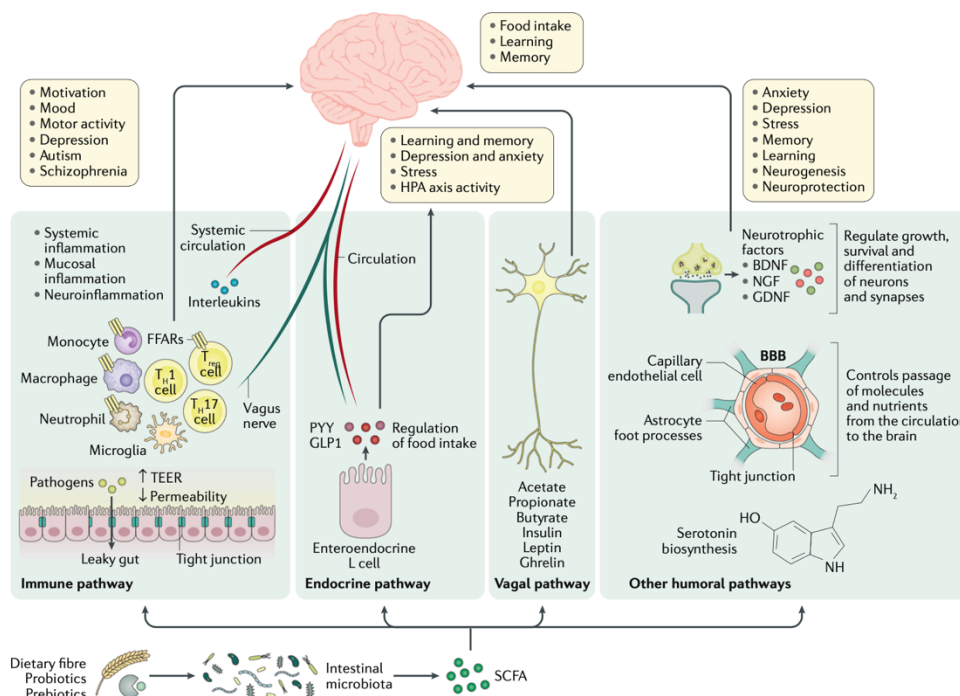
Pri fermentaciji prehranskih vlaknin in škroba (tj. neprebavljeni ogljikovi hidrati) mikroorganizmi tvorijo kratkoverižne maščobne kisline (KVMK), ki igrajo pomembno vlogo pri uravnavanju neuro-immunoendokrinega sistema. Imajo sposobnost prehajanja krvno-možganske bariere in študije so pokazale, da lahko vplivajo na ključne nevrološke in vedenjske procese (Silva, Bernardi in Frozza, 2020).

KVMK spadajo med nasičene maščobne kisline (Tan, McKenzie, Potamitis, Thorburn, Mackay in Macia, 2014). Med najbolj zastopanimi so acetat, propionat in butirat, ki so približno v razmerju 3:1:1, vendar je to razmerje odvisno tudi od prehrane in mikrobnе sestave posameznika (Topping in Clifton, 2001).

Poleg prehranske vrednosti, KVMK pomagajo pri nižanju črevesnega pH ter tako pomagajo vzdrževati naselitev bakterij, ki so koristne za nas, in onemogočajo naselitev škodljivih bakterij. Stimulirajo epiteljske celice za posredovanje prirojenega imunskega odgovora na patogene in pomagajo preprečiti kronični vnetni odgovor (Klemenak, 2016 po Kim C.H., Park in Kim M., 2014). KVMK imajo še druge funkcije: delujejo protimikrobno, uravnavajo osmotsko in pH ravnovesje, spodbujajo črevesni krvni obtok ter absorbcijo vode in natrija iz črevesja, vplivajo tudi na diferenciacijo in proliferacijo epitelnih celic (Klemenak, 2016 po Hijova in Chmelarova, 2007). Te molekule so tudi eden ključnih mediatorjev komunikacije med mikrobioto, črevesjem in možgani. Raziskave, ki bi neposredno raziskovale mediatorsko funkcijo KVMK na ljudeh in njihov vpliv na čustveno in kognitivno delovanje, so redke (Dalile, Oudenhove, Vervliet in Verbeke, 2019).

Slika 2

Nastanek in poti delovanja KVMK (Dalile, Oudenhove, Vervliet in Verbeke, 2019)



Trenutno poznamo štiri poti, preko katerih KVMK lahko vplivajo na delovanje možganov: imunska, endokrina, vagusna pot ter prehajanje preko krvno-možganske pregrade (Dalile, Oudenhove, Vervliet in Verbeke, 2019). Po imunski poti KVMK sodelujejo s črevesnimi

epitelijskimi in imunskimi celicami (monociti in nevtrofilci) tako, da aktivirajo receptorje prostih maščobnih kislin, ali pa z zaviranjem histonskih deacetilaz, kjer pride do hiperacetilacije in promocije transkripcije. Vse to vpliva na integriteto črevesnega epitelijskega (Silva, Bernardi in Frozza, 2020). KVMK preko uravnavanja izločanja interlevkinov iz enteroendokrinih celic vplivajo tudi na sistemsko vnetje. Modulirajo pa tudi nevroinflamacijo, in sicer tako, da vplivajo na morfologijo in delovanje celic mikroglije, s čimer vplivajo tudi na naše čustvovanje, kognitivne funkcije in patofiziologijo duševnih motenj. Druga pot delovanja je endokrina pot. KVMK se povežejo s svojimi receptorji na kolonocitih, kar spodbudi prenos signala preko sistemske cirkulacije ali vagusne poti do možganov. Enteroendokrine celice L izločajo črevesne hormone, kot sta glukagonu podoben peptid 1 (GLP1) in peptid tirozin tirozin (PYY). Slednji lahko vplivajo na spomin, učenje in razpoloženje. KVMK lahko preko receptorjev tudi direktno vplivajo na vagus in po njem pošljejo signale v možgane (Dalile, Oudenhove, Vervliet in Verbeke, 2019). Zadnja pot je preko krvno-možganske pregrade, ki jo KVMK lahko prehajajo preko monokarboksilatnih transporterjev, ki se nahajajo na endotelijskih celicah. S tem vplivajo na integriteto pregrade in inhibirajo poti, ki so povezane z vnetnimi odzivi. Prav tako s pomočjo acetilacije histona modulirajo ravni nevrotrofnih dejavnikov in prispevajo k biosintezi serotonina. KVMK preko teh poti lahko posredno in neposredno uravnavajo procese povezane z nevroogenezo in delovanjem nevronov ter vplivajo tako na sposobnost učenja in spomina kot tudi na razpoloženje (Dalile, Oudenhove, Vervliet in Verbeke, 2019).

Različne raziskave ugotavljajo, da imajo KVMK protivnetne učinke (Vinolo, Rodrigues, Nachbar in Curi, 2011) in sodelujejo pri gastrointestinalni fiziologiji, imunski funkciji, presnovi in celo razvoju in homeostazi CŽS, zato imajo potencial pri razvoju novih terapevtskih pristopov za zdravljenje motenj CŽS (Silva, Bernardi in Frozza, 2020). Ker je večina študij izvedena na glodalcih, moramo biti pri interpretaciji rezultatov in možnih vplivih KVMK na ljudi previdni, saj so potrebne dodatne študije s človeško populacijo.

1.1.4 Povezava z vagusom in vpliv na živčni sistem

Avtonomni živčni sistem (AŽS) je nehotno živčevje (tj. ni pod človekovim zavestnim nadzorom), katerega naloga je uravnavanje pomembnih življenjskih funkcij, kot so dihanje, srčni utrip, presnova in prebava ter uravnavanje krvnega tlaka. Delimo ga na simpatično in parasimpatično živčevje, ki ju nadzoruje CŽS, ter na enterično živčevje, ki deluje neodvisno od CŽS. Simpatični živčni sistem ob stresni situaciji aktivira stanje "boj ali beg" in vzdržuje telesno homeostazo, naloga parasimpatičnega živčnega sistema pa je uravnavanje aktivnosti predvsem, ko telo počiva (npr. slinjenje, spolna vznburjenost, prebavljanje hrane ipd.) (McCorry, 2007).

Črevesje in možgani za uravnavanje zdravja in bolezni komunicirajo preko GBA (Zheng idr., 2019). CŽS, ki stalno prejema signale iz črevesja ter je odgovoren za vzdrževanje homeostaze preko HPA osi, modulira črevesno funkcijo. Slednjo regulira tudi preko simpatičnih in parasimpatičnih vej AŽS. V stresni situaciji se aktivira HPA os, kar spodbudi sproščanje nevrnskih in nevroedokrinih signalnih molekul, kot so kateholamini, serotonin in citokini. Sproščajo jih enterokromafinske in imunske celice, ki se nahajajo v lumnu črevesja in vplivajo tudi na sestavo in delovanje črevesne mikrobiote (Lyte, 2013). Stres vodi v povišano raven noradrenalina in kortizola, kar lahko spodbudi širjenje enteričnih patogenov (Hughes in Sperandio, 2008). Spremeni se tudi aktivnost parasimpatične in vagusne poti v črevesje ter želodec (Mayer, 2000), kar pripomore: (1) k spremembi v črevesnih funkcij, vključno z gibljivostjo in prepustnostjo črevesja, (2) k izločanju kisline in (3) k imunskemu odzivu (Mayer, Tillisch in Gupta, 2015).

Po drugi strani črevesje modulira CŽS predvsem preko imunskega sistema in nevroimunskih mehanizmov, nevrotransmiterjev in AŽS, kar vključuje vagus, enterični živčni sistem, enteroendokrino signalizacijo in metabolite, ki izvirajo iz črevesne mikrobiote (Cryan idr., 2019). Preko vagusa poteka najbolj neposredna pot, ki povezuje črevesje in možgane. Vagus zazna določene dražljaje iz črevesja, odvisno od tega, kateri receptorji se izrazijo na vagusnih aferentih, ter potem prenese signale v možgane.

1.1.5 Regulacija imunskega odziva

Imunski odziv je reakcija, ki se pojavi, ko se organizem brani pred različnimi vsiljivci (virusi, bakterije ipd.). Imunski sistem pri človeku delimo na dva dela, in sicer na prirojeni (nespecifični) in pridobljeni (specifični) imunski odziv. Prirojeni imunski odziv, pri katerem posredujejo limfoidne celice (ILC), ki tvorijo naravne celice ubijalke ter citotoksične in necitotoksične podmnožice limfoidnih celic (ILC1, ILC2 in ILC3), je hiter oziroma nastopi takoj, nima pa imunskega spomina in se na patogene odziva nespecifično (Belizário in Faintuch, 2018). Pridobljeni imunski odziv pa je sicer počasnejši, vendar ob srečanju s patogenom razvije spomin in je zato imunski odziv ob vsakem srečanju z istim patogenom okrepljen - razviti odziv je namreč prilagojen na specifičen patogen (npr. cepljenje). Večino časa oba odziva medsebojno sodelujeta. Prirojeni odziv namreč predstavlja prvo obrambno linijo gostitelja, čez nekaj časa se pridruži še pridobljeni imunski odziv, ki sproži nastanek specifičnih protiteles (Kato, Kawamoto, Maruya in Fagarasan, 2014).

Odnos med črevesno mikrobioto in imunskim sistemom je vzajemen. Mikrobiota prispeva k predelavi hranil, k razvoju, zorenju in delovanju celic imunskega sistema, imunski sistem pa ima ključno vlogo pri oblikovanju in odločanju, katere bakterije bodo poseljevale črevesno mikrobioto. Kompleksnost bakterijskih združb v črevesju se ujema s kompleksnostjo

imunskega sistema gostitelja (Kato, Kawamoto, Maruya in Fagarasan, 2014). Prav tako porušeno ravnovesje črevesnih bakterij sovпада z okvarami v delovanju imunskega sistema. Če pride do disfunkcije imunskega sistema, se lahko pojavijo različne avtoimunske bolezni, vnetja ali rakave spremembe (Chaplin, 2010). Pri vseh boleznih sodobnega časa, ki predstavljajo vzrok invalidnosti ali umrljivosti (npr. bolezni srca in ožilja, rak, diabetes, avtoimune bolezni, nevrodegenerativne bolezni ipd.), pa je prisotno kronično vnetje (Furman idr., 2019).

Stresni življenjski dogodki lahko vplivajo na naše zdravje, vključno z imunološkim zdravjem. Raziskave kažejo, da glukokortikoidni hormoni in kateholamini, ki jih sprošča endokrini sistem, spremenijo delovanje makrofagov in limfocitov ter drugih celic imunskega sistema. Modulacija imunskega odziva s strani CŽS deluje preko kompleksne mreže signalov, ki ima dvosmerno komunikacijo med živčnim, endokrinim in imunskim sistemom. HPA os in simpatično-nadledvična os sta glavni poti, preko katerih lahko spreminjamo imunsko funkcijo (Padgett in Glaser, 2003).

1.1.6 Vpliv mikroorganizmov na črevesne celice in izločanje hormonov

Črevesni hormoni, ki jih sproščajo enteroendokrine celice, ki so razpršene po prebavnem traktu, delujejo kot signalne molekule številnim različnim celicam v sluznici in znotraj GBA osi. Enteroendokrine celice znotraj sluznice črevesja sintetizirajo številne hormone, kot so CCK (ang. *cholecystokinin*, slo. holecistokinin), PYY, GLP-1, GIP (ang. *glucose-dependent insulinotropic peptide*, slo. od glukoze odvisni inzulinotropni peptid) in 5-HT. Te molekule imajo regulatorne vloge v ključnih presnovnih procesih kot so občutljivost na inzulin, toleranca za glukozo, shranjevanje maščob in reguliranje apetita. Na sproščanje teh hormonov vpliva prisotnost bakterij in njihovih presnovkov v črevesju, ki predstavljajo pomembno komponento regulacije metabolizma gostitelja (Martin, Sun, Rogers in Keating, 2019).

Nevroaktivne snovi, kot so 5-HT, GABA (ang. *γ-aminobutirična kislina*) in presnovki triptofana, imajo pomembno vlogo pri reguliranju CŽS, sintetizirajo jih lahko tudi mikrobi v črevesju. Bakterije iz družine *Escherichia* in kvasovka *Candida* lahko uporabijo triptofan iz hrane in iz njega sintetizirajo serotonin, bakterije *Bacillus* in *Serratia* pa lahko sintetizirajo dopamin. Naštete bakterije lahko proizvajajo nevrokemikalije, ki so po strukturi podobne nevrotransmiterjem. Pot, po kateri lahko vplivajo na možganske funkcije, še ni znana, predvideva pa se, da te nevroaktivne snovi prečkajo sluznico črevesja in delujejo na CŽS (Sun, Li in Nie, 2020).

Raziskave kažejo, da več črevesnih hormonov, npr.: 5-HT, neuropeptid Y (NPY, ang. *neuropeptide Y*), GLP-1, CCK in grelin, igra vlogo v motnjah razpoloženja, kot sta tesnoba

in depresija. Periferni 5-HT sodeluje pri modulaciji gibljivosti črevesja, zaznavanju bolečine, izločanju elektrolitov, srčnih funkcijah, tonusu žil, razvoju organov in vnetij. V CŽS deluje kot nevrottransmitter za uravnavanje razpoloženja spanja in apetita (Herr, Bode in Duerschmied, 2017). NPY, vključno s PYY in polipeptidom trebušne slinavke, vpliva na motnje, ki jih povezujemo s stresom, nevrozaščito, nevroinflamacijo in nevrogenezo. Omenjeni hormoni namreč sodelujejo pri modulaciji tesnobe in depresije (Verma, Wood, Lach, Herzog, Sperk in Tasan, 2016). GLP-1 se na stres odzove z aktivacijo receptorja GLP-1, saj endogeni ali eksogeni glukokortikoidi zmanjšajo biološko upornost GLP-1 (Ghosal, Myers in Herman, 2013). CCK se proizvaja v perifernem živčnem sistemu in v CŽS sodeluje pri regulaciji vnosa hrane. Raven CCK pozitivno korelira s tesnobnim vedenjem, poleg tega pa vpliva na motnje razpoloženja preko drugih nevrottransmitterjev (glutamat, acetilholin in GABA), ki imajo ključno vlogo pri čustvenem vedenju (Rezayat, Roohbakhsh, Zarrindast, Massoudi in Djahanguiri, 2005). Grelin je najbolj poznan kot regulator hranjenja, vse več študij pa nakazuje na pomembno vlogo grelina pri odzivu na stres, tesnobo in depresijo. Raziskave na glodalcih so pokazale, da različni dejavniki stresa (npr. dolgotrajni stres, socialni poraz) pripomorejo k povečani ravni grelina (Fritz, Singewald in De Bundel, 2020; Meyer, Burgos-Robles, Liu, Correia in Goosens, 2014).

1.1.7 Disbioza mikrobiote

Disbioza se nanaša na neravnovesje v mikrobnih vrstah, ki je običajno povezano z oslABLJENO funkcijo črevesne pregrade in aktivacijo vnetnih celic. Neustrezna prehrana, starost, stres in bolezni lahko povzročijo padec raznolikosti bakterijskih družin v črevesju in neustrezno razmerje med posameznimi združbami (DeGruttola, Low, Mizoguchi in Mizoguchi, 2016).

Do disbioze lahko pride zaradi treh razlogov: (1) izgube koristnih organizmov, (2) prekomerne rasti potencialno škodljivih organizmov in (3) izgube splošne raznolikosti mikrobov (DeGruttola, Low, Mizoguchi in Mizoguchi, 2016). Lahko pa se pojavi tudi v drugih mikrobiomih, kot so koža, nožnica in ustna votlina (Belizário in Faintuch, 2018).

Dlje trajajoča črevesna disbioza (Kuhn, Pedraza in Demoruell, 2014) prispeva k vrsti vnetnih bolezni, kot so vnetna črevesna bolezen (Frank idr., 2007), sindrom razdražljivega črevesja, diabetes (Qin idr., 2012), rakava obolenja (Belizário in Faintuch, 2018), povezujejo pa jo tudi z zunajčrevesnimi motjami, kot so alergija, astma, presnovni sindrom, bolezni srca in ožilja, debelost (Turnbaugh idr., 2006), hipertenzija (Yang idr., 2015) ter bolezni CŽS (Carding, Verbeke, Vipond, Corfe, Owen, 2015; Shi, Duan in Niu, 2017).

Vzpostavitev zdravega odnosa med mikrobioto in imunskim sistemom v zgodnjem življenju je pomembna za vzdrževanje črevesne homeostaze. Sicer še ne poznamo točne sestave

»zdrave« mikrobiote, vendar se nakazuje okvir, ki identificira določene bakterijske vrste, povezane z zdravo mikrobioto, in vpliva na to, ali se ohranja homeostaza ali pa se sprožijo vnetni mehanizmi (Carding, Verbeke, Vipond, Corfe, Owen, 2015).

Stres, ki je dandanes prisoten že na vsakem koraku, ima različne biološke učinke, za katere je znano, da vključujejo modulacijo črevesnih mikroorganizmov oz. njihove homeostaze, kar lahko vpliva tudi na to, kako se gostitelj odzove na stresno situacijo (Karl idr., 2018).

1.2 STRES

Stres je fiziološki odziv organizma na stresor, ki lahko prihaja iz okolja ali pa je psihičnega izvora. Stresor predstavlja kakršenkoli dražljaj, ki zmoti telesno ravnovesje oziroma homeostazo (Stephens in Wand, 2012). Organizem se s stresom odzove na situacijo, ki predstavlja izziv, grožnjo ali pa fizično oziroma psihično oviro, kjer se poruši naravna homeostaza telesa (Ulrich-Lai in Herman, 2009).

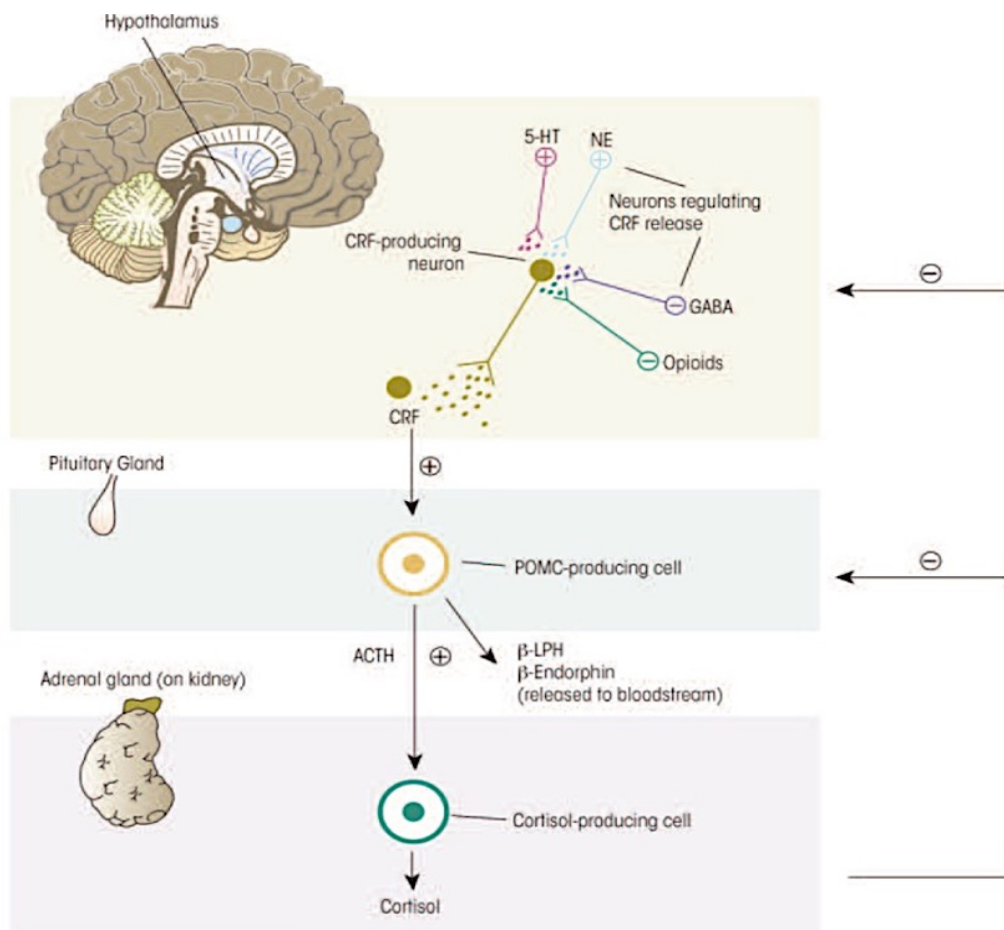
Kratkoročni stres običajno traja nekaj minut do nekaj ur ter krepi prirojeni in pridobljeni imunski odziv. Mehanizmi vključujejo spremembe v dendritičnih celicah, nevtrofilcih, makrofagih, spremembe v potovanju in zorenju limfocitov, kot tudi spremembe pri lokalni in sistemski proizvodnji citokinov. Pri dolgotrajnem stresu, ki traja dlje kot nekaj ur, pa lahko pride do disfunkcije imunskega odziva, saj disregulira prirojeni in pridobljeni imunski odziv tako, da spremeni ravnovesje citokinov tipa 1 in tipa 2. Posledično se razvije kronično vnetje, zmanjša se lahko število, potovanje in aktivnost imunoprotektivnih celic. Kronični stres poveča dovzetnost telesa za nekatere vrste raka, saj zavira delovanje citokinov tipa 1 in zaščitnih T celic ter stimulira supresorske T celice. Kratkotrajni stres krepi izražanje imunoprotektivnih odzivov (npr. celjenje ran) in izboljša izražanje imunopatoloških odzivov (protivnetnih, avtoimunskih). Kronični stres pa zavira zaščitne imunske odzive in ojača patološke imunske odzive (Dhabhar, 2014).

Homeostaza organizma se zagotavlja skozi proces alostaze, ki vključuje različne fiziološke in vedenjske spremembe. Deluje na ravni celega organizma, tako znotraj tkiva, kot znotraj vsake posamezne celice. Telo se na stresor odzove s stimulacijo AŽS in aktivacijo HPA osi, kar sproži tudi spremembe delovanja endokrinega in imunskega sistema (Ulrich-Lai in Herman, 2009). Prekomerna oz. dolgoročno povišana aktivnost HPA osi lahko privede do nastanka različnih bolezni CŽS, nevrodegeneracije, diabetesa, hipertenzije, osteoporoze, motenj razpoloženja in razvoja anksioznosti in depresije. Še več, poviša se tveganje za razvoj sindroma razdražljivega črevesja in tveganje za razvoj avtoimunih oz. vnetnih bolezni (Rea, Dinan in Cryan, 2016).

1.2.1 HPA os

Hipotalamično-hipofizna-nadledvična os (HPA os, ang. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*) vključuje hipotalamus, hipofizo in nadledvično žlezo (Slika 3).

Ob stresnem dražljaju se v paraventricularnem jedru (PVN) hipotalamusa preko krvnih žil, ki povezujejo hipotalamus in hipofizo, sprostita dva hormona: CRH in arginin vazopresin (AVP). Oba hormona stimulirata prednjo hipofizo, ki stimulira izločanje ACTH v krvni obtok. ACTH sproži sintezo in sproščanje glukokortikoidov iz nadledvičnih žlez (glavni glukokortikoidni hormon je kortizol). V možganske signalne poti so vključeni različni neurotransmiterji, ki imajo na PVN lahko zaviralne (npr. GABA ali opiodi) ali stimulatívne učinke (npr. noradrenalin ali 5-HT). Centralni živčni sistem in endokrini (hormonski) sistem sta tesno povezana preko usklajevanja aktivnosti glukokortikoidov (Stephens in Wand, 2012). Poleg HPA osi imajo pri odzivu na stres pomembno vlogo tudi druge strukture, kot so noradenergični nevroni v možganskem deblu, parasimpatični sistem in simpatični adrenomedularni tokokrogi (SAM, ang. *sympatho-adrenal-medullary mediators*) (Smith in Vale, 2006 po Habib, Gold in Chrousos, 2001).

Slika 3*HPA os (Stephens in Wand, 2012)*

HPA os ima vgrajeno negativno povratno zanko kot zaščito pred dolgotrajno aktivacijo. Te zanke so namenjene vzdrževanju določenih ravni hormonov in homeostaze. Izločanje CRH, AVP in ACTH se nadzoruje preko inhibicije delovanja HPA osi, kar opravlja kortizol s svojo koncentracijo na nivoju sprednje hipofize, PVN in hipokampusa. Obstajata dve vrsti receptorjev za kortizol, mineralokortikoidni (tip 1) in glukokortikoidni (tip 2), ki sodelujeta v mehanizmih negativne povratne zanke. Kortizol ima večjo afiniteto do receptorjev tipa 1 kot tipa 2. Ta razlika v afiniteti pomaga vzdrževati sorazmerno nizke ravni kortizola v krvi ob običajnem dnevu (sproščanje kortizola poteka v skladu s cirkadianim ritmom), ko pa je koncentracija kortizola v krvi visoka (npr. v stresni situaciji), se kortizol veže na glukokortikoidne receptorje, kar vodi v odziv na stresor. Ta homeostatski mehanizem je pomemben, ker ima tako velika kot premajhna izpostavljenost kortizolu lahko škodljive posledice za zdravje in počutje (Smith in Vale, 2006; Stephens in Wand, 2012). Disregulacijo stresnega odziva povezujemo s številnimi presnovnimi in duševnimi motnjami, kot so avtoimunske bolezni, hipertenzija, motnje razpoloženja ter druge motnje,

povezane s stresom (npr. anksioznost, motnje hranjenja, zasvojenost) (Smith in Vale, 2006; Kinlein in Karatsoreos, 2020).

1.2.2 Kortizol

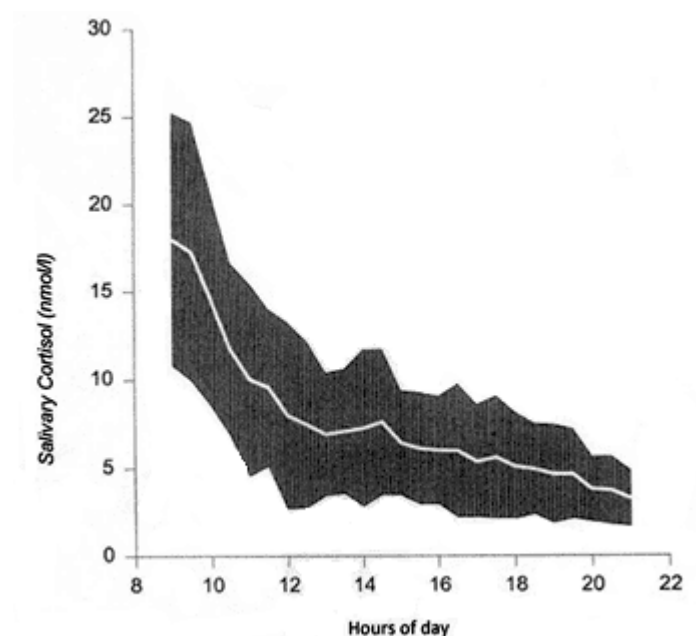
Kortizol je glukokortikoidni hormon, ki ga izloča zunanja skorja nadledvične žleze (Gatti idr., 2009). Koncentracija kortizola v slini se pogosto uporablja kot biomarker za zaznavanje psihičnega stresa in z njim povezanimi duševnimi in fiziološkimi motnjami. Merimo ga lahko tudi v serumu ali urinu (Dorn idr., 2007; Poll idr., 2007).

Kortizol je lipofilni hormon in za transport po telesu potrebuje proteine. Največji delež kortizola (približno 80 %) se veže na kortikosteroid vezujoči globulin (CBG, ang. *corticosteroid-binding globulin*). Gre za protein α -globulin, ki veže biološko aktivni, nekonjugirani kortizol v krvni plazmi (Slovenski medicinski slovar, 2020), imenovan tudi transkortin. Poleg tega se 10 % kortizola veže na albumin, ostalih 10 % pa je prostega oziroma nevezanega (El-Farhan idr., 2017; Torpy in Ho, 2007).

Kortizol je vključen v energetski metabolizem in neposredno vpliva na sintezo in razgradnjo ogljikovih hidratov, beljakovin in lipidov. Ima pa še nekatere druge funkcije: spodbuja glukoneogenezo; zmanjša periferni vnos glukoze v celice; aktivira sintezo glikogena; inhibira fosforilazo glikogena, kar vodi do večjih zalog glikogena; aktivira lipolizo, da se poveča kroženje prostih maščobnih kislin; poveča adipogenezo, tako da aktivira lipoprotein lipaze ter poveča koncentracijo leptina. Kortizol ima tudi protivnetne in imunosupresivne učinke, saj zmanjša število limfocitov v obtoku, zavira sintezo imunoglobina, inducira apoptozo limfocitov in preprečuje nastajanje nekaterih vnetnih citokinov (npr. interleukini 1, 2, 6 in dejavnik tumorske nekroze (TNF, ang. *tumor necrosis factor*) (Torpy in Ho, 2007).

Slika 4

Hevristični model spreminjanja koncentracije kortizola v slini tekom dneva (prirejeno po Cohen, Gianaros in Manuck, 2016; bela črta označuje povprečje, sivo območje predstavlja \pm standardni odklon)



Večina raziskav upošteva koncentracijo kortizola v slini kot ustrezen pokazatelj delovanja HPA osi. Na odziv HPA osi lahko vplivajo številni dejavniki, kot so raven CRH, raven AVP, raven ACTH in koncentracija kortizola v krvi ali urinu (Hellhammer, Wust in Kudielka, 2009). Kortizol deluje kot negativni regulator ACTH in CRH, medtem ko stres neposredno vpliva na hipotalamus in sproščanje CRH (El-Farhan idr., 2017).

Na raven kortizola v telesnih tekočinah vpliva tudi cirkadiani ritem posameznika. Izločanje ACTH je pulzirajoče in sledi cirkadianemu ritmu, skupaj s CRH. Pri zdravem odraslem posamezniku, ki ni pod stresom, se pri kortizolu v slini v 24 urah zgodi od 18 do 25 pulzov, začeni z visoko amplitudnimi impulzi, ki se odvijajo v približno 90-minutnih intervalih med 3. in 9. uro, svoj vrh pa dosežejo med 7. in 11. uro. Frekvenca se potem zmanjša med 18. uro in polnočjo. Kortizol ima najvišji vrh zjutraj (tj. med 8. in 9. uro) in najnižjo stopnjo med polnočjo in 3. uro zjutraj (El-Farhan idr., 2017). Značilen je torej jutranji maksimum, potem pa se raven skozi dan niža, vse do polnoči, ko ponovno poskoči po parih urah spanja (Aardal in Holm, 1995; Hansen idr., 2003; Gatti idr., 2009).

Raven kortizola v telesu se spreminja tekom dneva, variira pa tudi glede na letni čas in glede na druge dejavnike, kot so izmensko delo, uživanje zdravil, dieta, telesna aktivnost, menstrualni cikel pri ženskah, količina in kakovost spanja ipd. Pri zdravih posameznikih je najvišja raven kortizola v slini zjutraj, kmalu po bujenju (koncentracija kortizola se poveča

za 50% do 160% v 30 minutah od bujenja), in najnižja zvečer med 17. in 19. uro (Hansen, Garde in Persson, 2008).

Tabela 1

Pregled meritev kortizola v slini (nmol/L) v različnih raziskavah

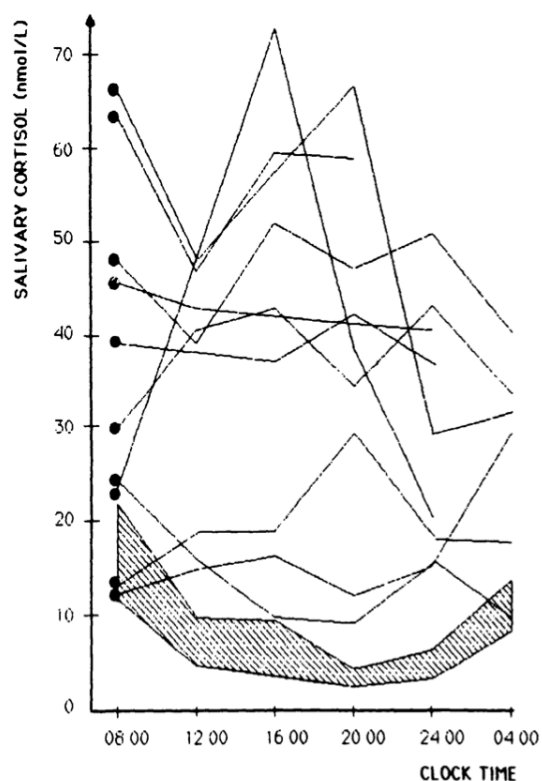
Referenca	N	Starost	Zdravi/bolni	Kortizol (nmol/L) in čas odvzema
Laudat idr., 1988	20	24-40	zdravi	8-12 (ob 4. uri), 11-22 (ob 8. uri), 5-10 (ob 12. uri), 4-9 (ob 16. uri), 3-5 (ob 20. uri), 3-6 (ob 24. uri), individualne vrednosti na sliki 5
	10	11-78	Cushingov. sin	
Laudat idr., 1988	58	24-40	zdravi	4,8-32,2 (ob 8. uri), 2,2-4,2 (ob 20. uri), 9,2-66,1 (ob 8. uri), 9,2-66,1 (ob 20. uri),
	4	11-78	Cushingov. sin	1,7-5,3 (ob 8. uri), 1,7-5,3 (ob 20. uri)
	8	30-52	adrenalna insuf.	
Aardal in Holm, 1995	197	20-70	zdravi	3,5-27,0 (ob 8. uri), <6,0 (ob 22. uri)
Hansen idr., 2003	120	30-59	zdravi	3,6-35,1 (ob prebujanju), 7,6-39,4 (20 min po prebujanju), <10,3 (med 17. in 19. uro)
Vogeser idr., 2006	100	14-59	zdravi	<8,9 (ob 23. uri)
Coelli idr., 2016	122	18-74	zdravi	<8,3 (ob 24. uri)

Raziskave, predstavljene v tabeli, 1 nakazujejo, da prosti kortizol, izmerjen v slini zdravih udeležencev, doseže svoj vrh okvirno med 8. in 11. uro (odvisno od tega, kdaj se zbudimo), potem pa pada tekom dneva vse do večera, ko je njegova vrednost ponavadi pod 10 nmol/L (slika 12). Vrednost kortizola se od polnoči naprej postopoma zvišuje vse do jutra, ko zopet doseže najvišjo koncentracijo, kar nakazuje na cirkadiani ritem kortizola.

Razpon vrednosti kortizola ob določeni uri je pri posameznikih različen, zato težko določimo optimalne vrednosti za populacijo oz. je potrebno upoštevati številne dejavnike (npr. spol, starost, aktivnost), ki lahko vplivajo na meritve. Ker so protokoli določanja koncentracije kortizola v raziskavah različni (npr. vzorci so vzeti ob različnih urah in intervalih ter pridobljeni iz različnih telesnih tekočin), vrednosti težko primerjamo.

Slika 5

Cirkadiana variacija kortizola v slini pri 20 zdravih udeležencih (osenčen del) in 10 pacientih s Cushingovim sindromom (črne pike) (Laudat idr., 1988)



V primerjavi z merjenjem kortizola v krvi je odvzem kortizola v slini popolnoma neinvazivna metoda, ki omogoča enostavno merjenje doma, brez kontaminacije rezultatov, npr. stresnega odziva zaradi igle (Poll idr., 2007), poleg tega pa različne raziskave kažejo pozitivne korelacije med kortizolom v slini in krvi (Ljubijankić, Popović-Javorić, Sćeta, Sapcanin, Tahirović in Sofić, 2008; Pool idr., 2007). Merjenje kortizola v slini je fiziološko pomembno, saj ni vezan na CBG, kot je v krvi (Gröschl, 2008). Trenutno najprimernejša in najpogosteje uporabljena metoda odvzema sline je s pomočjo žvečenja bombažne krpice ali preko pasivnega slinjenja v plastično cev, vendar merjenje s pomočjo žvečenja bombažne krpice boljše napoveduje FSC (ang. *free serum cortisol*) in TSC (ang. *total serum cortisol*) kot pasivno slinjenje v cev (Pool idr., 2007).

1.2.3 Stres v povezavi z zdravjem in boleznijo

Stresorji imajo velik vpliv na razpoloženje, naše počutje, vedenje in zdravje. Ali in kako stres vpliva na posameznika, je v veliki meri odvisno od njegove interpretacije dogodkov. Višja kot je stopnja subjektivnega stresa, večji je psihološki vpliv na posameznika (Zhang idr., 2020). Mladi so običajno bolj prilagodljivi, ko pride do akutnega stresa, in jim to še ne

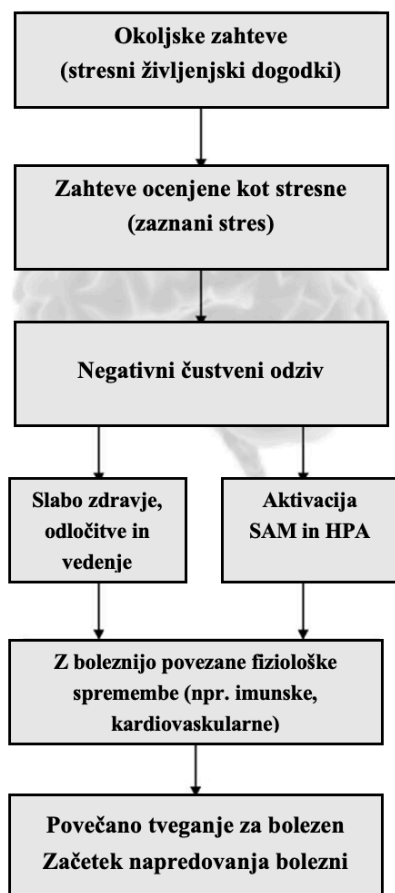
predstavlja bremena za zdravje. Nekateri posamezniki so tudi bolj pozitivno naravnani in se s kroničnimi stresorji dobro spopadajo (Glanz in Johnson, 1999). Študije kažejo, da imajo naše vedenjske navade in način življenja velik vpliv na to, kako se spopadamo s stresom (npr. uživanje alkohola in/ali nikotina, uživanje kofeina ali drugih energijskih pijač, uživanje zdravil, telesna dejavnost, spalna higiena), na spopadanje s stresom pa vpliva tudi naša telesna sestava (Zänkert, Bellingrath, Wüst in Kudielka, 2019). Če je posameznik bolj biološko ranljiv zaradi starosti, genskih ali drugih dejavnikov in če stresorji trajajo dlje časa, se lahko razvije bolezen. Pogosto se to pojavi v primeru, ko oseba nima veliko psihosocialne podpore in se slabše sooča s stresom (Schneiderman, Ironson in Siegel, 2005).

Izpostavljenost različnim stresorjem se začne prenatalno, saj je plod že preko mame izpostavljen stresu. Izpostavljenost močnim in kroničnim stresorjem v razvojnih letih ima nevrobiološke učinke in povečuje tveganje za razvoj anksioznosti in depresije, motenj razpoloženja, težav z agresijo. Lahko vodi v večjo zdravstveno obolevnost, strukturne spremembe CŽS in zgodnjo smrt (Shaw, 2003). Običajno se prve epizode depresije razvijejo po pojavu večjega negativnega življenjskega dogodka (Paykel, 2001). Vedenja, ki se jih poslužujemo ali pa se pojavijo, ko smo pod stresom (kajenje, uživanje različnih substanc, motnje spanja, nesreče, prehranjevalne motnje ipd.), pomembno vplivajo na naše zdravje. Posamezniki, ki živijo v bolj stresnih okoljih (skupnost z veliko ločitvami, nasilje, poslovni neuspehi, naravne nesreče ipd.), hitreje posežejo po teh škodljivih vedenjih (predvsem kajenju). Pogosto se kronični stresni dogodki pozitivno povezujejo z večjim uživanjem alkohola, ki ga posamezniki uporabljajo kot obliko samozdravljenja, ko se pojavi tesnoba ali anksioznost (Colby, Linsky in Straus, 1994).

Slika 6 prikazuje hevristični model procesa pri stresu, ki ponazarja integracijo okoljskih, psiholoških in bioloških dejavnikov ter mehanizmov pri stresu. Ni nujno, da so v proces vedno vključeni vsi dejavniki in mehanizmi (Cohen, Gianaros in Manuck, 2016).

Slika 6

Hevristični model procesa pri stresu (prirejeno po Cohen, Gianaros in Manuck, 2016)



Kako možgani zaznajo stres, lahko vpliva na naše vedenje in razpoloženje (npr. v smislu »obvladovanja« zaznanih negativnih dogodkov v obliki povečanega kajenja). Stresne situacije vplivajo na interpretacijo fizioloških občutkov (npr. interpretacija občutkov kot simptomov bolezni, kar vodi v iskanje zdravstvene oskrbe) in povečajo možnost za impulzivno sprejemanje odločitev (Smyth, Zawadzki in Gerin, 2013). Vključijo se pomembne poti, preko katerih stresni dogodki vplivajo na naše zdravje.

Znana je povezava med psihosocialnimi stresorji in boleznimi, kot so kardiovaskularne bolezni, respiratorne bolezni, težave z imunskim sistemom, rak, artritis in depresija (Cohen, Janicki-Deverts in Miller, 2007; Juster, McEwen in Lupien, 2010; Slavich, O'Donovan, Epel in Kemeny, 2010). Izpostavljenost stresu lahko poveča možnost za razvoj kardiovaskularnih bolezni, še posebej pri moških z nizkim socialnoekonomskim statusom (Marmot, 2003), pri ženskah pa je boljši napovednik bolezni prisotnost stresa v zakonu (Orth-Gomér, Wamala, Horsten, Schenck-Gustafsson, Schneiderman in Mittleman, 2000).

Leta 1998 so naredili študijo, v kateri so ugotovili, da imajo posamezniki z najbolj stresnimi dogodki in najvišjo stopnjo zaznanega stresa največjo verjetnost za pojav simptomov prehlada. Ljudje, pri katerih je stres vztrajal več mesecev (npr. ob brezposelnosti, stalne težave z odnosi), so pogosteje zboleli za prehladom kot tisti, ki so bili stresu izpostavljeni manj časa (manj kot mesec) (Cohen, Frank, Doyle, Skoner, Rabin in Gwaltney, 1998). To je lahko vsaj deloma posledica slabše regulacije vnetnih odzivov s strani glukokortikoidnih receptorjev oz. kortizola (Cohen idr., 2012). Leserman in sodelavci so proučevali vpliv življenjskih stresorjev v okviru okužbe z virusom HIV. Moške s HIV so spremljali do 7,5 let in ugotovili, da je bolezen hitreje napredovala pri tistih, ki so imeli več kumulativnih stresnih dogodkov in so kot mehanizem spopadanja uporabljali zanikanje, imeli pa so tudi nižjo socialno podporo in povišan serumski kortizol (2000). Stres vpliva tudi na poslabšanje avtoimunskih bolezni in stanj, pri katerih je prisotno prekomerno vnetje (npr. kardiovaskularne bolezni). V obdobju kroničnega stresa pri zdravem posamezniku kortizol počasi zavira nastajanje vnetnih citokinov, pri posameznikih z avtoimunim obolenjem ali kardiovaskularno motnjo pa ostane proizvodnja vnetnih citokinov povišana, kar povzroči poslabšanje simptomov in patofiziologije (Harbuz, Chover-Gonzalez in Jessop, 2003). Podobne študije kažejo napredek raziskovalcev pri razumevanju, kako stres spodbuja bolezen oziroma slabša simptomatologijo prizadetih posameznikov (Zhang idr., 2020).

Dolgotrajna proizvodnja vnetnih citokinov lahko škodljivo vpliva tako na fizično zdravje kot na duševno zdravje. V času bolezni vnetni citokini povzročajo utrujenost, slabo počutje, zmanjšan apetit in brezvoljnost, kar so običajno simptomi, ki jih povezujemo z depresijo (Schneiderman, Ironson in Siegel, 2005). Ob kroničnem stresu (npr. vsakodnevni stres na delovnem mestu) lahko pride do izgorelosti, ki se sprva težko prepozna, ker vključuje več simptomov, ki so značilni tudi za druge bolezni (npr. anksioznost, depresija). S stresom pogosto povezujejo tudi bolezni, kot so shizofrenija, posttravmatska stresna motnja, fibromialgija, anksiozne motnje, atopični dermatitis, panične motnje in anoreksija. Pri vseh teh boleznih je zaznana disregulacija HPA osi (Zänkert, Bellingrath, Wüst in Kudielka, 2019).

Znani so nekateri zaščitni dejavniki, ki pripomorejo k spopadanju s stresom, kot je na primer dobra socialna podpora, trdna samopodoba, optimizem, iskanje smisla in druge tehnike, ki pomagajo pri sproščanju (meditacija, masaža, sproščanje mišic ipd.) (Kamp, West, Holmstrom, Luo, Wyatt in Given, 2019). Prav tako je pri spoprijemanju s stresom pomembna osebna struktura posameznika. Tisti, ki imajo višjo samopodobo, so se ob soočenju s težko matematično nalogo, ki je predstavljala akutni stres, bolje odrezali in imeli nižjo raven kortizola (Preussner, Hellhammer in Kirschbaum, 1999). Nasprotno, osebnosti, ki jih običajno povezujemo z večjo psihopatologijo (tj. visok nevroticizem, nizka

ekstravertnost), pa se težje spoprijemajo s stresom (Zänkert, Bellingrath, Wüst in Kudielka, 2019).

1.2.4 Stres v vsakdanjem življenju

Psihološki stres je pogost v vsakdanjem življenju in večino stresnih izkušenj spremljajo fiziološki in psihološki odzivi. Kakovost našega življenja in to, kakšna bo naša prihodnost kot osebe in vrste, je odvisna od naše sposobnosti prilagajanja različnim stresorjem oz. izzivom spreminjajočega se okolja. Vplivi stresa na posameznika se tekom življenja kopičijo in vsaka dodatna stresna izkušnja poveča splošno prilagoditveno breme in lahko spodkopava zdravje (Cohen, Gianaros in Manuck, 2016).

Stresorji so lahko zelo različni. Soočamo se s pomanjkanjem različnih virov (npr. pomanjkljivo ali neustrezno zdravstveno zavarovanje), z nalezljivimi boleznimi (različne infekcije kot posledica kroničnih in sistemskih vnetij), vojno in terorizmom, ekonomskim padcem ipd. Naš vsakdanji obstoj in stabilnost sta negotova zaradi stresa na delovnem mestu, stresa v intimnih in zasebnih odnosih, nevarnosti v prometu, različnih vrst nasilja ipd. Vsi smo izpostavljeni fizičnim in psihičnim stresnim situacijam na družbeni in medosebni ravni (Schneiderman, Ironson in Siegel, 2005).

Psihološki stres povzroča različne psihološke okvare, spremenjeno kognicijo in vedenje, poleg tega lahko vodi v spremembe sestave mikrobiote. Motnje v cirkadianem ritmu (npr. zaradi izmenskega dela) povzročajo večjo prepustnost črevesja, spremeni se imunski odziv, poveča se dovzetnost za vnetja, poškodbe epitelja ter za razvoj kroničnih bolezni povezanih z vnetjem (Karl idr., 2018 po Pagel idr., 2017). Izpostavljenost onesnaženem okolju (kemikalije, strupen industrijski material, pesticidi, onesnažena tla in voda s težkimi kovinami) poleg dolgoročnega vpliva na zdravje dihal vpliva tudi na mikrobioto in njeno presnovno aktivnost (Arcidiano idr., 2018).

Raziskave kažejo, da ima telesna vadba lahko pozitiven ali negativen vpliv na našo mikrobioto. Dolga in intenzivna telesna aktivnost povzroči klasičen stresni odziv (povišana koncentracija kortizola), kar se kaže kot zmanjšana oskrba črevesja s krvjo, kar lahko povzroči hipoksijo, izčrpavanje zalog ATP, tvorbo prostih radikalov in oksidativni stres. Posledično pride do poškodbe črevesne pregrade in večje prepustnosti črevesja (van Wijck idr., 2012). Teh učinkov ne opazimo pri nižje intenzivnih vadbah. Redna in zmerna telesna vadba je pomembna, saj s tem ohranjamo pretok krvi v črevesju, moduliramo gibljivost črevesja in izboljšamo imunsko funkcijo, vplivamo pa tudi na sestavo bakterij v črevesju (poveča se delež koristnih bakterij). Gibanje je pomembno, vendar moramo poskrbeti za to, da je redno, primerno dolgo in primerno intenzivno (Karl idr., 2018).

Največkrat govorimo samo o negativnih učinkih stresa na naše telo. Ne smemo pa pozabiti, da je stres funkcija organizma, da se prilagodi na spremembe in tako imenovani eustres na naše telo deluje stimulatивно in nas spodbuja in izziva, da smo v neki nalogi še boljši. Ko povečamo raven pozitivnega stresa, se posameznik s stresno situacijo še bolje spoprime in je bolj vztrajen (npr. športna tekmovanja, določeni delovni roki, javni nastopi). Na žalost je izpostavljenost eustresu vedno manjša, nadomešča pa ga dolgoročen in intenziven stres (Leow, Alderson, Guelfi in Dimmock, 2018).

Stresu se v vsakdanjem življenju ni mogoče izogniti. Način spopadanja s stresnimi situacijami nam marsikaj pove o našem zdravju in zdravju naše družbe (Schneiderman, Ironson in Siegel, 2005). Vse več je dokazov, da zdrava črevesna mikrobiota podpira adaptacijo celic oz. celotnega organizma na spremembe okolja ter predstavlja enega ključnih regulatorjev imunskega odziva in stresa (Rea, Dinan in Cryan, 2016). Vsi organizmi so tekom življenja izpostavljeni številnim mikro in makro dejavnikom, ki ogrožajo njihovo homeostazo, kar se lahko izrazi kot stresni odziv, bodisi na fizični, psihološki ali imunološki ravni. Ravno zato je raziskovanje oziroma iskanje preprostih in učinkovitih načinov za lajšanje stresa toliko bolj pomembno in tudi aktualna tema v raziskavah, predvsem na medicinskem področju (Zhang idr., 2020).

1.3 PROBIOTIKI

Beseda probiotik izhaja iz latinske besede *pro* in *bios*, kar pomeni "za življenje". Gre za žive mikroorganizme, ki imajo ugodne učinke na zdravje gostitelja, saj pomagajo vzdrževati normalno delovanje črevesne sluznice, hkrati pa jo ščitijo pred škodljivimi dejavniki, kot so toksini, alergeni in patogeni (Rao in Samak, 2013). Probiotike najdemo v različnih fermentiranih živilih, kot so jogurt, kefir, kombuča, kislo zelje, kimči ipd., ter v različnih prehranskih dopolnilih. Da so probiotični organizmi učinkoviti, je zaželen dnevni vnos vsaj 100 milijonov živih organizmov. Probiotične izdelke je priporočljivo uživati redno in dlje časa (vsaj nekaj mesecev), saj se le s tem v črevesje prenese zadostna količina bakterij in kvasovk, ki preživi tranzicijo preko želodca (Rao in Samak, 2013). Probiotični mikroorganizmi se delijo v več sevov, med najbolj poznanimi sevi pa so predstavniki laktobacilov (*Lactobacillus*) in bifidobakterij (*Bifidobacterium*), ki so tudi del normalne črevesne mikrobiote (Pandery, Naik in Vakil, 2015).

Večjo učinkovitost probiotikov dosežemo z vključevanjem prebiotikov v prehrano. Prebiotiki so vlaknine, ki spodbujajo rast in aktivnost probiotikov, so vir hrane črevesnim bakterijam in jim s tem omogočajo lažje preživetje, poleg tega pa imajo probiotiki ob prisotnosti prebiotikov večjo odpornost proti različnim dejavnikom iz okolja. V bistvu gre za neprebavljene dele hrane, ki spodbujajo rast in/ali aktivnost določenih mikroorganizmov v črevesju. Ustrezati morajo določenim kriterijem, kot so stabilnost med obdelavo živila,

neprebavljivost oziroma delna prebavljivost, dostopnost za fermentacijo in selektivna stimulacija probiotičnih sevov ter seveda pozitiven vpliv na zdravje posameznika. Prebiotike v telo vnašamo s hrano (npr. koruza, banana, polnozrnat kruh) ali preko prehranskih dodatkov (Pandery, Naik in Vakil, 2015). V obliki prehranskega dopolnila so na voljo še sinbiotiki, ki vsebujejo tako probiotike kot prebiotike za sinergično delovanje. Oboje lahko v zadostni meri vnesemo tudi preko prehranskih vlaknin in probiotičnih živil.

Pojavljajo se tudi prehranska dopolnila, ki ponujajo postbiotike (npr. butirat). To so metaboliti bakterij (npr. KVMK) in odmrli probiotiki, ki jih najdemo tudi v fermentiranih živilih. Postbiotiki vključujejo katerokoli snov, ki jo sprosti ali proizvede mikroorganizem pri presnovi in ima neposredno ali posredno ugoden učinek na gostitelja (Żółkiewicz, Marzec, Ruszczyński in Feleszko, 2020). Kot prehransko dopolnilo so zanimivi zaradi več prednosti pred probiotiki, kot so razpoložljivost v čisti obliki, enostavna proizvodnja in skladiščenje ter tudi poseben mehanizem delovanja. Poleg tega imajo potencial za izboljšanje zdravja preko modulacije fiziologije (npr. izboljšanje stanja ali preprečevanje nastanka bolezni), izkazujejo namreč tudi protivnetno, imunomodularno, antioksidativno in protivirusno delovanje. Vsekakor so potrebne nadaljnje raziskave, ki bodo ponudile širše znanje o vlogah postbiotikov za zdravje (Nataraj, Ali, Behare in Yadav, 2020).

Probiotične bakterije lahko koristijo zdravju preko treh splošnih mehanizmov. Nekateri probiotiki lahko jasno zavrejo patogene preko neposrednega delovanja ali preko vpliva na komezalno (tj. v telesu živečo) mikrobioto. Drugi mehanizem je moduliranje signalnih poti s strani nekaterih probiotičnih sevov. Tretji mehanizem, preko katerega lahko probiotične bakterije koristijo zdravju, pa je moduliranje imunskega odziva gostitelja, kar ima lokalne in sistemske učinke, ki so odvisni od vrste seva (Corr in Gahan, 2009; Lebeer, Vanderleyden in De Keersmaecker, 2010; Rao in Samak, 2013).

Nekateri probiotikom rečejo tudi psihobiotiki, saj imajo pozitivne učinke na čustva, kognicijo in druge psihološke procese (Sarkar, Lehto, Harty, Dinan, Cryan in Burnet, 2016). Vedno bolj pogoste so študije, ki proučujejo, kako probiotiki vplivajo na uravnavanje psihiatričnih motenj. Te študije kažejo, da v stresnih situacijah probiotiki odigrajo koristno vlogo pri uravnavanju sinteze različnih nevrotransmiterjev in bioaktivnih dejavnikov, kot so kortizol (Takada idr., 2016), CRH (Yang idr., 2016) in TNF- α (Marcos idr., 2004), ter do neke mere izboljšajo s stresom povezane psihiatrične in fizične simptome (Zhang idr., 2020). V preglednem članku iz 2020 so obravnavali sedem študij, ki so raziskovale razmerje med trajanjem jemanja probiotikov (manj in več kot 8 tednov) in njihovimi psihološkimi učinki (predvsem na tesnobo in depresijo kot posledico stresa). Probiotiki so vsebovali en ali več sevov bakterij. Rezultati so pokazali, da uporaba probiotikov na splošno zmanjša raven subjektivnega stresa pri zdravih osebah ter lahko izboljša njihovo raven tesnobe ali depresije,

ki sta povezani s stresom, s čimer se kažejo potencialne psihobiotske lastnosti probiotikov (Zhang idr., 2020).

1.3.1 Probiotiki *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)

Bakterije iz rodu *Lactobacillus* spadajo med Gram pozitivne bakterije, ki se nahajajo pri ljudeh in živalih. Pri ljudeh te bakterije živijo v ustih, prebavilih in ženskih genitalijah. Sev LGG je široko uporabljen probiotičen sev, za katerega se kaže, da ima pozitivne učinke pri lažšanju težav s prebavili in drisko, pri modulaciji imunskih odzivov za preprečevanje alergijskih simptomov in pri zdravljenju z vnetji povezanih črevesnih bolezni (Nissilä idr., 2017; Rao in Samak, 2013). LGG spodbuja prebavo, krepi imunski sistem, povečuje odpornost proti okužbam in zavira rast patogenih bakterij. Znižuje nivo oksidativnega stresa in zmanjšuje prepustnost črevesne sluznice (Rao in Samak, 2013). Pokazano je bilo tudi, da je sev odporen na želodčno kislino in žolč, ima dobro rast in dober oprijem na epitelijskih celicah (Doron, Snyderman in Gorbach, 2005). Je eden izmed bolj razširjenih probiotičnih sevov, ki se uporablja v različnih komercialno dostopnih izdelkih, njegovi učinki pa so bili proučeni v različnih kliničnih študijah (Segers in Lebeer, 2014).

Randomizirana dvojno slepa in s placebom nadzorovana pilotna študija je pokazala, da LGG izboljša delovanje črevesne pregrade in klinični status otrok, obolelih s Chronovo boleznijo. V omenjeni študiji so sodelovali štirje otroci, ki so prejeli probiotik (1×10^{10} bakterij) dvakrat na dan kar šest mesecev (Gupta, Andrew, Kirschner in Guandalini, 2000). Druga študija pa je pokazala, da je oralno jemanje LGG (med 5 dnevi in 4 tedni, dnevna doza 2×10^{10} bakterij) spodbudilo sproščanje IL-10 in sprožilo protivnetne učinke pri otrocih z atopijskim dermatitisom (Pessi, Hurme in Isolauri, 2000).

Čeprav je preiskovanje probiotikov v zadnjih dveh desetletjih v porastu, še vedno ne vemo veliko o bioaktivnih faktorjih, ki jih proizvajajo različni probiotiki. Eksperimentalni dokazi o blagodejnih učinkih probiotikov se hitro uporabijo za komercialne namene v obliki različnih produktov, čeprav so mehanizmi delovanja še slabo razumljeni (Rao in Samak, 2013). Število pro- in prebiotičnih izdelkov na trgu strmo narašča in podrobnejši vpogled v biopsihološke učinke suplementacije je na mestu.

1.3.2 Prehrana

Kot že omenjeno, je prehrana eden izmed pomembnejših dejavnikov, ki vplivajo na homeostazo črevesne mikrobiote, in igra kritično vlogo že v prenatalnem obdobju. Raziskave kažejo, da ima prehrana vpliv na bolezni, ki jih povezujemo z disbiozo (debelost, sladkorna bolezen, alergijske motnje, rak) (DeGruttola, Low, Mizoguchi in Mizoguchi,

2016). Če primerjamo »zahodno« prehrano, ki je pretežno sestavljena iz živalskih beljakovin, sladkorja in nasičenih maščob, ter agrarno prehrano, ki vsebuje malo živalskih beljakovin in nasičenih maščob, veliko ogljikovih hidratov in preprostih sladkorjev, se pokažejo velike razlike. Ljudje, ki se prehranjujejo z »zahodno« prehrano, imajo povečano število bakterij družine *Firmicutes* in *Proteobacteria*, ljudje z agrarno prehrano pa imajo večje količine bakterij iz družine *Actinobacteria* in *Prevotella* in imajo večjo raven KVMK, ki ščitijo pred potencialno patogenimi črevesnimi bakterijami (De Filippo idr., 2010).

Celovita rastlinska prehrana je bogata s fitokemikalijami, ki prinašajo koristne učinke za zdravje. Sem spadajo tudi polifenoli, ki lahko delujejo kot antioksidanti. Slednji običajno pridejo do debelega črevesja nedotaknjeni in imajo tudi določene protimikrobne lastnosti, ki spreminjajo črevesno mikrobioto. Povečano uživanje hrane, ki vsebuje polifenole (sadje, zelenjava, vino, čaj, itd.), zmanjšuje tveganje za nastanek raka, pripomore k nižjemu krvnemu tlaku in holesterolu, ter zmanjša tveganje za razvoj srčno-žilnih bolezni (Queipo-Ortuño idr., 2012). Polnozrnata žita, ki so bogata s fenolnimi skupinami, vsebujejo veliko ferulinske kisline, ki jo mikrobiota počasi in neprekinjeno sprošča, en del pa jo pretvori v dihidroferulinsko kislino. Ti dve kislini veljata za zaščito pred spremembami v epitelijskih celicah in zmanjšata tveganje za razvoj debelosti. Povečan vnos rastlinske prehrane pomeni večjo razpoložljivost substratov, ki jih bakterije skozi proces fermentacije pretvorijo v KVMK (Garcia, Selma-Royo, Alcantara in Collado, 2018). Raziskave kažejo, da se, če uživamo prebiotike (Macfarlane, G. T. in Macfarlane, S., 2011) in probiotike (Derrien in Hylckama Vlieg, 2015) ali sledimo dieti, kot je npr. mediteranska, poveča proizvodnja KVMK v debelem črevesu (David idr., 2016; De Filippis idr., 2016). Vlajninsko bogata hrana (sadje, zelenjava, stročnice, žitarice) ima visok prebiotični potencial in lahko zniža tveganje za razvoj raka na črevesju ter zmanjša vnetja in tveganje za razvoj bolezni srca in ožilja, diabetesa in debelosti (Vitaglione idr., 2015).

1.4 NAMEN IN CILJI

Raziskovanje povezave med črevesno mikrobioto in možgani je vedno bolj aktualno. Kljub temu je to področje še precej nerazumljeno, potrebna so nadaljnja proučevanja interakcij med mikroorganizmi in našimi možgani v kontekstu splošnega zdravja in patoloških stanj. Namen naše študije je bil preveriti, če in kako jemanje probiotikov Waya® (sev *L. rhamnosus* GG, ATCC 53103) vpliva na stresni odziv oziroma uravnavanje stresa pri zdravih posameznikih. S to raziskavo želimo doprinesiti k boljšemu vpogledu v vlogo mikrobiote pri regulaciji stresa ter razvoju učinkovitih preventivnih strategij in terapij. Cilj magistrskega dela je tudi izpostaviti pomembnost ozaveščanja vsakega posameznika o zdravem življenjskem slogu, kjer uravnotežena mikrobiota predstavlja pomemben korak k psihofizičnemu blagostanju. Zbrani podatki bodo lahko podlaga za nadaljnje bolj podrobne

in natančne študije o tem, kako z življenjskimi navadami, vključno z načinom prehranjevanja, vplivamo na raven stresa v svojem življenju.

1.5 RAZISKOVALNA VPRAŠANJA IN HIPOTEZE

Na podlagi obstoječe literature smo predpostavili, da bodo udeleženci, ki bodo 26 dni jemali probiotik WAYA® (sev *L. rhamnosus* GG, ATCC 53103), po koncu suplementacije kazali nižjo raven stresa (nižjo koncentracijo kortizola v slini), medtem ko pri udeležencih, ki bodo jemali placebo, sprememb v stresnem odzivu po tem času ne bomo zaznali oziroma bodo izmerjene spremembe manjšega obsega v primerjavi z eksperimentalno skupino. Zanimalo nas je tudi, kako bodo izmerjeni odzivi (raven kortizola in odgovori na DASS-21) povezani z mnenjem udeležencev raziskave, ali so prejeli probiotik ali placebo.

2 METODA

Pred začetkom raziskave smo pridobili soglasje Komisije za etiko raziskovanja Oddelka za psihologijo Fakultete za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije na Univerzi na Primorskem. Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko pa je na našo vlogo odgovorila (Priloga A), da raziskava ne sodi v njeno pristojnost, saj proučuje učinke prehranskih dopolnil.

2.1 UDELEŽENCI

V raziskavo je bilo vključenih 81 oseb, ki so se odzvale na oglas, objavljen v družbenih medijih. Izključitveni kriteriji so bili: starost pod 18 let; starost nad 75 let; jemanje antibiotikov v zadnjih treh mesecih; jemanje zdravil, ki lahko vplivajo na stopnjo kortizola; v zadnjih treh mesecih diagnosticirane nevrološke, psihiatrične, gastrointestinalne ali endokrine motnje; intolerance na sestavine v probiotiku/placebo kapsulah; ter nosečnost in dojenje. Izvedli smo dvojno slepo randomizirano študijo: udeleženci niso vedeli, ali prejemajo aktivno učinkovino ali placebo, v eksperimentalno ali kontrolno skupino so bili razdeljeni naključno.

Zaradi jemanja antibiotikov smo iz analize podatkov izločili dva udeleženca, zaradi manjkajočih podatkov pa štiri (zaradi neustreznih vzorcev sline, kot je opisano v razdelku 2.3.5, oziroma manjkajočih odgovorov na vprašalnik DASS-21). To pomeni, da so bili izločeni podatki treh udeležencev iz skupine s probiotiki in treh iz skupine s placebom. Tako je končni vzorec obsegal 75 udeležencev: probiotične kapsule je jemalo 40, kapsule s placebom pa 35 udeležencev. Strukturo vzorca po spolu in starosti prikazuje slika 7.

Slika 7

Struktura udeležencev po spolu in starosti

Spol	Placebo		Probiotik		Celoten vzorec	
ženska	22	63%	26	65%	48	64%
moški	13	37%	14	35%	27	36%

Starost	Placebo		Probiotik		Celoten vzorec	
18-25 let	2	6%	2	5%	4	5%
25-35 let	14	40%	16	40%	30	40%
35-45 let	10	29%	9	23%	19	25%
45-55 let	8	23%	9	23%	17	23%
55-65 let	1	3%	3	8%	4	5%
65-75 let	0	0%	1	3%	1	1%

2.2 PRIPOMOČKI

2.2.1 Vprašalniki

Udeleženci so izpolnili demografski vprašalnik (informacije o spolu, starosti, izobrazbi, regiji, prehranjevalnih navadah, uživanju zdravil ali prehranskih dodatkov), Splošni vprašalnik 1 (informacije o prehranskih dodatkih, zdravstvenem stanju in telesni aktivnosti), Vprašalnik depresije, anksioznosti in stresa – DASS-21 (Depression Anxiety Stress Scale) (Lovinbond in Lovinbond, 1995) in Splošni vprašalnik 2 (kratko poročanje o morebitnih težavah in zaznanih spremembah v povezavi z raziskovalnim protokolom). Ob jemanju kapsul so izpolnjevali evidenčno tabelo, kamor so zapisovali čas odvzema vzorcev slin, če so vzeli kapsulo in če se je v tem dnevu zgodil kakšen poseben dogodek (Priloga D).

2.2.2 Pripomočki za merjenje koncentracije kortizola v slini

Raziskovalni inštitut InnoRenew CoE (Izola, Slovenija) nam je podaril zbiralnike slin iz podjetja Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Nemčija), za odvzem vzorcev slin, in tudi omogočil hrambo vzorcev ter meritev kortizola v slini. Salivete® Cortisol (Art. št. 51.1534.500), oblikovane za detekcijo kortizola iz slin, so sestavljene iz modrega pokrova, bombažne gaze z dobro absorpcijo in posodice, ki ujame slino. Zbiralniki slin so oblikovani tako, da lahko kortizol zaznajo že pri majhnem vzorcu slin (povprečen volumen slin za odrasle osebe je okoli 1.1ml) (Sarstedt, 2020).

Za analizo vzorcev smo uporabili napravo IDS-iSYS (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Nemčija), *in vitro* diagnostično napravo, ki je namenjena kvantitativni zaznavi kortizola v človeški slini. Za analizo naprava IDS-iSYS uporablja: kalibratorje (fosfatni pufer z ribjo želatino in natrijevim azidom), magnetne delce, prevlečene s streptavidinom (shranjene v pufru z natrijevim azidom), biotininiran kortizolni sledilnik (v fosfatnem pufru) in mišja monoklonska protitelesa, označena z derivatom akrinidijevega estera (v tris bazičnem pufru).

2.2.3 Probiotiki WAYA in placebo kapsule

Probiotične in placebo kapsule je doniralo podjetje Medis d.o.o (Ljubljana, Slovenija), ki je neodvisno podjetje za tržnje farmacevtike v srednji in vzhodni Evropi. Probiotiki WAYA® vsebujejo probiotični sev *Lactobacillus rhamnosus* GG. Sev je med najbolj preizkušenimi probiotičnimi sevi in ne vsebuje alergenov. S stalno kontrolo kakovosti in visoko tehnologijo proizvodnje se zagotavlja primerna koncentracija, živost in aktivnost kulture v probiotičnih izdelkih. Probiotiki WAYA® vsebujejo 100 % mikroenkapsulirani probiotični sev *L.*

rhamnosus GG. Placebo kapsule so vsebovale popolnoma enake sestavine kot probiotične kapsule, z izjemo probiotične kulture.

2.3 POSTOPEK

2.3.1 Protokol raziskave

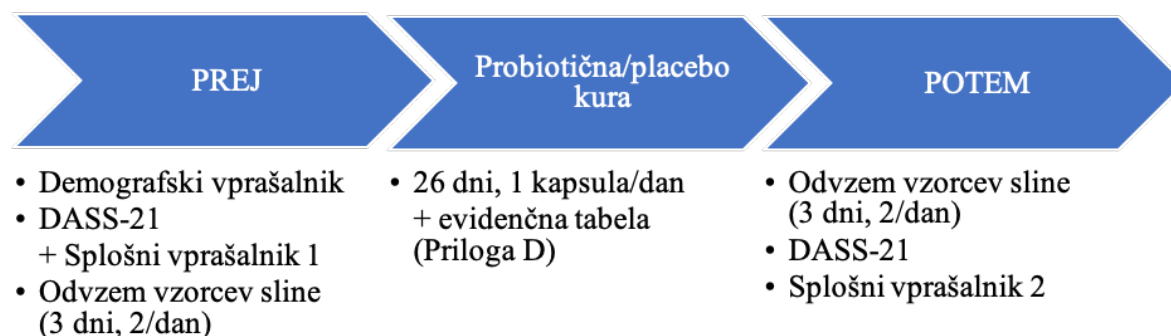
Vsi zainteresirani za sodelovanje so prejeli brošuro s podrobnejšimi informacijami o raziskavi (prostovoljno sodelovanje brez plačila, anonimnost, varovanje osebnih podatkov, možen odstop od sodelovanja v raziskavi kadarkoli, posredovanje izmerjenih vrednosti po koncu raziskave) (Priloga C). Udeleženci, ki so se odločili za sodelovanje v raziskavi, so podpisali obveščeno soglasje (Priloga B). Na treh lokacijah (Ljubljana, Kranj in Koper) smo osebno razdelili pakete s potrebnimi pripomočki za izvedbo študije. Vsak udeleženec je prejel dve zaprti kuverti s šestimi označenimi zbiralniki slin, navodila za odvzem slin, preglednico, kamor so zapisovali ure odvzema slin in posebne dogodke, ter kuverto s 26 kapsulami placeba ali probiotikov WAYA. Iz prejetih kapsul ni bilo razvidno, ali gre za placebo ali probiotično kapsulo. Preko elektronske pošte so udeleženci prejeli podrobna navodila z opisom postopkov in protokolov reševanja vprašalnikov, odvzema vzorcev slin in jemanja kapsul. Vse osebne podatke smo anonimizirali v skladu z zakonom o varstvu osebnih podatkov in udeležencem dodelili kode, da smo lahko izvedli dvojno slepo študijo. Anonimizirani podatki o udeležencih so bili hranjeni v posebni tabeli, do katere je imela dostop samo avtorica magistrske naloge.

Vsi udeleženci so sledili enakemu protokolu. V prvem tednu eksperimenta so vsi udeleženci na elektronsko pošto prvič prejeli vprašalnik DASS-21, demografski vprašalnik in Splošni vprašalnik 1, ki so jih morali izpolniti pred/ob odvzemu vzorcev slin. Tri zaporedne dni (nedelja, ponedeljek in torek) so udeleženci odvzeli dva vzorca slin dnevno, okvirno med 16. in 19. uro, in jih shranili v hladilniku ali zmrzovalniku. Udeleženci so bili seznanjeni, da vsaj pol ure pred odvzemom slin ne jedo, pijejo ali kadajo, zbiralnice s slino pa takoj shranijo v hladilnik ali zmrzovalnik. Sledilo je 26 dni jemanja ene kapsule probiotika WAYA ali placebo kapsule na dan, ob enakem času v dnevu. V priloženi evidenčni tabeli (Priloga D) so beležili, če so kapsulo vzeli in kdaj, ter če so bili v tistem dnevu izpostavljeni intenzivnejšem stresu kot običajno oziroma so bili priča posebnim dogodkom (prometna nesreča, bolezen, praznovanje, intenziva fizična aktivnost ipd.). Po zaključeni kuri s probiotikom WAYA ali placebo so udeleženci ponovno odvzeli vzorce slin na tri zaporedne dni (nedelja, ponedeljek in torek), po dva vzorca na dan, okvirno med 16. in 19. uro. V zadnjem tednu so ponovno izpolnili vprašalnik DASS-21 in Splošni vprašalnik 2, ki sta bila poslana preko elektronske pošte.

Po končanem zajemu podatkov smo pakete z zbiralniki slin in izpolnjenimi preglednicami zbrali na treh lokacijah (Ljubljana, Kranj in Koper) in jih prenesli v zamrzovalnik (-18°C) v laboratoriju v Kopru (prostori InnoRenew). Udeležencem smo bili za dodatna vprašanja ves čas raziskave na voljo preko elektronske pošte in telefona.

Slika 8

Postopek pridobivanja podatkov



2.3.2 Vprašalniki

2.3.2.1 Demografski vprašalnik

Udeleženci so izpolnili demografski vprašalnik, ki zajema 14 splošnih vprašanj, ki se navezujejo na način življenja in prehranjevanja. Pri vprašalniku smo zajeli podatke o (1) spolu, (2) dodeljeni kodi (Nxxx), (3) starosti, (4) izvorni regiji, (5) statusu, (6) zadnji dokončani šoli, (7) poklicu, (8) alergijah ali intolerancah na hrano/pijačo ali zdravila, (9) prisotnosti nevroloških, psihiatričnih, gastrointestinalnih ali endokrinih motenj, (10) jemanju zdravil v obdobju zadnjih 3 mesecev, (11) uživanju prebiotičnih ali probiotičnih hranil, simbiotikov, fermentiranih živil ali drugih prehranskih dodatkov, (12) načinu prehranjevanja, (13) tedenski aktivnosti ter (14) športih, s katerimi se ukvarjajo.

2.3.2.2 Splošni vprašalnik 1

Vprašalnik 1 so udeleženci izpolnjevali v tednu pred jemanjem kapsul probiotika ali placeba. Zajema sedem vprašanj, ki udeleženca sprašujejo o (1) dodeljeni kodi, (2) datumu izpolnjevanja, (3) ali je kadilec/ka oziroma oralno uporablja tobak, (4) ženske smo vprašali, če jemljejo kakršnokoli obliko kontracepcije, (5) se udeleženci poslužujejo kakšnih sprostitev tehnik (joga, meditacija, avtogeni trening ipd.), (6) ali uživajo kavo, zeleni/črni čaj ali energijske pijače in (7) v kakšni količini.

2.3.2.3 Vprašalnik depresije, anksioznosti in stresa (DASS-21)

Vprašalnik je sestavljen iz 21 postavk, ki merijo simptome depresije, anksioznosti in stresa in je bil pridobljen preko UP FAMNIT, ki ima dovoljenje za njegovo uporabo. Vsaka izmed treh lestvic je sestavljena iz sedmih simptomov, kjer udeleženci označijo resnost simptomov na štiristopenjski lestvici (ocenjujejo simptome v zadnjem tednu). Lestvica stresa meri nespecifične dražljaje, kot so težave pri sproščanju, živčnost, hitra razdražljivost oziroma odziv na stresorje in nepotrpežljivost. Lestvica anksioznosti meri avtonomno vzburjenost, učinek skeletnih mišic, situacijsko anksioznost in subjektivno izkušnjo anksioznega efekta. Lestvica depresije pa meri disforijo, brezup, razvrednotenje življenja, samopodcenjevanje, pomanjkanje zanimanja oziroma vpletenosti, anhedonijo in nedejavnost (Corcoran in Fischer, 2013).

Udeleženci lahko na postavke odgovorijo s štirimi odgovori na štiristopenjski lestvici, in sicer: 0 – nikakor/nikoli ne velja zame, 1 – velja zame do določene mere ali nekaj časa, 2 – velja zame v veliki meri ali znaten del časa, in 3 – zelo velja zame ali večino časa. Namen vprašalnika je oceniti resnost simptomov (blaga, zmerna, resna ali zelo resna stopnja) in ni namenjen postavljanju diagnoze.

2.3.2.4 Splošni vprašalnik 2

Udeleženci so vprašalnik 2 izpolnjevali, ko so zaključili s probiotično ali placebo kuro. Sestavlja ga 11 vprašanj. V tem vprašalniku so navedli (1) dodeljeno kodo, (2) datum izpolnjevanja, (3) ali so imeli v času raziskave kakšne težave, oceno počutja pred (4) in po (5) raziskavi, oceno zaznavanja stresa pred (6) in po (7) raziskavi, (8) ali so mnenja, da so jemali probiotične ali placebo kapsule in (9) zakaj tako menijo, (10) ali so opazili kakšne spremembe (npr. spremembe prebave, apetita, spremembe v stopnji energije) ter (11) ali menijo, da je jemanje kapsul pripomoglo k manj stresa.

2.3.3 Odvzem in shranjevanje vzorcev

Vzorci slin smo zbirali s pomočjo zbiralnikov slin Salivette® Cortisol, ki so namenjene zbiranju vzorcev slin. Udeleženci so prejeli navodila za odvzem vzorca slin z zbiralniki, predpisana s strani proizvajalca (prikaz na sliki 9). Zbiralniki slin so bili označeni z nalepkami s kodo udeleženca raziskave.

Udeleženec vsaj 30 minut pred odvzemom vzorca slin ni smel nič jesti, piti, kaditi ali si umivati zob. Zbiralnik slin je odprl in iz njega potegnil bombažno blazino, ki jo je vstavil v usta tako, da se je s prsti čim manj dotikal blazinice. Le-to je imel v ustih vsaj 1 minuto,

da se je dobro napojila, potem pa jo je vrnil v zbiralnik in ga dobro zaprl. Ko je odvil vzorec, je zabeležil čas odvzema na zbiralnik ali na priloženo evidenčno tabelo. Zbiralnik je pospravil v hladilnik ali zamrzovalnik, kjer so bili shranjeni vse do oddaje raziskovalcem, ki so jih odnesli v laboratorij, kjer so vse zbiralnike zamrznili na -18 stopinj Celzija.

Slika 9

Potek odvzema vzorcev sline z zbiralnikom sline Salivette® Cortisol (povzeto po Sarstedt, 2020)



2.3.4 Priprava vzorcev in meritev koncentracije kortizola

Preden smo vzorce centrifugirali, smo jih vzeli iz zamrzovalnika, da so bili vsi zbiralniki sline na sobni temperaturi. Centrifugirali smo jih 5 min na 4000 RPM (Hettich Centrifuge Universal 320 R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Nemčija). Iz vsakega zbiralnika smo nato odstranili bombažno blazinico in ga vstavili v napravo IDS-iSYS, ki z avtomatiziranim postopkom izračuna koncentracijo kortizola v slini. Uporabljena je bila metoda CLIA (IDS Ltd., 2021). Naprava meri kortizol na osnovi imunološkega preizkusa, s pomočjo kemiluminiscence (tj. sproščanje svetlobe kot posledice kemične reakcije med določenimi molekulami). Mešanico približno 200 μ L vzorca sline in kalibratorjev je naprava inkubirala z biotiniliranim označevalcem kortizola in z mišjimi monoklonskimi protitelesi proti kortizolu, konjugiranimi z akridinijem (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Nemčija). Po prvi inkubaciji so bile dodane magnetne kroglice, označene s streptavidinom, sledila je druga inkubacija. Skozi postopek izpiranja se je odstranil analit, ki se ni vezal na magnetne kroglice. Ko je bil dodan sprožilni reagent, se je zaradi interakcije z akridinijem sprostila svetloba. Detektirana svetloba je obratno sorazmerna s koncentracijo analita v prvotnem vzorcu (Sarstedt, 2020).

Slika 10

IDS-iSYS (Sarstedt), naprava za merjenje kortizola v slini (povzeto po Sarstedt, 2020)



2.3.5 Kakovost vzorcev sline

Vzorci sline so bili zbrani za namene meritve ravni kortizola v sklopu raziskovalnega dela za magistrsko nalogo: Preverjanje vpliva dodajanja probiotika (*Lactobacillus rhamnosus* GG) na raven stresa.

Vsak od 75 udeležencev je oddal 12 vzorcev sline. Prvih šest vzorcev so oddali v dnevih od 6. do 8. 10. 2019, pred jemanjem probiotika ali placeba, vsak dan po dva vzorca, med 16. in 19. uro. Drugih šest vzorcev so oddali po koncu jemanja probiotika ali placeba, v tednu od 3. do 5. 11. 2019, prav tako vsak dan dva vzorca, med 16. in 19. uro. Udeleženci so jemali vzorce sline v skladu z navodili proizvajalca, opisanimi tudi v razdelku 2.3.3. Vseh vzorcev sline nismo testirali, saj so bili nekateri neprimerni (premajhna vsebnost sline, kontaminacija vsebine, odvzeti ob napačnem času ipd.). Skupaj je bilo zbranih 900 vzorcev sline, od katerih 92 ni bilo primernih za analizo. Popolnost zbranih podatkov o kortizolu prikazuje slika 11, iz katere je razvidno, zakaj je bilo 6 oseb izločenih iz analize podatkov (glej tudi razdelka 2.1 in 2.3.6).

2.3.6 Statistična analiza

Podatke smo zbirali in urejali z elektronsko preglednico Microsoft® Office Excel 2016 (Microsoft Corp., Redmond, ZDA) in analizirali s statističnim programskim paketom IBM SPSS Statistics 25 (IBM Corp., Armonk, ZDA). Za vse spremenljivke smo izdelali frekvenčne porazdelitve in izračunali opisne statistike. Zaradi nepopolnih podatkov o

vrednostih kortizola in DASS-21 smo udeležencem raziskave določili utež glede na popolnost podatkov (legenda k sliki 11):

- pri 16 udeležencih smo pridobili vse podatke (utež 1),
- pri 42 udeležencih so podatki o nekaterih meritvah kortizola manjkali (utež 0,75).
- pri 7 udeležencih smo lahko uporabili samo nepopolne podatke o kortizolu, ker so manjkali odgovori na vprašalnik DASS-21 (utež 0,5);
- pri 10 udeležencih smo lahko uporabili samo podatke o DASS-21, ker je bilo premalo primernih vzorcev za merjenje kortizola ali jih sploh ni bilo (utež 0,5).

Najprej smo razlike v srednjih vrednostih kortizola med meritvami ob različnih časih na začetku študije analizirali z enosmerno analizo variance (ANOVA) za ponovljene meritve. Če je Mauchlyjev test pokazal statistično značilno odstopanje od predpostavke o sferičnosti, smo upoštevali popravek Greenhouse-Geisser. Na podlagi te analize in vzorcev manjkajočih vrednosti (slika 11) smo raven kortizola (tako pred kot po jemanju probiotika oziroma placeba) povzeli s tremi merami:

- srednjo vrednostjo povprečja popoldanskih meritev in povprečja večernih meritev (»kortizol povprečje«; če bi preprosto povprečili vse meritve, bi bili rezultati pri udeležencih z večjim številom popoldanskih meritev kot večernih pristranski v smislu previsokih vrednosti, pri udeležencih z večjim številom večernih meritev kot popoldanskih pa v smislu prenizkih vrednosti);
- minimumom večernih meritev (»kortizol minimum«) in
- maksimumom popoldanskih meritev (»kortizol maksimum«).

Na ta način je izvedeno mero »povprečje« dobil vsak udeleženeec, ki je imel vsaj eno popoldansko in vsaj eno večerno meritev; mero »minimum« vsak, ki je imel vsaj eno večerno meritev, in »maksimum« vsak, ki je imel vsaj eno popoldansko meritev.

Glavno hipotezo raziskave smo preverjali z enosmerno analizo kovariance (ANCOVA) za neponovljene meritve, pri kateri je bila medosebni dejavnik skupina (probiotik oz. placebo), odvisna spremenljivka mera izida na koncu študije (tj. po jemanju kapsul), kovariata pa mera izida na začetku študije (tj. pred jemanjem kapsul). Izidov je bilo šest: vse tri izvedene mere kortizola in dosežki na vseh treh lestvicah vprašalnika DASS-21. Analize kovariance smo izvedli z uteženimi podatki. V vsakem modelu smo ustreznost predpostavke o homogenosti med skupinama preizkusili z Levenovim testom.

Za oceno morebitne medsebojne povezanosti različnih izidov smo za mere kortizola, dosežke na DASS-21 in subjektivni oceni blagostanja in stresa (v okviru vprašalnika) izračunali razliko med vrednostjo na koncu in vrednostjo na začetku študije ter ocenili medsebojne korelacije teh razlik (s Pearsonovim in Spearmanovim koeficientom). Za subjektivni oceni blagostanja in stresa (ki kot opisni urejenostni spremenljivki nista primerni

za analizo kovariance) smo morebitni učinek skupine (tj. probiotikov v primerjavi s placebo) preizkusili s testom t za neodvisna vzorca za izračunano razliko med koncem in začetkom študije. Te analize smo izvedli brez uteževanja podatkov.

Na enak način (tj. s testom t za izračunane razlike brez uteževanja podatkov) smo primerjali vse izide in subjektivni oceni glede na mnenje udeležencev, ali so prejeli probiotike ali placebo (za te primerjave analiza kovariance ne bi bila ustrezna, saj tako definirana skupina ni randomiziran dejavnik). Medsedbojno povezanost opisnih spremenljivk smo preizkusili s Fisherjevim eksaktnim testom (FET). Mejo statistične značilnosti smo pri vseh analizah postavili pri $p = 0,05$.

Slika 11

Prikaz manjkajočih podatkov, izločanja udeležencev in uteževanja podatkov

Št.	Splošno		Vprašalnik 2	DASS21		Vzorci sline		Uporaba
	Demografija	Vprašalnik 1		Prej	Potem	Prej	Potem	
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
19								
20								
21								
22								
23								
24								
25								
26								
27								
28								
29								
30								
31								
32								
33								
34								
35								
36								
37								
38								
39								
40								
41								
42								
43								
44								
45								
46								
47								
48								
49								
50								
51								
52								
53								
54								
55								
56								
57								
58								
59								
60								
61								
62								
63								
64								
65								
66								
67								
68								
69								
70								
71								
72								
73								
74								
75								
76								
77								
78								
79								
80								
81								

Skupina	Utež	Uporaba
probiotik	1	popolni podatki
placebo	0,75	nepopolni vzorci sline
	0,5	uporabljeni samo podatki o DAS
	0,5	uporabljeni samo nepopolni podatki o kortizolu
	0	izločeni zaradi antibiotikov
	0	izločeni zaradi manjkajočih podatkov o DAS in kortizolu

2.3.7 Morebitno nasprotje interesov

Raziskava je bila izvedena neodvisno. Podjetje Medis (Ljubljana, Slovenija) ni sodelovalo pri meritvah ali katerem koli drugem postopku. Podjetje InnoRenew CoE (Izola, Slovenija) nam je podarilo zbiralnike slin podjetja Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Nemčija) in ni imelo nobenega vpliva na rezultate raziskave.

3 REZULTATI

3.1 VREDNOSTI KORTIZOLA

Opisne statistike za izmerjene vrednosti kortizola ob različnih časih na začetku študije za izvirne (neutežene) in utežene podatke za udeležence, pri katerih je bilo mogoče določiti koncentracijo kortizola v vseh šestih vzorcih sline, prikazuje slika 12. Povprečne vrednosti so se med časi statistično značilno razlikovale (ANOVA s popravkom Greenhouse-Geisser: $p = 0,003$ za neutežene podatke in $p = 0,012$ za utežene podatke). Potrdilo se je predvideno dnevno nihanje (Aardal in Holm, 1995; Coelli idr., 2016, Hansen idr., 2003; Laudat idr., 1988 in Vogeser idr., 2006) z višjimi vrednostmi popoldan in nižjimi zvečer, zaradi česar so smiselne izvedene mere kortizola, opisane v razdelku 2.3.6. Enak vzorec dnevnega nihanja potrjujejo tudi opisne statistike za vse udeležence (ne glede na število razpoložljivih meritev), zbrane v tabeli 2.

Slika 12

Povprečne vrednosti kortizola (s 95% intervalom zaupanja) pred jemanjem kapsul za udeležence z vsemi meritvami kortizola za neutežene (levo; $N=36$) in utežene podatke (desno; $N=29$) (debela vodoravna črta označuje skupno povprečje)

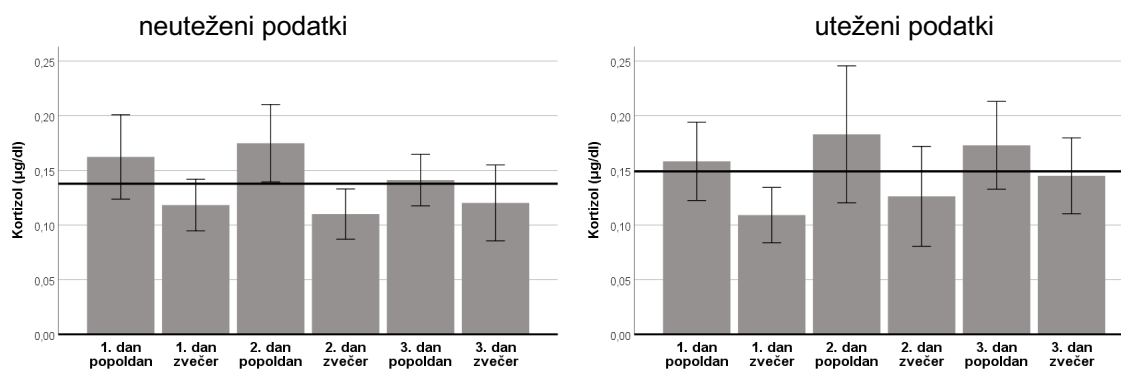


Tabela 2

Opisne statistike za meritve kortizola pred in po jemanju kapsul za vse udeležence z razpoložljivimi podatki za posamezno meritev

Kortizol (µg/dl)	N	Pred jemanjem kapsul		Po jemanju kapsul		
		Mediana	Interkvartilni razmik	N	Mediana	Interkvartilni razmik
1. dan popoldan	48	0,093	0,146 - 0,228	48	0,107	0,154 - 0,199
1. dan zvečer	45	0,069	0,130 - 0,175	45	0,063	0,102 - 0,180
2. dan popoldan	51	0,095	0,175 - 0,239	51	0,099	0,153 - 0,207
2. dan zvečer	46	0,071	0,099 - 0,190	46	0,060	0,118 - 0,197
3. dan popoldan	47	0,092	0,148 - 0,192	47	0,083	0,152 - 0,254
3. dan zvečer	46	0,069	0,104 - 0,133	46	0,067	0,112 - 0,190

V tabeli 3 so zbrane opisne statistike izvedenih mer kortizola za utežene podatke udeležencev pred in po jemanju probiotičnih ali placebo kapsul. Očitno je, da se z vidika celotnega vzorca vrednosti kortizola na začetku študije ne razlikujejo bistveno od vrednosti ob koncu študije.

Tabela 3

Opisne statistike izvedenih mer kortizola pred in po jemanju kapsul za utežene podatke

Čas	Kortizol ($\mu\text{g}/\text{dl}$)*	<i>N</i>	Povprečje	SD	Mediana	Interkvartilni razmik
Pred	Povprečje ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	53	0,156	0,078	0,141	0,101 - 0,203
	Minimum ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	55	0,098	0,062	0,085	0,053 - 0,126
	Maksimum ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	54	0,239	0,123	0,222	0,146 - 0,315
Potem	Povprečje ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	50	0,187	0,140	0,150	0,111 - 0,197
	Minimum ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	50	0,138	0,177	0,087	0,048 - 0,157
	Maksimum ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	53	0,273	0,245	0,199	0,149 - 0,338

Opombe. *povprečje – srednja vrednost povprečja popoldanskih in povprečja večernih vrednosti; min – minimum večernih vrednosti; max – maximum popoldanskih vrednosti; SD – standardni odklon.

3.2 UČINEK PLACEBA ALI PROBIOTIKA

V tabeli 4 so povzeti rezultati analize kovariance za izvedene mere kortizola in dosežke na vprašalniku DASS-21. Rezultati Levenovega testa kažejo, da je bila v vseh modelih izpolnjena predpostavka o homogenosti varianc med skupinama. Skupina ni imela statistično značilnega učinka na nobenega od izidov (vse vrednosti *p* so nad 0,5). Učinka jemanja probiotikov na raven kortizola ali na dosežke na vprašalniku DASS-21 torej nismo potrdili. To je razvidno tudi iz slik 13 in 14, ki prikazujeta, da ob koncu študije niti glede povprečnih, najnižjih in najvišjih izmerjenih vrednosti kortizola v slini niti glede povprečnega dosežka na lestvicah vprašalnika DASS-21 ni bilo statistično značilnih razlik med skupino, ki je jemala probiotik, in skupino, ki je jemala placebo.

Po pričakovanju je bil praktično pri vseh izidih statistično značilen učinek kovariate (tj. vrednosti na začetku študije), kar pomeni, da so udeleženci, ki so v primerjavi z drugimi imeli višje (oz. nižje) vrednosti izidov na začetku študije, imeli v povprečju višje (oz. nižje) vrednosti tudi na koncu študije.

Tabela 4

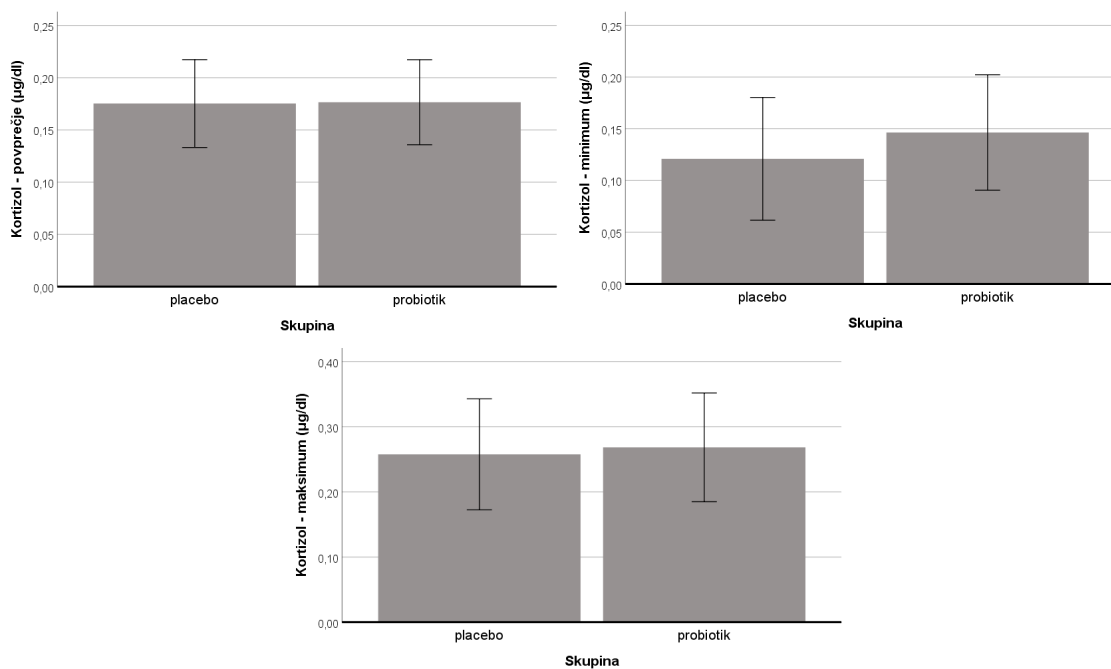
Povzetek enosmernih analiz kovariance za ugotavljanje učinka probiotikov oziroma placeba na raven kortizola v slini in dosežke na vprašalniku DASS-21

Izid		Levenov test*	Učinek skupine**	Učinek kovariate***
Kortizol	Povprečje	0,486	0,967	<0,001
	Min	0,482	0,519	0,093
	Max	0,697	0,859	0,031
DASS-21	Depresivnost	0,549	0,950	0,056
	Anksioznost	0,643	0,728	<0,001
	Stres	0,226	0,918	<0,001

Opombe. * test enakosti variance napake med skupinami; ** primerjava med probiotiki in placebom; *** učinek začetne vrednosti izida.

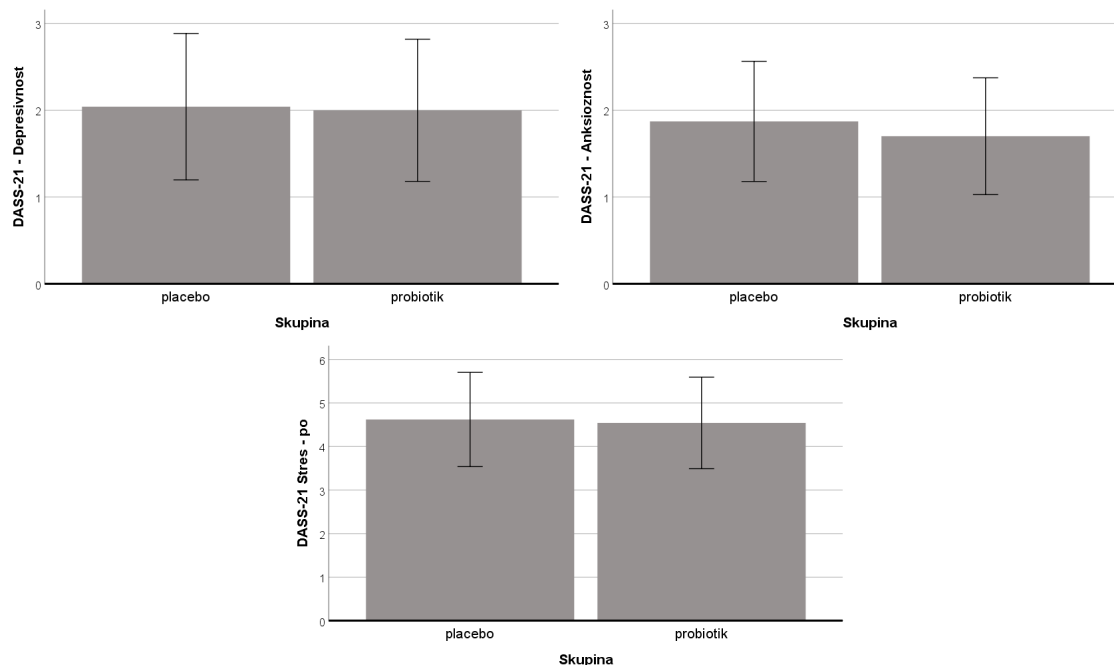
Slika 13

Ocene robnih povprečij (s 95% intervalom zaupanja) po jemanju probiotičnih ali placebo kapsul za izvedene mere kortizola



Slika 14

Ocene robnih povprečij (95% interval zaupanja) po jemanju probiotičnih ali placebo kapsul za lestvice vprašalnika DASS-21



3.3 SUBJEKTIVNO ZAZNANE SPREMEMBE PO JEMANJU KAPSUL

Tabela 5 in slika 15 povzemata zaznane spremembe (tj. morebitne spremembe prebave, apetita, ravni energije ipd.) in oceno učinka kapsul na stres (»Ali menite, da so kapsule pripomogle k zmanjšanju stresa?«) pri obeh skupinah udeležencev. En udeleženec (iz skupine s placebom) na ti vprašanji ni odgovarjal.

Glede zaznanih sprememb je bila razlika statistično značilna (FET: $p = 0,039$), in sicer je spremembe zaznalo 59 % udeležencev, ki so jemali probiotik, med udeleženci, ki so jemali placebo, pa le 34 %. Glede zaznanega učinka kapsul na stres med skupinama ni bilo statistično značilne razlike (FET: $p = 1,000$), saj je v obeh skupinah 26 % udeležencev menilo, da so kapsule pripomogle k zmanjšanju stresa.

Tabela 5

Zaznane spremembe in mnenje o zmanjšanju stresa po jemanju probiotične ali placebo kapsule

Skupina	Zaznane spremembe		Zmanjšanje stresa	
	Ne	Da	Ne	Da
Placebo	23 (66%)	12 (34%)	26 (74%)	9 (26%)
Probiotik	16 (41%)	23 (59%)	29 (74%)	10 (26%)
Skupaj	39 (53%)	35 (47%)	55 (74%)	19 (26%)

Slika 15

Delež zaznanih sprememb in mnenja o zmanjšanju stresa po jemanju probiotične ali placebo kapsule



Pred nadaljnjimi analizami smo preverili, ali je bilo mnenje udeležencev o tem, v kateri skupini so bili, povezano z dejansko skupino, torej ali je raziskava ostala »slepa« z vidika udeležencev. Med dejansko in zaznano skupino ni bilo povezave: v skupini s probiotikom je 49 % udeležencev menilo, da so prejeli probiotik, in 51 %, da so prejeli placebo, v skupini s placebo pa 51 %, da so prejeli probiotik, in 49 %, da so prejeli placebo (FET: $p = 1,000$). Ker sta bili dejanska in zaznana pripadnost skupini medsebojno neodvisni, smo v nadaljevanju analizirali mnenje o pripadnosti skupini kot dejavnik, ki bi lahko vplival na izide.

Tabela 6 in slika 16 povzemata zaznane spremembe (tj. morebitne spremembe prebave, apetita, ravni energije ipd.) in oceno učinka kapsul na stres glede na mnenje udeleženca, v kateri skupini se je nahajal (tj. ali je prejel probiotik ali placebo).

Glede obeh vprašanj je bila razlika statistično značilna (FET: $p = 0,001$). Spremembe je zaznalo kar 68 % udeležencev, ki so menili, da so jemali probiotik, med udeleženci, ki so

menili, da so jemali placebo, pa le 27 %. Mnenja, da je jemanje kapsul zmanjšalo stres, je bilo 48 % udeležencev, ki so verjeli, da so jemali probiotik, in le 8 % udeležencev, ki so verjeli, da so jemali placebo. Ti rezultati jasno kažejo, da je na subjektivno zaznane spremembe po jemanju kapsul vplivalo prepričanje udeleženca o tem, ali je jemal probiotik ali placebo.

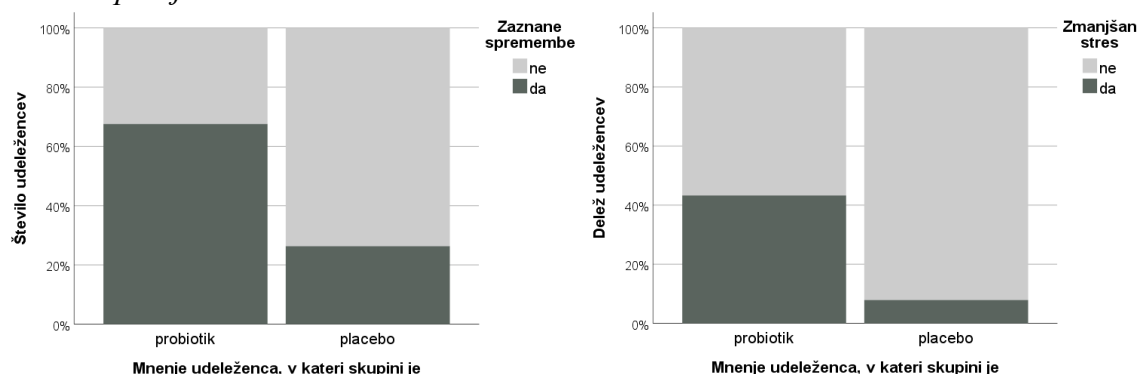
Tabela 6

Zaznane spremembe in mnenje o zmanjšanju stresa glede na mnenje udeleženca, v kateri skupini je bil

Mnenje, da je v skupini	Zaznane spremembe		Zmanjšan stres	
	Ne	Da	Ne	Da
Placebo	27 (73%)	10 (27%)	34 (92%)	3 (8%)
Probiotik	12 (32%)	25 (68%)	21 (57%)	16 (43%)

Slika 16

Delež zaznanih sprememb in mnenja o zmanjšanju stresa glede na mnenje udeleženca, v kateri skupini je bil



3.4 OCENE BLAGOSTANJA IN STRESA PRED IN PO JEMANJU KAPSUL

Udeleženci so podali tudi oceno svojega blagostanja in zaznane ravni stresa pred in po jemanju kapsul (oboje na lestvici od 1 do 5). Višja ocena je pomenila večje blagostanje oz. večji stres.

Tabela 7 povzema povezanost razlik v teh ocenah po jemanju kapsul v primerjavi z ocenami pred jemanjem kapsul z istovrstnimi razlikami v ocenah na lestvicah DASS-21 in izvedenih merah kortizola. Po pričakovanju so spremembe blagostanja negativno korelirane (tj. obratno sorazmerne) s spremembami stresa (porast blagostanja je povezana z upadom stresa

in obratno). Pričakovane so tudi pozitivne medsebojne korelacije razlik na lestvicah DASS-21, hkrati pa razlike v dosežkih na lestvicah DASS-21 niso povezane z razlikami v merah kortizola. Razlike v oceni blagostanja in stresa so povezane z razlikami v ocenah na lestvicah DASS-21 v pričakovani smeri (povečanje subjektivne ocene blagostanja je povezano z zmanjšanjem dosežka na lestvici stresa DASS-21 itd.), le razlika v subjektivni oceni stresa ni povezana z razliko v dosežku na lestvici anksioznosti DASS-21. Razlike v vrednostih kortizola niso povezane niti z razlikami v subjektivnih ocenah niti z razlikami v dosežkih na lestvicah DASS-21, so pa razlike v merah kortizola medsebojno pozitivno povezane.

Tabela 7

Korelacije razlik med vrednostmi pred in po jemanju kapsul za oceno stresa in blagostanja, lestvice DASS-21 in izvedene mere kortizola (Pearsonov r in Spearmanov ro; uteženi podatki)

		Ocena stresa	DASS-21: Depresija	DASS-21: Anksiozn.	DASS-21: Stres	Kortizol: povprečje	Kortizol: minimum	Kortizol: maksimum
Ocena blagostanja	r	-0,63***	-0,52***	-0,30*	-0,34*	-0,12	-0,11	0,09
Ocena stresa	ro	-0,50***	-0,56***	-0,31**	-0,39*	0,17	0,10	0,09
DASS-21: Depresija	r		0,53***	0,16	0,28*	-0,05	0,06	-0,06
DASS-21: Anksioznost	ro		0,43***	0,10	0,25*	0,00	-0,05	0,01
DASS-21: Stres	r			0,38**	0,63***	-0,10	-0,05	-0,14
Kortizol: povprečje	ro			0,38**	0,62***	0,02	-0,05	-0,04
Kortizol: minimum	r				0,65***	-0,19	-0,01	-0,11
Kortizol: maksimum	ro				0,48***	-0,24	-0,11	-0,14
	r					-0,21	-0,08	-0,09
	ro					-0,13	0,82	0,02
	r						0,82***	0,71***
	ro						0,72***	0,81***
	r							0,28*
	ro							0,42**

Opombe. * $0,01 < p \leq 0,05$, ** $0,001 < p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$.

Tabela 8 prikazuje primerjavo skupine, ki je uživala probiotike, s skupino, ki je uživala placebo, glede razlike med subjektivno oceno blagostanja oziroma stresa po jemanju kapsul in subjektivno oceno pred jemanjem kapsul. Razlika med skupinama ni statistično značilna.

Tabela 8

Primerjava skupin glede spremembe subjektivnih ocen po jemanju kapsul (neuteženi podatki)

Razlika	Skupina	Povprečje	SD	p^*
Ocena blagostanja	placebo	0,28	0,78	0,085
	probiotik	-0,10	1,07	
Ocena stresa	placebo	0,03	0,70	0,518
	probiotik	0,18	1,23	

Opombe. * test t za neodvisna vzorca.

Tabela 9 prikazuje primerjavo razlik v izidih po jemanju kapsul med udeleženci, ki so menili, da jemljejo probiotik, in udeleženci, ki so menili, da jemljejo placebo. Enako kot pri morebitnem učinku dejanske skupine (tabela 4, slika 14), se vrednosti kortizola in dosežki na lestvicah DASS-21 niso statistično značilno razlikovali. Tudi glede razlike v oceni stresa razlika ni statistično značilna (enako kot za dejansko skupino – tabela 8), sprememba subjektivne ocene blagostanja pa se je statistično značilno razlikovala, pri čemer se je samoocena blagostanja pri udeležencih, ki so menili, da so jemali probiotik, v povprečju zvišala, pri udeležencih, ki so menili, da so jemali placebo, pa v povprečju znižala.

Sklenemo lahko, da obstajajo razlike v subjektivnih samoocenah izida raziskave glede na prepričanje udeležencev o tem, ali da so uživali probiotike ali ne, razlik v objektivnih pokazateljih pa nismo opazili niti glede na to, kaj so dejansko prejeli, niti glede na prepričanje udeležencev o prejemani učinkovini.

Tabela 9

Primerjava spremembe izvedenih mer kortizola, dosežkov na lestvicah DASS-21 in subjektivnih ocen blagostanja in stresa po jemanju kapsul glede na mnenje udeleženca, v kateri skupini se je nahajal (uteženi podatki, razen pri subjektivnih ocenah)

Razlika	Mnenje, da je v skupini	Povprečje	SD	<i>p</i> *
Kortizol: povprečje	probiotik	0,036	0,132	0,272
	placebo	0,000	0,084	
Kortizol: minimum	probiotik	0,040	0,176	0,916
	placebo	0,035	0,143	
Kortizol: maksimum	probiotik	0,056	0,298	0,291
	placebo	-0,018	0,157	
DASS-21:depresivnost	probiotik	-0,83	3,04	0,243
	placebo	0,17	3,06	
DASS-21:anksioznost	probiotik	-0,41	1,79	0,413
	placebo	0,10	2,65	
DASS-21: stres	probiotik	-1,01	2,89	0,219
	placebo	0,33	4,77	
Ocena blagostanja**	probiotik	0,35	0,86	0,014
	placebo	-0,18	0,98	
Ocena stresa**	probiotik	-0,05	1,00	0,175
	placebo	0,26	1,01	

Opombe. * test *t* za neodvisna vzorca, ** neuteženi podatki.

4 RAZPRAVA

Namen naše študije je bil preveriti, če oziroma kako 26-dnevno jemanje probiotikov Waya® (sev *L. rhamnosus* GG, ATCC 53103) vpliva na doživljanje stresa pri zdravih posameznikih. Predvidevali smo, da bodo udeleženci, ki so prejeli probiotik, kazali manjšo raven stresa (tj. nižjo raven kortizola v slini in nižje vrednosti na DASS-21), medtem ko pri udeležencih, ki so prejeli placebo, tega učinka ne bo zaznali oziroma bodo izmerjene spremembe manjše kot pri eksperimentalni skupini.

Glede na pridobljene podatke naše hipoteze ne moremo potrditi, saj spremembe pred začetkom in po končani suplementaciji s placebo ali probiotiki, v izmerjeni ravni kortizola in vrednostih pri DASS-21 vprašalniku niso statistično značilne (tabela 4, sliki 13 in 14), oziroma pri udeležencih, ki so prejeli probiotik, vrednosti kortizola in vrednosti pri DASS-21 vprašalniku niso bile nižje, kot pri tistih udeležencih, ki so prejeli placebo.

Opazili smo le statistično značilno razliko v subjektivno zaznanih spremembah (tj. morebitne spremembe prebave, apetita, ravni energije ipd.) pri udeležencih, ki so prejeli probiotike, v primerjavi s tistimi, ki so prejeli placebo (tabela 5 in slika 15). Kar 59% udeležencev, ki so prejeli probiotik, je poročalo o zaznanih spremembah v počutju, pri udeležencih, ki so jemali placebo, pa jih je spremembe zaznalo le 34%. Učinek suplementacije na zaznavanje stresa med placebo in probiotično skupino pa ni statistično značilen (v obeh skupinah je 26% udeležencev zaznalo razliko).

Hkrati se je izkazalo, da ima mnenje oziroma prepričanje udeležencev o tem, kaj jemljejo, pomembno vlogo oziroma vpliv na subjektivno zaznavanje sprememb in na doživljanje stresa (tabela 6 in slika 16). Kar 68% udeležencev, ki so menili, da jemljejo probiotik, je zaznalo spremembe (tj. morebitne spremembe prebave, apetita, ravni energije ipd.), medtem ko je bil pri udeležencih, ki so menili, da jemljejo placebo, ta delež le 27%. Mnenja, da jemanje probiotika zmanjša stres, je bilo 48% udeležencev, ki so verjeli, da so jemali probiotik, in le 8% tistih, ki so verjeli, da jemljejo placebo. Tudi rezultati, zbrani v tabeli 9, so pokazali, da se je samoocena blagostanja pri udeležencih, ki so menili, da so jemali probiotik, v povprečju zvišala, pri udeležencih, ki so menili, da so jemali placebo, pa znižala.

Vse to o nakazuje na pomemben učinek placeba, saj je udeleženec prepričan, da je suplement, ki ga je zaužil, v bistvu učinkovina, ki bo pozitivno vplivala na njegovo zdravje in počutje. Raziskave nakazujejo pomembno vlogo placeba na področju različnih psihiatričnih stanj, kot so depresija, tesnoba, odvisnost in shizofrenija (Požgain, I., Požgain, Z. in Degmečić, 2014). Koristni in terapevtski učinke placeba, ki jih doživijo udeleženci med »zdravljenjem«, so posledica odziva možganov (preko učenja, pričakovanja) na kontekst, v katerem se izvaja zdravljenje. Ugotovitve v študijah kažejo, da se zmanjša aktivnost v

predelih možganov, ki so povezani z bolečino in negativnimi čustvi, poveča pa se aktivnost v stranski in medialni prefrontalni skorji, ventralem striatumu in možganskem deblu. Obstaja tudi več fizioloških poti, preko katerih placebo vpliva na fiziološke in vedenjske procese. Raziskovanje placebo učinka se je šele dobro začelo in boljše razumevanje bi lahko prineslo koristi za zdravje ljudi (Geuter, Koban in Wager, 2017; Wager in Atlas, 2015).

Ko smo pri spremembah blagostanja in zaznanem stresu primerjali rezultate pred in po suplementaciji, smo ugotovili, da negativno korelirajo (tabela 7), kar pomeni, da večje kot je blagostanje, manjše je zaznavanje stresa in obratno (Cohen, Gianaros in Manuck, 2016; Zhang idr., 2020). Pri vprašalniku DASS-21 so korelacije razlik med lestvicami pozitivne, ne moremo pa jih povezati z razlikami v merah kortizola. Razlike v oceni blagostanja in zaznanega stresa pa so povezane z razlikami ocen na lestvicah pri DASS-21, z izjemo ocene subjektivnega stresa, ki ni povezana z razliko v dosežku na lestvici anksioznosti. Prav tako se ni se pokazala povezava med razlikami v vrednostih kortizola pred in po suplementaciji ter subjektivnimi ocenami, niti z razlikami v ocenah pri vprašalniku DASS-21.

Na podlagi naših rezultatov ne moremo potrditi vpliva probiotika na objektivno zaznavanje stresa (tabela 4). Podobni rezultati so bili ugotovljeni tudi pri dvojno slepi, randomizirani študiji, katere namen je bil ugotoviti, ali lahko probiotiki zmanjšajo škodljive učinke akutnega stresa na delovni spomin pri 58 zdravih udeležencih, ki so 28 dni jemali suplement (probiotik ali placebo). Ugotovili so, da brez indukcije stresa probiotiki niso vplivali na možgane, vedenje ali na samoporočanje sprememb pri udeležencih. Vseeno pa je skupina, ki je prejela probiotik, pokazala povečanje učinkovitosti delovnega spomina, kar nakazuje na nevrokognitivne učinke probiotikov (Papalini idr., 2018). Pregled različnih študij je nakazal trend, da dodajanje probiotikov lahko zmanjša stopnjo subjektivnega stresa pri zdravih udeležencih in posledično vpliva na anksioznost in depresijo, vendar so potrebne bolj podrobne klinične študije, ki bi ponudile boljše razumevanje delovanja specifičnih sevov probiotikov in kako jih lahko uporabimo za lajšanje stresa (Zhang idr., 2020).

Pomembno je omeniti omejitve raziskave, ki bi posledično lahko vplivale tudi na končni izid. Večjo konsistentnost, natančnost in bolj dosledno upoštevanje navodil bi lahko zagotovili, če bi bili udeleženci pri jemanju vzorcev slin pod našim nadzorom. Tako smo morali nekatere izmed vzorcev slin izključiti iz nadaljnje analize, saj so bili odvzeti ob napačnih urah, kontaminirani, ali pa v njih ni bilo dovolj slin. Prav tako bi bilo smiselno, da bi udeležence spremljali skozi daljše časovno obdobje in pridobili od vsakega udeleženca več vzorcev slin – dnevno ali tekom obdobja (Zhang idr., 2020). Poleg tega so bili vsi udeleženci prostovoljci in za sodelovanje niso bili plačani, zato bi bila njihova motivacija lahko manjša, kot če bi za udeležbo prejeli nagrado ali plačilo. Potrebno je vzeti v obzir tudi

to, da so bili udeleženci iz različnih okolij in imajo različne navade, kar vse lahko vpliva na rezultate.

Na podlagi naše raziskave ne moremo trditi, da suplementacija pomembno spremeni doživljanje stresa. Kot že omenjeno (razdelek 1.2.2) lahko k nihanju kortizola pripomore več različnih dejavnikov, kot so dieta, uživanje zdravil, izmensko delo, telesna aktivnost, količina in kakovost spanja, menstrualni cikel pri ženskah ipd. (Hansen, Garde in Perrson, 2008), na katere v tej študiji nismo imeli vpliva oziroma jih nismo nadzorovali. Pri merjenju kortizola je pomembno opozoriti tudi na to, da ni določenih točnih vrednosti kortizola v slini, ki bi se dale posplošiti na celotno populacijo (Aardal in Holm, 1995; Coelli idr., 2016; Hansen idr., 2003; Laudat idr., 1988 in Vogeser idr., 2006) in obstaja samo določen trend nihanja kortizola v slini čez dan (tabela 2). Posledično je težko v tako kratem času in z majhnim vzorcem ugotoviti, ali je vzorec vrednosti kortizola pri določenem udeležencu v mejah normale ali pa se nakazuje kakšen odklon.

Ne glede na omejitve naši rezultati nakazujejo potencialno uporabo probiotika kot prehransko dopolnilo za izboljšanje subjektivnega stanja, študije, ki so jih izvedli drugi, pa nakazujejo možnost, da z redno suplementacijo določenega seva ali več sevov lahko blagodejno vplivamo na nevrokognitivne povezave v možganih in posledično na naše vedenje, počutje in zdravje (Papalini idr., 2018; Sarkar, Lehto, Harty, Dinan, Cryan in Burnet, 2016; Zhang idr., 2020). Probiotiki lahko pozitivno delujejo tudi na naš imunski sistem, znižujejo nivo oksidativnega stresa ter zmanjšujejo prepustnost črevesne sluznice (Corr in Gahan, 2009; Leber, Vanderleyden in De Keersmaecker, 2010; Rao in Samak, 2013). Vse to so dobra izhodišča za nadaljnje raziskovanje in poglobljanje znanja o teh zanimivih organizmih, ki lahko ponudijo mnoge nove oblike terapij in zdravljenja stanj, ki jih povezujemo s preveliko izpostavljenostjo stresorjem (npr. vnetne črevesne bolezni, presnovne in duševne motnje) (Smith in Vale, 2006; Kinlein in Karatsoreos, 2020).

Nekatere študije kažejo, da so potrjeni učinki probiotikov na kognicijo in odpornost na stres redki in si lahko tudi nasprotujejo. Raziskava, objavljena v ugledni znanstveni reviji, poroča o različnih odzivih posameznikov na vnos empiričnih probiotikov, kjer pri nekaterih ni prišlo do kolonizacije črevesne sluznice z zaužitimi probiotiki, prav tako so bile spremembe črevesnega transkriptoma različno izražene (Zmora idr., 2018). Ta skupina znanstvenikov je proučila tudi učinek probiotikov po antibiotični intervenciji (Suez idr., 2018). Izkazalo se je, da je po koncu jemanja antibiotikov spontana rekolonizacija črevesja upočasnjena in lahko celo nepopolna, če se vključi suplementacija s probiotiki. Po drugi strani pa se je črevesna mikrobiota obnovila v nekaj dneh, če je bila izvedena avtologna transplantacija fekalne mikrobiote. Še več, novejša raziskava kažejo na možnost razvoja rezistence na antibiotike preko prenosa genov probiotikov v gostiteljev genom, kar lahko zmanjša učinkovitost antibiotičnih intervencij in prispeva k že tako problematični neodzivnosti

populacije na številna zdravila (Selvin, Maity, Sajayan in Kiran, 2020). Zaenkrat ni trdnih medicinskih dokazov, ki bi podpirali pozitivne učinke probiotikov na spoprijemanje s stresom, prav tako tudi ni konsenza glede njihovih škodljivih učinkov (Liu, 2017; Rieder, Wisniewski, Alderman in Campbell, 2018; Zhang idr., 2020).

Raziskave, ki proučujejo vplive probiotikov, so si med seboj zelo različne in jih med seboj težko primerjamo. Razlikujejo se v samem raziskovalnem protokolu; vrsti probiotičnega izdelka; uporabi enega ali več sevov bakterij; trajanju intervencije in količini vnosa probiotikov; načinu meritev in analize (z osredotočanjem na posamene vrste vzorcev in parametre); v značilnostih udeležencev (zdravi, bolni, spol, starost, aktivnost idr.); tega, ali je študija slepa, vključuje placebo oziroma kontrolno skupino; kateri biološki vzorci so analizirani; in končno, kateri potencialni učinek želimo opazovati (Zhang idr., 2020). Potrebno je tudi omeniti, da obstaja veliko dejavnikov, ki lahko neposredno in posredno vplivajo na rezultate študij, ki proučujejo učinke jemanja probiotikov na zdravje človeka. Na rezultate v veliki meri vpliva življenjski slog udeležencev raziskave (prehrana, fizična aktivnost, spalne navade, higiena, jemanje zdravil, regulacija stresa), gensko ozadje, starost, prisotnost bolezni in tudi okolje, v katerem živijo, s svojo kulturo, ureditvijo družbe in geografsko lego.

5 SKLEPI

Probiotiki so učinkoviti za zdravljenje različnih patologij, saj preprečujejo disbiozo, ki se pojavi, ko naše telo ni v ravnovesju, oziroma je izpostavljeno različnim stresnim faktorjem. Rezultati naše raziskavo pa so pokazali, da 26-dnevna suplementacija s probiotikom Waya® (sev *L. rhamnosus* GG, ATCC 53103) pri zdravih odraslih nima učinka na raven stresa, izmerjeno preko ravni kortizola v slini, in na zaznavanje anksioznosti, depresije in stresa, kot ga meri vprašalnik DASS-21. Naše osnovne hipoteze nam tako ni uspelo potrditi.

Rezultati pa so pokazali znaten vpliv placeba oziroma, da je zelo pomembno, kaj udeleženci menijo, da jemljejo. Tisti, ki so bili mnenja, da so ves čas uživali probiotične kapsule, so poročali o večjem blagostanju ter o nižji stopnji stresa, čeprav se to ni pokazalo niti pri meritvah kortizola niti pri rezultatih na lestvicah DASS-21.

Povpraševanje in zanimanje za probiotike in probiotično hrano se je v zadnjih desetletjih povečalo, kar spodbuja nadaljnje zanimanje za raziskave, ki preučujejo koristne učinke probiotikov na zdravje. Na podlagi dosedanjih raziskav (Corr in Gahan, 2009; Lebber, Vanderleyden in De Keersmaecker, 2010; Papalini idr., 2018; Rao in Samak, 2013; Sarkar, Lehto, Harty, Dinan, Cryan in Burnet, 2016; Zhang idr., 2020) lahko rečemo, da dodajanje probiotikov pri zdravih posameznikih izboljša črevesno mikrobioto. Učinkoviti so v posebnih primerih in posebnih okoliščinah (Iannitti in Palmieri, 2010; George Kerry, Patra, Gouda, Park, Shin in Das, 2018; Papalini idr., 2018), je pa potrebno več raziskav, da bi lahko dokazovali njihovo učinkovitost pri zdravih in nezdravih ljudeh (Khalesi, Bellissimo, Vandelanotte, Williams, Stanley in Irwin, 2018).

Preden probiotike vključimo v terapije za lajšanje doživljanja stresa ali simptomov raznih bolezni, potrebujemo bolj zanesljive in konsistentne klinične dokaze (Kothari, Patel in Kim, 2019; Lerner, Shoenfeld in Matthias, 2019; Wang idr., 2020). Ob trenutnem pomanjkljivem poznavanju mehanizmov delovanja in omejenem številu študij, previdnost in preudarnost pri suplementaciji s probiotiki ni odveč. Z boljšim razumevanjem delovanja mikrobiote v odnosu s človekom in napredkom tehnologije, bodo v prihodnosti najbrž na voljo izdelki, ki bi lahko uspešno delovali tako v preventivi kot pri obvladovanju in zdravljenju različnih obolenj. Na podlagi trenutnih ugotovitev sklepamo, da redno vključevanje probiotičnih živil ali prehranskih dopolnil s probiotiki v prehrano prispeva k vzpostavitvi in ohranjanju optimalne mikrobiote človeka. Pomembno pa se je osredotočiti na dejavnike življenjskega sloga, ki modulirajo našo mikrobioto (prehrana, gibanje, spanje, stik z naravo ipd.) in se izogibati oz. zmanjšati rizične faktorje (npr. velika količina stresa, nezdrava in osiromašena prehrana, alkohol, uživanje različnih zdravil ipd.).

Ob stalnem naraščanju zanimanja za proizvodnjo različnih probiotičnih izdelkov in trženje probiotikov je pomembno, da boljše raziščemo in razumemo njihove učinke in potencialno vlogo v našem vsakdanjem življenju in terapijah. Spoznanja, pridobljena z našo raziskavo, lahko služijo kot podpora nadaljnjemu delu, saj ponujajo nekaj iztočnic, ki jih je vredno podrobneje raziskati.

6 LITERATURA

Aardal, E. in Holm, A-C. (1995). Cortisol in saliva – reference ranges and relation to cortisol in serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 33, 927-932.

Arcidiacono S., Soares J. W., Karl J. P., Chrisey L., Dancy B. C. R., Goodson M., Gregory, F., Hammamieh, R., Loughnane, N. K., Kokoska, R., Mark Riddle, C. A. P. T., Whitaker, K. in Racicot, K. (2018). The current state and future direction of DoD gut microbiome research: a summary of the first DoD gut microbiome informational meeting. *Standards in Genomic Sciences*. 13(5). 10.1186/s40793-018-0308-0

Bamalan, O. A. in Al Khalili, Y. (2020). Physiology, Serotonin. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

Belizário, J. E. in Faintuch, J. (2018). Microbiome and Gut Dysbiosis. *Experientia supplementum* (2012), 109, 459–476. https://doi.org/10.1007/978-3-319-74932-7_13

Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., Mitter, B., ... Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>

Biagi, E., Candela, M., Fairweather-Tait, S., Franceschi, C. in Brigidi, P. (2012). Aging of the human metaorganism: the microbial counterpart. *Age* (Dordrecht, Netherlands), 34(1), 247–267. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9217-5>

Borre, Y. E., O'Keeffe, G. W., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T. G. in Cryan, J. F. (2014). Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends in molecular medicine*, 20(9), 509–518.

Božović, D., Račić, M. in Ivković, N. (2013). Salivary cortisol levels as a biological marker of stress reaction. *Medical archives*, 67 5, 374-7.

Breit, S., Kupferberg, A., Rogler, G. in Hasler, G. (2018). Vagus Nerve as Modulator of the Brain-Gut Axis in Psychiatric and Inflammatory Disorders. *Frontiers in psychiatry*, 9, 44. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00044>

Carabotti, M., Scirocco, A., Maselli, M. A. in Severi, C. (2015). The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Annals of gastroenterology*, 28(2), 203–209.

Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D. T., Corfe, B. M. in Owen, L. J. (2015). Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microbial ecology in health and disease*, 26, 26191. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26191>

Chaplin D. D. (2010). Overview of the immune response. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2 Suppl 2), S3–S23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>

Chovatiya, R. in Medzhitov, R. (2014). Stress, Inflammation, and Defense of Homeostasis. *Molecular Cell*, 54 (2), 281–288. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.030

Coelli, S., Farias, C. B., Soares, A. A., Crescente, G. M., Hirakata, V. N., Souza, L. B., Czepielewski, M. A., Camargo, J. L. in Silveiro, S. P. (2017). Influence of age, gender and body mass index on late-night salivary cortisol in healthy adults. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 55(12), 1954–1961. <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-1100>

Cohen, S., Gianaros, P. J. in Manuck, S. B. (2016). A Stage Model of Stress and Disease. *Perspectives on psychological science: a journal of the Association for Psychological Science*, 11(4), 456–463. <https://doi.org/10.1177/1745691616646305>

Cohen, S., Frank, E., Doyle, W. J., Skoner, D. P., Rabin, B. S. in Gwaltney, J. M., Jr (1998). Types of stressors that increase susceptibility to the common cold in healthy adults. *Health psychology: official journal of the Division of Health Psychology, American Psychological Association*, 17(3), 214–223. <https://doi.org/10.1037//0278-6133.17.3.214>

Cohen, S., Janicki-Deverts, D., Doyle, W. J., Miller, G. E., Frank, E., Rabin, B. S. in Turner, R. B. (2012). Chronic stress, glucocorticoid receptor resistance, inflammation, and disease risk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 5995–5999. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118355109>

Cohen, S., Janicki-Deverts, D. in Miller, G. E. (2007). Psychological stress and disease. *JAMA*, 298(14), 1685–1687. <https://doi.org/10.1001/jama.298.14.1685>

Colby, J. P., Jr, Linsky, A. S. in Straus, M. A. (1994). Social stress and state-to-state differences in smoking and smoking related mortality in the United States. *Social science & medicine (1982)*, 38(2), 373–381. [https://doi.org/10.1016/0277-9536\(94\)90407-3](https://doi.org/10.1016/0277-9536(94)90407-3)

Corcoran, K. in Fisher, J. (2013). *Measures for Clinical Practice and Research a Source Book Fifth Edition Volume 2: Adults*. Oxford University Press, New York.

Corr, S. C., Hill, C. in Gahan, C. G. (2009). Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. *Advances in food and nutrition research*, 56, 1–15. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(08\)00601-3](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(08)00601-3)

Cryan, J. F., O'Riordan, K. J., Cowan, C., Sandhu, K. V., Bastiaanssen, T., Boehme, M., Codagnone, M. G., Cussotto, S., Fulling, C., Golubeva, A. V., Guzzetta, K. E., Jaggard, M., Long-Smith, C. M., Lyte, J. M., Martin, J. A., Molinero-Perez, A., Moloney, G., Morelli, E., Morillas, E., O'Connor, R., ... Dinan, T. G. (2019). The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiological reviews*, 99(4), 1877–2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>

Dalile, B., Van Oudenhove, L., Vervliet, B. in K. Verbeke. (2019). The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16, 461–478. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0157->

David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J. in Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>

De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G. in Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), 14691–14696. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>

De Filippis, F., Pellegrini, N., Vannini, L., Jeffery, I. B., La Storia, A., Laghi, L., Serrazanetti, D. I., Di Cagno, R., Ferrocino, I., Lazzi, C., Turrone, S., Cocolin, L., Brigidi, P., Neviani, E., Gobbetti, M., O'Toole, P. W. in Ercolini, D. (2016). High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut*, 65(11), 1812–1821. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309957>

DeGruttola, A. K., Low, D., Mizoguchi, A. in Mizoguchi, E. (2016). Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models. *Inflammatory bowel diseases*, 22(5), 1137–1150. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000750>

Derrien, M. in van Hylckama Vlieg, J. E. (2015). Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends in microbiology*, 23(6), 354–366. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.03.002>

Dhabhar, F., S. (2014). Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunology Research*, 58(2-3), 193-210. doi:10.1007/s12026-014-8517-0

Dorn, L. D., Lucke, J. F., Loucks, T. L. In Berga S. L. (2007). Salivary cortisol reflects serum cortisol: analysis of circadian profiles. *Association for Clinical Biochemistry*, 44, 281-284.

Doron, S., Snyderman, D. R. in Gorbach, S. L. (2005). Lactobacillus GG: bacteriology and clinical applications. *Gastroenterology clinics of North America*, 34(3), 483–ix. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2005.05.011>

Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E. in Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308(5728), 1635–1638. <https://doi.org/10.1126/science.1110591>

El-Farhan, N., Rees, D. A. In Evans, C. (2017). Measuring cortisol in serum, urine and saliva – are obur assays good enough? *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*, 54 (3), 308-322.

Frank, D. N., St, A. A., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N. in Pace, N. R. (2007). Molecular- phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A*, 104, 13780–5.

Fritz, E. M., Singewald, N. in De Bundel, D. (2020). The Good, the Bad and the Unknown Aspects of Ghrelin in Stress Coping and Stress-Related Psychiatric Disorders. *Frontiers in synaptic neuroscience*, 12, 594484. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.594484>

Fung, C. in Vanden Berghe, P. (2020). Functional circuits and signal processing in the enteric nervous system. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 77(22), 4505–4522. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03543-6>

Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., Carrera-Bastos, P., Targ, S., Franceschi, C., Ferrucci, L., Gilroy, D. W., Fasano, A., Miller, G. W., Miller, A. H., Mantovani, A., Weyand, C. M., Barzilai, N., Goronzy, J. J., Rando, T. A., Effros, R. B., Lucia, A., Kleinstreuer, N. in Slavich, G. M. (2019). Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature medicine*, 25(12), 1822–1832. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0675-0>

Fülling, C., Dinan, T. G., in Cryan, J. F. (2019). Gut Microbe to Brain Signaling: What Happens in Vagus.... *Neuron*, 101(6), 998–1002. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.02.008>

Garcia-Mantrana, I., Selma-Royo, M., Alcantara, C. in Collado, M. C. (2018). Shifts on gut microbiota associated to mediterranean diet adherence and specific dietary intakes on general adult population. *Frontiers in Microbiology*, 9, 890. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00890>

Gatti, R., Antonelli, G., Prearo, M., Spinella, P., Cappellin, E. in De Palo, E. F. (2009). Cortisol assays and diagnostic laboratory procedures in human biological fluids. *Clinical Biochemistry*, 42 (2009), 1205-1217.

Geuter, S., Koban, L. in Wager, T. D. (2017). The Cognitive Neuroscience of Placebo Effects: Concepts, Predictions, and Physiology. *Annual review of neuroscience*, 40, 167–188. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-072116-031132>

Ghosal, S., Myers, B. in Herman, J. P. (2013). Role of central glucagon-like peptide-1 in stress regulation. *Physiology & behavior*, 122, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.04.003>

Glanz, M. D. in Johnson, J. L. (1999). *Resilience and Development: Positive Life Adaptations*. New York: Kluwer Academic. Plenum.

Gonzalez-Santana, A. in Diaz Heijtz, R. (2020). Bacterial Peptidoglycans from Microbiota in Neurodevelopment and Behavior. *Trends in molecular medicine*, 26(8), 729–743. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.05.003>

Gröschl, M. (2008). Current status of salivary hormone analysis. *Clinical Chemistry*, 54, 1759-1769.

Gupta, P., Andrew, H., Kirschner, B. S. in Guandalini, S. (2000). Is lactobacillus GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 31(4), 453–457. <https://doi.org/10.1097/00005176-200010000-00024>

Habib, K. E., Gold, P. W. in Chrousos, G. P. (2001). Neuroendocrinology of stress. *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America*, 30 (3), 695-728. doi: 10.1016/s0889-8529(05)70208-5

Hansen, Å. M., Garde, A. H., Christensen, J. M., Eller, N. H. In Netterstrøm, B. (2003). Evaluation of radioimmunoassay and establishment of a reference interval for salivary cortisol in healthy subjects in Denmark. *The Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 63, 303-310.

Hansen, Å. M., Garde, A. H. in Persson, R. (2008). Sources of biological and methodological variation in salivary cortisol and measurement among healthy adults: A review. *The Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 68 (6), 448-458.

Harbuz, M. S., Chover-Gonzalez, A. J. in Jessop, D. S. (2003). Hypothalamo-pituitary-adrenal axis and chronic immune activation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 992, 99–106. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb03141.x>

Hellhammer, D.H., Wüst, S. In Kudielka, B. M. (2009). Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology*, 34 (2), 163-171.

Henry, J. D. in Crawford, J. R. (2005). The short-form version of the Depression Anxiety Stress Scales (DASS-21): Construct validity and normative data in a large non-clinical sample. *British Journal of Clinical Psychology*, 44 (2), 227–239.

Herr, N., Bode, C. in Duerschmied, D. (2017). The Effects of Serotonin in Immune Cells. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 4, 48. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2017.00048>

Hijova, E. in Chmelarova, A. (2007). Short chain fatty acids and colonic health. *Bratislavské Lekárske Listy*, 108(8), 354–8.

Hollister, E. B., Gao, C. in Versalovic, J. (2014). Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology*, 146(6), 1449–1458. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.052>

Høverstad, T. in Midtvedt, T. (1986). Short-chain fatty acids in germfree mice and rats. *Journal of Nutrition*, 116(9), 1772-6.

Hughes, D. T. in Sperandio, V. (2008). Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. Nature reviews. *Microbiology*, 6(2), 111–120. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1836>

IDS Ltd. (2021, Februar). User Manual IDS iSYS. <https://www.idsplc.com/wp-content/uploads/2019/03/IDS-iSYS-User-Manual-V14-revision-M1>.

Iannitti, T. in Palmieri, B. (2010). Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clinical nutrition* (Edinburgh, Scotland), 29(6), 701–725. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2010.05.004>

Juster, R. P., McEwen, B. S. in Lupien, S. J. (2010). Allostatic load biomarkers of chronic stress and impact on health and cognition. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 35(1), 2–16. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.10.002>

Kamp, K. J., West, P., Holmstrom, A., Luo, Z., Wyatt, G. in Given, B. (2019). Systematic Review of Social Support on Psychological Symptoms and Self-Management Behaviors Among Adults with Inflammatory Bowel Disease. *Journal of nursing scholarship: an official publication of Sigma Theta Tau International Honor Society of Nursing*, 51(4), 380–389. <https://doi.org/10.1111/jnu.12487>

Karl, J. P., Hatch, A. M., Arcidiacono, S. M., Pearce, S. C., Pantoja-Feliciano, I. G., Doherty, L. A. in Soares, J. W. (2018). Effects of Psychological, Environmental and Physical Stressors on the Gut Microbiota. *Frontiers in microbiology*, 9, 2013. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02013>

Kato, L. M., Kawamoto, S., Maruya, M. in Fagarasan, S. (2014). The role of the adaptive immune system in regulation of gut microbiota. *Immunological reviews*, 260(1), 67–75. <https://doi.org/10.1111/imr.12185>

Kau, A. L., Ahern, P. P., Griffin, N. W., Goodman, A. L. in Gordon, J. I. (2011). Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*, 474, 327–36.

Kinlein, S. A. in Karatsoreos, I. N. (2020). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis as a substrate for stress resilience: Interactions with the circadian clock. *Frontiers in neuroendocrinology*, 56, 100819. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.100819>

Kim, C. H., Park, J. in Kim, M. (2014). Gut microbiota-derived short-chain Fatty acids, T cells, and inflammation. *Immune Network*, 14(6), 277–88.

Khalesi, S., Bellissimo, N., Vandelanotte, C., Williams, S.L., Stanley, D. In Irwin, C. (2018). A review of probiotic supplementation in healthy adults: helpful or hype? *European Journal of Clinical Nutrition*, 73, 24-37.

Klemenak, M. (2016). *Vpliv probiotika Bifidobacterium Breve BR03 na raven provnetnih in protivnetnih citokinov ter kratkoveržnih maščobnih kislin pri otrocih s celiakijo*. [Doktorska disertacija, Medicinska fakulteta Univerze v Mariboru]. DKUM. <https://dk.um.si/Dokument.php?id=107617>

Kothari, D., Patel, S. in Kim, S. K. (2019). Probiotic supplements might not be universally-effective and safe: A review. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 111, 537–547. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.104>

Kuhn, K. A., Pedraza, I. in Demoruelle, M. K. (2014). Mucosal immune responses to microbiota in the development of autoimmune disease. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, 40, 711–25.

Laudat, M. H., Cerdas, S., Fournier, C., Guiban, D., Guilhaume, B. In Luton, J.P. (1988). Salivary Cortisol Measurement: A practical Approach to Assess Pituitary-Adrenal Function. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 66 (2), 343-348.

Lebeer, S., Vanderleyden, J. in De Keersmaecker, S. C. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature reviews. Microbiology*, 8(3), 171–184. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2297>

Lerner, A., Shoenfeld, Y. in Matthias, T. (2019). Probiotics: If It Does Not Help It Does Not Do Any Harm. Really? *Microorganisms*, 7(4), 104. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7040104>

Leserman, J., Petitto, J. M., Golden, R. N., Gaynes, B. N., Gu, H., Perkins, D. O., Silva, S. G., Folds, J. D. in Evans, D. L. (2000). Impact of stressful life events, depression, social support, coping, and cortisol on progression to AIDS. *The American journal of psychiatry*, 157(8), 1221–1228. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.157.8.1221>

Leow, S., Jackson, B., Alderson, J. A., Guelfi, K. J. in Dimmock, J. A. (2018). A Role for Exercise in Attenuating Unhealthy Food Consumption in Response to Stress. *Nutrients*, 10(2), 176. <https://doi.org/10.3390/nu10020176>

Ley, R. E., Peterson, D. A. In Gordon, J. I. (2006). Ecological and evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. *Cell*, 124(4), 837-848. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.017>

Liu R. T. (2017). The microbiome as a novel paradigm in studying stress and mental health. *The American psychologist*, 72(7), 655–667. <https://doi.org/10.1037/amp0000058>

Ljubijankić, N., Popović-Javorić, R., Šćeta, S., Sapcanin, A., Tahirović, I. in Sofić, E. (2008). Daily fluctuation of cortisol in the saliva and serum of healthy persons. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 8(2), 110–115. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2008.2962>

Lyte M. (2013). Microbial endocrinology in the microbiome-gut-brain axis: how bacterial production and utilization of neurochemicals influence behavior. *PLoS pathogens*, 9(11), e1003726. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003726>

Macfarlane, G. T. in Macfarlane, S. (2011). Fermentation in the human large intestine: its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 45, S120–S127

Marcos, A., Wärnberg, J., Nova, E., Gómez, S., Alvarez, A., Alvarez, R., Mateos, J. A. in Cobo, J. M. (2004). The effect of milk fermented by yogurt cultures plus *Lactobacillus casei* DN-114001 on the immune response of subjects under academic examination stress. *European journal of nutrition*, 43(6), 381–389. <https://doi.org/10.1007/s00394-004-0517-8>

Marmot M. (2003). Social resources and health. In: Kessel F, Rosenfield PL, Anderson NB, editors. *Expanding the Boundaries of Health and Social Science*. New York: Oxford Univ. Press. pp. 259–285.

Martin, A. M., Sun, E. W., Rogers, G. B. in Keating, D. J. (2019). The Influence of the Gut Microbiome on Host Metabolism Through the Regulation of Gut Hormone Release. *Frontiers in physiology*, 10, 428. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00428>

Mayer E. A. (2000). The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut*, 47(6), 861–869. <https://doi.org/10.1136/gut.47.6.861>

Mayer, E. A., Tillisch, K. in Gupta, A. (2015). Gut/brain axis and the microbiota. *The Journal of clinical investigation*, 125(3), 926–938. <https://doi.org/10.1172/JCI76304>

McCorry L. K. (2007). Physiology of the autonomic nervous system. *American journal of pharmaceutical education*, 71(4), 78. <https://doi.org/10.5688/aj710478>

Mcdermott, A. J. in Huffnagle, G. B. (2014). The microbiome and regulation of mucosal immunity. *Immunology*, 142, 24–31.

Meyer, R. M., Burgos-Robles, A., Liu, E., Correia, S. S. in Goosens, K. A. (2014). A ghrelin-growth hormone axis drives stress-induced vulnerability to enhanced fear. *Molecular psychiatry*, 19(12), 1284–1294. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.135>

Nataraj, B. H., Ali, S. A., Behare, P. V. in Yadav, H. (2020). Postbiotics-parabiotics: the new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microbial cell factories*, 19(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01426-w>

Nissilä, E., Douillard, F. P., Ritari, J., Paulin, L., Järvinen, H. M., Rasinkangas, P., Haapasalo, K., Meri, S., Jarva, H. in de Vos, W. M. (2017). Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus rhamnosus* clinical isolates, their comparison with strain GG and

their recognition by complement system. *PloS one*, 12(5), e0176739. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176739>

Orth-Gomér, K., Wamala, S. P., Horsten, M., Schenck-Gustafsson, K., Schneiderman, N. in Mittleman, M. A. (2000). Marital stress worsens prognosis in women with coronary heart disease: The Stockholm Female Coronary Risk Study. *JAMA*, 284(23), 3008–3014. <https://doi.org/10.1001/jama.284.23.3008>

Padgett, D. A. In Glaser, R. (2003). How stress influences the immune response. *Trends in Immunology*, 24(8), 444-448. doi:10.1016/S1471-4906(03)00173-X

Pagel, R., Bär, F., Schröder, T., Sünderhauf, A., Künstner, A., Ibrahim, S. M., Autenrieth, S. E., Kalies, K., König, P., Tsang, A. H., Bettenworth, D., Divanovic, S., Lehnert, H., Fellermann, K., Oster, H., Derer, S. in Sina, C. (2017). Circadian rhythm disruption impairs tissue homeostasis and exacerbates chronic inflammation in the intestine. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 31(11), 4707–4719. <https://doi.org/10.1096/fj.201700141RR>

Pandey, K. R., Naik, S. R. in Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *Journal of food science and technology*, 52(12), 7577–7587. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1>

Papalini, S., Michels, F., Kohn, N., Wegman, J., van Hemert, S., Roelofs, K., Arias-Vasquez, A. in Aarts, E. (2018). Stress matters: Randomized controlled trial on the effect of probiotics on neurocognition. *Neurobiology of stress*, 10, 100141. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2018.100141>

Paykel, E. S. (2001). Stress and affective disorders in humans. *Seminars in clinical neuropsychiatry*, 6(1), 4–11. <https://doi.org/10.1053/scnp.2001.19411>

Perlmutter, D. (2017). *Zdravi možgani: moč črevesnih mikrobov za zdravje in zaščito vaših možganov – za vse življenje*. Umco.

Pessi, T., Sütas, Y., Hurme, M. in Isolauri, E. (2000). Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 30(12), 1804–1808. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2000.00948.x>

Poll, E., Kreitschmann-Andermahr, I., Langejuergen, Y., Stanzel, S., Gilsbach, J. M., Gresser, A. In Yagmuer E. (2007). Saliva collection method affects predictability of serum cortisol. *Clinica Chimica Acta*, 382(2007), 15-19.

Požgain, I., Požgain, Z. in Degmečić, D. (2014). Placebo and nocebo effect: a mini-review. *Psychiatria Danubina*, 26(2), 100–107.

Pruessner, J. C., Hellhammer, D. H. in Kirschbaum, C. (1999). Low self-esteem, induced failure and the adrenocortical stress response. *Personality and Individual Differences*, 27(3), 477–489. [https://doi.org/10.1016/S0191-8869\(98\)00256-6](https://doi.org/10.1016/S0191-8869(98)00256-6)

Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F. idr. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 490, 55–60.

Queipo-Ortuño, M. I., Boto-Ordóñez, M., Murri, M., Gomez-Zumaquero, J. M., Clemente-Postigo, M., Estruch, R., Cardona Diaz, F., Andrés-Lacueva, C. in Tinahones, F. J. (2012). Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *The American journal of clinical nutrition*, 95(6), 1323–1334. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.027847>

Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H. G., Tims, S., Zoetendal, E. G. in de Vos, W. M. (2012). Long-term monitoring of the human intestinal microbiota composition. *Environmental microbiology*, 10.1111/1462-2920.12023. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12023>

Rao, R. K. in Samak, G. (2013). Protection and Restitution of Gut Barrier by Probiotics: Nutritional and Clinical Implications. *Current nutrition and food science*, 9(2), 99–107. <https://doi.org/10.2174/1573401311309020004>

Rea, K., Dinan, T. G. in Cryan, J. F. (2016). The microbiome: A key regulator of stress and neuroinflammation. *Neurobiology of stress*, 4, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.03.001>

Rezayat, M., Roohbakhsh, A., Zarrindast, M. R., Massoudi, R. in Djahanguiri, B. (2005). Cholecystokinin and GABA interaction in the dorsal hippocampus of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. *Physiology & behavior*, 84(5), 775–782.

Rieder, R., Wisniewski, P. J., Alderman, B. L. in Campbell, S. C. (2017). Microbes and mental health: A review. *Brain, behavior, and immunity*, 66, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.01.016>

Sarkar, A., Lehto, S. M., Harty, S., Dinan, T. G., Cryan, J. F. in Burnet, P. (2016). Psychobiotics and the Manipulation of Bacteria-Gut-Brain Signals. *Trends in neurosciences*, 39(11), 763–781. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.09.002>

Sarstedt (2020). Pridobljeno na <https://www.sarstedt.com/en/home/>.

Schneiderman, N., Ironson, G. In Siegel, S. D. (2005). Stress and health: psychological, behavioral, and biological determinants. *Annual review of clinical psychology*, 1, 607–628. <https://doi.org/10.1146/annurev.clinpsy.1.102803.144141>

Segers, M. E. in Lebeer, S. (2014). Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG--host interactions. *Microbial cell factories*, 13 Suppl 1(Suppl 1), S7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S7>

Selvin, J., Maity, D., Sajayan, A. in Kiran, G. S. (2020). Revealing antibiotic resistance in therapeutic and dietary probiotic supplements. *Journal of global antimicrobial resistance*, 22, 202–205. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.02.007>

Sender, R., Fuchs, S. in Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS biology*, 14(8), e1002533. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>

Shaw, J. A. (2003). Children exposed to war/terrorism. *Clinical child and family psychology review*, 6(4), 237–246. <https://doi.org/10.1023/b:ccfp.0000006291.10180.bd>

Shi, N., Li, N. in Niu, H. (2017). Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Military Medical Research*, 4(14). doi:10.1186/s40779-017-0122-9

Silva, Y. P., Bernardi, A. in Frozza, R. L. (2020). The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Frontiers in endocrinology*, 11, 25. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025>

Slavich, G. M., O'Donovan, A., Epel, E. S. in Kemeny, M. E. (2010). Black sheep get the blues: a psychobiological model of social rejection and depression. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 35(1), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.01.003>

Smith, S. M. In Vale, W. W. (2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 8 (4), 383–395.

Smyth, J., Zawadzki, M. in Gerin W. (2013). Stress and disease: A structural and functional analysis. *Social & Personality Psychology Compass*; 7:217–227. doi:10.1111/spc3. 12020

Stephens, M. A. C. in Wand, G. (2012). Stress and the HPA Axis. Role of Glucocorticoids in Alcohol Dependence. *Alcohol Research*, 34 (4), 468-483.

Strandwitz P. (2018). Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain research*, 1693(Pt B), 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.015>

Suez, J., Zmora, N., Zilberman-Schapira, G., Mor, U., Dori-Bachash, M., Bashiardes, S., Zur, M., Regev-Lehavi, D., Ben-Zeev Brik, R., Federici, S., Horn, M., Cohen, Y., Moor, A. E., Zeevi, D., Korem, T., Kotler, E., Harmelin, A., Itzkovitz, S., Maharshak, N., Shibolet, O., ... Elinav, E. (2018). Post-Antibiotic Gut Mucosal Microbiome Reconstitution Is Impaired by Probiotics and Improved by Autologous FMT. *Cell*, 174(6), 1406–1423.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.047>

Sun, L. J., Li, J. N. in Nie, Y. Z. (2020). Gut hormones in microbiota-gut-brain cross-talk. *Chinese medical journal*, 133(7), 826–833. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000706>

Takada, M., Nishida, K., Kataoka-Kato, A., Gondo, Y., Ishikawa, H., Suda, K., Kawai, M., Hoshi, R., Watanabe, O., Igarashi, T., Kuwano, Y., Miyazaki, K. in Rokutan, K. (2016). Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota relieves stress-associated symptoms by modulating the gut-brain interaction in human and animal models. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 28(7), 1027–1036. <https://doi.org/10.1111/nmo.12804>

Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A. N., Mackay, C. R. in Macia, L. (2014). The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Advances in Immunology*, 121, 91-119. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9>

Termania, Slovenski medicinski slovar – Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta. (2020). Pridobljeno s: <https://www.termania.net/slovarji/slovenski-medicinski-slovar/5542091/transkortin>

Topping, D. L. in Clifton, P. M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiology Review*, 81(3), 1031–1064. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1031>

Torpy, D. J. in Ho, J. T. (2007). Corticosteroid-binding globulin gene polymorphisms: clinical implications and links to idiopathic chronic fatigue disorders. *Clinical Endocrinology*. 67(2), 161–167. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2007.02890.x>

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R. in Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444, 1027–131. <https://doi.org/10.1038/nature05414>

Ulrich-Lai, Y. M. In Herman, J. P. (2009). Neural Regulation of Endocrine and Autonomic Stress Responses. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(6), 397-409. <https://doi.org/10.1038/nrn2647>

van Wijck, K., Lenaerts, K., Grootjans, J., Wijnands, K. A., Poeze, M., van Loon, L. J., Dejong, C. H. in Buurman, W. A. (2012). Physiology and pathophysiology of splanchnic hypoperfusion and intestinal injury during exercise: strategies for evaluation and prevention. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 303(2), G155–G168. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00066.2012>

Verma, D., Wood, J., Lach, G., Herzog, H., Sperk, G. in Tasan, R. (2016). Hunger Promotes Fear Extinction by Activation of an Amygdala Microcircuit. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 41(2), 431–439. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.163>

Vinolo, M. A. R., Rodrigues, H. G., Nachbar, R. T. in Curi, R. (2011). Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients*, 3(10), 858–76. doi: 10.3390/nu3100858

Vitaglione, P., Mennella, I., Ferracane, R., Rivellese, A. A., Giacco, R., Ercolini, D., Gibbons, S. M., La Storia, A., Gilbert, J. A., Jonnalagadda, S., Thielecke, F., Gallo, M. A., Scalfi, L. in Fogliano, V. (2015). Whole-grain wheat consumption reduces inflammation in a randomized controlled trial on overweight and obese subjects with unhealthy dietary and lifestyle behaviors: role of polyphenols bound to cereal dietary fiber. *The American journal of clinical nutrition*, 101(2), 251–261. <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.088120>

Vogeser, M., Durner, J., Seliger, E. in Auerhammer, C. (2006). Measurement of late-night salivary cortisol with automated immunoassay system. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44 (12), 1441-1445.

Wager, T. D. in Atlas, L. Y. (2015). The neuroscience of placebo effects: connecting context, learning and health. Nature reviews. *Neuroscience*, 16(7), 403–418. <https://doi.org/10.1038/nrn3976>

Wang, Y., Jiang, Y., Deng, Y., Yi, C., Wang, Y., Ding, M., Liu, J., Jin, X., Shen, L., He, Y., Wu, X., Chen, X., Sun, C., Zheng, M., Zhang, R., Ye, H., An, H. in Wong, A.

- (2020). Probiotic Supplements: Hope or Hype? *Frontiers in microbiology*, 11, 160. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00160>
- Yang, H., Zhao, X., Tang, S., Huang, H., Zhao, X., Ning, Z., Fu, X. in Zhang, C. (2016). Probiotics reduce psychological stress in patients before laryngeal cancer surgery. *Asia-Pacific journal of clinical oncology*, 12(1), e92–e96. <https://doi.org/10.1111/ajco.12120>
- Yang, T., Santisteban, M. M, Rodriguez, V., Li, E., Ahmari, N., Carvajal, J. M., Zadeh, M., Gong, M., Qi, Y., Zubcevic, J., Sahay, B., Pepine, C. J., Raizada, M. K., in Mohamadzadeh, M. (2015). Gut dysbiosis is linked to hypertension novelty and significance. *Hypertension*, 65(6), 1331–1340. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05315>
- Ye, H., Liu, J., Feng, P., Zhu, W. in Mao, S. (2016). Grain-rich diets altered the colonic fermentation and mucosa-associated bacterial communities and induced mucosal injuries in goats. *Scientific Reports*, 6(20329). <https://doi.org/10.1038/srep20329>
- Yoo, B. B. in Mazmanian, S. K. (2017). The Enteric Network: Interactions between the Immune and Nervous Systems of the Gut. *Immunity*, 46(6), 910–926. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.05.011>
- Zänkert, S., Bellingrath, S., Wüst, S. in Kudielka, B. M. (2019). HPA axis responses to psychological challenge linking stress and disease: What do we know on sources of intra- and interindividual variability? *Psychoneuroendocrinology*, 105, 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.10.027>
- Zhang, N., Zhang, Y., Li, M., Wang, W., Liu, Z., Xi, C., Huang, X., Liu, J., Huang, J., Tian, D., Mu, J., Liao, X. in Zhai, S. (2020). Efficacy of probiotics on stress in healthy volunteers: A systematic review and meta-analysis based on randomized controlled trials. *Brain and behavior*, 10(9), e01699. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/brb3.1699>
- Zheng, P., Zeng, B., Liu, M., Chen, J., Pan, J., Han, Y., Liu, Y., Cheng, K., Zhou, C., Wang, H., Zhou, X., Gui, S., Perry, S. W., Wong, M. L., Licinio, J., Wei, H. in Xie, P. (2019). The gut microbiome from patients with schizophrenia modulates the glutamate-glutamine-GABA cycle and schizophrenia-relevant behaviors in mice. *Science advances*, 5(2), eaau8317. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau8317>
- Zmora, N., Zilberman-Schapira, G., Suez, J., Mor, U., Dori-Bachash, M., Bashirdes, S., Kotler, E., Zur, M., Regev-Lehavi, D., Brik, R. B., Federici, S., Cohen, Y., Linevsky, R., Rothschild, D., Moor, A. E., Ben-Moshe, S., Harmelin, A., Itzkovitz, S., Maharshak, N., Shibolet, O., ... Elinav, E. (2018). Personalized Gut Mucosal Colonization Resistance to

Empiric Probiotics Is Associated with Unique Host and Microbiome Features. *Cell*, 174(6), 1388–1405.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.041>

Żółkiewicz, J., Marzec, A., Ruszczyński, M. in Feleszko, W. (2020). Postbiotics-A Step Beyond Pre- and Probiotics. *Nutrients*, 12(8), 2189. <https://doi.org/10.3390/nu12082189>

IZJAVA O AVTORSTVU MAGISTRSKEGA DELA

Spodaj podpisana Doroteja Kuhar, z vpisno številko 89162013 vpisana v študijski program Biopsihologija, 2. stopnja, sem avtorica magistrskega dela z naslovom:

Preverjanje vpliva dodajanja probiotika (*Lactobacillus rhamnosus* GG) na nivo stresa.

S svojim podpisom zagotavljam, da je predloženo magistrsko delo izključno rezultat mojega lastnega dela. Prav tako se zavedam, da je predstavljanje tujih del kot mojih lastnih kaznivo po zakonu.

Soglašam z objavo elektronske verzije magistrskega dela v zbirki »Dela FAMNIT« ter zagotavljam, da je elektronska oblika magistrskega dela identična tiskani.

Doroteja Kuhar



PRILOGE

PRILOGA A *Mnenje Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko*

Spoštovani,

v nadaljevanju vam posredujem odgovor članice KME, mag. Irgolič:

V zvezi z vašim dopisom v katerem nas prosite za mnenje oziroma potrditev raziskave, ki jo nameravate izvajati v okviru magistrske naloge, katere namen je raziskati vpliv dodajanja probiotikov na splošno počutje in na nivo stresa pri zdravih posameznikih, vam sporočamo, da raziskava ne sodi v pristojnost Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko.

Obrazložitev:

- Pristojnosti Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko (KME) so določene z Zakonom o spremembah in dopolnitvah zakona o zdravstveni dejavnosti (Ur. l. RS, št. 64/17), ki v 24. členu določa, da KME daje mnenja v postopkih kliničnih preskušanj zdravil v skladu s predpisi, ki urejajo zdravila. V vašem dopisu navajate raziskavo, ki jo boste izvajali s prehranskim dopolnilom in CBD kapljicami, ki tudi ne sodijo med zdravila. Raziskave na ljudeh so skladno z Zakonom o zdravilih, Ur. l. RS, št. 17/14 klinična preskušanja, za katera daje KME soglasja oz. mnenja o etični sprejemljivosti. Dovoljenja za izvajanja vseh kliničnih raziskav v Republiki Sloveniji pa izdaja na podlagi mnenja KME in vseh ostalih z zakonom določenih dokumentov izključno JAZMP;

- Klinična preskušanja, ki morajo potekati v vsaki državi članici EU v skladu z veljavnimi predpisi določajo, da se klinično preskušajo na ljudeh le izdelki, ki izpolnjujejo zahteve za zdravila, za katera se morajo predložiti rezultati analiznih preskušanj in nekliničnih farmakološko-toksikoloških preskušanj (Zakon o zdravilih, Ur. l. RS, št. 7/14, čl. 34, točka 1), kar pomeni, da prehranska dopolnila v nobenem pogledu ne izpolnjujejo pogojev, ki so osnova za presojo varnosti in neškodljivosti za sodelujoče v kliničnih preskušanjih;

- Pri proizvodnji zdravil v preskušanju se uporablja dobra proizvodna praksa (GMP), ki zagotavlja kakovost takih zdravil zaradi zagotavljanja varnosti udeležencev ter zanesljivosti in ponovljivosti kliničnih podatkov iz kliničnega preskušanja. Te določbe so zapisane v Zakonu o zdravilih v poglavju VII in v Uredbi (EU) št. 536/2014 Evropskega parlamenta in Sveta, ki obravnava izključno samo zdravila v kliničnih preskušanjih in določa zahteve za njihovo proizvodnjo v skladu z določbami dobre proizvodne prakse v poglavju IX;

- Za prehranska dopolnila niso predpisani farmacevtski standardi kakovosti, ker niso namenjena zdravljenju in preprečevanju bolezni. Enako velja tudi za klinične standarde učinkovitosti. Zato se prehranskim dopolnilom tudi ne sme pri predstavljanju pripisovati lastnosti zdravljenja ali ozdravljenja bolezni pri ljudeh;

- V skladu z Uredbo (ES) 1924/2006 Evropskega parlamenta in Sveta o prehranskih in zdravstvenih trditvah na živilih, so dovoljene le odobrene prehranske in zdravstvene trditve, če so zanje izpolnjeni pogoji o zadostni vsebnosti določene snovi v živilu in če so utemeljene s splošno sprejetimi znanstvenimi podatki. Prehranskim dopolnilom, ki so v prometu, se ne sme pripisovati zdravilnih učinkov. Zdravstvene trditve je potrebno v skladu s členom 6 in členom 13 Uredbe (ES) 1924/2006 utemeljiti s splošno sprejetimi znanstvenimi dokazi;

- Pri živilih ni predhodnega preverjanja pri neodvisnih državnih organih, ampak je za izdelke odgovoren proizvajalec in vsak člen v verigi do prodajalca končnemu potrošniku;

- Prehranska dopolnila praviloma tudi nimajo opozoril in previdnostnih ukrepov za bolnike, ker se pričakuje, da so namenjena zdravim ljudem za dopolnjevanje prehrane in ne za zdravljenje in tudi nimajo navedenih neželenih učinkov. Bistvene razlike med prehranskimi dopolnili in zdravili so predvsem glede namena uporabe ter dokazane učinkovitosti za zdravljenje bolezni in bolezenskih stanj.

Z ozirom na vaš dopis in na postavljeno vprašanje vam sporočamo, da veljavni predpisi, ki urejajo klinične raziskave v EU in v Republiki Sloveniji, ne določajo pogojev za prehranska dopolnila. Ti predpisi tudi ne določajo posebej kliničnih preskušanj za prehranska dopolnila. Uredbi, ki veljata za celotno področje EU, določata le zdravstvene trditve, ki pa jih ocenjuje Evropska agencija za varnost hrane.

S spoštovanjem!

Pripravila: Nada Irgolič, mag. farm., spec.

Lep pozdrav!
Maja Žejn
Svetovalec



REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA ZDRAVJE

Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko

Štefanova ulica 5, 1000 Ljubljana, Slovenija

T: +386 1 478 69 13

gp.mz@gov.si, kme.mz@gov.si

www.mz.gov.si

PRILOGA B *Soglasje za sodelovanje pri raziskavi*

Pristopna izjava k sodelovanju pri raziskavi v namene zbiranja podatkov za magistrsko nalogo, in privolitev za obdelavo osebnih podatkov

Opis sodelovanja

Vabljeni ste k sodelovanju v raziskavi, ki v okviru magistrskega študija Biopsihologija poteka na Oddelku za psihologijo, Fakultete za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije, Univerze na Primorskem pod mentorstvom dr. Gaja Vidmarja in somentorstvom dr. Tine Tinkare Peternelj, izvedbo le-te pa izvaja Doroteja Kuhar dipl.biopsih (UN).

Namen raziskave je preučiti, kako štiri tedensko jemanje probiotika/placeba vpliva na stopnjo stresa in na razpoloženje pri zdravih posameznikih.

V kolikor se odločite za sodelovanje, bodo vaše naloge: rešiti dva vprašalnika, ki merita stopnjo depresije, anksioznosti in stresa, ter vprašalnik o splošnem počutju; odvzem vzorcev sline za merjenje stopnje stresnega hormona kortizola in jemanje probiotika/placeba štiri zaporedne tedne. Vprašalniki in vzorci sline za merjenje kortizola se jemljejo en teden pred in en teden po jemanju probiotikov/placeba, vmes pa štiri tedne enkrat dnevno jemljete probiotike/placebo.

Za sodelovanje v raziskavi boste v prvem in šestem tednu vse skupaj potrebovali približno dve uri časa (reševanje vprašalnikov, jemanje vzorcev sline in prevzem probiotika/placeba in vialic za vzorce sline), v vmesnih štirih tednih pa samostojno jemljete dodeljene kapsule ob dogovorjeni uri in spremljate posebne dogodke. Sodelovanje v raziskavi je prostovoljno in za udeležbo ne boste prejeli nobenega nadomestila.

Sodelovanje v raziskavi ne prinaša nobenih tveganj, vse metode, ki bodo uporabljene so neinvazivne. Zaradi dolžine raziskave in samostojnega dela udeležencev, vam bomo za morebitna vprašanja, ki se navezujejo na raziskavo na voljo preko elektronske pošte: gutbrain@gmail.com.

Sodelovanje v preizkušnji ne prinaša posebnih koristi razen znanja in izkušenj, ki si jih boste pridobili v okviru sodelovanja. Zbrani rezultati bodo omogočili nadaljnje raziskovanje o povezavi med črevesjem, možgani in stresom.

Varovanje podatkov

Sodelovanje v raziskavi je v celoti prostovoljno in ga lahko kadarkoli prekinete brez posledic.

Vaše podatke bomo hranili v skladu z uredbo o GDPR. Prav tako lahko kadarkoli uveljavljate pravico do pozabe (izbris vseh osebnih podatkov), če so izpolnjene predpostavke iz 17.člena o varstvu podatkov. Rezultati raziskave in demografski podatki bodo anonimizirani, vaša identiteta v nobenem primeru ne bo razkrita. Javno objavljeni bodo samo skupinski rezultati.

V primeru morebitnih dodatnih vprašanj se lahko obrnete na somentorico dr. Tino Tinkaro Peternelj (e-mail: tina.peternelj@famnit.upr.si) ali na Dorotejo Kuhar (e-mail: doroteja.selan@gmail.com; tel: 040 979 563).

Izjava

Spodaj podpisani (-a) _____,

svobodno, zavedno in prostovoljno pristopam k raziskavi, katere namen je preučevati vpliv jemanja probiotika na stopnjo stresa ter na razpoloženje zdravih posameznikov.

Seznanjen(-a) sem z dejstvom, da sodelovanje lahko kadarkoli prekinem brez kakršnih koli posledic. Seznanjen(-a) sem s postopkom raziskave in vsemi metodami, ki jim bom izpostavljen/a.

S podpisom jamčim, da sem izvajalce raziskave seznanil(-a) z vsemi svojimi zdravstvenimi in drugimi težavami (npr. bolezni, zdravstvena stanja, alergije in intolerance ipd.), ki bi lahko povzročile kakršnekoli negativne posledice med ali po raziskavi.

S podpisom jamčim, da sem to izjavo prebral(-a) dosledno in v celoti in da sem dobil(-a) priložnost za postavitev dodatnih vprašanj v zvezi z mojim sodelovanjem na raziskavi. Izjavljam, da se za sodelovanje odločam povsem svobodno.

Datum:

Podpis udeleženca:

Datum:

Podpis raziskovalca:

Pozdravljeni!

Sem Doroteja Kuhar, študentka zadnjega letnika magistrskega programa biopsihologija na UP FAMNIT. Med študijem me je radovednost ponesla v raziskovanje človeškega črevesja in njegovo povezavo s praktično vsemi ostalimi nivoji človeškega delovanja.

Kljub temu, da je to zadnje čase aktualna tema, še ne vemo dovolj, da bi z gotovostjo lahko trdili, kaj vse ta kompleksni sistem zmore, zato sem se odločila, da svojo magistrsko nalogo posvetim naslednji temi:

Vpliv dodajanja probiotika (*Lactobacillus rhamnosus* GG) na raven stresa.

1. UVOD – pomen mikrobiote za naše zdravje

Človeški mikrobiom

Človeško mikrobioto sestavlja veliko število različnih mikroorganizmov (bakterije, arheje, kvasovke, enocelični evkarionti, paraziti in virusi), ki so prisotni tako na koži kot v notranjih organih, predvsem pa v gastrointestinalnem traktu, kjer daleč najvišje koncentracije najdemo v črevesju. Mikrobiota naj bi predstavljala tudi do 90% vseh celic v in na našem telesu (Rea, Dinan in Cryan, 2016).

Mikrobiota odraslega človeka je odvisna od različnih dejavnikov: kako smo bili rojeni, smo uživali materino mleko ali adaptirano mleko, kakšen imamo način prehranjevanja, jemljemo kakšna zdravila, smo izpostavljeni kakšni infekciji ali stresu, živimo v izrazito sterilnem okolju oz. pretiravamo z osebno higieno, ipd. (Rea, Dinan in Cryan, 2016). Od otroštva naprej se mikrobiota stabilizira in postane bolj raznolika ter lahko botruje različnim dejavnikom iz okolja, kot so patogeni, zdravila in razni onesnaževalci (Rajilic-Stojanovic idr., 2012).

Naše črevesje ima vgrajen lasten imunski sistem, ki mu rečemo limfno tkivo črevesja, ki predstavlja kar 80%-90% našega celotnega imunskega sistema. To nakazuje na pomembnost in hkrati tudi na ranljivost našega črevesja. Antibiotiki, zdravila, določena živila in stres imajo ključno vlogo pri pestrosti mikrobiote, zato je toliko bolj pomembno, da skrbimo za zdrav in aktiven način življenja. Z raznovrstno in polnovredno prehrano, ki vsebuje veliko vlaknin in pa fermentirana živila, ter kvalitetnimi probiotičnimi pripravki pomagamo zagotavljati optimalno ravnovesje bakterij v črevesju (Perlmutter, 2017).

Mikrobiota – črevesje – možgani

Črevesni mikroorganizmi so del kompleksnega omrežja, imenovanega 'os mikrobiota-črevesje-možgani' (*'microbiota-gut-brain axis'*), ki povezuje enterični živčni sistem in mikrobioto, simpatično in parasimpatično divizijo avtonomnega živčnega sistema ter nevroendokrine in nevroimune komponente centralnega živčnega sistema (Rea, Dinan in Cryan, 2016). Razvoj mikrobiote in naselitev pomembnih bakterij v črevesju se odvija vzporedno z rastjo, maturacijo in brstenjem nevronov v mladih možganih. S starostjo upada raznovrstnost bakterij v črevesju, prav tako pa se zmanjšuje kompleksnost nevronske povezave (Biagi, 2012 in Borre, 2014).

Črevesni mikroorganizmi igrajo številne pomembne vloge v našem telesu; vpleteni so v prebavo in presnovo hrane, signaliziranje občutka lakote in sitosti, pomagajo pri detoksifikaciji, so nezamenljiv del imunskega sistema ter sodelujejo v sintezi vitaminov (Perlmutter, 2017). Črevesne bakterije vplivajo na delovanje enteroendokrinih celic v

prebavnem traktu, ki sproščajo nevrnske prenašalce in hormone, ki preko živcev komunicirajo z možgani. V črevesju se skriva enterični živčni sistem, ki mu nekateri rečejo kar drugi možgani. Večina hormona serotonina, bolj znanega kot hormon sreče, tako nastane v črevesju in ne v možganih. Vedno bolj postaja jasno, da imajo bakterije v našem črevesju vpliv ne samo na prebavljanje zaužite hrane, temveč tudi na razpoloženje in vedenje (Perlumtter, 2017).

Mikrobiota in stres

Kljub hitremu razvoju znanosti, se razumevanje povezave med črevesjem, tamkajšnjimi mikroorganizmi in centralnim živčevjem počasi nadgrajuje. Os mikrobiota-črevesje-možgani je dinamična in vključuje različna tkiva in organe, med drugimi možgane, žleze, črevesje, imunske celice in gastrointestinalno mikrobioto (Rea, Dinan in Cryan, 2016). Vzpostavljena je kompleksna multimodalna komunikacija, ki zagotavlja homeostazo organizma. Kadar se v telesu le-ta poruši, to vodi do različnih fizioloških in vedenjskih sprememb. Aktivira se t.i. hipotalamično-hipofizna-adrenalna os ('*hypothalamic-pituitary-adrenal axis*', HPA), ki sproži spremembe v imunskem in nevrottransmitterskem sistemu. Okvarjeno delovanje HPA osi lahko privede do nastanka različnih bolezni centralnega živčnega sistema, nevrodegeneracije, diabetesa, hipertenzije, osteoporoze, motenj razpoloženja in razvoja anksioznosti in depresije. Še več, poviša se nivo tveganja za razvoj sindroma razdražljivega črevesja in tveganje za razvoj avtoimunih oz. vnetnih bolezni (Rea, Dinan in Cryan, 2016).

Vse več je dokazov, da zdrava črevesna mikrobiota podpira adaptacijo celic oz. celotnega organizma na spremembe okolja ter predstavlja enega ključnih regulatorjev imunskega odziva in stresa (Rea, Dinan in Cryan, 2016). Vsi organizmi so tekom življenja izpostavljeni številnim mikro in makro dejavnikom, ki ogrožajo njihovo homeostazo, kar se lahko izrazi kot stresni odziv, bodisi na fizični, psihološki ali imunološki ravni. Pokazano je bilo, da različne oblike psihološkega stresa (npr. ločitev od matere, zvočni stres, utesnjenost v množici, poraz) spreminjajo sestavo črevesne mikrobiote (Bailey, 2014; Bhwarni idr., 2015; De Palma, idr., 2015), prav tako opažajo zmanjšano raznovrstnost in neravnotežje bakterij v črevesju ljudi s sindromom razdražljivega črevesja (Jeffery idr., 2012; Shankar idr., 2015). Znano je, da je kronični stres bolj škodljiv od akutnega stresa (Perlmutter, 2017). Dolgoročni psihološki stres in tesnoba povečata prepustnost črevesja in zamajata ravnovesje med črevesnimi bakterijami, kar vodi k še večji prepustnosti črevesja, nadaljnjim vnetjem in sklone se začaran krog stresnega okolja.

Probiotiki, prebiotiki in sinbiotiki

Beseda probiotik izhaja iz latinske besede *pro* in *bios*, kar pomeni "za življenje". Gre za žive mikroorganizme, ki imajo ugodne učinke na zdravje gostitelja, če jih uživa v ustreznih količinah. Najdemo jih v različnih fermentiranih živilih kot so jogurt, kefir, kombuča, kislo zelje, ter v različnih prehranskih dopolnilih. Da so probiotični organizmi učinkoviti, je željeno, da je dnevni vnos vsaj 100 milijonov živih organizmov. Probiotični mikroorganizmi se delijo v več sevov, med najbolj poznanimi sevi pa so predstavniki laktobacilov (*Lactobacillus*) in bifidobakterij (*Bifidobacterium*), ki so tudi del normalne črevesne mikrobiote (Pandery, Naik in Vakil, 2015).

Da probiotiki bolje delujejo, si lahko pomagamo s prebiotiki. Prebiotiki so vlaknine, ki spodbujajo rast in aktivnost probiotikov. V bistvu gre za neprebavljene dele hrane, ki spodbujajo rast in/ali aktivnost določenih mikroorganizmov v črevesju. Ustrezati morajo določenim kriterijem, kot so stabilnost med obdelavo živila, neprebavljivost oziroma delna prebavljivost, dostopnost za fermentacijo in selektivna stimulacija probiotičnih sevov ter seveda pozitiven vpliv na zdravje posameznika. Prebiotike v telo vnašamo s hrano ali preko prehranskih dodatkov. Večinoma so to ogljikovi hidrati, kot je inulin (regrat, cikorija, čebula ipd.), fruktooligosaharidi (banane, čebula, por ipd.), galaktosaharidi (materino

mleko), in druge prehranske vlaknine (celuloza, pektin, beta-glukani, sojini oligosaharidi), ki jih najdemo v sadju, zelenjavi, stročnicah, otrobih ipd. (Pandery, Naik in Vakil, 2015). Sinbiotiki pa vsebujejo tako probiotike kot prebiotike in imajo sinergistično delovanje. Prebiotiki so vir hrane probiotičnim črevesnim bakterijam in s tem jim omogočajo lažje preživetje, poleg tega, pa imajo probiotiki ob prisotnosti prebiotikov večjo odpornost proti različnim dejavnikom iz okolja. Najpogosteje kombinirajo probiotična seva laktobacilov in bifidobakterij, za prebiotike pa dodajo inulin in fruktooligosaharide (doma si to lahko pripravite kot ovsene kosmiče s kefirjem) (Pandery, Naik in Vakil, 2015).

2. SODELOVANJE V RAZISKAVI

Najprej najlepša hvala za izkazano zaupanje in pripravljenost za sodelovanje pri raziskavi in posledično k izdelavi moje magistrske naloge. V nadaljevanju nekaj informacij o tem, kako bo izgledala raziskava, h kateri vas vabim.

Potek raziskave

Raziskava bo potekala dobre 4 tedne, med oktobrom in novembrom 2019. Zaželeno je udeležba 70 zdravih posameznikov in posameznic.

Udeleženci bodo naključno razvrščeni v dve skupini, ki bosta 26 dni jemali probiotike ali placebo kapsule. Raziskava bo dvojno slepa, kjer udeleženci in izvajalci meritve/raziskave ne bodo vedeli, kateri skupini so bili dodeljeni probiotiki oz. placebo, da se izognemo kakršnikoli pristranskosti. Pred in po jemanju probiotika ali placeba se bodo izvedle meritve stresnega hormona kortizola v slini, vsak udeleženec pa bo tudi izpolnil vprašalnik DASS-21, ki meri prisotnost stresa, anksioznosti in depresije.

V prvem tednu raziskave se odvzame vzorce slin (opisano v nadaljevanju) in izpolni vprašalnik DASS-21 in vprašalnik o vašem življenjskem stilu. V tem tednu tudi prejmete kapsule s probiotiki (opis produkta spodaj) ali s placebo. Vzorce slin boste v za to namenjenih vialah shranili v hladilniku, vse skupaj bomo prevzeli ob koncu tedna 1. Sledilo bo 26 dnevno jemanje probiotičnih/placebo kapsul enkrat dnevno (probiotike/placebo jemljite vsak dan ob približno istem času). V teh štirih tednih bodite pozorni tudi na posebne dogodke ali občutke, ki so se vam pripetili (npr. bolezen, spremembe v razpoloženju, selitev, potovanje, nova služba, konflikt, zahtevna opravila ipd.) in v tabelo, ki bo priložena, zapišite opažanja (kaj in kdaj se vam je kaj zgodilo ipd.) V zadnjem tednu raziskave sledi ponoven odvzem vzorcev slin in izpolnjevanje vprašalnika DASS-21.

Zaželeno je, da v času, ko sodelujete v raziskavi, ne spreminjate drugih življenjskih ali prehranjevalnih navad, vse izvajajte kot ponavadi.

Raziskava bo potekala v okviru UP FAMNIT, zato bo del aktivnosti potekal v njihovih prostorih, vendar vam osebno ne bo potrebno prihajati v Koper. Za reševanje vprašalnikov in prevzem kapsul in vzorcev slin se bomo dogovorili naknadno (izvedli bomo par skupin v različnih terminih).

Merjenje hormona kortizola v vzorcu slin

Stopnjo stresnega hormona kortizola se najlažje in najbolj enostavno izmeri v slini. Vzorec slin boste odvzeli v tednu pred in v tednu po jemanju probiotika ali placeba. Vzorec slin se jemlje 3 zaporedne dni (od nedelje do torka), dvakrat dnevno, npr. ob 16. in ob 19. uri oziroma v popoldanskem času, z razmikom nekaj ur, saj je takrat nivo kortizola najbolj stabilen.

Vsak posameznik prejme 12 vialic (6 za teden pred jemanjem probiotika in 6 po zaključku jemanja probiotikov). Viale z vzorcem sline hranite v zamrzovalniku. Prvih 6 vzorcev prevzamemo po prvem tednu, ostalih 6 pa po 26 dnevih.

Odvzem sline je hiter, enostaven in neinvaziven. Točna navodila o odvzemu vzorca sline, vam bodo posredovana.

Vprašalnik DASS-21

DASS-21 je sestavljen iz 21 postavk in meri simptome depresije, anksioznosti in stresa. Vsaka izmed lestvic je sestavljena iz sedmih simptomov in vaša naloga je, da označite resnost simptomov na štiristopenjski lestvici (ocenjujete simptome v zadnjem tednu).

Izberete enega izmed naslednjih odgovorov: 0 - nikakor/nikoli ne velja zame, 1 - velja zame do določene mere ali nekaj časa, 2 - velja zame v veliki meri ali dober del časa in 3 - zelo velja zame ali večino časa.

Tekom raziskave vprašalnik rešujete dvakrat, prvič v tednu pred začetkom jemanja probiotikov/placeba in drugič, ko zaključite z uživanjem probiotikov/placeba.

Vprašalnik vam predamo istočasno, ko prevzamete kapsule in vialice za odvzem vzorca sline. Vprašalnik rešite samostojno doma, v prostoru, kjer vas ne bo nihče motil. Rešite ga kadarkoli v tednu, ko začnete z odvzemanjem vzorcev sline. Prosimo, da ga rešujete kar se da iskreno.

Vprašalnik prejmete preko elektronske pošte.

3. OPIS PROBIOTIKA- kapsule z mlečnokislinskimi bakterijami

Kapsule za odrasle in otroke edine vsebujejo mikroenkapsulirano mlečnokislinsko bakterijo *Lactobacillus rhamnosus* GG, ki spada med najbolj raziskane mlečnokislinske bakterije na svetu in je naravno prisotna tudi v naših prebavilih.

Kapsule:

- Edine kapsule z najvišjo koncentracijo mikroenkapsulirane mlečnokislinske bakterije *Lactobacillus rhamnosus* GG
- 1 kapsula vsebuje vsaj 1×10^{10} celic mikroenkapsulirane mlečnokislinske bakterije *Lactobacillus rhamnosus* GG
- kapsule so gastrorezistentne, ovoj kapsul je v celoti rastlinski
- so primerne za odrasle in otroke, starejše od 2 let
- za otroke se lahko kapsula odpre in vsebina poje na žlički
- ne vsebujejo alergenov (mlečnih beljakovin, laktoze, glutena, jajc, rib, arašidov, sezama, SO₂, soje, oreškov, zelene, gorčice, rakov)

Uporaba: kapsule pogoltnite z veliko hladne tekočine (1 na dan), kapsule so primerne tudi za nosečnice in doječe matere.

Vsebnost: Ena kapsula vsebuje najmanj 1×10^{10} celic mikroenkapsulirane mlečnokislinske bakterije *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103).

Sestavine: Hidroksipropilmetil celuloza (E464), *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), maltodekstini, barvilo: titanov dioksid (E171).

Opozorila: Shranjujte v suhem in temnem prostoru pri sobni temperaturi. Shranjevati nedosegljivo otrokom! Prehransko dopnilo ni nadomestilo za uravnoteženo in raznovrstno prehrano. Pomembna sta raznolika in uravnotežena prehrana ter zdrav način življenja. Priporočene dnevne količine oziroma odmerka se ne sme prekoračiti. Če ste alergični ali preobčutljivi na sestavine kapsul, izdelka ne uporabljajte. Izdelek ne vsebuje alergenov, laktoze, glutena in mlečnih beljakovin.

4. POGOJI ZA SODELOVANJE V RAZISKAVI

- starost 18+,
- zdravi udeleženci,
- ne jemljete antibiotikov ali drugih zdravil,
- pripravljeni jemati probiotik/placebo vsak dan 26 dni,
- pripravljeni oddati vzorce slin in rešiti vprašalnik DASS-21 in vprašalnik o življenjskih in prehranjevalnih navadah,
- beležiti pomembne dogodke tekom 4 tednov.

Naloge

- odvzem vzorcev slin (teden 1: od nedelje do torka, 2x dnevno),
- reševanje vprašalnika (teden 1),
- jemanje probiotika 1x dnevno (26 dni),
- odvzem vzorcev slin (po 26 dnevih: od nedelje do torka 2x dnevno),
- reševanje vprašalnika
- zapisovanje posebnih dogodkov,
- prehrana in količina gibanja naj bosta taka kot ponavadi (ne vnašajte drugih sprememb v življenje),
- shranjevanje vzorcev slin v zamrzovalniku,
- shranjevanje probiotikov na temperaturi nižji od 25°C.

Izločitveni kriteriji

- diagnosticirane nevrološke, psihiatrične, gastrointestinalne ali endokrine motnje,
- če ste sedaj ali v obdobju zadnjih 3 mesecev uživali zdravila,
- če začnete jemati antibiotike ali druga zdravila tekom poteka raziskave,
- intolerance na sestavine, ki se nahajajo v probiotiku,
- nosečke in doječke (zaradi nihanja hormonov),
- ne upoštevanje protokola jemanja vzorcev slin ali probiotika/placeba.

* V primeru, da vaša prehrana vsebuje veliko probiotične/prebiotične hrane ali pa dnevno zaužijete druga probiotična/prebiotična prehranska dopnila, nas na to opozorite oziroma označite v vprašalniku, ki ga boste prejeli.

5. VAROVANJE PODATKOV

Vsi pridobljeni podatki bodo anonimizirani in vodeni pod določeno kodo, s katero onemogočimo povezavo rezultatov in vaših osebnih podatkov. Vsi podatki bodo vodeni v skladi z GDPR uredbo.

O rezultatih študije vas bomo obvestili preko elektronske pošte.

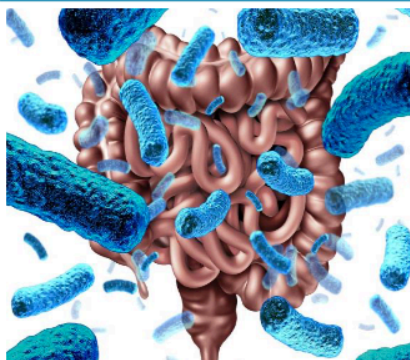


#1 ALI VEŠ

...da se v črevesju proizvede do 90% serotonina (hormon sreče), ki je pomemben za zdravje in razpoloženje?

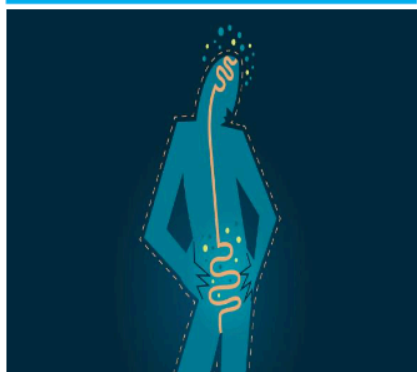
#2 ALI VEŠ

...da v črevesju prebiva do 10x več bakterij, kot je celic v celem telesu?



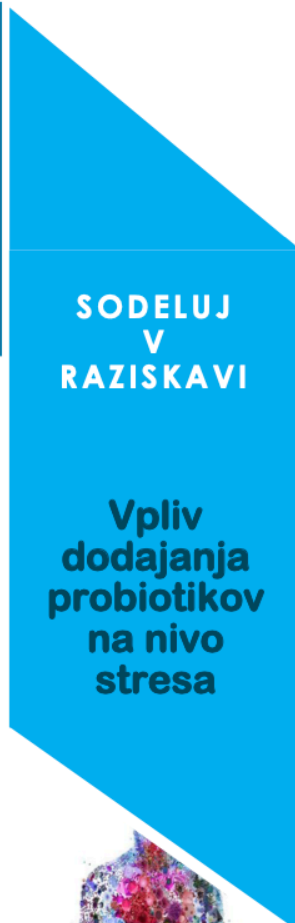
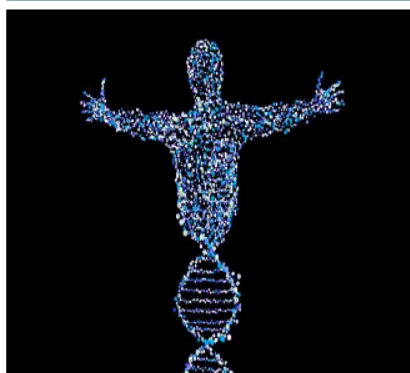
#3 ALI VEŠ

...da je želja po določeni hrani deloma odvisna od tega, kaj si želijo jesti črevesne bakterije?



#4 ALI VEŠ

...da antibiotiki in oralna kontracepcija ubijajo črevesne bakterije?



**SODELUJ
V
RAZISKAVI**

**Vpliv
dodajanja
probiotikov
na nivo
stresa**



SODELUJ V RAZISKAVI ZA MAGISTRSKO NALOGO

VPLIV PROBIOTIKOV NA NIVO STRESA

- ✓ Te zanima delovanje enega izmed najbolj kompleksnih in neraziskanih človeških organov?
- ✓ Imaš čas septembra in oktobra in si prostovoljno pripravljen/a nekaj časa nameniti za razvoj znanosti?
- ✓ Si starejši/a od 18 let?
- ✓ Ne jemlješ antibiotikov ali drugih zdravil?
- ✓ Nisi nosečka ali doječka?
- ✓ Ti ni težko deliti nekaj osebnih podatkov in slediti enostavnim navodilom?

Če si na zgornja vprašanja odgovoril/a z DA, potem te srčno vabim, da se nam pridružiš in na spodnji e-mail pošlješ prijavo za sodelovanje ali pa se prijaviš preko FB strani Vpliv dodajanja probiotikov na nivo stresa (@gutbrain) preko gumba **Prijavi se**.

Ko se prijaviš, ti pošljem dodatne informacije o poteku raziskave. **E-mail: gutbrain@gmail.com**

