



Univerza v Mariboru

Medicinska fakulteta

DOKTORSKA DISERTACIJA

**VPLIV PROBIOTIKA *BIFIDOBACTERIUM BREVE BR03* NA RAVEN
PROVNETNIH IN PROTIVNETNIH CITOKINOV TER
KRATKOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN PRI OTROCIH S
CELIAKIJO**

Oktober, 2016

Martina Klemenak



Univerza v Mariboru

Medicinska fakulteta

DOKTORSKA DISERTACIJA

**VPLIV PROBIOTIKA *BIFIDOBACTERIUM BREVE BR03* NA RAVEN
PROVNETNIH IN PROTIVNETNIH CITOKINOV TER
KRATKOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN PRI OTROCIH S
CELIAKIJO**

Oktober, 2016

Martina Klemenak, dr. med.

Mentorica: prof. dr. Dušanka Mičetić Turk, dr. med.

Somentor: doc. dr. Tomaž Langerholc, uni. dipl. inž. kem.

KAZALO

Seznam kratic in okrajšav	III
Seznam slik in shem	IV
Seznam tabel	IV
Seznam grafov	IV
POVZETEK	VI
ABSTRACT	VIII
1. UVOD	1
1.1. Patogeneza celiakije	2
1.1.1. Genetski dejavniki	2
1.1.2. Imunološki dejavniki	3
1.1.3. Dejavniki okolja	5
1.2. Črevesna mikrobiota	6
1.2.1. Črevesna mikrobiota in imunski sistem	7
1.2.2. Vpliv BGD na črevesno mikrobioto	7
1.2.3. Vpliv BGD na imunski sistem	8
1.3. Kratkoverižne maščobne kisline	9
1.3.1. Nastanek KVMK	10
1.3.2. Merjenje KVMK	12
1.3.3. Funkcija KVMK	12
1.3.4. Celiakija in KVMK	14
1.4. Zdravljenje celiakije	16
1.5. Namen doktorske disertacije	23
1.5.1. Teze doktorske disertacije	23
2. PREISKOVANCI IN METODE	24
2.1. Preiskovanci	24
2.2. Potek raziskave:	26
2.3. Metode	28
2.3.1. Probiotično prehransko dopolnilo	28
2.3.2. Vzorci periferne krvi in analiza citokinov	28
2.3.3. Analiza blata za vsebnost KVMK	29

2.4.	Statistična obdelava podatkov	29
3.	REZULTATI.....	30
3.1.	Rezultati analize citokina TNF- α	33
3.1.1.	Primerjava začetnih vrednosti TNF- α	33
3.1.2.	Sprememba vrednosti TNF- α pri otrocih s celiakijo na BGD po uživanju probiotika oz. placeba	35
3.2.	Rezultati analize citokina IL-10	37
3.3.	Rezultati analize kratkoverižnih maščobnih kislin.....	38
3.3.1.	Primerjava začetnih vrednosti KVMK.....	38
3.3.2.	Razlike v začetnih vrednostih KVMK pri otrocih s celiakijo na BGD glede na trajanje BGD.	45
3.3.3.	Spremembe vrednosti KVMK po uživanju probiotika oz. placeba pri otrocih s celiakijo na BGD.....	46
3.3.4.	Spremembe vrednosti KVMK po uživanju probiotika/placeba glede na trajanje BGD	50
3.3.5.	Povezave med pozitivnimi serološkimi označevalci za celiakijo in KVMK	51
4.	DISKUSIJA	52
4.1.	Potrditev oziroma zavrnitev tez doktorske disertacije.....	59
5.	SKLEP	60
6.	LITERATURA IN VIRI	61
7.	PRILOGE.....	71
7.1.	Priloga 1.....	71
7.2.	Članki kot sestavni del doktorske disertacije	72
8.	Življenjepis	87
9.	Zahvala.....	89
10.	Izjava	90

Seznam kratic in okrajšav

APC: antigen predstavitvene celice

BGD: brezglutenska dieta

CD4 celice: celice T pomagalke

CFU: enota, kolonijsko število mikroorganizmov

ESPGHAN: Evropsko združenje za pediatrično gastroenterologijo, hepatologijo in prehrano

HLA: humani levkocitni antigen

IFN- γ : interferon gama

IgA: imunoglobulini A

IL: interlevkin

IQR: interkvartilni razmik

KVMK: kratkoverižne maščobne kisline

TG2: tkivna transglutaminaza (tudi tTG)

TNF- α : dejavnik tumorske nekroze alfa (angl. tumor necrosis factor alpha)

Tr1: T-regulatorne celice tipa 1

Seznam slik in shem

Slika 1: Patogeneza celiakije	4
Slika 2: Nastanek KVMK.....	11
Slika 3: Delovanje probiotikov.....	18
Schema 1: Potek raziskave.....	26
Schema 2: Vključitev preiskovancev v raziskavo.....	32

Seznam tabel

Tabela 1: Vrednosti posameznih KVMK pri otrocih z celiakijo	14
Tabela 2: Osnovne značilnosti otrok, ki so zaključili raziskavo	31
Tabela 3: Vrednosti posameznih KVMK in razmerje med KVMK pri vseh treh skupinah otrok	38

Seznam grafov

Graf 1: Začetne vrednosti TNF- α pri vseh treh skupinah otrok	33
Graf 2: Začetne vrednosti TNF- α pri otrocih s celiakijo, ki so bili na BGD < 1 leto in > 1 leto	34
Graf 3: Spremembe TNF- α po uživanju probiotika oz. placeba pri otrocih s celiakijo na BGD	35
Graf 4: TNF- α po uživanju probiotika oz. placeba pri otrocih s celiakijo na BGD <1 leto	36
Graf 5: TNF- α po uživanju probiotika oz. placeba pri otrocih s celiakijo na BGD >1 leto	37
Graf 6: Začetne vrednosti očetne kisline pri vseh treh skupinah otrok	39
Graf 7: Začetne vrednosti propionske kisline pri vseh treh skupinah otrok.....	40
Graf 8: Začetne vrednosti maslene kisline pri vseh treh skupinah otrok.....	41
Graf 9: Začetne vrednosti skupnih KVMK pri vseh treh skupinah otrok.....	42
Graf 10: Začetne vrednosti fermentacijskega indeksa pri vseh treh skupinah otrok.....	43
Graf 11: Začetne vrednosti razmerja med KVMK pri vseh treh skupinah otrok	44

Graf 12: Spremembe očetne k. po uživanju probiotika oz. placebo pri otrocih s celiakijo na BGD	46
Graf 13: Spremembe propionske k. po uživanju probiotika oz. placebo pri otrocih s celiakijo na BGD	47
Graf 14: Spremembe maslene k. po uživanju probiotika oz. placebo pri otrocih s celiakijo na BGD ..	48
Graf 15: Spremembe skupnih KVMK po uživanju probiotika oz. placebo pri otrocih s celiakijo na BGD	49
Graf 16: Spremembe FI po uživanju probiotika oz. placebo pri otrocih s celiakijo na BGD.....	50

POVZETEK

Celiakija je imunsko posredovana sistemska bolezen, ki je posledica uživanja glutena. Edini do sedaj učinkovit način zdravljenja je brezglutenska dieta (BGD), dosledno izvajanje le-te pa predstavlja težavo za mnoge osebe s celiakijo. Pri nekaterih osebah kljub strogi BGD simptomi bolezni vztrajajo in pri 40–50 % je vnetje še vedno prisotno. V več študijah je bilo ugotovljeno, da imajo osebe s celiakijo neravnovesno črevesno mikrobioto (povečan delež gramnegativnih bakterij in zmanjšan delež bifidobakterij), ki ima pomembno vlogo v patogenezi bolezni. Tudi po uvedbi BGD imajo te osebe še vedno zmanjšan delež bifidobakterij. Določene vrste *Bifidobacterium breve* so v *in vitro* študijah delovale protivnetno.

Cilj doktorske disertacije je bil ugotoviti vpliv 3-mesečnega jemanja *Bifidobacterium breve* BR03 in B632 (v nadaljevanju probiotik) na proinflammatory citokin dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- α), protivnetni citokin interleukin 10 (IL-10) v serumu in na raven kratkoverižnih maščobnih kislin (KVMK) v blatu pri otrocih s celiakijo na BGD.

V raziskavo smo vključili 10 otrok z na novo odkrito aktivno celiakijo, 49 otrok s celiakijo na BGD in 18 zdravih otrok. Otroke s celiakijo na BGD smo randomizirali v dve skupini. Prva skupina je 3 mesece prejela probiotik, druga skupina pa placebo. Meritve citokinov TNF- α in IL-10 so potekale po navodilih proizvajalca z metodo kemiluminiscence na aparatu Immulite One. Iz vzorcev blata smo s pomočjo visokozmogljivostne tekočinske kromatografije analizirali očetno, propionsko, masleno in mlečno kislino. Fermentacijski indeks ($[\text{očetna kislina}] - ([\text{propionska kislina}] + [n\text{-maslena kislina}]) / [\text{skupne KVMK}]$) smo uporabili za prikaz vnetnega količnika KVMK.

Pri otrocih s celiakijo na BGD je prišlo po jemanju probiotika do značilnega znižanja TNF- α . Ob kontroli, 3 mesece po koncu jemanja probiotika, se je raven TNF- α ponovno značilno dvignila. Vrednosti IL-10 so bile pri večini otrok pod ravno kvantifikacije. Otroci z aktivno celiakijo so imeli značilno višje začetne vrednosti oetne in propionske kisline v blatu v primerjavi z zdravimi otroki. Otroci s celiakijo na BGD so imeli značilno več propionske kisline v primerjavi z zdravimi otroki. Vrednosti mlečne kisline so bile pri večini otrok pod ravno kvantifikacije. Po jemanju probiotika ni prišlo do značilnih sprememb vrednosti KVMK v blatu. Fermentacijski indeks (FI) se je 3 mesece po koncu uživanju probiotika še značilno znižal, kar nakazuje zmanjšanje vnetja na ravni črevesja.

Z raziskavo smo dokazali, da sta izbrana probiotična seva *Bifidobacterium breve* BR03 in B632 delovala protivnetno, saj so se po jemanju le-teh vrednosti TNF- α v serumu značilno znižale in nakazano se je znižal FI, ki ponazarja aktivnost kroničnega, s črevesno floro povezanega vnetja.

Ključne besede: celiakija, TNF- α , citokini, kratkoverižne maščobne kisline, črevesna mikrobiota, bifidobakterije

UDK: 602.3:579.864:577.175.1:616.341-008.1-053.2(043.3)

Influence of probiotic *Bifidobacterium breve* BR03 administration on the level of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines and short-chain fatty acids in children with celiac disease

ABSTRACT

Celiac disease (CD) is an immune-mediated disorder triggered by ingestion of gluten. Gluten-free diet (GFD) has so far proved to be the only effective treatment. Many patients with CD have problems with full compliance to GFD. Symptoms persist in some patients despite strict GFD and in 40–50 % of them inflammation is still present. Increasing evidence suggests that persons with CD have gut microbiota dysbiosis (increased number of Gram negative bacteria and decreased number of bifidobacteria), which play an important role in the disease pathogenesis. Even after a long-term treatment with GFD patients have a decreased number of bifidobacteria. Some strains of *Bifidobacterium breve* have shown *in vitro* anti-inflammatory effect on the gut level.

The aim of doctoral dissertation was to investigate the influence of three months administration of *Bifidobacterium breve* BR03 and B632 (afterwards probiotic) on the pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha (TNF- α), anti-inflammatory cytokine interleukin 10 (IL-10) in serum and on the level of short chain fatty acids (SCFA) in faeces of children with celiac disease on GFD.

Clinical study was conducted on 10 children with newly diagnosed active CD, 49 children with CD on GFD and 18 healthy children. Children with CD on GFD were randomized in two groups. The first group received probiotic for three months and the second group was

administered placebo. Measurements of cytokines TNF- α and IL-10 was performed according to the manufacturer's instructions with chemiluminescent immunometric assay in Immulite One. Faecal samples were analyzed for acetic, propionic, butyric and lactic acid with high performance liquid chromatography. Fermentation index ($[\text{acetic acid}] - ([\text{propionic acid}] + [n\text{-butyric acid}]) / [\text{total SCFAs}]$) was used for the assessment of inflammatory status in the gut of patients.

TNF- α levels were significantly decreased in children with CD on GFD after receiving probiotics for three months. At checkup, three months after the end of intervention with probiotics, TNF- α significantly increased again. IL-10 levels were below the detection level in most of the children. Children with an active CD had significantly higher baseline levels of acetic and propionic acid in faeces compared to healthy children. Children with CD on GFD had significantly higher baseline levels of propionic acid in faeces compared to the healthy children. Lactic acid levels were below detection level in most of the children. After probiotic administration there was no significant differences in individual SCFA levels in faeces. However, faecal fermentation index was significantly decreased three months after the end of probiotic intervention, suggesting a decrease of inflammation on the gut level.

Our study has shown that selected *B. breve* strains have an anti-inflammatory effect. After administration of the probiotic, TNF- α levels in serum as well as faecal FI decreased, which represents chronic, gut microbiota-mediated inflammation.

Key words: celiac disease, TNF- α , cytokines, short chain fatty acids, gut microbiota, bifidobacteria

UDK: 602.3:579.864:577.175.1:616.341-008.1-053.2(043.3)

1. UVOD

Celiakija je imunsko posredovana sistemska bolezen, ki je posledica uživanja glutena in sorodnih proteinov v pšenici, rži, ovsu in ječmenu pri genetsko predisponiranih osebah (1). Je ena najpogostejših kroničnih boleznih pri otrocih in odraslih. Pogostost bolezni v Evropi je okoli 1/200–1/100 prebivalcev (2). Naraščanja pojavnosti celiakije ne moremo v celoti pripisati zgolj boljši osveščenosti zdravnikov o bolezni, temveč tudi dejavnikom, ki so do sedaj še neznani (3).

Pri bolnikih s celiakijo uživanje glutena povzroči kronično vnetje v mukozi proksimalnega dela tankega črevesa, kar vodi v izgubo normalne barierne funkcije črevesja in znake malabsorpcije. Značilne histopatološke spremembe v mukozi so intraepitelna limfocitoza, hiperplazija kript in vilusna atrofija (1). Bolezen poteka s simptomi in znaki na prebavilih (npr. dolgotrajna driska, trebušni krči, napihnjen trebuh, kronično zaprtje, bruhanje) ali/in zunajčrevesnimi simptomi (npr. slabokrvnost, nenapredovanje, nizka rast, zakasnela puberteta, osteoporoza, herpetiformni dermatitis, okvare sklenine, nevrološke motnje) oz. je asimptomatska (1,4). Celiakija se pogosto pojavlja z nekaterimi avtoimunimi boleznimi, kot so sladkorna bolezen tipa 1, avtoimuni tiroiditis, avtoimune bolezni jeter, juvenilni kronični artritis, z Downovim, Turnerjevim in Williamsovim sindromom ter imunoglobulin A (IgA) nefropatijo in pomanjkanjem IgA (1).

Diagnoza celiakije se postavi po merilih Evropskega združenja za pediatrično gastroenterologijo, hepatologijo in prehrano (ESPGHAN) na podlagi značilne klinične slike, pozitivnih seroloških in genetskih markerjev ter znakov atrofije črevesne sluznice na histološkem pregledu. Biopsija tankega črevesa v določenih primerih po novih smernicah iz leta 2012 (1) ni potrebna, vendar se v večini primerov še vedno upošteva smernice iz leta 1990 (5).

1.1. Patogeneza celiakije

Celiakija je T-celično posredovana avtoimunska bolezen, ki jo sproži uživanje glutena in glutenu podobnih proteinov pri genetsko predisponiranih posameznikih. Nastane kot posledica kompleksne povezave genetskih, imunoloških in okoljskih dejavnikov (6).

1.1.1. Genetski dejavniki

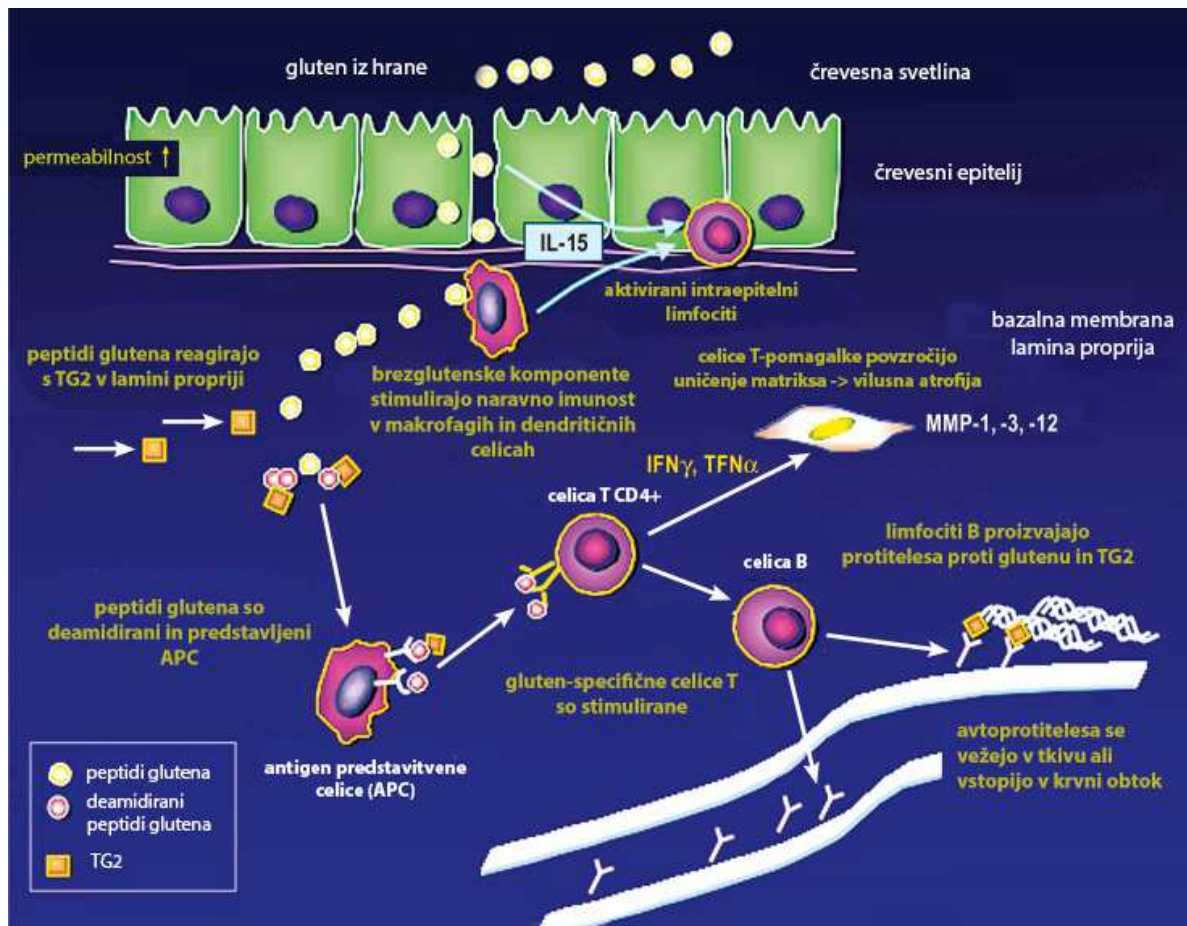
Predpogoj za nastanek celiakije je genetska predispozicija za razvoj bolezni. To so pokazale tudi študije na dvojčkih. Konkordančni količnik med monozigotnimi dvojčki je 75 %, med dizigotnimi dvojčki 20 % in 10 % med sorodniki prvega kolena (7).

Najbolj znana je povezava celiakije z aleli HLA (humani levkocitni antigen), ki so kodirani na šestem kromosomu (6p21.3). Genetski zapis HLA-DQ2 ima 90 % bolnikov s celiakijo, večina ostalih ima genetski zapis HLA-DQ8. Ta dva HLA-genotipa ima tudi 30 % splošne populacije, vendar samo 1–3 % ljudi razvije celiakijo (8). HLA-proteini so heterodimeri, sestavljeni iz α - in β -verige, in so lahko kodirani v *cis* (na istem kromosomu) ali *trans* (na dveh kromosomih) konfiguraciji. V populaciji najdemo dve konformaciji DQ2, DQ2.2 in DQ2.5. Večina bolnikov ima izoformo HLA-DQ2.5, ki je kodirana z α -verigo DQA1*0501 in β -verigo DQB1*0201. 5–12 % bolnikov nosi haplotip HLA-DR4; DQ8, ki je zapisan z DRB1*04, DQA1*0301; DQB1*0302 (9).

Geni HLA-DQ predstavljajo 35 % genetskega tveganja, ostalo predstavljajo geni ne-HLA. Raziskovalci so nedavno v asociacijski študiji na celotnem genomu identificirali 39 lokusov ne-HLA (115 različnih genov), ki sodelujejo pri razvoju celiakije. Najmanj 28 lokusov ne-HLA vključuje gene, ki so povezani z imunskim sistemom. Mnogi lokusi ne-HLA so skupni več avtoimunim boleznim (10).

1.1.2. Imunološki dejavniki

Pri bolnikih s celiakijo izpostavljenost glutenu aktivira pridobljeni in prirojeni imunski sistem (slika 1). Peptidi glutena vstopijo v črevesno mukozo, kjer postanejo primarni substrat za tkivno transglutaminazo II (TG2, tudi tTG), ki nato deamidira ostanke glutamina v negativno nabito glutaminsko kislino. Negativni naboj peptidov glutena kot tudi prisotnost ostankov prolina omogočajo lažjo vezavo le-teh v peptidni žep kompleksa HLA-DQ2 na antigen predstavitevni celici (APC). Kompleksi HLA-DQ2/DQ8 na celici APC vežejo in predstavijo peptide glutena celici T CD4⁺ v lamini propriji, kar sproži T_h1-usmerjen imunski odgovor z nastankom interferona gama (IFN γ), ki nato poveča nastanek dejavnika tumorske nekroze alfa (TNF- α), in slednji igra ključno vlogo pri poškodbi črevesne mukoze (11). Za nastanek celiakije je ključnega pomena tudi aktivacija prirojenega imunskega sistema, posredovanega z interlevkinom 15 (IL-15). Za IL-15 je značilno, da vpliva na povečanje intraepitelnih limfocitov s T-celičnim receptorjem (TCR) alfa/beta in limfocitov TCR gama/delta, ki delujejo citotoksično na epitelne celice, kar prispeva k poškodbi črevesne mukoze (12). Celice prirojenega imunskega sistema povečajo izražanje provnetnih citokinov, kar vpliva na povečano število limfocitov v lamini propriji in epiteliju, in to prispeva k popolni sliki bolezni (13). Posledica tega vnetnega odgovora je razgradnja matriksa, remodelacija mukoze, atrofija vilusov, hiperplazija celic kript in povišano število intraepitelnih celic (14).



Slika 1: Patogeneza celiakije. Slika povzeta po Schuppanu in Zimmerju (15).

Legenda: MMP-matriks metaloproteinaze

Vloga T_H2 -protivnetnih citokinov (interlevkinov IL-4, IL-6 in IL-10) v patogenezi celiakije ni popolnoma jasna, vendar ji pripisujejo imunoregulatorno vlogo na ravni mukoze (16–18). IL-10 je pomemben imunomodulatorni citokin, ki deluje na APC z zaviranjem sinteze citokinov in zmanjšanim izražanjem kostimulatornih in MHC II molekul (19). IL-10 je v aktivni fazi celiakije povišan v serumu in se po prehodu na BGD značilno zniža (16).

Raziskave so pokazale, da pride pri celiakiji do systemskega vnetnega dogajanja, saj so poleg povišanih vrednosti citokinov na ravni črevesne mukoze povišane tudi serumske vrednosti citokinov (16–18, 20). Izsledki raziskav so tudi potrdili, da raven dviga posameznih citokinov sovpada z aktivnostjo bolezni. Po prehodu na BGD se nekateri povišani citokini vrnejo na bazalne vrednosti (16, 17, 20).

1.1.3. Dejavniki okolja

Gluten

Glavni okoljski dejavnik tveganja za nastanek celiakije je izpostavitvev glutenu in glutenu sorodnim proteinom, ki se nahajajo v pšenici, piri, ječmenu, rži in ovsu. Gluten je skupno ime za več kot 50 različnih proteinov, ki jih glede na topnost delimo v dve skupini. Prvi so v alkoholu topni prolamini, ki jih v pšenici imenujemo gliadini, v ječmenu hordeini, v ovsu avenini in v rži sekalini. Drugo skupino glutenskih proteinov predstavljajo v kislinah topni proteini, ki jih v pšenici imenujemo glutenini (21). Študije so pokazale, da različni glutenski peptidi delujejo neposredno toksično na sluznico tankega črevesa ali sprožijo imunski odgovor. Zaenkrat največjo toksičnost pripisujejo α -gliadinu, ki ima največ imunogenih peptidov. Slednji so deamidirani v črevesju s pomočjo tTG, kar jim zagotavlja lažjo vezavo v žep na HLA-DQ2 ali HLA-DQ8 na APC in stimulira tako prirojeni in pridobljeni imunski sistem (22).

Ostali dejavniki

Veliko ljudi zbolijo za celiakijo v odrasli dobi, kar nakazuje, da so za nastanek bolezni pomembni tudi dodatni dejavniki okolja (23). Mednje spadajo neravnovesna črevesna mikrobiota, način poroda, vrsta hranjenja po porodu, uporaba antibiotikov, infekcije (24). Veliko študij je opisovalo vpliv različnih infekcij (z adenovirusom, rotavirusom, enterovirusom, virusom hepatitisa C) na pojav celiakije pri genetsko predisponiranih pacientih (11, 25–28). Pri otrocih, rojenih poleti, je tveganje za nastanek celiakije večje. Po eni hipotezi so otroci, rojeni poleti, prvič izpostavljeni glutenu pozimi, ko je sočasno tudi večja možnost okužbe z virusi ali bakterijami (29).

1.2. Črevesna mikrobiota

Črevesna mikrobiota vpliva na zdravje človeka preko delovanja na črevesno obrambno pregrado, imunsko funkcijo, absorpcijo hranil in potencialno preko neposrednega signaliziranja s črevesnim epitelijem. Ravnovesje med mikroorganizmi, prisotnimi v črevesju, je ključno pri vzdrževanju zdravja. Opisano je bilo, da je neravnovesna mikrobiota povezana s povečanim tveganjem za kronične vnetne črevesne bolezni, alergije, debelost, sladkorno bolezen, sindrom razdraženega črevesa in z antibiotiki povzročeno drisko (30).

Črevesni mikrobiom spodbuja zorenje imunskega sistema in toleranco preko aktivacije imunskih odgovorov, za katere je značilno izražanje imunoglobulinov in citokinov, vključno z IL-8, IL-10, IL-17, IL-21, IL-22 in INF- γ (31, 32). Gastrointestinalni trakt je prekrit s slojem mukoznega glikokaliksa, v katerem strukture iz ogljikovih hidratov predstavljajo vezavna mesta za bakterije. Podedovane razlike v izražanju ogljikovih hidratov lahko vodijo v kolonizacijo z določenim sevom bakterij. Tudi prisotnost določenih bakterijskih vrst lahko povzroči spremembe okolja, ki predisponirajo celiakijo neodvisno od genetskega ozadja preko izražanja ogljikovih hidratov (33).

Olivares in sodelavci (24) so v nedavni študiji ugotovili, da genotip dojenčkov, rojenih v družinah s tveganjem za nastanek celiakije, vpliva na zgodnjo sestavo črevesne mikrobiote. Dojenčki z visokim tveganjem za razvoj celiakije (HLA-DQ2) imajo višji delež bakterij iz debel Firmicutes (vrste klostridiji) in Proteobacteria (enterobakterije) in manjši delež Actinobacteria (bifidobakterije in korineobakterij) kot tisti dojenčki z manjšim genetskim tveganjem (ne-HLA-DQ2/8-nosilci). Vsi dojenčki v tej študiji so bili rojeni vaginalno in hranjeni z materinim mlekom.

Neravnovesna mikrobiota pri bolnikih s celiakijo je opredeljena kot povečan delež škodljivih gramnegativnih bakterij (bakteroidete in enterobakterije) in zmanjšan delež koristnih grampozitivnih bakterij (bifidobakterij) (34–36). Neravnovesna mikrobiota pri otrocih s celiakijo se več kot 1 leto po uvedbi brezglutenske diete (BGD) le delno normalizira (zmanjša se število *E. coli* in stafilokokov) (34), saj imajo ti otroci še vedno nižje skupno število bifidobakterij v primerjavi z zdravimi kontrolami (37, 38). To lahko prispeva tudi k nepopolni obnovi črevesne imunske homeostaze pri teh bolnikih (37). Pri osebah s celiakijo, ki imajo kljub dalj časa trajajoči BGD še vedno gastrointestinalne težave, so ugotovili večje neravnovesje v črevesni mikrobioti, kot ga imajo posamezniki s celiakijo na BGD brez simptomov (39).

1.2.1. Črevesna mikrobiota in imunski sistem

In vitro študije in študije na živalih so pokazale, da neravnovesna črevesna mikrobiota bolnikov s celiakijo lahko potencialno poveča vnetni odgovor, povzročen z glutenom, in prispeva k povečani črevesni prepustnosti in translokaciji peptidov gliadina (40–42). Medina in sodelavci (40) so v študiji ugotovili značilno višje koncentracije TNF- α in IFN- γ , ko so mononuklearne celice iz periferne krvi stimulirali z blatom pacientov z aktivno celiakijo in celiakijo na BGD, v primerjavi s kontrolami. Nasprotno so celice, stimulirane z blatom zdravih kontrol, sprožile povečano izražanje IL-10 v primerjavi s tistimi z aktivno celiakijo in celiakijo na BGD. Iz tega lahko sklepamo, da ima tudi črevesna mikrobiota vpliv na nastanek provnetnega črevesnega okolja, kot je tudi značilno za samo bolezen (16).

1.2.2. Vpliv BGD na črevesno mikrobioto

Način prehranjevanja je eden izmed glavnih okoljskih dejavnikov, ki vplivajo na sestavo črevesne mikrobiote. Tako tudi BGD vpliva na sestavo črevesne mikrobiote. De Palma in

sodelavci (43) so raziskovali vpliv enomesečne BGD na sestavo črevesne mikrobiote in imunsko funkcijo pri zdravih odraslih. Zdravi odrasli so 1 mesec jedli običajno prehrano, izvzeti so bili samo brezglutenski izdelki. Po 1 mesecu so ugotovili značilno zmanjšanje bifidobakterij in laktobacilov ter povečanje oportunističnih patogenov (*E. coli* in enterobakterije). Te spremembe naj bi bile posledica z BGD povezanega značilnega zmanjšane vnosa neškrobnih polisaharidov, saj ti prispejo neprebavljeni do distalnega dela kolona in predstavljajo glavno hrano za t. i. koristne bakterije v črevesni mikrobioti (44). Za bolnike z aktivno celiakijo in celiakijo na BGD je tudi značilno zmanjšanje števila bifidobakterij in laktobacilov glede na gramnegativne bakterije (34–36). Te ugotovitve kažejo, da BGD še dodatno prispeva k zmanjšanju števila t. i. koristnih bakterij in tako ne prispeva k normalizaciji črevesne mikrobiote pri zdravljenih bolnikih s celiakijo (43).

1.2.3. Vpliv BGD na imunski sistem

De Palma in sodelavci so v isti študiji (43) preučevali tudi vpliv enomesečne BGD pri zdravih odraslih na izražanje citokinov v mononuklearnih celicah iz periferne krvi, ki so jih stimulirali z vzorci blata pred in po uvedbi BGD. Po uvedbi BGD je bilo izražanje TNF- α , IFN- γ , IL-8 in IL-10 značilno nižje kot pri posameznikih na standardni, gluten vsebujoči prehrani. BGD vpliva na generalno zmanjšanje bakterijsko vzpodbujenega nastanka citokinov *in vitro*, kar je posledica generaliziranega zmanjšanja vseh luminalnih bakterij v debelem črevesju. Brottveit s sodelavci (45) je v študiji raziskoval vpliv 3-dnevnega uživanja glutena (4 rezine kruha, ki je vseboval gluten) pri osebah s celiakijo na BGD. Po ponovnem uživanju glutena je tretji dan prišlo do značilnega porasta vrednosti TNF- α in IL-8 na ravni mukoze tankega črevesa, raven IFN- γ pa se ni spremenil. Imunosupresivni vpliv, povezan z BGD, naj bi bil delno koristen za bolnike s celiakijo, ki so nagnjeni k imunskemu odgovoru T_h1, vendar se lahko odraža na obrambnih in regulatornih mehanizmih bolnikov proti škodljivim antigenom in kroničnem

vnetju. To lahko pomeni, da so posamezniki na BGD bolj nagnjeni k naselitvi potencialno škodljivih bakterij in infekcijam, ki so lahko povezane s simptomi bolezni, ki vztrajajo kljub BGD. Iz tega lahko sklepamo, da bi za bolnike s celiakijo bilo koristno dietetično svetovanje s promocijo prehranjevanja s polisaharidi in tudi s probiotiki, ki bi presegli te razlike (46).

1.3. Kratkoverižne maščobne kisline

Sestavo črevesne mikrobiote je možno analizirati na več načinov:

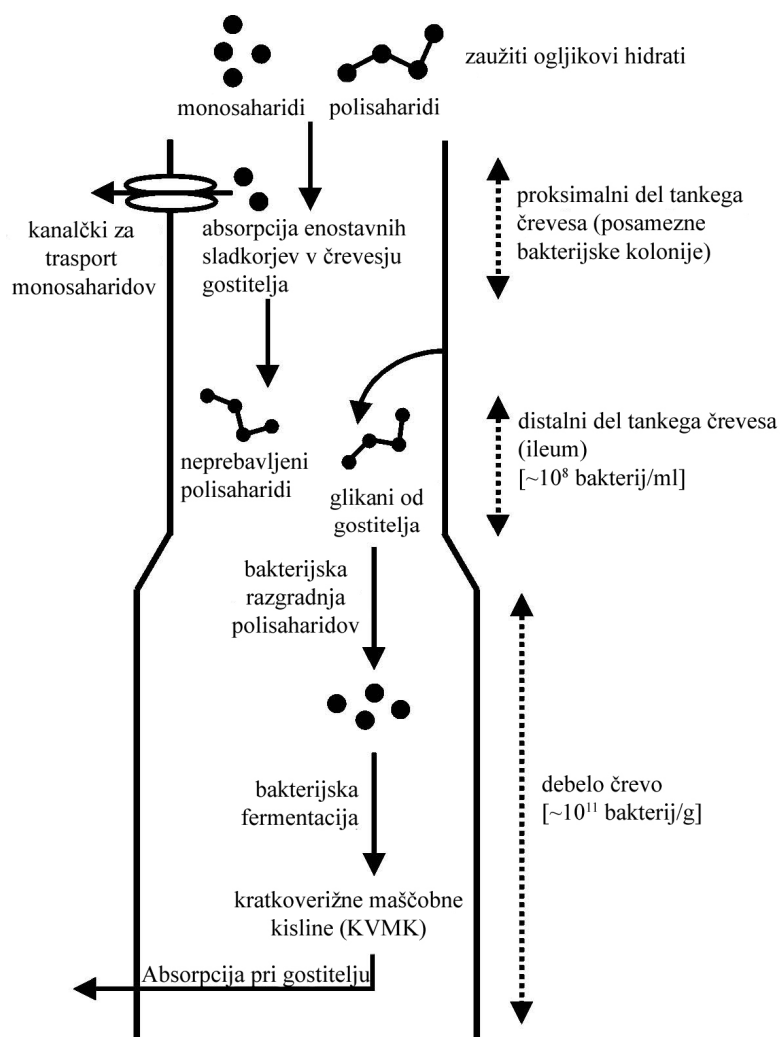
1. z identifikacijo in kvantifikacijo na stotine mikrobov v črevesju,
2. z analizo produktov bakterijske presnove (microflora-associated characteristic-MAC) (47).

Analiza črevesne mikrobiote iz blata je časovno potratna in draga metoda. Tjellström je predlagal, da se za iskanje razlik med posamezniki uporablja z mikrobioto povezane značilnosti (MAC). MAC so definirane kot zapis anatomskih, fizioloških, biokemičnih ali imunološki funkcij v organizmu, na katerega vpliva mikrobiota (48). Sedaj je splošno sprejeto dejstvo, da je opazovanje funkcije črevesne mikrobiote primeren način za študij črevesnega ekosistema (49).

Kratkoverižne maščobne kisline (KVMK) so glavni bakterijski metaboliti, ki nastanejo po fermentaciji prehranskih vlaknin in odpornega škroba s specifičnimi črevesnimi anaerobnimi bakterijami. So nasičene maščobne kisline, ki imajo 6 ali manj ogljikovih molekul. Mednje spadajo očetna kislina, propionska kislina, maslena kislina, valerična kislina in kaproična kislina (50).

1.3.1. Nastanek KVMK

Enostavni sladkorji, kot sta glukoza in galaktoza, se absorbirajo v proksimalnem delu tankega črevesa. Prav tako se v črevesju hidrolizirajo nekatere vrste disaharidov do monosaharidov in škrob se razgradi do glukoze, ne morejo pa se hidrolizirati in uporabiti ostali polisaharidi. Tako pride velika količina neprebavljene hrane do distalnega dela prebavnega trakta. Neškrobni polisaharidi, nerazgradljivi oligosaharidi in odporni škrob se s pomočjo bakterij fermentirajo, pri čemer nastajajo plini in KVMK (slika 2) (49). Živila z visoko vsebnostjo fermentabilnih vlaknin so ječmen, oves, sadje in zelenjava. V manjši meri nastanejo KVMK pri presnovi proteinov iz hrane in endogenih proteinov, kot so mukus in epitelne celice (51). Predvidevajo, da so razvejane KVMK (*i*-maslena kislina, *i*-valerična kislina, *i*-kaproična kislina) metabolni produkt razgradnje proteinov in lipidov. Za nastanek KVMK so nujno potrebne specifične bakterije v debelem črevesju, kar dokazujejo študije na miših brez črevesnih bakterij (52).



Slika 2: Nastanek KVMK. Povzeto po Hooperju (49).

Fermentacija poteka predvsem v proksimalnem delu debelega črevesja in nato so KVMK s transportom dostavljene proti distalnim delom debelega črevesja. Njihova koncentracija torej pada od proksimalnega (70-140 mM) proti distalnemu (20-70 mM) delu črevesja (53). Največ se tvori očetne, propionske in maslene kisline. Njihovo molarno razmerje v črevesju je 60 : 25 : 15 (očetna : propionska : maslena kislina) (54), čeprav so njihovi deleži odvisni od prehrane, črevesne mikrobiote, mesta fermentacije in gostiteljevega genotipa (51). Večina KVMK nastane in se porabi v črevesju, majhen delež očetne in propionske kisline prispe preko portalne vene do jeter, kjer se presnovijo, del očetne kisline se sprosti v sistemski krvni obtok (55).

1.3.2. Merjenje KVMK

Niti skupna vrednost KVMK niti posamezne KVMK v distalnem kolonu ne odražajo koncentracije v proksimalnem delu debelega črevesja (56). KVMK se absorbirajo in se transportirajo preko portalne vene do jeter in del le-teh, ki se ne absorbira, se posreduje drugim organom in tkivom za presnovo (57). Koncentracije KVMK v periferni krvi so zelo nizke in samo acetata je dovolj, da ga lahko izmerimo. Tudi količina KVMK v blatu ne odraža metabolnih procesov v črevesju v celoti, saj se kar 95 % nastalih KVMK absorbira in presnovi znotraj gostitelja. Meritve KVMK so koristne za nastanek sprememb v izločanju in ne nujno v produkciji, ker na fekalne KVMK vpliva stopnja same tranzicije. Kar pomeni, da fekalne koncentracije nenujno odražajo vrednosti v proksimalnem delu debelega črevesja. (58).

1.3.3. Funkcija KVMK

KVMK imajo poleg prehranske vrednosti tudi druge vloge v fiziologiji črevesja. So prevladujoči anioni v črevesni vsebini in znižujejo pH-vrednost vsebine debelega črevesa ter tako pomagajo vzdrževati naselitev črevesja s koristnimi bakterijami in preprečujejo naselitev škodljivih bakterij. Ta funkcija je pomembna, saj pripravijo epitelne celice za posredovanje primernega prirojenega imunskega odgovora na patogene in komezalne bakterije in tako pomagajo preprečiti kronični črevesni vnetni odgovor na mikrobo in njihove produkte. V tem pogledu imajo protivnetno aktivnost pri regulaciji črevesnega vnetja (59). KVMK delujejo tudi protimikrobno z uravnavanjem osmotskega in pH-ravnovesja, privzema hranilnih snovi in proizvodnje energije (60). Spodbujajo tudi črevesni krvni obtok, absorpcijo vode in natrija iz črevesja ter vplivajo na diferenciacijo in proliferacijo epitelnih celic. Le-te dobijo 60–70 % energije iz KVMK, še posebej iz maslene kisline. Tako KVMK vplivajo na morfologijo in barierno funkcijo črevesja (61). Vpliv KVMK na imunski sistem so preučevali predvsem v študijah *in vitro* (62–69). Ugotovljen je bil protivnetni učinek KVMK (zlasti propionske in

maslene kisline), saj zmanjšajo nastanek provnetnih kemokinov, citokinov, zmanjšajo migracijo levkocitov in sprožijo apoptozo v limfocitih, makrofagih in nevtrofilcih (64). Tam, kjer je vnetje povzročeno z anaerobnimi bakterijami ali po izgubi črevesne epitelne integritete, lahko visoke koncentracije KVMK vodijo v zbiranje nevtrofilcev in povečanje vnetnega procesa (62, 68). Prevelika koncentracija KVMK povzroči poškodbo epitelija in poveča izražanje IL-2 in IFN- γ v mukozi črevesja (70).

Do sedaj je malo znanega, kakšna je vloga posamezne KVMK. Ocetna kislina se iz črevesja hitro absorbira in transportira do jeter. Ob prisotnosti acetil-CoA sintetaze se v citosolu maščobnega tkiva in mlečnih žlez uporablja za lipogenezo (61). Izsledki študij so pokazali, da očetna kislina v večjih koncentracijah deluje provnetno (62).

Maslena kislina je najboljše raziskana KVMK, saj je v mnogih *in vitro* študijah pokazala pozitivne učinke na zdravje (51, 65–67). Večina absorbirane maslene kisline se presnovi v črevesnem epiteliju in predstavlja pomemben vir energije za kolonocite. Maslena kislina ima tudi številne druge funkcije, npr. zaviranje črevesne karcinogeneze, vnetja in oksidativnega stresa in izboljšanje funkcije črevesne bariere (51). Dokazano je bilo, da dodajanje maslene kisline *per os* zmanjša vnetje in mukozne lezije v eksperimentalnem modelu ulceroznega kolitisa (65). Vendar obstaja tudi nekaj nasprotnojučih si študij, ki kažejo na negativni vpliv višjih koncentracij maslene kisline na permeabilnost in visceralno senzitivnost debelega črevesa (51). V blatu dojenih otrok najdemo majhne koncentracije maslene kisline (68). Nedavni dokazi namigujejo, da je povečana produkcija ali akumulacija KVMK lahko toksična za črevesno mukozo prezgodaj rojenih novorojenčkov in lahko ima vlogo v patogenezi neonatalnega nekrozantnega enterokolitisa (71). Maslena kislina v nizki koncentraciji vzdržuje barierno funkcijo črevesne stene preko vpliva na citokinski odgovor celic T-pomagalk (69).

Večina v črevesju proizvedene propionske kisline se absorbira in prehaja v portalno veno. Njena funkcija je zniževanje maščobnih kislin v jetrih in plazmi, zmanjševanje vnosa hrane z uravnavanjem teka, izboljšanje občutljivosti tkiv na inzulin. *In vitro* študije so pokazale, da ima propionska kislina protivnetne sposobnosti, vendar so te pogojene s koncentracijo, pH-jem tekočine in vzrokom vnetja (72). Propionska kislina deluje tudi protimikrobno proti kolonizaciji gastrointestinalnega trakta s patogenimi bakterijami, kot je *Salmonella*, tako da zavira izražanje invazivnih genov v *Salmonella typhimurium*, ki so pomembni za invazijo in širjenje v črevesni epitelij (73).

1.3.4. Celiakija in KVMK

Pri bolnikih s celiakijo je s spremenjeno črevesno mikrobioto povezana tudi sestava KVMK. Tjellström je med prvimi preučeval presnovno funkcijo črevesne mikrobiote otrok s celiakijo. Pri novodkritih otrocih z aktivno celiakijo, otrocih s celiakijo na BGD manj kot 1 leto, otrocih s celiakijo na BGD več kot 1 leto ter zdravih otrocih je ugotavljal razliko tako v posameznih vrednostih KVMK kot tudi v skupni vrednosti KVMK (tabela 1). Na novo odkriti otroci z aktivno celiakijo in otroci s celiakijo na BGD manj kot 1 leto so imeli višje vrednosti očetne, *i*-maslene in *i*-valerične kisline ter skupnih KVMK v primerjavi z zdravimi kontrolami (47, 74). Propionske in *n*-valerične kisline je bilo značilno več pri otrocih s celiakijo na BGD manj kot 1 leto kot pri zdravih otrocih (47). Pri otrocih s celiakijo, ki so bili na BGD več kot 1 leto, je bila tako skupna raven KVMK kot tudi raven posameznih KVMK enaka kot pri zdravih kontrolah. Tudi razmerje med tremi glavnimi KVMK, tj. očetno, *n*-masleno in propionsko kislino, se je značilno razlikovalo med otroki z aktivno celiakijo in otroki s celiakijo na BGD več kot 1 leto (74).

Da ima črevesna mikrobiota pomembno vlogo v patogenezi bolezni, kaže tudi študija na sorodnikih prvega kolena bolnikov s celiakijo, pri katerih je bila raven očetne kisline in

skupnih KVMK nižja in raven maslene kisline v primerjavi z zdravimi odraslimi višja. Te ugotovitve kažejo, da imajo sorodniki prvega kolena »celiakoprotektivno« črevesno mikrobioto z zmanjšanim nastankom očetne kisline in posamezniki s celiakijo »celiakogeno« črevesno mikrobioto (75).

Tabela 1: Vrednosti posameznih KVMK in razmerje med tremi glavnimi KVMK pri otrocih z aktivno celiakijo, celiakijo na BGD < 1 leto, celiakijo na BGD > 1 leto in zdravimi kontrolami (74).

	Aktivna celiakija		Celiakija na BGD < 1 leto		Celiakija na BGD > 1 leto		Zdravi	
	mmol/kg	%	mmol/kg	%	mmol/kg	%	mmol/kg	%
očetna kislina	71,6	67	69,1	69	30,9	55	27,8	51
propionska kislina	15,7	15	15,2	15	12,2	21	11,7	21
<i>i</i> -maslena kislina	2,5		2,4		2,4		1,7	
<i>n</i> -maslena kislina	19,3	18	16,2	16	13,3	24	15,0	28
<i>n</i> -valerična kislina	3,3		3,1		2,9		2,1	
<i>i</i> -valerična kislina	1,8		2,0		1,8		1,4	
fermentacijski indeks	0,29 ± 0,03		0,33 ± 0,02		0,07 ± 0,06		0,05 ± 0,02	
SKUPNE KVMK	114,2		108,0		63,5		59,7	

Fermentacijski indeks

Tjellström s sodelavci je za prikaz vnetne aktivnosti KVMK v črevesju izumil fermentacijski indeks (FI). FI prikazuje razmerje med domnevno provnetno KVMK, tj. očetno kislino, in dvema protivnetnima KVMK, propionsko in masleno kislino, glede na skupno količino KVMK. Tjellström je FI uporabil pri Crohnovi bolezni in tudi celiakiji, saj je za obe bolezni značilno kronično gastrointestinalno mukozno vnetje (77). Nizek FI pomeni višjo protivnetno aktivnost in obratno – visok FI pomeni nižjo protivnetno aktivnost. Pri na novo odkritih otrocih s celiakijo in tistih na BGD manj kot 1 leto je FI visok, kar kaže še na prisotno vnetje. Po enem letu na BGD se FI približa tistemu pri zdravih otrocih (74). FI bi nam lahko pomagal pri določanju aktivnosti kroničnega, s črevesno mikrobioto povezanega vnetja:

$$\text{Fermentacijski indeks} = \frac{\text{očetna kislina} - (\text{propionska kislina} + \text{maslena kislina})}{\text{skupne KVMK}} \quad (76).$$

1.4. Zdravljenje celiakije

Edini do sedaj učinkovit način zdravljenja celiakije je BGD. Veliko študij je pokazalo, da imajo bolniki s celiakijo težave z doslednostjo pri držanju BGD, kar vodi do zapletov bolezni na številnih organih oz. organskih sistemih. Pri bolnikih s celiakijo je povišana pojavnost zunajčrevesnih avtoimunih bolezni, kljub temu da je primarni poškodovani organ mukoza tankega črevesja (78). Zelo neugoden zaplet je osteoporoza, prisotne so lahko ginekološke, hematološke in nevrološke motnje ter psihiatrične bolezni. Najresnejši zaplet je razvoj malignih bolezni, predvsem malignega limfoma tankega črevesa (79, 80).

Čeprav se nekateri bolniki držijo stroge BGD, jih ima veliko še vedno simptome bolezni. Ponovna biopsija tankega črevesa pri otrocih s celiakijo, ki so imeli 2 leti po uvedbi BGD še vedno simptome bolezni, je pokazala pri 23 % intraepitelno limfocitozo in pri 15 % vilusno atrofijo (81). Študija na odraslih bolnikih s celiakijo je pokazala, da po 1 letu stroge BGD doseže popolno histološko obnovo sluznice tankega črevesa samo 66 % posameznikov (82). Študija na finskih odraslih bolnikih s celiakijo, ki so bili povprečno na BGD 11 let, je pokazala, da je intraepitelna limfocitoza na dolgi rok prisotna pri 40–50 % bolnikov (83). To je najverjetneje posledica nehotenega uživanja glutena, zato se je pojavila potreba po dodatnem zdravljenju celiakije.

Z novimi načini zdravljenja celiakije se ukvarja veliko različnih študij. Pristop k zdravljenju na ravni črevesnega lumna vključuje proizvodnjo genetsko modificiranih žit brez glutena, fermentacijo glutena na netoksične komponente pri proizvodnji hrane, razgrajevanje glutena s pomočjo encimov ali probiotikov in vezavo glutena s pomočjo polimernih vezalcev. Na ravni črevesnega epitelija poteka razvoj modulatorjev tesnih stikov, blokatorjev transcelularnega transporta gliadina in blokatorjev IL-15, saj slednji vplivajo na povečanje števila

intraepitelnih limfocitov. Na ravni imunskega dogajanja v lamini propriji poteka razvoj zaviralcev TG2, blokatorjev komponent HLA-DQ2 ali HLA-DQ8, anticitokinske terapije, zaviralcev T- in B-celic, cepiva za vzpostavitev oralne tolerance na gluten in probiotikov za aktivno spreminjanje črevesne mikrobiote (84–88).

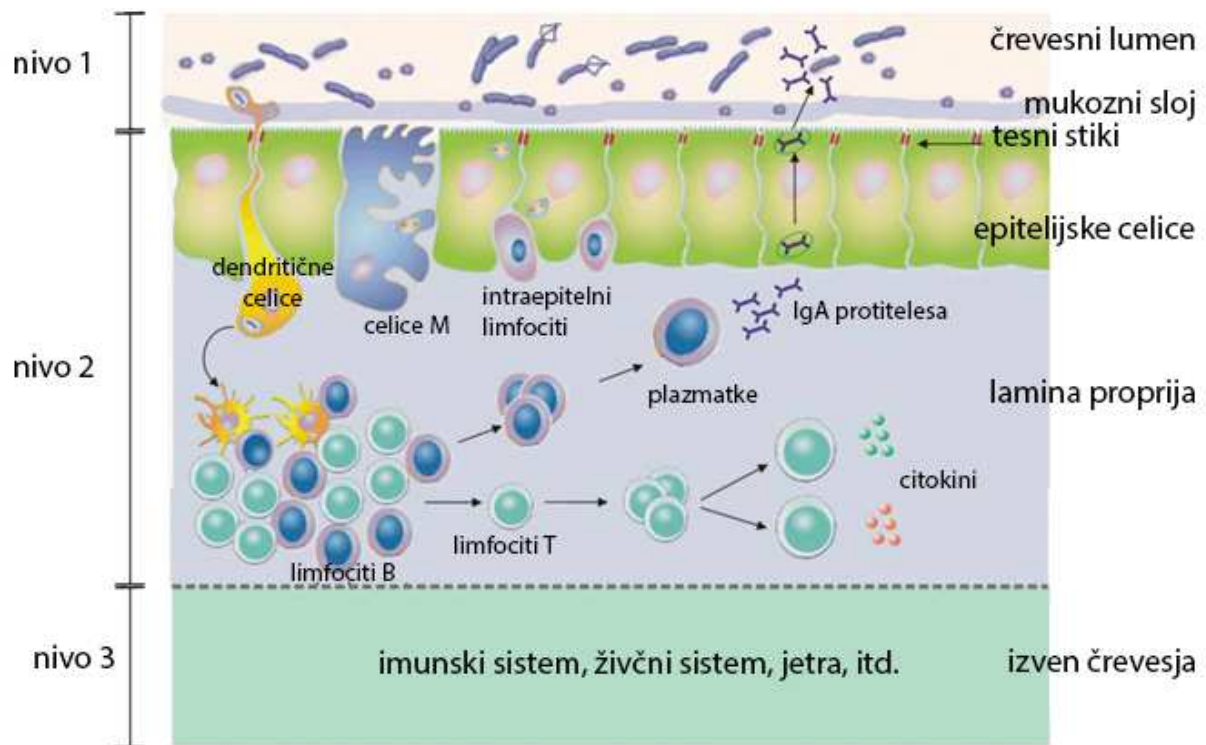
Spremljanje odgovora na zdravljenje z BGD pri otrocih s celiakijo običajno temelji na prenehanju kliničnih simptomov in normalizaciji seroloških testov. Zadnje študije pri otrocih s celiakijo kažejo, da normalizacija seroloških markerjev ne sovпада vedno z obnovitvijo sluznice tankega črevesa (89, 90). Zlati standard za oceno uspešnosti zdravljenja je še vedno biopsija tankega črevesa, ki zaradi invazivnosti preiskave predstavlja težavo pri študijah novih načinov zdravljenja pri otrocih s celiakijo. Zato se raziskovalci poslužujejo različnih markerjev za določanje uspešnosti zdravljenja (91).

1.4.1. Probiotiki

Probiotiki so po definiciji Svetovne zdravstvene organizacije (WHO: ang. World Health Organization) in Organizacije za prehrano in kmetijstvo (FAO: ang. Food and Agriculture Organization) opredeljeni kot živi mikroorganizmi, ki ob zaužitju v zadostni količini pozitivno delujejo na zdravje (92).

Probiotiki delujejo na treh ravneh: v lumnu črevesa, na ravni endotela in na sistemski imunski sistem in druge organe (slika 3) (93). V lumnu črevesa tekmujejo za vezavna mesta s patogenimi bakterijami, porabljajo hranila za rast patogenih bakterij, izločajo protimikrobne snovi (vodikov peroksid, bakteriocini, organske kisline). Na ravni endotela okrepijo tesne stike med enterociti, povečajo nastajanje in izločanje sluzi in IgA ter uničujejo receptorje za toksine. Skupaj s komenzalno mikrobioto imajo probiotiki pomembno vlogo pri

vzpostavljanju imunskega ravnovesja (94). Imunomodulatorni učinek probiotikov so preučevali pri veliko avtoimunih boleznih. Probiotične bakterije lahko usmerijo imunski odgovor ali v T_h1 -provnetno smer ali v T_h2 -protivnetno smer, odvisno od vrste probiotičnih bakterij (95).



Slika 3: Delovanje probiotikov. Slika povzeta po Rijkersu (93).

Uporaba probiotikov je na splošno ocenjena kot varna (GRAS: ang. generally recognized as safe), saj so uporabljeni mikroorganizmi enaki tistim, ki se nahajajo v prebavilih zdravega človeka. GRAS je označba ameriške Administracije za hrano in zdravila (FDA: ang. Food and Drug Administration) in pomeni, da je neka dodana substanca s strani strokovnjakov spoznana kot varna (96). Evropska komisija za varnost živil (EFSA) pogosto objavlja seznam, kateri probiotiki spadajo med varna živila (Qualified Presumption of Safety status) (97).

Na pediatrični populaciji uporaba probiotikov iz leta v leto narašča. V različnih študijah so preučevali vpliv probiotikov za preprečevanje in zdravljenje nekaterih bolezni v otroški dobi. Dokazano učinkoviti so določeni probiotiki za zdravljenje akutnega infekcijskega gastroenteritisa, za preprečevanje in zdravljenje z antibiotiki povzročene driske, zdravljenje laktozne intolerance in atopijskega dermatitisa. Tudi rezultati raziskav, ki potrjujejo učinkovitost probiotikov pri kronični vnetni bolezni črevesja, sindromu razdražljivega črevesja in nekrozantnemu enterokolitisu, so obetavni, vendar jih je malo (98, 99).

1.4.2. Predlagani potencialni pozitivni mehanizmi delovanja probiotičnih bakterij pri celiakiji

Pri otrocih s celiakijo je bila v raziskavah dokazana neravnovesna črevesna mikrobiota, ki se po prehodu na BGD le delno normalizira (34–36). Otroci s celiakijo na BGD imajo še vedno manj bifidobakterij kot zdravi vrstniki. Uporaba potencialno koristnih bakterij (probiotikov) bi lahko pomagala vzpostaviti ponovno ravnovesje črevesne mikrobiote (37).

In vitro analize so pokazale, da spremenjena mikrobiota (zlasti določene enterobakterije), izolirana iz blata ali bioptov duodenoma pri bolnikih s celiakijo, aktivira provnetne poti. Določene vrste bifidobakterij lahko zavirajo vnetne in toksične učinke, ki jih povzročajo izolirane enterobakterije in peptidi glutena (42, 100, 101). *In vitro* študije so pokazale, da nekatere vrste bifidobakterij sprožijo nizko produkcijo provnetnih citokinov, kot so IFN- γ , TNF- α , IL-2, in visoko produkcijo protivnetnih citokinov, kot so IL-10 (100, 102, 103). Potencialni probiotik bi tako vplival na uravnavanje pridobljenega in prirojenega imunskega odgovora. Študija na transgenskih miškah z izraženim DQ8 heterodimerom in celiakijo je pokazala, da pride po uživanju določenih vrst laktobacilov (*Lactobacillus paracasei* in *L. fermentum*) do neželenega dviga provnetnega citokina TNF- α in ob tem ne pride do dviga

protivnetnih citokinov IL-10 in IL-12 (104). Iz tega lahko povzamemo, da je potrebno pozitivno delovanje potencialnega probiotičnega seva preizkusiti najprej v predkliničnih študijah.

Aloisio s sodelavci (105) je preučevala delovanje 46 vrst bifidobakterij proti patogenim bakterijam, odpornost proti antibiotikom ter adhezijo in citotoksični vpliv na človeške celice. Sposobnost vezave bakterij na črevesni epitelij je eden izmed najpomembnejših dejavnikov, ki vplivajo na zadrževanje bakterij v črevesju in preprečevanje njihove odstranitve s peristaltiko in adhezijo patogenih bakterij. Preučevali so tudi sposobnost različnih bifidobakterij, da promovirajo zdravo črevesno okolje, ki ga lahko opredelimo s povečano presnovno aktivnostjo in primernim imunskim odgovorom epitelnih celic. Študija je pokazala, da imajo te sposobnosti samo naslednje vrste bifidobakterij: 3 sevi *Bifidobacterium breve* in *Bifidobacterium longum subsp. longum*. *B. breve* BR03 se je izkazal za še posebej učinkovitega zaradi močne protimikrobne aktivnosti proti koliformnim bakterijam in sposobnosti vezave na celične linije črevesnega epitelija in hkrati za varnega, saj ne prenaša odpornosti na antibiotike in ne izraža citotoksičnih učinkov na črevesni epitelij.

Mogna in sodelavci (106) so v kliničnem preizkusu preučevali zmožnost kolonizacije črevesne mikrobiote zdravih otrok s prehranskim dodatkom *B. breve* BR03 in *B. breve* B632 v razmerju 1 : 1 in dnevnim odmerkom 2×10^8 CFU. Po tritedenskem jemanju izbranih probiotičnih sevov so ugotovljali značilno povečanje skupnih bifidobakterij v blatu in značilno zmanjšanje koliformnih bakterij (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Pseudomonas*) v blatu zdravih otrok. Podobno so Simone in sodelavci (107) ugotovili pozitiven vpliv *B. breve* B632 na zaviranje rasti enterobakterij v *in vitro* modelu, ki je stimuliral črevesno mikrobioto 2-mesečnega otroka s kolikami.

Dve nedavni študiji sta pokazali, da sevi *Bifidobacterium breve* modulirajo usmerjenost celic T proti T_H2 in regulatornim celicam T 1 (Tr1) *in vitro* in *in vivo*. Celice Tr1 so potrebne za vzpostavitev črevesne homeostaze celic T CD4⁺ (108, 109). Disregulacija celic Tr1 naj bi bila pomembna v patogenezi avtoimunih bolezni pri ljudeh (110).

Probiotični sevi *B. breve* so pridobili od Evropske komisije za varnost živil status varnih živil (97). Vpliv različnih sevov bifidobakterij in laktobacilov na imunski odgovor v provnetnem okolju pri celiakiji se v študijah *ex vivo* in *in vivo* preučuje na živalskih modelih preobčutljivosti na gluten (40, 101, 104). Do sedaj sta bila objavljena 2 klinična preizkusa s probiotiki pri bolnikih s celiakijo. Smecuol in sodelavci (111) so preučevali vpliv 3-tedenskega uživanja *Bifidobacterium infantis* pri odraslih bolnikih z na novo odkrito nezdravljeno celiakijo, ki so v času študije uživali običajno glutensko prehrano. Dokazali so blago zmanjšanje nekaterih simptomov bolezni (zaprtje in prebavne motnje). Izbrani probiotik ni vplival ne na zmanjšanje driske in bolečine v trebuhu ne na črevesno prepustnost in serumsko raven nekaterih provnetnih citokinov in kemokinov. Niso pa ugotovili vpliva na imunski sistem ali na permeabilnost sluznice črevesa. Olivares in sodelavci (112) so preučevali vpliv 3-mesečnega uživanja seva *Bifidobacterium longum* CECT 7347 skupaj z BGD pri otrocih s celiakijo. Pri tistih, ki so uživali probiotik, so ugotavljali znižanje perifernih limfocitov T CD3⁺, neznačilno znižanje TNF- α , zmanjšano število bakterij skupine *Bacteroides fragilis* in zmanjšano vsebnost sIgA v blatu.

V naši raziskavi smo se na podlagi rezultatov *in vitro* študije (105) odločili za preučevanje delovanja probiotičnega seva *B. breve* BR03. Dobavitelj probiotičnega seva (Probiotal S.p.A) je imel dobre izkušnje še s sevom *B. breve* B632 in nam je ponudil izbran probiotični sev *B. breve* BR03 v kombinaciji z *B. breve* B632 (v razmerju 1 : 1). V kasneje objavljeni

raziskavi sta se omenjena probiotična seva pri zdravih otrocih izkazala za učinkovita v kolonizaciji črevesja, saj se je v blatu značilno povišalo število bifidobakterij in zmanjšalo število gramnegativnih bakterij (106). Dodatno je še ena kasneje objavljena raziskava (107) potrdila da, *B. breve* B632 vpliva na zaviranje rasti enterobakterij *in vitro*.

1.5. Namen doktorske disertacije

Doslej je bilo opravljenih nekaj *in vitro* študij različnih probiotičnih sevov na celičnih modelih celiakije in *in vivo* študij na genetsko modificiranih živalih ter 2 klinična preizkusa uporabe probiotikov pri osebah s celiakijo (40,100–103,111–113). V našem kliničnem preizkusu smo pri otrocih s celiakijo prvi preverili delovanje probiotičnih sevov *Bifidobacterium breve* BR03 in B632 in njihovo delovanje na raven protivnetnih in provnetnih citokinov v serumu in na sestavo in količino KVMK v blatu.

Namen doktorske disertacije je:

- preučiti znanstveno literaturo o delovanju probiotičnih sevov kot dopolnilno zdravljenje celiakije;
- ugotoviti vpliv izbranih probiotičnih sevov *Bifidobacterium breve* BR03 in B632 na imunski sistem pri otrocih s celiakijo na BGD;
- ugotoviti vpliv izbranih probiotičnih sevov *Bifidobacterium breve* BR03 in B632 na sestavo kratkoverižnih maščobnih kislin pri otrocih s celiakijo.

1.5.1. Teze doktorske disertacije

- Izbrana probiotična seva *Bifidobacterium breve* BR03 in B632 povišata protivnetni citokin IL-10 in znižata provnetni citokin TNF- α pri otrocih z aktivno celiakijo in otrocih s celiakijo, ki so na BGD.
- Fermentacijski indeks kratkoverižnih maščobnih kislin se po jemanju izbranih probiotičnih sevov *Bifidobacterium breve* BR03 in B632 pri otrocih z aktivno celiakijo in otrocih s celiakijo na BGD zniža.
- Izbrana probiotična seva *Bifidobacterium breve* BR03 in B632 znižata raven očetne in propionske kisline in povišata raven maslene kisline v blatu pri otrocih z aktivno celiakijo in otrocih s celiakijo na BGD.

2. PREISKOVANCI IN METODE

2.1. Preiskovanci

V klinično raziskavo smo vključili otroke z aktivno celiakijo in otroke s celiakijo na BGD, ki so se v obdobju od junija 2013 do junija 2014 zdravili na Kliniki za pediatrijo Univerzitetnega kliničnega centra (UKC) Maribor oz. so prihajali na redni pregled v gastroenterološko ambulanto Klinike za pediatrijo UKC Maribor. V raziskavo smo vključili tudi zdrave otroke.

Kriteriji za vključitev otrok z aktivno celiakijo v klinično raziskavo:

- starost 1–18 let,
- na novo diagnosticirana celiakija na podlagi ESPGHAN-ovih kriterijev (1, 5),
- ob začetku raziskave so na običajni glutenski prehrani, nato po odvzemu vzorcev krvi in blata prehod na BGD,
- odsotnost drugih akutnih ali kroničnih bolezni,
- niso prejeli redno zdravil ali antibiotikov vsaj 1 mesec pred pričetkom raziskave.

Kriteriji za vključitev otrok s celiakijo na BGD v klinično raziskavo:

- starost 1–18 let,
- diagnoza celiakije postavljena na podlagi ESPGHAN-ovih kriterijev (novi, stari),
- na BGD 6 mesecev ali več,
- odsotnost drugih akutnih ali kroničnih bolezni,
- niso prejeli redno zdravil ali antibiotikov vsaj 1 mesec pred pričetkom raziskave.

Kriteriji za vključitev zdravih otrok za kontrolno skupino:

- starost 1–18 let,
- odsotnost akutnih ali kroničnih bolezni,
- niso prejeli redno zdravil ali antibiotikov vsaj 1 mesec pred pričetkom raziskave.

Otroke z aktivno celiakijo smo zbirali prospektivno v času trajanja raziskave (1 leto). Po postavitvi diagnoze celiakije in vključitvi v raziskavo smo jim dodelili probiotik oz. placebo po metodi enostavne randomizacije z 1 : 1 alokacijo. To metodo smo uporabili, saj nismo vedeli, koliko bo v tem času na novo odkritih otrok s celiakijo, in tako smo preprečili neenakomerno število dodeljenega probiotika oz. placeba.

Otroke s celiakijo na BGD smo randomizirali v dve skupini; ena skupina je prejela izbrani probiotik, druga pa placebo. Randomizacijo smo izvedli s pomočjo računalniškega programa, dosegljivega na spletni strani <http://www.randomization.com>. Randomizirano alokacijsko zaporedje je bilo generirano z bloki po 8. Paketi probiotika ali placeba so bili označeni s številčno kodo, tako da preiskovanci in raziskovalci niso vedeli, ali uživajo probiotik ali placebo.

K sodelovanju v raziskavi smo povabili zdrave otroke, ki smo jih vključili v kontrolno skupino. To so bili predvsem otroci prijateljev in znancev raziskovalke.

Starši oz. zakoniti zastopniki otrok so bili podrobno seznanjeni z raziskavo in podpisali obrazec za prostovoljno sodelovanje v raziskavi. Za sodelovanje v raziskavi niso prejeli nobenega denarnega ali kakršnega koli drugega nadomestila. Seznanjeni so bili z dejstvom, da lahko iz raziskave kadar koli izstopijo. Varovanje podatkov smo zagotovili v skladu z Zakonom o varstvu osebnih podatkov.

Za klinično raziskavo je bilo pridobljeno soglasje s strani Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko, KME 44/11/12, 19/03/13 (Priloga 1). Klinična raziskava je bila registrirana v bazo kliničnih raziskav na spletni strani <https://www.clinicaltrials.gov> (registracijska številka: NCT02244047).

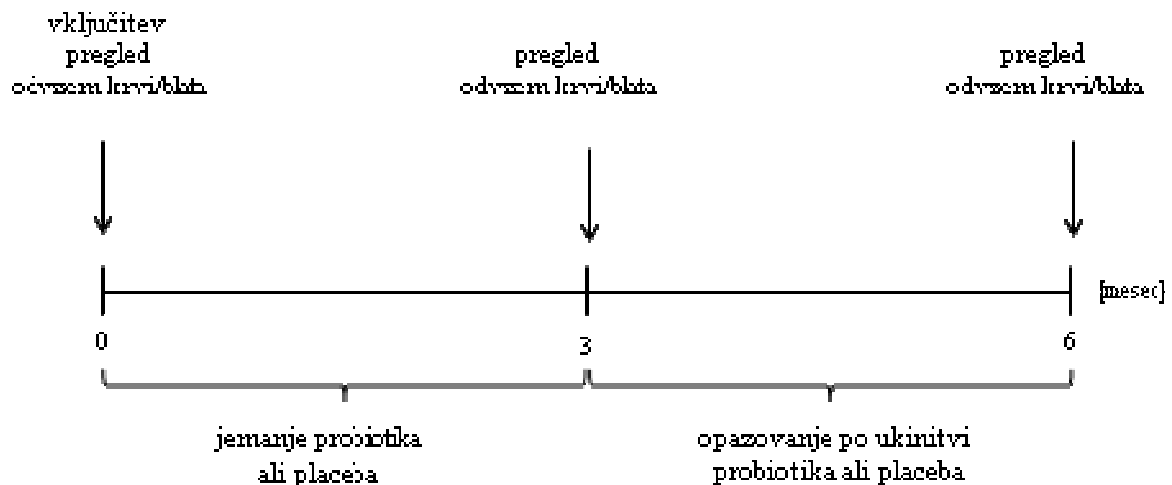
2.2. Potek raziskave:

Otroke z aktivno celiakijo smo vključili v študijo ob potrditvi diagnoze celiakije in pred začetkom zdravljenja z BGD. Otroke s celiakijo na BGD, ki so prišli na redno ambulantno kontrolo, smo vključili v študijo. K sodelovanju v raziskavi smo povabili zdrave otroke, ki smo jih vključili v kontrolno skupino.

Preiskovanci so bili razvrščeni v naslednje skupine:

1. **skupina:** otroci z aktivno celiakijo, ki so 3 mesece uživali izbrani probiotik;
2. **skupina:** otroci z aktivno celiakijo, ki so 3 mesece uživali izbrani placebo;
3. **skupina:** otroci s celiakijo na BGD, ki so 3 mesece uživali izbrani probiotik;
4. **skupina:** otroci s celiakijo na BGD, ki so 3 mesece uživali placebo;
5. **skupina:** zdravi otroci (kontrolna skupina).

Shema 1: Potek raziskave.



Otroke z aktivno celiakijo smo vključili v študijo takoj po postavitvi diagnoze na podlagi ESPGHAN-ovih kriterijev (1, 5). Hkrati smo ob odvzemu krvi za diagnostične preiskave celiakije odvzeli tudi kri za določitev citokinov TNF- α in IL-10. Dodatno smo vzeli še vzorec

blata za analizo KVMK. Ob prvem jemanju vzorcev blata in krvi so preiskovani še uživali običajno glutensko prehrano, nato so prešli na BGD. Po že opisanem postopku randomizacije so prejeli probiotik ali placebo. Preiskovanci so probiotik oz. placebo uživali v obliki praška, ki so ga raztopili v mlačni vodi, čaju ali soku in ga 3 mesece jemali zjutraj pred zajtrkom. Starši so dobili tudi posodice za blato in navodila za shranjevanje in transport blata.

Otroke s celiakijo na BGD, ki so prišli na redno ambulantno kontrolo, smo vključili v študijo. Otroke smo klinično pregledali in pridobili podatke, ali se držijo BGD in ali imajo simptome celiakije. Nato so diplomirane medicinske sestre Klinike za pediatrijo odvzele kri za serološke teste (EMA, tTG) za celiakijo, za citokina TNF- α in IL-10 in ostale redne preiskave (kompletna in diferencialna krvna slika, železo, feritin, vitamin D, kalcij, fosfat, alkalna fosfataza, ščitnični hormoni). Starši so dobili tudi posodice za blato in navodila za shranjevanje in transport blata. Preiskovanci so probiotik oz. placebo uživali v obliki praška, ki so ga raztopili v mlačni vodi, čaju ali soku in ga 3 mesece jemali zjutraj pred zajtrkom.

Starše otrok, vključenih v raziskavo, smo prosili, naj v času trajanja študije opazujejo spremembe v odvajanju blata in pojav gastrointestinalnih ali drugih težav. Prav tako smo jim svetovali, da v času trajanja študije ne spreminjajo otrokovih prehranskih navad. Ob vsakem kontrolnem obisku v ambulanti (čez 3 in 6 mesecev) smo otroke klinično pregledali in izključili akutno bolezensko stanje. Nato smo odvzeli kri za citokine. Blato so po navodilih prinesli s seboj.

Zdrave otroke smo ob vsaki kontroli klinično pregledali in izprašali o preteklih akutnih bolezenskih stanjih ter uživanju antibiotikov. Prav tako smo jim ob kontroli odvzeli kri za citokine, s seboj so prinesli tudi blato. Otroci so oddali kri in blato za analizo do 3-krat.

2.3. Metode

2.3.1. Probiotično prehransko dopnilo

Probiotični sev smo izbrali na podlagi pregleda znanstvene literature. Probiotično prehransko dopnilo z izbranim probiotičnim sevom in placebo nam je brezplačno dobavilo podjetje Probiotal S.p.A (Italija). Probiotično prehransko dopnilo je bilo pripravljeno v obliki prahu, pakirano v pakette in je vsebovalo maltodekstrin ter mešanico dveh liofiliziranih probiotičnih sevov, in sicer 50 % *Bifidobacterium breve* BR03 in 50 % *Bifidobacterium breve* B632 v dnevni dozi 2×10^9 CFU/3 g praška. Placebo je bil prav tako pripravljen v obliki prahu, pakiran v pakette in je vseboval maltodekstrin. Preiskovanci so prašek, vmešan v mlačni napitek, zaužili zjutraj pred zajtrkom. Proizvajalec je zagotovil analize in specifikacije proizvoda ter poskrbel za šifriranje placeba oz. probiotika.

2.3.2. Vzorci periferne krvi in analiza citokinov

Diplomirane medicinske sestre Klinike za pediatrijo UKC Maribor so ob vsaki kontroli poleg ostalih rutinskih preiskav krvi preiskovancem odvzele dodatno do 4,5 ml krvi iz periferne vene za analizo citokinov. Vzorce krvi smo dostavili Oddeleku za laboratorijsko diagnostiko UKC Maribor. Tam so vzorce krvi najprej centrifugirali 10 minut pri 800 x g, nato so jih razdelili v alikvote in jih do analize shranili v zamrzovalniku na -85°C . Analiza citokinov TNF- α in IL-10 je potekala po navodilih proizvajalca z metodo kemiluminiscence na aparatu Immulite One (Siemens Healthcare Diagnostis). Rezultati so bili podani v pg/ml. Spodnja meja za kvantifikacijo TNF- α je bila 4 pg/ml, za IL-10 pa 5 pg/ml.

2.3.3. Analiza blata za vsebnost KVMK

Starši so dobili posodice za blato, dodatno posodico za hladen transport blata in navodila. Takoj po odvzemu so vzorca blata shranili v zamrzovalnik in ga nato s pomočjo posode za hladen transport prinesli ob vsaki kontroli s seboj. Blato smo nato hranili v zamrzovalniku na -20°C do analize KVMK. Analiza KVMK iz blata je potekala v laboratoriju Katedre za mikrobiologijo, biokemijo, molekularno biologijo in biotehnologijo Fakultete za kmetijstvo in biosistemske vede Univerze v Mariboru s pomočjo visokozmogljivostne tekočinske kromatografije (HPLC). Analiza je bila narejena po metodi, ki so jo objavili Torii s sodelavci (114). Maščobne kisline smo najprej derivatizirali v hidrazide, ki smo jih ločili s pomočjo reverznofazne kromatografije in detektirali z detektorjem UV-VIS. Nato smo za posamezne KVMK naredili umeritvene krivulje glede na interne standarde. Analizirali smo očetno kislino, propionsko kislino, *n*-masleno kislino in mlečno kislino. Rezultati so bili podani v $\mu\text{mol/g}$ mokre teže.

2.4. Statistična obdelava podatkov

Za statistično analizo smo uporabili programsko orodje SPSS Statistics 21.0 (IBM, Armonk, New York). Porazdelitev podatkov in normalnost smo preverili z uporabo Kolmogorov-Smirnovega testa ali Shapiro-Wilkovega testa. Glede na nenormalno porazdelitev podatkov smo uporabili samo neparametrične statistične teste. Od neparametričnih testov smo uporabili Mann-Whitneyev U-test in parni Wilcoxonov test predznačenih rangov. Ničelne domneve smo zavračali s 5 % tveganjem. Statistično značilno razliko smo upoštevali pri vrednosti $p \leq 0,05$.

3. REZULTATI

Vključitvene kriterije za klinično raziskavo je izpolnjevalo 10 otrok z aktivno celiakijo, 49 otrok s celiakijo na BGD in 18 zdravih otrok za kontrolno skupino. Zaradi sočasne akutne bolezni, ugotovljene ob pregledu, smo iz analize rezultatov izključili 2 otroka z aktivno celiakijo, ki sta prejemale probiotik, 2 otroka s celiakijo na BGD (enega iz skupine, ki je prejemale probiotik, in enega iz skupine, ki je prejemale placebo) smo izključili iz raziskave, ker se nista udeležila kontrolnih pregledov. Dodatno smo izključili iz analize enega otroka s celiakijo na BGD iz skupine, ki je prejemale probiotik, zaradi akutne bolezni, ugotovljene ob kontrolnem pregledu. Prikaz otrok, dodeljenih v posamezne skupine, prikazuje shema 2.

Klinično raziskavo je tako zaključilo 8 otrok z na novo odkrito aktivno celiakijo (od tega so 3 otroci prejemale probiotik, 5 jih je prejemale placebo), 46 otrok s celiakijo na BGD (od tega je 22 otrok prejemale probiotik in 24 otrok placebo) in 18 zdravih otrok iz kontrolne skupine.

Predvidevali smo, da bomo v času trajanja raziskave (1 leto) zbrali v skupino otrok z na novo odkrito aktivno celiakijo vsaj 20 ali več otrok, ki bi po začetku zdravljenja z BGD sočasno uživali še probiotik oz. placebo. Študijo je zaključilo 8 otrok z na novo odkrito aktivno celiakijo, od katerih jih je 5 uživalo placebo in 3 probiotik. Zato smo te otroke združili v eno skupino (otroci z aktivno celiakijo) in za statistično analizo upoštevali samo začetne (izhodiščne) vrednosti citokinov in KVMK iz te skupine otrok.

Tabela 2: Osnovne značilnosti otrok, ki so zaključili raziskavo.

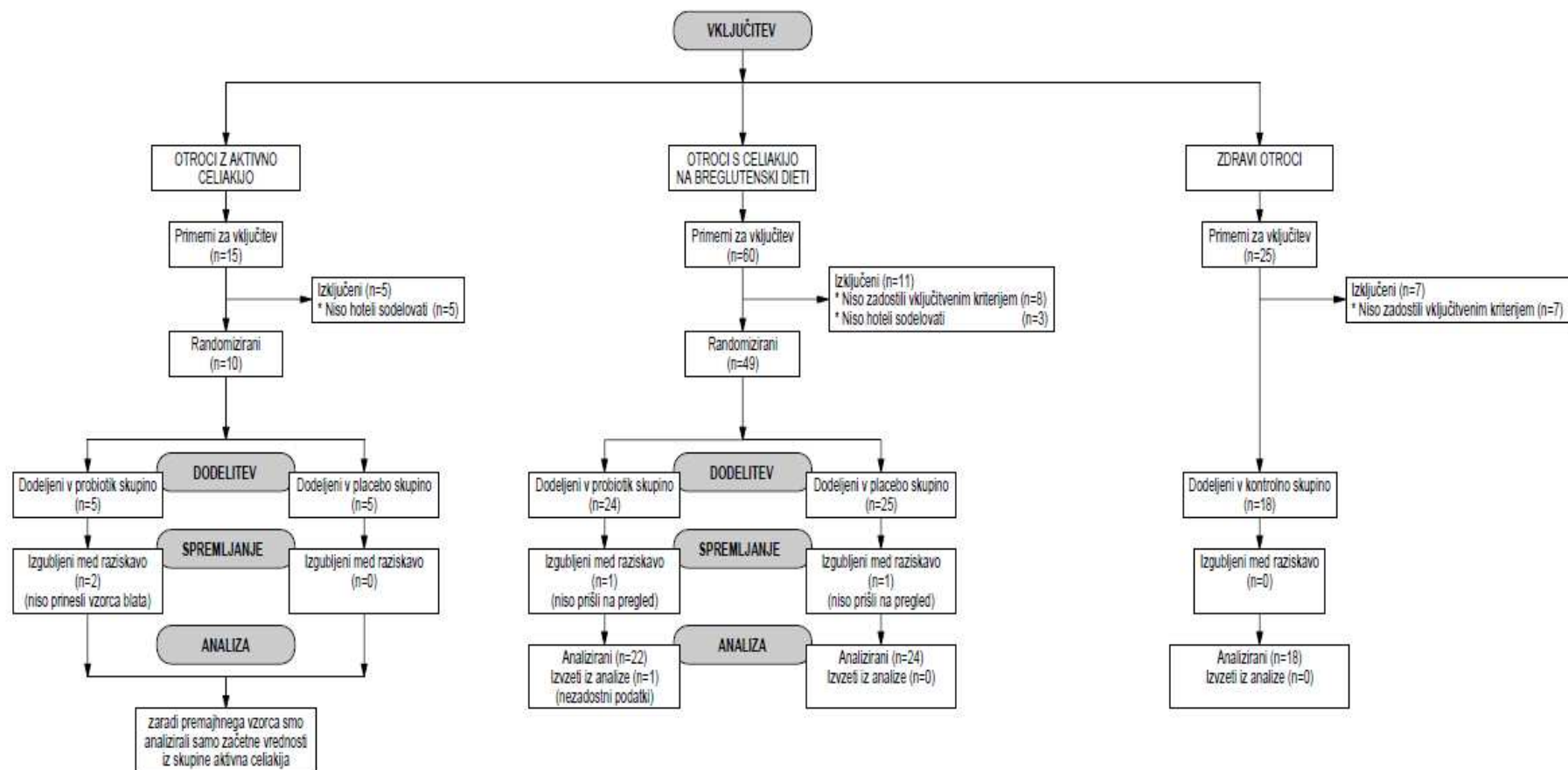
	Aktivna celiakija	Placebo skupina	Probiotik skupina	Zdravi otroci
Št. oseb	8	24	22	18
Spol (M/Ž)	1 / 7	10 / 14	6 / 16	7 / 11
Starost (leta)	6,6 ± 5,8	10,8 ± 5,0	10,4 ± 4,2	8,8 ± 6,0
Trajanje BGD (leta)	/	7,1 ± 5,5	5,6 ± 3,7	/
Doslednost za BGD	/	80%	91%	/

Rezultati so podani kot povprečne vrednosti ± standardna deviacija.

Osnovne značilnosti otrok, vključenih v raziskavo, so prikazane v tabeli 2. Med skupinama otrok s celiakijo na BGD, ki so prejeli placebo oz. probiotik, nismo opazili statistično značilnih razlik v spolu, povprečni starosti in trajanju BGD.

V nobeni od skupin nismo beležili neželenih stranskih učinkov uživanja probiotika oz. placeba. Namen naše raziskave ni bil oceniti zdravstveno stanje oz. simptome otrok s celiakijo, zato smo spremembe zdravstvenega stanja otrok ovrednotili samo na podlagi pogovora s starši in otroki. Po pripovedovanju staršev so bili nekateri otroci s celiakijo na BGD, ki so uživali probiotik, bolj zdravi kot v preteklih sezonah (raziskava je potekala pozimi, v času okužb dihal). Probiotik je tudi vplival na motiliteto GIT nekaterih otrok, spet drugi so bili manj zaprti. Pri otrocih, ki so uživali placebo, starši niso opazili sprememb v zdravju. Teh opažanj nismo statistično opredelili, saj nismo imeli izdelanega standardiziranega vprašalnika, ki bi ga uporabili ob vsakem pregledu.

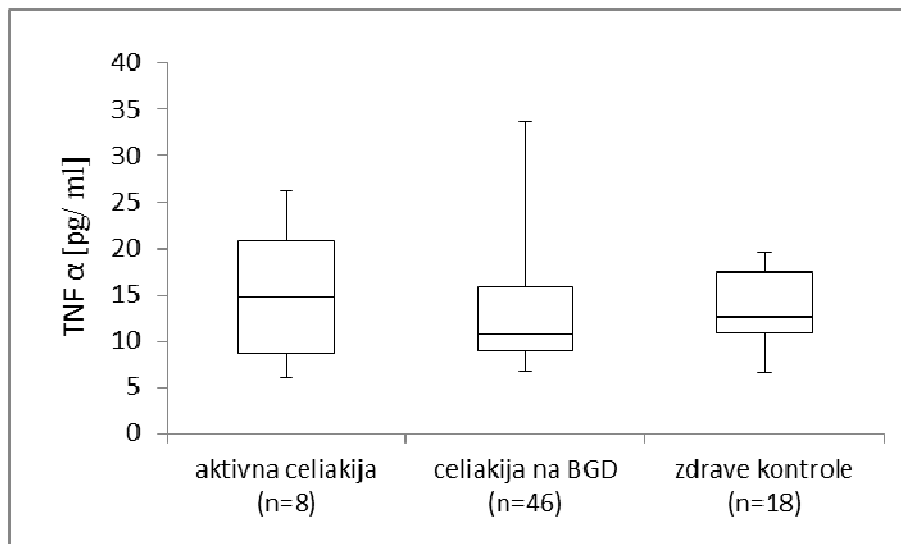
Shema 2: Vključitev otrok z na novo odkrito aktivno celiakijo, s celiakijo na BGD in zdravih otrok v raziskavo.



3.1. Rezultati analize citokina TNF- α

3.1.1. Primerjava začetnih vrednosti TNF- α

Graf 1: Začetne vrednosti TNF- α pri otrocih z aktivno celiakijo, otrocih s celiakijo na BGD in zdravih otrocih.



Rezultati so prikazani kot mediane in interkvartilni razmiki (IQR). Statistično značilnih razlik ni bilo.

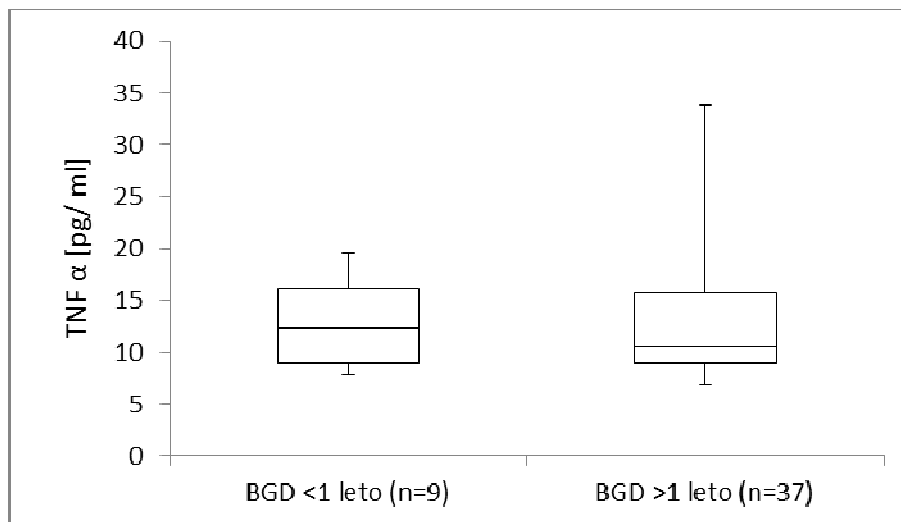
Najvišje začetne vrednosti TNF- α so imeli otroci z aktivno celiakijo. Vrednosti TNF- α pri otrocih s celiakijo na BGD in zdravih otrocih so bile podobne. Čeprav so bili otroci s celiakijo na BGD randomizirani v dve skupini, in sicer v skupino, ki je prejela probiotik, in skupino, ki je prejela placebo, je med obema skupinama otrok bila značilna razlika ($p = 0,015$) v začetni vrednosti TNF- α . V skupini, ki je prejela probiotik, so imeli otroci značilno višje začetne vrednosti TNF- α v primerjavi s skupino, ki je prejela placebo.

Pri otrocih s celiakijo smo preverjali tudi doslednost pri izvajanju BGD s pomočjo anamneze in spremljanja seroloških markerjev za celiakijo. Glede na pozitivne markerje za celiakijo in anamnezo o uživanju glutena smo ugotavljali 91 % doslednost pri izvajanju BGD v skupini, ki je prejela probiotik, in 80 % komplanco v skupini, ki je prejela placebo. Med posameznimi

bolniki s celiakijo nismo ugotavljali statistično značilne povezave med pozitivnimi serološkimi markerji za celiakijo in povišanimi vrednostmi TNF- α .

3.1.1.1. Razlike v začetnih vrednostih citokina TNF- α glede na trajanje BGD

Graf 2: Začetne vrednosti TNF- α pri otrocih s celiakijo, ki so bili na BGD manj kot 1 leto in več kot 1 leto

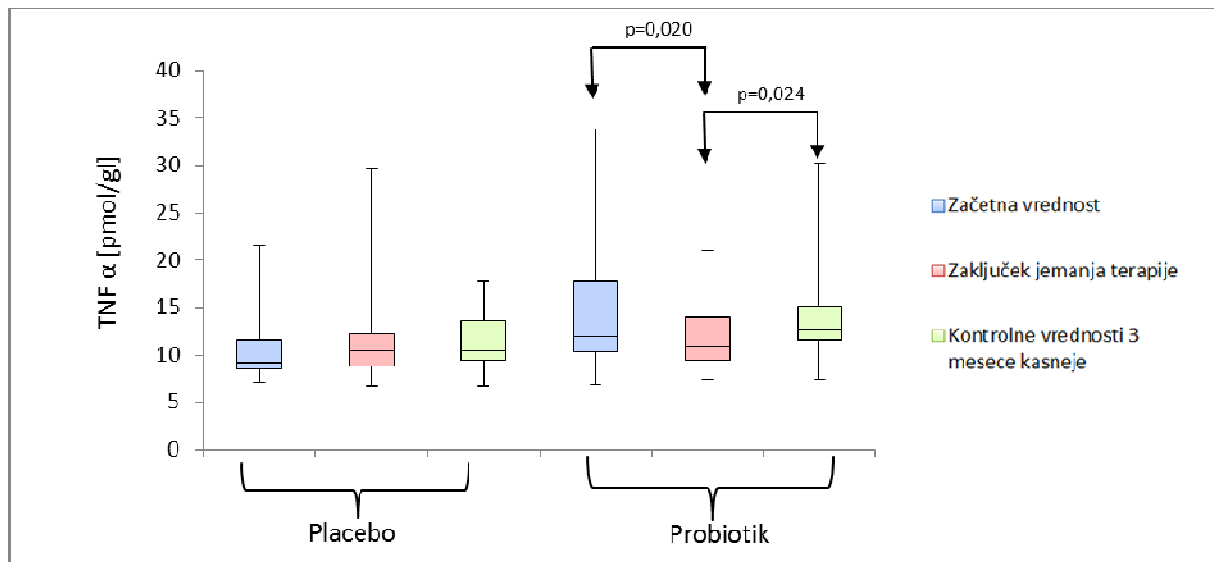


Rezultati so prikazani kot mediane in IQR. Statistično značilnih razlik ni bilo.

Vse otroke s celiakijo na BGD (iz skupine, ki je prejela probiotik, in skupine, ki je prejela placebo) smo za namene statistične analize razdelili na tiste, ki so bili na BGD manj kot 1 leto in tiste, ki so bili na BGD več kot 1 leto. Primerjali smo začetne vrednosti TNF- α iz obeh na novo formiranih skupin. Začetna povprečna vrednost TNF- α v obeh skupinah je bila skoraj enaka.

3.1.2. Sprememba vrednosti TNF- α pri otrocih s celiakijo na BGD po uživanju probiotika oz. placeba

Graf 3: Spremembe vrednosti TNF- α po uživanju probiotika oz. placeba pri otrocih s celiakijo na BGD.



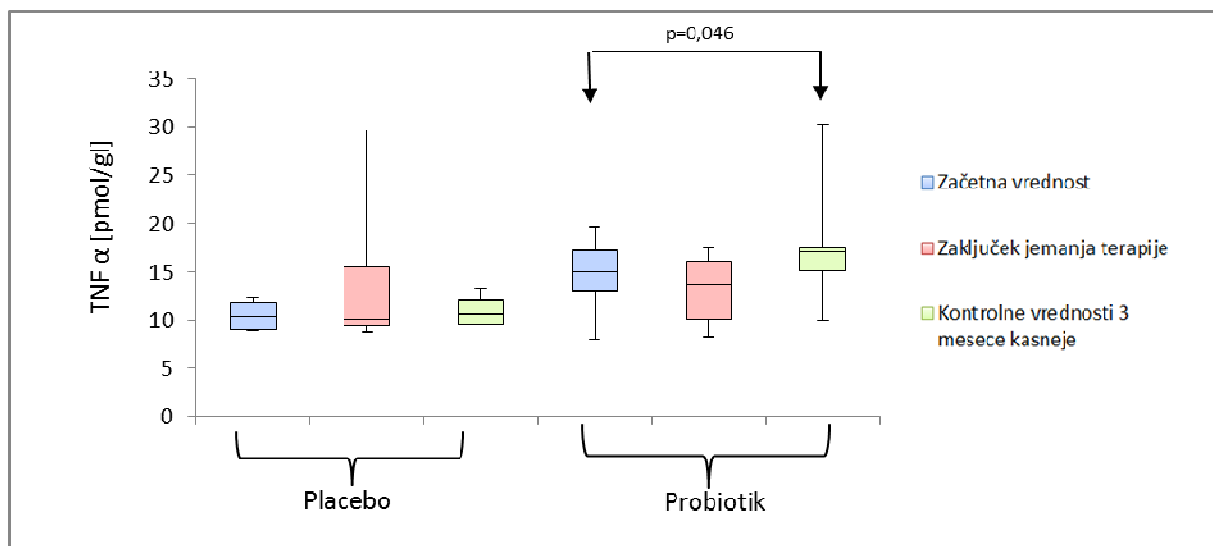
Rezultati so prikazani kot mediane in IQR. Za dokazovanje statistično značilne razlike ($p < 0,05$) smo uporabili parni Wilcoxonov test predznačenih rangov.

V skupini otrok s celiakijo na BGD so se vrednosti TNF- α po zaključku uživanja probiotika značilno znižale ($p = 0,020$) glede na začetne vrednosti. 3 mesece po zaključku terapije s probiotikom so se vrednosti TNF- α ponovno značilno dvignile ($p = 0,024$). Ob zaključku uživanja placeba so se vrednosti TNF- α neznačilno dvignile v primerjavi z začetnimi vrednostmi.

3.1.2.1. Spremembe vrednosti TNF- α po uživanju probiotika oz. placeba glede na trajanje BGD

Za namene statistične analize smo spremembe vrednosti TNF- α po uživanju probiotika oz. placeba primerjali v obeh skupinah otrok tudi glede na trajanje BGD (manj kot 1 leto ali več kot 1 leto). Razlike so prikazane v grafu 4 in grafu 5.

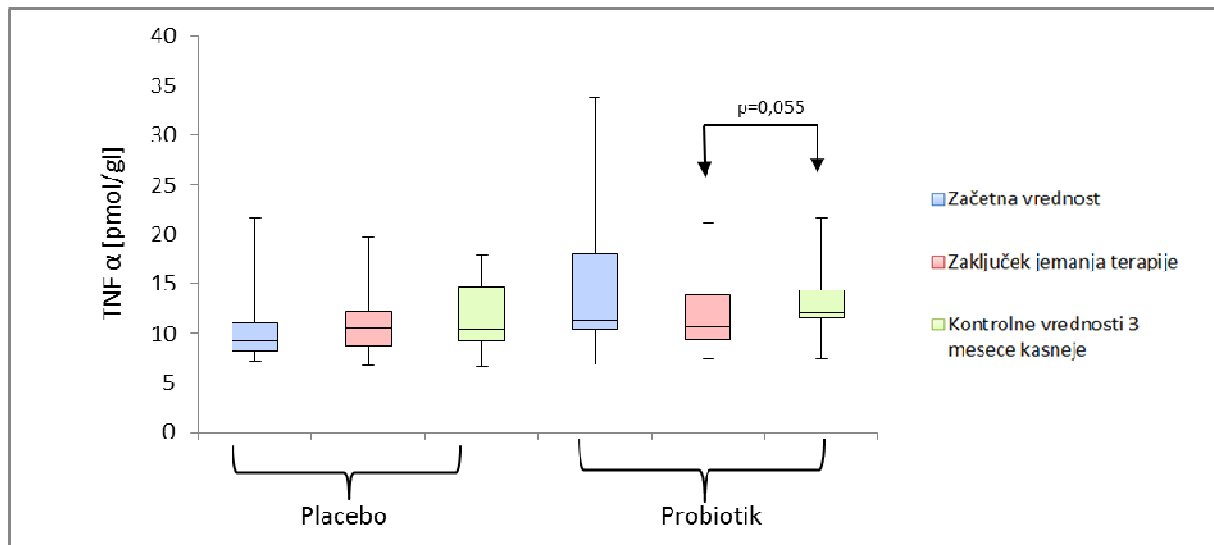
Graf 4: Spremembe vrednosti TNF- α po uživanju probiotika oz. placeba pri otrocih s celiakijo na BGD < 1 leto.



Rezultati so prikazani kot mediane in IQR. Za dokazovanje statistično značilne razlike ($p < 0,05$) smo uporabili parni Wilcoxonov test predznačenih rangov.

Pri otrocih s celiakijo na BGD manj kot 1 leto so se ob zaključku jemanja probiotika vrednosti TNF- α statistično neznačilno znižale, medtem ko so se v skupini, ki je uživala placebo, vrednosti neznačilno povišale. 3 mesece po zaključku uživanja probiotika so se vrednosti TNF- α neznačilno dvignile. V skupini otrok s celiakijo na BGD, ki je uživala probiotik, je bila razlika med začetno in kontrolno vrednostjo TNF- α značilna ($p = 0,046$).

Graf 5: Sprememba vrednosti TNF- α po uživanju probiotika oz. placeba pri otrocih s celiakijo na BGD > 1 leto.



Rezultati so prikazani kot mediane in IQR. Za dokazovanje statistično značilne razlike ($p < 0,05$) smo uporabili parni Wilcoxonov test predznačenih rangov.

Ob zaključku jemanja probiotika so se vrednosti TNF- α skoraj značilno znižale ($p = 0,055$), medtem ko so se v skupini, ki je prejela placebo, statistično neznačilno povešale.

3.2. Rezultati analize citokina IL-10

Pri otrocih z na novo odkrito aktivno celiakijo so bile začetne vrednosti citokina IL-10 pri treh otrocih od osmih (37,5 %) nad ravnjo kvantifikacije (> 5 pg/ml). Pri otrocih s celiakijo na BGD je bilo nad ravnjo kvantifikacije IL-10 8 % vzorcev in v skupini zdravih otrok 11 % vzorcev. Ker so bile pri večini preiskovancev vrednosti citokina IL-10 pod mejo kvantifikacije, statistične analize nismo izvedli.

3.3. Rezultati analize kratkoverižnih maščobnih kislin

3.3.1. Primerjava začetnih vrednosti KVMK

Pred začetkom jemanja probiotika oz. placeba smo v vseh skupinah otrok izmerili začetne vrednosti posameznih KVMK, skupnih KVMK in izračunali fermentacijski indeks ter določili razmerje med posameznimi KVMK. Razlike med skupinami prikazuje Tabela 3 in Grafi 7–12.

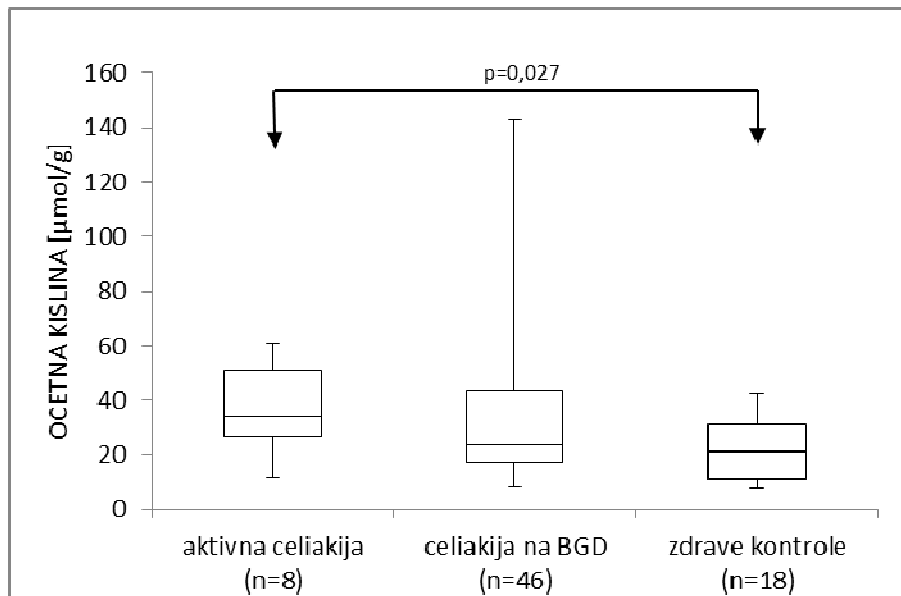
Določali smo vrednosti očetne, propionske, maslene in mlečne kisline. Mlečno kislino smo izključili iz analize, ker bi bila kvantifikacija zaradi nizkih koncentracij zelo nezanesljiva, poleg tega smo jo uspeli kvantificirati le v 25 % vzorcev. Pri skupnih vrednostih KVMK smo upoštevali seštevek treh glavnih KVMK (očetne, propionske in maslene kisline).

Tabela 3: Vrednosti posameznih KVMK in razmerje med KVMK pri otrocih z aktivno (na novo odkrito) celiakijo, pri otrocih s celiakijo na BGD in pri kontrolni skupini zdravih otrok.

	Aktivna celiakija		Celiakija ob BGD		Zdrave kontrole	
	$\mu\text{mol/g}$	%	$\mu\text{mol/g}$	%	$\mu\text{mol/g}$	%
Število oseb	7		46		18	
Očetna kislina	34 (12,0–60,7)	61	23,6 (8,4–143,0)	61	21,2 (7,8–42,6)	67
Propionska kislina	12,4 (7,5–17,4)	22	8,9 (0–35,1)	23	5,2 (0–16,5)	16
Maslenska kislina	9,5 (3,1–46,3)	17	6,1 (0–37,8)	16	5,4 (2,3–43,3)	17
Fermentacijski indeks	0,16 (–0,07–0,33)		0,22 (–0,42–1,00)		0,22 (–0,32–0,89)	
<i>Skupne KVMK</i>	55,1 (22,6–119,7)		36,6 (12,1–186,0)		29,7 (12,8–86,7)	

Rezultati so prikazani kot mediane, v oklepaju sta navedeni minimalna in maksimalna vrednost. Delež očetne, propionske in maslene kisline je izražen v odstotkih glede na seštevek vseh treh KVMK.

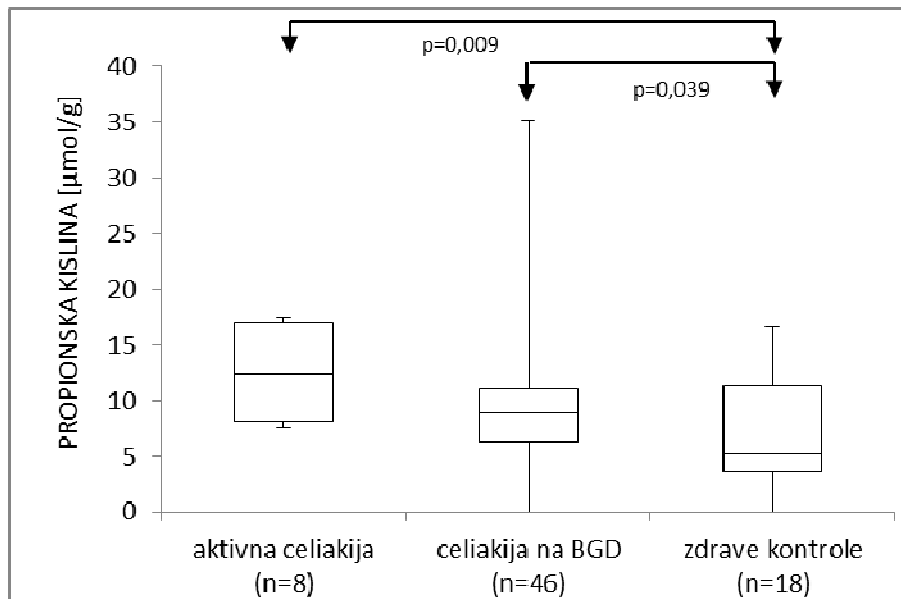
Graf 6: Začetne vrednosti očetne kisline pri otrocih z aktivno celiakijo, otrocih s celiakijo na BGD in zdravih otrocih.



Rezultati so prikazani kot mediane in IQR. Za dokazovanje statistično značilne razlike ($p < 0,05$) smo uporabili Mann-Whitneyjev U-test.

Otroci z aktivno celiakijo so imeli značilno več ($p = 0,027$) očetne kisline kot zdravi otroci. Pri vseh otrocih na BGD (iz skupine, ki je prejela probiotik, in skupine, ki je prejela placebo) smo opazili velik razpon vrednosti očetne kisline, vendar je bila srednja vrednost očetne kisline statistično neznačilno nižja kot pri otrocih z aktivno celiakijo.

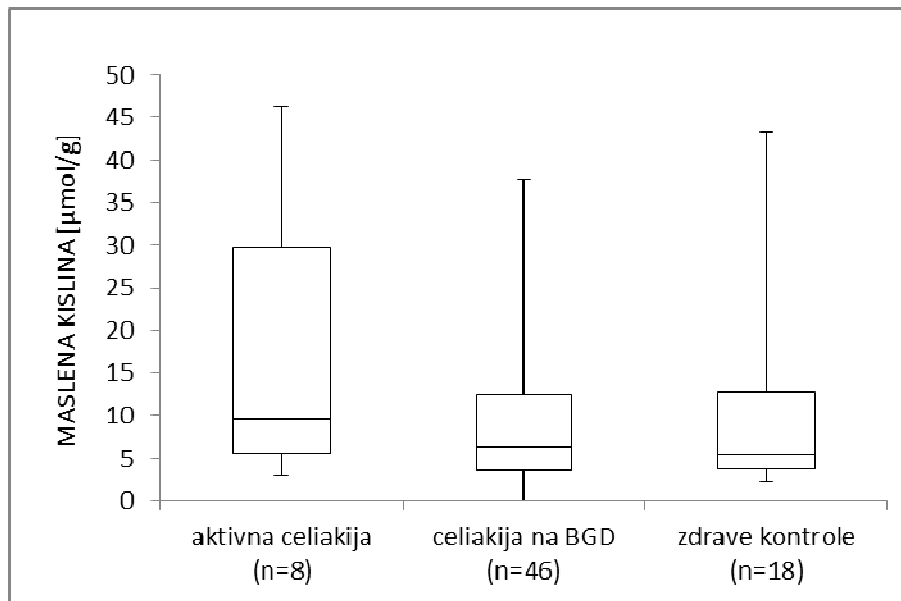
Graf 7: Začetne vrednosti propionske kisline pri otrocih z aktivno celiakijo, otrocih s celiakijo na BGD in zdravih otrocih.



Rezultati so prikazani kot mediane in IQR. Za dokazovanje statistično značilne razlike ($p < 0,05$) smo uporabili Mann-Whitneyjev U-test.

Otroci z aktivno celiakijo so imeli značilno več ($p = 0,009$) propionske kisline kot zdravi otroci. Prav tako so imeli otroci na BGD značilno več ($p = 0,039$) propionske kisline kot zdravi otroci. V skupini otrok s celiakijo na BGD smo tudi pri propionski kislini opazili velik razpon začetnih vrednosti.

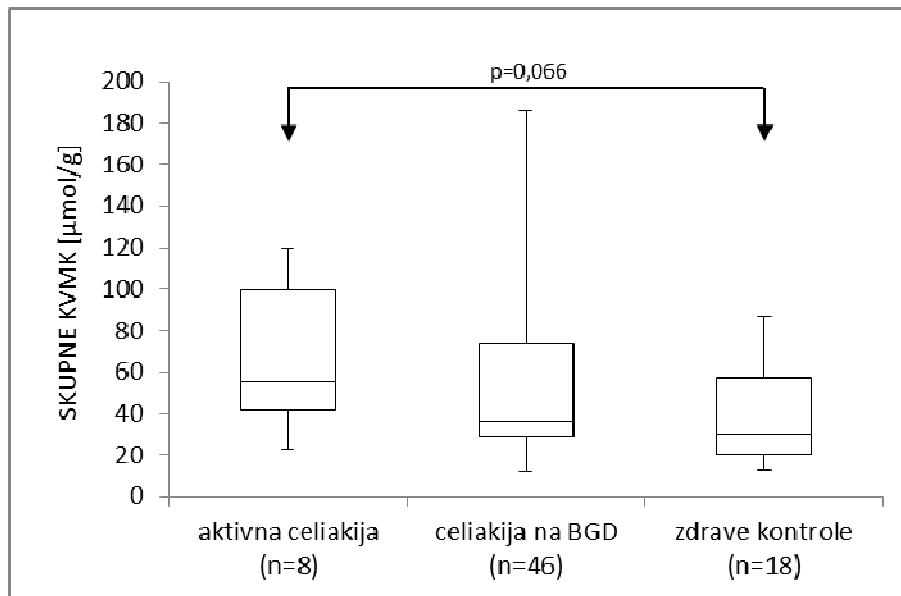
Graf 8: Začetne vrednosti maslene kisline pri otrocih z aktivno celiakijo, otrocih s celiakijo na BGD in zdravih otrocih.



Rezultati so prikazani kot mediane in IQR. Statistično značilnih razlik ni bilo.

Otroci z aktivno celiakijo so imeli statistično neznačilno več maslene kisline kot otroci s celiakijo na BGD in zdravi otroci. Otroci s celiakijo na BGD in zdravi otroci so imeli podobno srednjo vrednost maslene kisline. Pri tej KVMK je bil razpon začetnih vrednosti v vseh skupinah največji.

Graf 9: Začetne vrednosti skupnih KVMK (ocetne, propionske in maslene kisline) pri otrocih z aktivno celiakijo, otrocih s celiakijo na BGD in zdravih otrocih.

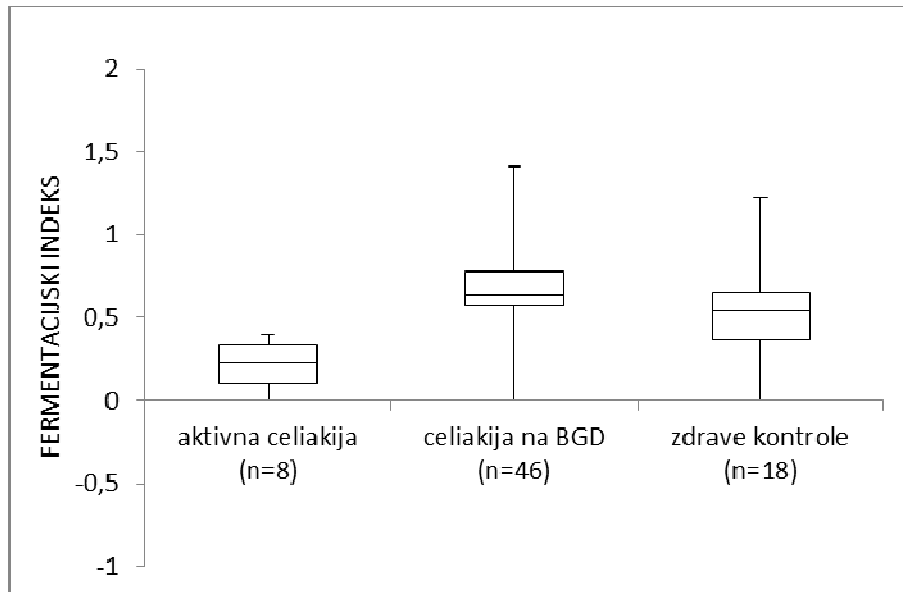


Rezultati so prikazani kot mediane in IQR. Za dokazovanje statistično značilne razlike ($p < 0,05$) smo uporabili Mann-Whitneyjev U-test.

Otroci z aktivno celiakijo so imeli skoraj značilno večje ($p = 0,066$) srednje skupne vrednosti KVMK kot zdravi otroci. Vrednosti skupnih KVMK so bile najnižje pri zdravih otrocih, nato so sledili otroci na BGD in nazadnje še otroci z aktivno celiakijo.

Graf 10: Začetne vrednosti fermentacijskega indeksa pri otrocih z aktivno celiakijo, otrocih s celiakijo na BGD in zdravih otrocih.

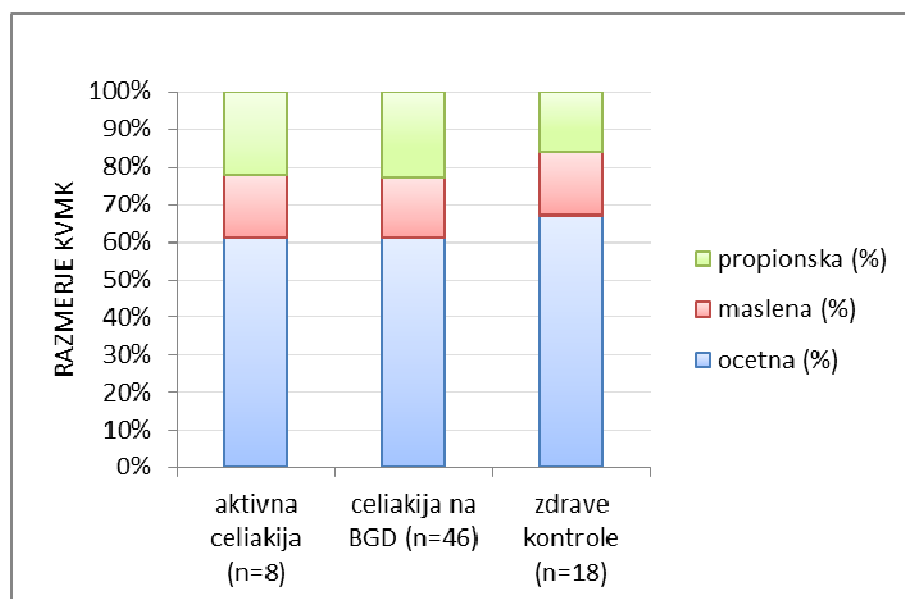
$$\text{Fermentacijski indeks} = \frac{\text{oetna kislina} - (\text{propionska kislina} + \text{maslena kislina})}{\text{skupne KVMK}} \quad (76)$$



Rezultati so prikazani kot mediane in IQR. Statistično značilnih razlik ni bilo.

Najvišje srednje vrednosti fermentacijskega indeksa so imeli otroci s celiakijo na BGD, najnižji indeks pa so imeli otroci z aktivno celiakijo.

Graf 11: Začetne vrednosti razmerja med KVMK pri otrocih z aktivno celiakijo, otrocih s celiakijo na BGD in zdravih otrocih.



Razmerja med srednjimi vrednostmi posameznih KVMK so podana v odstotkih. Statistično značilnih razlik ni bilo.

Otroci z aktivno celiakijo in celiakijo na BGD so imeli skoraj enako razmerje med posameznimi KVMK (Graf 12 in Tabela 4). Zdravi otroci so imeli nepomembno večji delež očetne kisline in manjši delež propionske kisline kot otroci z aktivno celiakijo oz. celiakijo na BGD.

3.3.2. Razlike v začetnih vrednostih KVMK pri otrocih s celiakijo na BGD glede na trajanje BGD.

Tudi za ugotavljanje razlik v začetnih vrednostih posamzenih KVMK, razmerja med KVMK ter fermentacijskega indeksa smo vse otroke s celiakijo na BGD (iz skupine, ki je prejela probiotik, in skupine, ki je prejela placebo) za namene statistične analize razdelili na tiste, ki so bili na BGD manj kot 1 leto, in tiste, ki so bili na BGD več kot 1 leto (Tabela 4).

Tabela 4: Vrednosti posameznih KVMK in razmerje med KVMK pri otrocih s celiakijo na BGD manj kot 1 leto in več kot 1 leto.

	Otroci s celiakijo na BGD < 1 leto		Otroci s celiakijo na BGD > 1 leto	
	μmol/g	%	μmol/g	%
Število oseb	9		37	
Ocetna kislina	21,7 (12,1–42,5)	68	24,3 (8,4–142,9)	61
Propionska kislina	6,3 (0–10,9)	12	9,3 (2,3–35,1)	16
Maslena kislina	3,9 (0–9,2)	20	6,5 (1,0–37,8)	23
Fermentacijski indeks	0,27 (0,10–1,00)		0,22 (–0,42–0,92)	
Skupne KVMK	28,5 (20,6–62,5)		38,6 (12,1–186,0)	

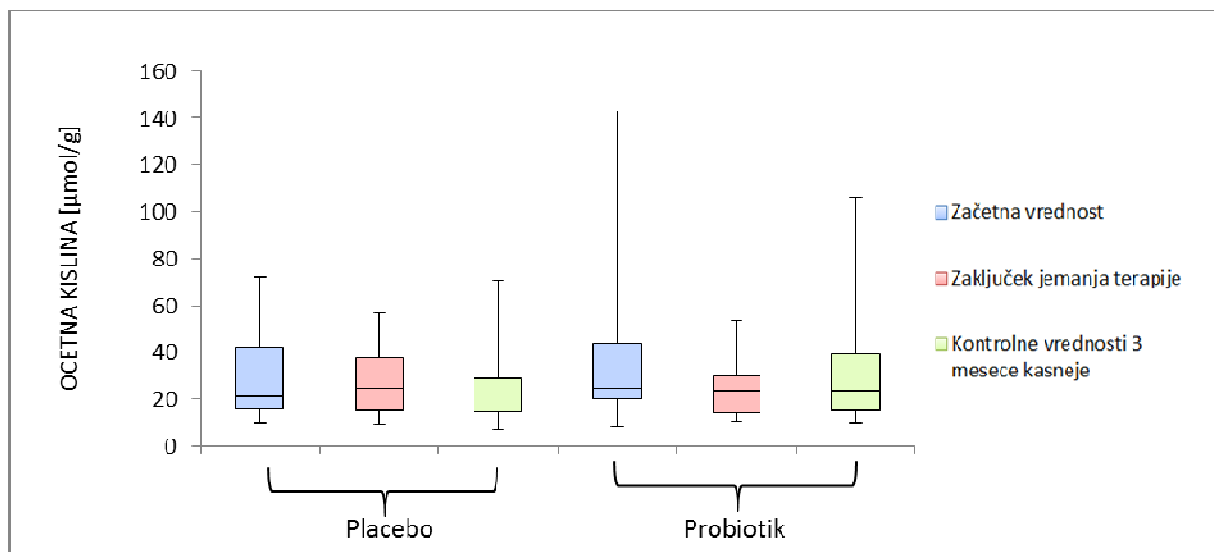
Rezultati so prikazani kot mediane, v oklepaju sta navedeni minimalna in maksimalna vrednost. Delež očetne, propionske in maslene kisline je izražen v odstotkih glede na seštevek vseh treh KVMK.

Do statistično značilnih razlik v na novo formiranih skupinah glede na trajanje BGD ni prišlo. Otroci s celiakijo na BGD < 1 leto so imeli skoraj pomembno manj ($p = 0,07$) maslene kisline kot otroci s celiakijo na BGD > 1 leto.

3.3.3. Spremembe vrednosti KVMK po uživanju probiotika oz. placeba pri otrocih s celiakijo na BGD

Spodaj predstavljeni grafi prikazujejo spremembo posameznih vrednosti KVMK po dodatku placeba oz. probiotika pri otrocih s celiakijo na BGD.

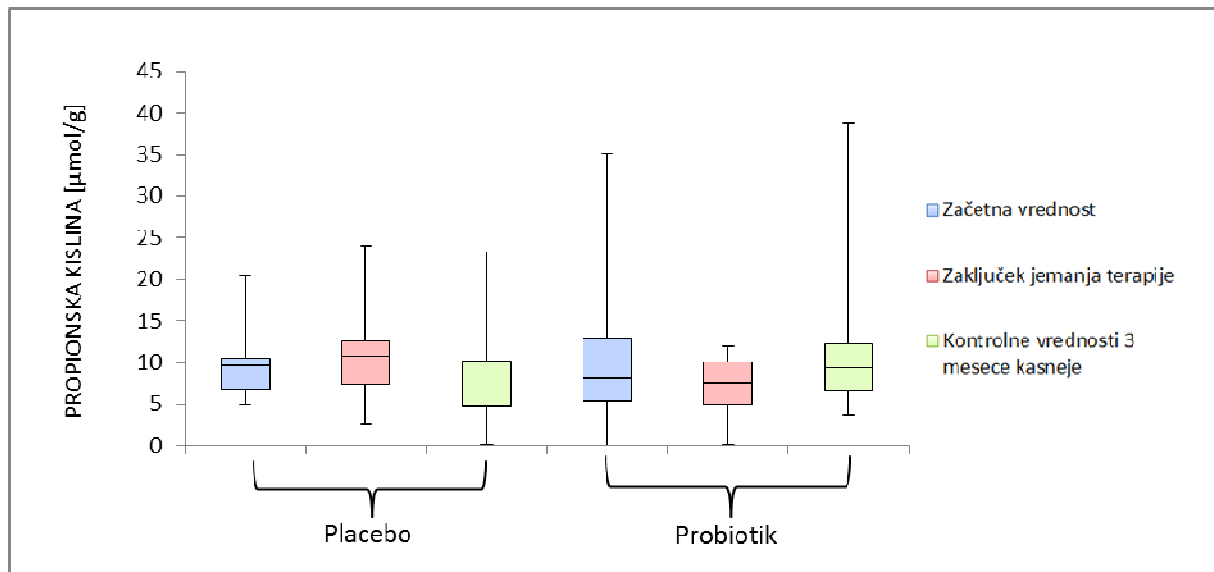
Graf 12: Spremembe vrednosti očetne kisline po uživanju probiotika oz. placeba pri otrocih s celiakijo na BGD.



Rezultati so prikazani kot mediane in IQR. Statistično značilnih razlik ni bilo.

Po uživanju placeba pri otrocih s celiakijo na BGD ni prišlo do večjih sprememb v količini očetne kisline v blatu. Po uživanju probiotika so srednje vrednosti očetne kisline ostale približno enake, vrednosti tretjega kvartila očetne kisline so se po uživanju probiotika neznačilno znižale, nato pa ob kontroli ponovno povišale.

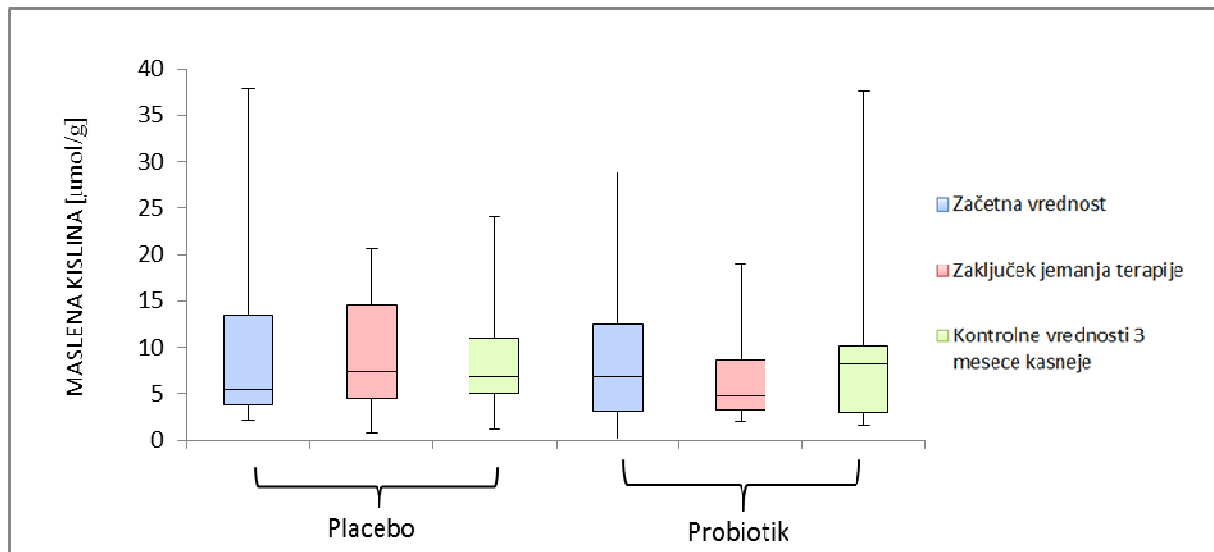
Graf 13: Spremembe vrednosti propionske kisline po uživanju probiotika oz. placeba pri otrocih s celiakijo na BGD.



Rezultati so prikazani kot mediane in IQR. Statistično značilnih razlik ni bilo.

Po uživanju placeba pri otrocih s celiakijo na BGD ni prišlo do večjih sprememb niti v srednjih vrednostih propionske kisline v blatu. Po uživanju probiotika so srednje vrednosti propionske kisline ostale približno enake, vrednosti tretjega kvartila propionske kisline so se po uživanju probiotika neznatno znižale, nato pa ob kontroli ponovno povišale.

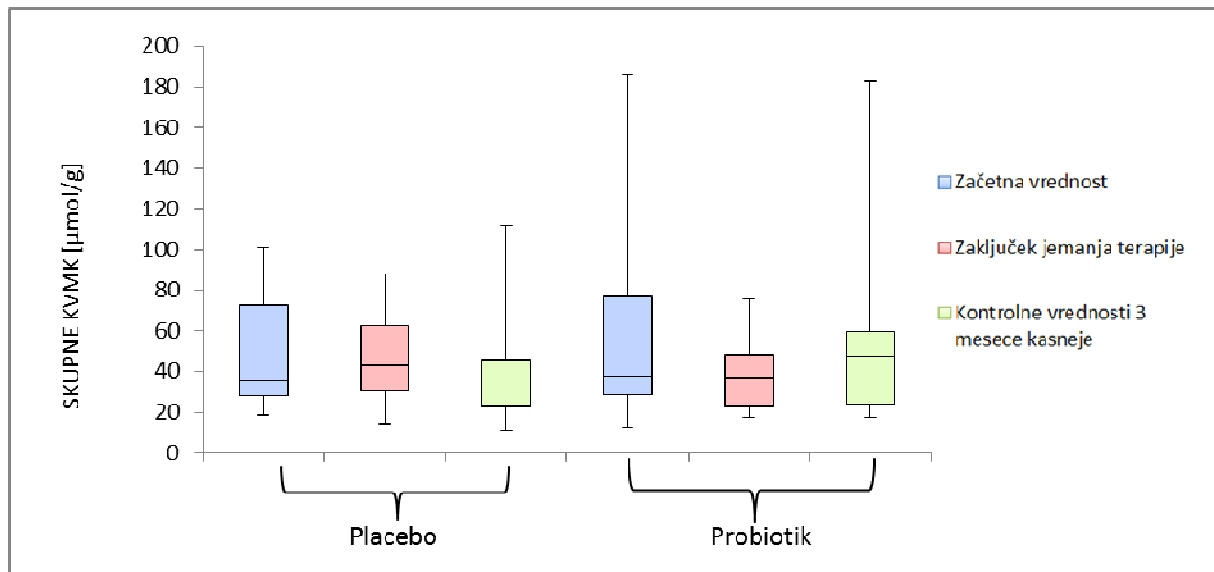
Graf 14: Spremembe vrednosti maslene kisline po uživanju probiotika oz. placeba pri otrocih s celiakijo na BGD.



Rezultati so prikazani kot mediane in IQR. Statistično značilnih razlik ni bilo.

Po uživanju probiotika pri otrocih s celiakijo na BGD je prišlo do neznačilnega znižanja srednje vrednosti in tretjega kvartila maslene kisline. Po koncu uživanja probiotika se je koncentracija maslene kisline ponovno neznačilno zvišala.

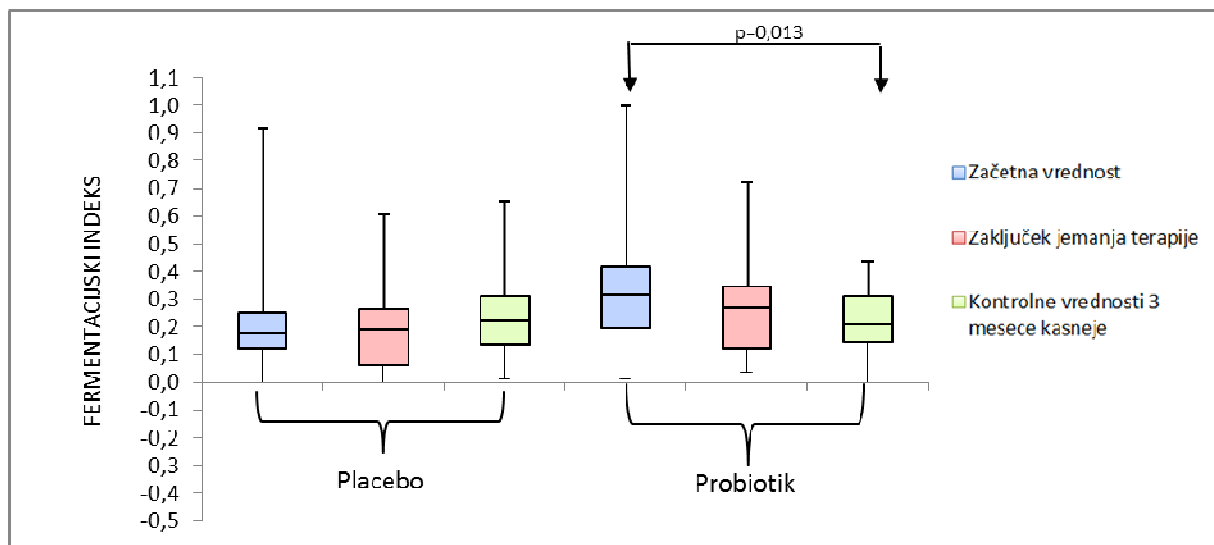
Graf 15: Spremembe skupne vrednosti KVMK po uživanju probiotika oz. placeba pri otrocih s celiakijo na BGD.



Rezultati so prikazani kot mediane in IQR. Statistično značilnih razlik ni bilo.

Po uživanju placeba pri otrocih s celiakijo na BGD se je srednja vrednost skupnih KVMK v blatu nekoliko dvignila. Po uživanju probiotika se je vrednost tretjega kvartila skupnih KVMK neznačilno znižala, ob kontroli pa ponovno povišala.

Graf 16: Spremembe vrednosti FI po uživanju probiotika oz. placeba pri otrocih s celiakijo na BGD.



Rezultati so prikazani kot mediane in IQR. Za dokazovanje statistično značilne razlike ($p < 0,05$) smo uporabili parni Wilcoxonov test predznačenih rangov.

Takoj po uživanju probiotika se je srednja vrednost FI pri otrocih s celiakijo na BGD neznačilno znižala. Dokazali smo značilno znižanje ($p = 0,013$) v FI med začetno in kontrolno (končno) vrednostjo 3 mesece po zaključku jemanju probiotika.

3.3.4. Spremembe vrednosti KVMK po uživanju probiotika/placeba glede na trajanje BGD

Podobno kot pri $TNF-\alpha$ smo pri KVMK naredili statistično analizo po uživanju probiotika/placeba pri otrocih glede na trajanje BGD (< 1 leto in > 1 leto). Ker pri tem nismo beležili statistično značilnih sprememb v vrednostih KVMK med posameznimi skupinami, rezultatov nismo predstavili v grafih.

3.3.5. Povezave med pozitivnimi serološkimi označevalci za celiakijo in KVMK

Ugotovili smo, da ne obstaja statistično značilna povezava med pozitivnimi serološkimi označevalci za celiakijo (EMA, tTG) in povišanimi ali znižanimi vrednostmi posameznih ali skupnih KVMK oz. FI. Tudi vrednosti TNF- α niso bile značilno povezane z vrednostmi KVMK.

4. DISKUSIJA

Do sedaj je bilo objavljenih malo kliničnih raziskav glede uporabe probiotikov pri otrocih s celiakijo. Cilj našega kliničnega preizkusa je bil ugotoviti vpliv jemanja *Bifidobacterium breve* BR03 in B632 (ob rednem zdravljenju z BGD) na imunski sistem bolnikov s preučevanjem ravni provnetnega citokina TNF- α in protivnetnega citokina IL-10 v serumu in ravni očetne, propionske in maslene kisline v blatu.

Za raziskavo smo izbrali seva *B.breve* BR03 in B632 na podlagi njunega dokazanega probiotičnega učinka v študijah *in vitro* (105, 107) in na podlagi kliničnega preizkusa (106), s katerimi so dokazali uspešno povečanje vrednosti bifidobakterij pri zdravih otrocih in zmanjšanje gramnegativnih bakterij v njihovem blatu. Neravnovesna črevesna mikrobiota (zmanjšan delež bifidobakterij in povišan delež gramnegativnih bakterij) je prisotna tako pri otrocih z na novo odkrito aktivno celiakijo kot pri otrocih z zdravljeno celiakijo na BGD (34–37).

Pri osebah s celiakijo izpostavljenost glutenu sproži tvorbo provnetnih in protivnetnih citokinov (11, 13). V raziskavi smo ugotavljali neznačilno višje začetne vrednosti citokina TNF- α pri otrocih z na novo odkrito celiakijo v primerjavi z zdravimi otroki. Pri otrocih s celiakijo, ki so bili na BGD vsaj 6 mesecev, so bile vrednosti TNF- α primerljive z vrednostmi pri zdravih otrocih. Raven protivnetnega citokina IL-10 je bila pri večini otrok v vseh skupinah pod nivojem kvantifikacije (5 pg/ml). Manavalan (16) je pri otrocih z aktivno celiakijo ugotavljal višje vrednosti TNF- α in IL-10 v primerjavi s kontrolami. Sicer je tudi Kekkonen s sodelavci (115) v klinični raziskavi pri zdravih odraslih ugotavljal, da je samo 39 % vzorcev v serumu vsebovalo IL-10 pri ravni kvantifikacije 0,78 pg/ml.

Ko smo za namene statistične analize primerjali začetne vrednosti TNF- α glede na trajanje BGD (BGD manj kot 1 leto in BGD več kot 1 leto), pri otrocih s celiakijo nismo našli značilnih sprememb. Nasprotno, Manavalan in sodelavci (16) so našli značilno manjše vrednosti nekaterih provnetnih in protivnetnih citokinov pri otrocih s celiakijo na BGD manj kot 1 leto v primerjavi z otroki na BGD več kot 1 leto. Rezultati naše primerjave glede na trajanje BGD so statistično šibki zaradi majhnega vzorca otrok s celiakijo na BGD manj kot 1 leto ($n = 9$) v primerjavi z otroki s celiakijo na BGD več kot 1 leto ($n = 37$).

Zanimiva je tudi značilna razlika začetnih vrednosti TNF- α pri otrocih s celiakijo na BGD, ki so kasneje uživali probiotik, in skupini, ki je uživala placebo. Ti otroci bi morali imeti primerljive vrednosti, saj so bili vsi v povprečju enako dolgo na BGD in randomizirani v obe skupini s pomočjo računalniškega zaporedja. V obeh skupinah je bilo tudi podobno število otrok na BGD < 1 leto (5 otrok je bilo v skupini, ki je prejela probiotik, in 4 otroci so bili v skupini, ki je prejela placebo). Dosledno držanje BGD smo preverjali z anamnezo, ki je večkrat nezanesljiva, in z bolj specifičnimi serološkimi testi (EMA, tTG). Na podlagi pozitivnih seroloških testov in anamneze smo izračunali komplanco za BGD v obeh skupinah otrok. Le-ta je bila v skupini, ki je prejela placebo, 80 %, otroci iz te skupine pa so imeli značilno nižje začetne vrednosti TNF- α kot tisti iz skupine, ki je prejela probiotik – komplanca je bila tukaj 91 %. Rezultati naše študije niso pokazali povezave med pozitivnimi serološkimi testi za celiakijo in vrednostjo citokinov TNF- α in IL-10. Manavalan (16) je našel značilno povezavo med ravnjo tTG in ravnjo provnetnih in protivnetnih citokinov (IL-10, IL-4 in IL-1 α , IL-1 β ter IL-8) v serumu z izjemo TNF- α in INF- γ . Nasprotno pa je Mysliwiec (116) našel značilno povezavo med vrednostmi tTG in TNF- α .

Eden izmed glavnih namenov naše študije je bil ugotoviti vpliv izbranih probiotičnih sevov *B.breve* BR03 in B632 (v nadaljevanju probiotika) na raven citokinov TNF- α in IL-10. Ugotovili smo, da se je pri otrocih s celiakijo, ki so bili na BGD vsaj 6 mesecev, po uživanju probiotika značilno znižala raven provnetnega citokina TNF- α . Pri otrocih s celiakijo na BGD, ki so uživali placebo, ni prišlo do značilnih sprememb ravni citokina TNF- α . 3 mesece po koncu uživanja probiotika smo ugotavljali statistično pomemben ponovni porast TNF- α . Nasprotno Smecuol (111) v kliničnem preizkusu na odraslih osebah z aktivno celiakijo ni ugotavljal vpliva uživanja probiotičnega seva *Bifidobacterium infantis* na TNF- α . Olivares (112) je podobno kot v naši študiji preučeval vpliv 3 mesečnega uživanja *Bifidobacterium longum* pri otrocih s celiakijo na BGD in ob tem ugotovil neznačilno znižanje TNF- α po uživanju probiotika.

Citokin TNF- α je odgovoren za poškodbo črevesne mukoze pri celiakiji in je vnetni mediator v mnogo različnih celicah po celem telesu (117). Tako predvidevamo, da znižanje tega provnetnega citokina lahko zmanjša črevesne in sistemske zaplete bolezni. Določanje serumske koncentracije citokinov ima dve pomembni omejitvi. Veliko citokinov kroži v obliki proteinov, vezanih na topne receptorje, prenašalne proteine ali zaviralce, zaradi česar se lahko prikazuje lažno nižja raven citokinov v serumu. Tudi sočasni vnetni proces iz drugega vzroka lahko poviša serumsko raven določenih citokinov. Znižanje serumskega citokina TNF- α po uživanju probiotika nakazuje, da zgoraj navedene trditve ne vplivajo bistveno na meritve citokina TNF- α (118).

Za preučevanje presnovne aktivnosti črevesne flore smo v naši študiji analizirali profil KVMK. Le-te nastanejo z bakterijsko fermentacijo nerazgradljive hrane v črevesju. Naša študija je pokazala, da imajo otroci z aktivno celiakijo značilno več očetne in propionske

kislina in skoraj značilno več skupnih KVMK v primerjavi z zdravimi otroki. Najvišje srednje vrednosti vseh KVMK so imeli otroci z aktivno celiakijo, sledili so otroci na BGD in najmanj so jih imeli zdravi otroci. Tudi Tjellström s sodelavci (74) je ugotavljal značilno višje vrednosti očetne kisline in skupnega števila KVMK pri otrocih z aktivno celiakijo in celiakijo na BGD manj kot 1 leto v primerjavi z zdravimi otroki. Ugotovili smo tudi, da imajo otroci, ki so na BGD več kot 6 mesecev, značilno več propionske kisline kot zdravi otroci. Nasprotno pa je Tjellström (74) dokazal, da imajo otroci s celiakijo na BGD več kot 1 leto enako raven tako skupnih kot tudi posameznih KVMK.

Kot je predlagal Tjellström (74), smo izračunali tudi FI, ki bi naj ponazarjal vnetni količnik KVMK. Presenetljivo smo v naši študiji ugotavljali neznačilno nižji FI, ki ponazarja visoko protivnetno aktivnost pri otrocih z na novo odkrito celiakijo v primerjavi z otroki s celiakijo na BGD in zdravimi kontrolami. Tjellström je v študiji na sicer večjem vzorcu otrok z na novo odkrito celiakijo ugotavljal prav nasprotno. Pri otrocih z aktivno celiakijo in celiakijo na BGD manj kot 1 leto je ugotavljal višji FI v primerjavi z zdravimi kontrolami in otroki s celiakijo na BGD več kot 1 leto (47, 74). Tudi mi smo ugotavljali višji FI pri otroci s celiakijo na BGD manj kot 1 leto v primerjavi z otroki na BGD več kot 1 leto. Statistična moč naše primerjave otrok je zaradi velike razlike v številu med skupino na novo okritih otrok z aktivno celiakijo ($n = 8$), skupino otrok s celiakijo na BGD manj kot 1 leto ($n = 9$) in skupino otrok s celiakijo na BGD več kot 1 leto ($n = 37$) je šibka. Za boljšo oceno razlik med skupinami otrok glede na BGD bi potrebovali večji vzorec otrok z aktivno celiakijo in celiakijo na BGD manj kot 1 leto. Po pregledu literature smo ugotovili, da na novo opredeljenega FI, ki bi naj kazal vnetno aktivnost KVMK, razen Tjellströma do sedaj ni uporabil nihče drug.

Ugotavljali smo tudi vpliv izbranega probiotika na raven očetne, propionske in maslene kisline v blatu pri otrocih s celiakijo na BGD. Po uživanju probiotika nismo ugotovili statistično značilnih razlik na ravni očetne, propionske in maslene kisline glede na začetne vrednosti. Po uživanju probiotika pri otrocih s celiakijo na BGD je prišlo neznačilnega znižanja srednje vrednosti maslene kisline v blatu. Ta ugotovitev je nasprotna z našo hipotezo, da po uživanju probiotika pride do povišanja maslene kisline v blatu. Naša hipoteza je bila osnovana na razmišljanju, da naš izbrani probiotik deluje protivnetno in posledično zvišuje raven maslene kisline v blatu, saj je bila slednja spoznana kot protivnetna KVMK v mnogih *in vitro* študijah (51, 65–67). Naši rezultati so skladni Wangovo študijo (119), ki je dokazala znižanje maslene kisline v blatu po štiritedenskem uživanju *B.breve* pri nedonošenčkih s porodno težo, nižjo od 1500 g. Hkrati so v študiji ugotavljali tudi zmanjšanje pojavnosti nekrozantnega enterokolitisa pri zelo nezrelih novorojenčkih. Ti nasprotujoči si rezultati kažejo na to, da KVMK uravnavajo vnetne odgovore samo v določenih bolezenskih stanjih, pri nekaterih omilijo vnetje, pri drugih ga poslabšajo (64). Do sedaj je bilo opravljenih malo kliničnih raziskav, ki bi opredelile pomen posameznih KVMK za imunski sistem pri različnih boleznih (59).

Po uživanju probiotika pri otrocih s celiakijo na BGD je prišlo do neznačilnega znižanja FI, kar nakazuje, da je imel probiotik vpliv na zmanjšanje vnetnega količnika KVMK. Zanimivo se je FI po koncu uživanja probiotika še znižal. Namreč, razlika med začetno in končno vrednostjo (3 mesece po koncu jemanja probiotika) FI je bila statistično značilna. Vrednosti TNF- α so se po uživanju probiotika značilno znižale in nasprotno so se vrednosti TNF- α 3 mesece po koncu uživanja probiotika ponovno značilno povišale.

Sestava KVMK v fecesu kaže na zapleteno interakcijo med gostiteljem, prehrano in mikrobi. Na količino KVMK v blatu vpliva ravnovesje med produkcijo in absorpcijo KVMK, tip črevesne mikrobiote, količina in vrsta hranil za fermentacijo in črevesni tranzitni čas (72). Za nezdravljeno celiakijo sta značilni vilusna atrofija in zmanjšana kapaciteta za absorpcijo hranilnih snovi, kar poveča količino hranil za fermentacijo v debelem črevesu in nastanek KVMK (120). To lahko pojasni višjo raven KVMK v blatu otrok z nezdravljeno aktivno celiakijo, kar sta potrdili tudi študiji Kopeknyja (121) in Tjellströma (74).

Pri otrocih s celiakijo na BGD vsaj 6 mesecev (povprečno je BGD trajala 6,4 leta) smo opazili nižje vrednosti KVMK kot pri nezdravljeni aktivni celiakiji, kar kaže na zacelitev mukoze tankega črevesa. Vpliv BGD na količino KVMK ni povsem jasen. Tudi BGD naj bi vplivala na znižanje KVMK, saj se s takšno dieto zaužije manj neškrobnih polisaharidov, ki predstavljajo glavni vir za nastanek KVMK (122). Caminero s sodelavci (123) je objavil analizo KVMK v blatu pri zdravih odraslih, ki so uživali običajno glutensko prehrano, po obdobju na BGD in dieti z različnimi količinami glutena. Raven KVMK se pri osebah, ki so uživale običajno prehrano, in osebah na BGD ni razlikovala. Do značilnih sprememb v količini KVMK je prišlo samo po uživanju nefiziološko velikih količin glutena (30 g/dan). V naši študiji smo ugotavljali značilno višje vrednosti propionske kisline pri otrocih s celiakijo na BGD v primerjavi z zdravimi otroki, kar lahko nakazuje na še spremenjeno črevesno floro pri otrocih s celiakijo na BGD. Nasprotno je Tjellström pri otrocih s celiakijo po 1 letu BGD ugotavljal normalizacijo KVMK (74). Prav tako so se po 1 letu na BGD normalizirali določeni, s črevesno floro povezani, presnovki (aminokislina, lipidi, piruvat, holin, glukoza ...) v serumu in urinu (124).

Da bi lahko zanesljiveje potrdili pozitiven vpliv določenega probiotika na črevesni in sistemski ravni pri osebah s celiakijo, bi morali v prihodnje testirati več parametrov, in sicer črevesno mikrobioto iz blata, imunski fenotip celic iz periferne krvi, serumsko koncentracijo različnih proinflammatoryh in protivnetnih citokinov, imunoglobuline A v črevesju, spremembe na ravni sluznice tankega črevesja z biopsijo in določitev intraepitelnih limfocitov (112). Vloga KVMK ostaja zaenkrat še nejasna. Zlati standard ugotavljanja aktivnosti bolezni predstavlja še vedno biopsija tankega črevesa. Ta metoda je invazivna in predraga za namene kliničnih raziskav in ponavadi se starši in otroci z njo ne strinjajo. Našo raziskavo bi lahko izboljšali tudi z vpeljavo prehranskega dnevnika pri otrocih s celiakijo, s čimer bi (v sodelovanju s kliničnim dietetikom) ugotavljali doslednost in sestavo BGD. Prav tako bi lahko vključili vprašalnik kliničnih simptomov pred in po jemanju probiotika. Sicer smo iz pogovora s starši izvedeli, da so otroci s celiakijo, ki so jemali probiotik, imeli manj okužb dihal v zimskem času v primerjavi s preteklo sezono. To posredno kaže na delovanje izbranega probiotika tudi na zmanjšanje pojavnosti in trajanje okužb dihal, kar je bilo v mnogih kliničnih raziskavah tudi potrjeno (125, 126).

4.1. Potrditev oziroma zavrnitev tez doktorske disertacije

Na podlagi naše študije smo **POTRDILI** hipotezo, ki trdi, da uživanje izbranega probiotika zniža proinflammatory citokin TNF- α pri otrocih s celiakijo na BGD. Hipotezo, da uživanje izbranega probiotika poviša protivnetni citokin IL-10, nismo mogli preveriti, saj je bila raven protivnetnega citokina IL-10 pri večini otrok pod nivojem kvantifikacije. Hipoteze prav tako nismo mogli potrditi v skupini otrok z aktivno celiakijo, saj smo v času trajanja študije zbrali premajhen vzorec otrok iz te skupine, ki so uživali izbrani probiotik oz. placebo.

Hipotezo, da se fermentacijski indeks KVMK po uživanju izbranega probiotika pri otrocih s celiakijo na BGD zniža, smo **POTRDILI**. Pri otrocih s celiakijo na BGD smo dokazali značilno znižanje fermentacijskega indeksa, ki je trajalo še 3 mesece po zaključku terapije z izbranimi probiotičnimi sevi.

Hipotezo, da uživanje izbranega probiotika poviša raven maslene kisline v blatu pri otrocih z aktivno celiakijo in s celiakijo na BGD, smo **OVRGLI**. Dokazali smo nasprotno, saj pride po jemanju *B. breve* BR03 in B632 v skupini otrok s celiakijo na BGD do neznačilnega znižanja maslene kisline.

5. SKLEP

Številne novejšje raziskave izpostavljajo pomen uravnovešene črevesne mikrobiote za zdravje človeka. Pri otrocih in odraslih s celiakijo je bila ugotovljena neravnovesna črevesna mikrobiota, ki prispeva k patogenezi bolezni. BGD je temelj zdravljenja celiakije, saj vpliva na normalizacijo histoloških sprememb sluznice tankega črevesa. Tudi po uvedbi BGD je črevesna flora ob zmanjšanem deležu bifidobakterij še vedno v neravnovesju, dolgoročno je pri 40–50 % (bolnikov s celiakijo) prisotno vnetje, kar lahko vodi v številne zaplete bolezni. Določene vrste bifidobakterij so bile v *in vitro* študijah spoznane za protivnetne.

S klinično raziskavo smo dokazali, da delujeta izbrana probiotična seva *Bifidobacterium breve* BR03 in B632 protivnetno, saj so se vrednosti TNF- α v serumu po njenem jemanju značilno znižale in nakazano se je znižal FI, ki ponazarja aktivnost kroničnega, s črevesno floro povezanega vnetja. Vsekakor bodo potrebne dodatne *in vitro* raziskave in randomizirane klinične raziskave z uporabo probiotikov na večjem vzorcu otrok s celiakijo.

6. LITERATURA IN VIRI

1. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2012; 54(1): 136–60.
2. Catassi C, Gatti S, Fasano A. The new epidemiology of celiac disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2014; 59 Suppl 1: S7–9.
3. Ludvigsson JF, Green PHR. The missing environmental factor in celiac disease. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371(14): 1341–3.
4. Garampazzi A, Rapa A, Mura S, Capelli A, Valori A, Boldorini R, et al. Clinical pattern of celiac disease is still changing. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2007; 45(5): 611–4.
5. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. *Arch. Dis. Child.* 1990; 65(8): 909–11.
6. de Sousa Moraes LF, Grzeskowiak LM, de Sales Teixeira TF, Gouveia Peluzio M do C. Intestinal microbiota and probiotics in celiac disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014; 27(3): 482–9.
7. Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M, et al. The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut.* 2002; 50(5): 624–8.
8. Nisticò L, Fagnani C, Coto I, Percopo S, Cotichini R, Limongelli MG, et al. Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. *Gut.* 2006; 55(6): 803–8.
9. Trynka G, Wijmenga C, van Heel DA. A genetic perspective on coeliac disease. *Trends Mol. Med.* 2010; 16(11): 537–50.
10. van Heel DA, Franke L, Hunt KA, Gwilliam R, Zhernakova A, Inouye M, et al. A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat. Genet.* 2007; 39(7): 827–9.
11. Meresse B, Ripoche J, Heyman M, Cerf-Bensussan N. Celiac disease: from oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis. *Mucosal Immunol.* 2009; 2(1): 8–23.
12. Gianfrani C, Auricchio S, Troncone R. Adaptive and innate immune responses in celiac disease. *Immunol. Lett.* 2005; 99(2): 141–5.
13. Cinova J, Palová-Jelínková L, Smythies LE, Cerná M, Pecharová B, Dvorák M, et al. Gliadin peptides activate blood monocytes from patients with celiac disease. *J. Clin. Immunol.* 2007; 27(2): 201–9.
14. Lionetti E, Catassi C. New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *Int. Rev. Immunol.* 2011; 30(4): 219–31.

15. Schuppan D, Zimmer K-P. The Diagnosis and Treatment of Celiac Disease. *Dtsch. Arztebl. Int.* 2013; 110(49): 835–46.
16. Manavalan JS, Hernandez L, Shah JG, Konikkara J, Naiyer AJ, Lee AR, et al. Serum cytokine elevations in celiac disease: association with disease presentation. *Hum. Immunol.* 2010; 71(1): 50–7.
17. Cataldo F, Lio D, Marino V, Scola L, Crivello A, Corazza GR, et al. Plasma cytokine profiles in patients with celiac disease and selective IgA deficiency. *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.* 2003; 14(4): 320–4.
18. Lahat N, Shapiro S, Karban A, Gerstein R, Kinary A, Lerner A. Cytokine profile in coeliac disease. *Scand. J. Immunol.* 1999; 49(4): 441–6.
19. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 1991; 146(10): 3444–51.
20. Björck S, Lindehammer SR, Fex M, Agardh D. Serum cytokine pattern in young children with screening detected celiac disease. *Clin. Exp. Immunol.* 2014; .
21. Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Corazza GR. The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clin. Exp. Immunol.* 2005; 140(3): 408–16.
22. Silano M, Vincentini O, De Vincenzi M. Toxic, immunostimulatory and antagonist gluten peptides in celiac disease. *Curr. Med. Chem.* 2009; 16(12): 1489–98.
23. Catassi C, Kryszak D, Bhatti B, Sturgeon C, Helzlsouer K, Clipp SL, et al. Natural history of celiac disease autoimmunity in a USA cohort followed since 1974. *Ann. Med.* 2010; 42(7): 530–8.
24. Olivares M, Neef A, Castillejo G, Palma GD, Varea V, Capilla A, et al. The HLA-DQ2 genotype selects for early intestinal microbiota composition in infants at high risk of developing coeliac disease. *Gut.* 2014; .
25. Sandberg-Bennich S, Dahlquist G, Källén B. Coeliac disease is associated with intrauterine growth and neonatal infections. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992. 2002; 91(1): 30–3.
26. Stene LC, Honeyman MC, Hoffenberg EJ, Haas JE, Sokol RJ, Emery L, et al. Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *Am. J. Gastroenterol.* 2006; 101(10): 2333–40.
27. Jabri B, Sollid LM. Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9(12): 858–70.
28. Plot L, Amital H. Infectious associations of Celiac disease. *Autoimmun. Rev.* 2009; 8(4): 316–9.
29. Ivarsson A, Hernell O, Nyström L, Persson LA. Children born in the summer have increased risk for coeliac disease. *J. Epidemiol. Community Health.* 2003; 57(1): 36–9.

30. Collado MC, Isolauri E, Salminen S, Sanz Y. The impact of probiotic on gut health. *Curr. Drug Metab.* 2009; 10(1): 68–78.
31. Cheng J, Kalliomäki M, Heilig HGJ, Palva A, Lähteenoja H, de Vos WM, et al. Duodenal microbiota composition and mucosal homeostasis in pediatric celiac disease. *BMC Gastroenterol.* 2013; 13: 113.
32. Vieira AT, Teixeira MM, Martins FS. The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. *Front. Immunol.* 2013; 4: 445.
33. Toft-Hansen H, Nielsen C, Biagini M, Husby S, Lillevang ST. Lectin staining shows no evidence of involvement of glycocalyx/mucous layer carbohydrate structures in development of celiac disease. *Nutrients.* 2013; 5(11): 4540–52.
34. Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *J. Clin. Pathol.* 2009; 62(3): 264–9.
35. Nadal I, Donat E, Donant E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *J. Med. Microbiol.* 2007; 56(Pt 12): 1669–74.
36. Sánchez E, Donat E, Ribes-Koninckx C, Fernández-Murga ML, Sanz Y. Duodenal-mucosal bacteria associated with celiac disease in children. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(18): 5472–9.
37. Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Imbalances in faecal and duodenal Bifidobacterium species composition in active and non-active coeliac disease. *BMC Microbiol.* 2008; 8: 232.
38. Di Cagno R, De Angelis M, De Pasquale I, Ndagijimana M, Vernocchi P, Ricciuti P, et al. Duodenal and faecal microbiota of celiac children: molecular, phenotype and metabolome characterization. *BMC Microbiol.* 2011; 11: 219.
39. Wacklin P, Kaukinen K, Tuovinen E, Collin P, Lindfors K, Partanen J, et al. The duodenal microbiota composition of adult celiac disease patients is associated with the clinical manifestation of the disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2013; 19(5): 934–41.
40. Medina M, De Palma G, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Bifidobacterium strains suppress in vitro the pro-inflammatory milieu triggered by the large intestinal microbiota of coeliac patients. *J. Inflamm. Lond. Engl.* 2008; 5: 19.
41. De Palma G, Nadal I, Medina M, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, et al. Intestinal dysbiosis and reduced immunoglobulin-coated bacteria associated with coeliac disease in children. *BMC Microbiol.* 2010; 10: 63.
42. Cinova J, De Palma G, Stepankova R, Kofronova O, Kverka M, Sanz Y, et al. Role of intestinal bacteria in gliadin-induced changes in intestinal mucosa: study in germ-free rats. *PloS One.* 2011; 6(1): e16169.

43. De Palma G, Nadal I, Collado MC, Sanz Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. *Br. J. Nutr.* 2009; 102(8): 1154–60.
44. de Graaf AA, Venema K. Gaining insight into microbial physiology in the large intestine: a special role for stable isotopes. *Adv. Microb. Physiol.* 2008; 53: 73–168.
45. Brottveit M, Beitnes A-CR, Tollefsen S, Bratlie JE, Jahnsen FL, Johansen F-E, et al. Mucosal cytokine response after short-term gluten challenge in celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. *Am. J. Gastroenterol.* 2013; 108(5): 842–50.
46. Sanz Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult humans. *Gut Microbes.* 2010; 1(3): 135–7.
47. Tjellström B, Stenhammar L, Högberg L, Fälth-Magnusson K, Magnusson K-E, Midtvedt T, et al. Gut microflora associated characteristics in children with celiac disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2005; 100(12): 2784–8.
48. Midtvedt T, Bjørneklett A, Carlstedt-Duke B, Gustafsson BE, Høverstad T, Lingaas E, et al. The influence of antibiotics upon microflora-associated characteristics in man and mammals. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1985; 181: 241–4.
49. Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu. Rev. Nutr.* 2002; 22: 283–307.
50. Tan J, McKenzie C, Potamitis M, Thorburn AN, Mackay CR, Macia L. The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv. Immunol.* 2014; 121: 91–119.
51. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer R-J. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2008; 27(2): 104–19.
52. Høverstad T, Midtvedt T. Short-chain fatty acids in germfree mice and rats. *J. Nutr.* 1986; 116(9): 1772–6.
53. Wong JMW, de Souza R, Kendall CWC, Emam A, Jenkins DJA. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J. Clin. Gastroenterol.* 2006; 40(3): 235–43.
54. Tazoe H, Otomo Y, Kaji I, Tanaka R, Karaki S-I, Kuwahara A. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 2008; 59 Suppl 2: 251–62.
55. Pomare EW, Branch WJ, Cummings JH. Carbohydrate fermentation in the human colon and its relation to acetate concentrations in venous blood. *J. Clin. Invest.* 1985; 75(5): 1448–54.
56. Bird AR, Hayakawa T, Marsono Y, Gooden JM, Record IR, Correll RL, et al. Coarse brown rice increases fecal and large bowel short-chain fatty acids and starch but lowers calcium in the large bowel of pigs. *J. Nutr.* 2000; 130(7): 1780–7.
57. Bergman EN. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.* 1990; 70(2): 567–90.

58. Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol. Rev.* 2001; 81(3): 1031–64.
59. Kim CH, Park J, Kim M. Gut microbiota-derived short-chain Fatty acids, T cells, and inflammation. *Immune Netw.* 2014; 14(6): 277–88.
60. Alva-Murillo N, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE. Short chain fatty acids (propionic and hexanoic) decrease *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells and modulate antimicrobial peptide expression. *Vet. Microbiol.* 2012; 155(2-4): 324–31.
61. Hijova E, Chmelarova A. Short chain fatty acids and colonic health. *Bratisl. Lekárske Listy.* 2007; 108(8): 354–8.
62. Nastasi C, Candela M, Bonefeld CM, Geisler C, Hansen M, Krejsgaard T, et al. The effect of short-chain fatty acids on human monocyte-derived dendritic cells. *Sci. Rep.* 2015; 5: 16148.
63. Cox MA, Jackson J, Stanton M, Rojas-Triana A, Bober L, Lavery M, et al. Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E(2) and cytokines. *World J. Gastroenterol. WJG.* 2009; 15(44): 5549–57.
64. Vinolo MAR, Rodrigues HG, Nachbar RT, Curi R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients.* 2011; 3(10): 858–76.
65. Vieira ELM, Leonel AJ, Sad AP, Beltrão NRM, Costa TF, Ferreira TMR, et al. Oral administration of sodium butyrate attenuates inflammation and mucosal lesion in experimental acute ulcerative colitis. *J. Nutr. Biochem.* 2012; 23(5): 430–6.
66. Cavaglieri CR, Nishiyama A, Fernandes LC, Curi R, Miles EA, Calder PC. Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. *Life Sci.* 2003; 73(13): 1683–90.
67. Zhang L-T, Yao Y-M, Lu J-Q, Yan X-J, Yu Y, Sheng Z-Y. Sodium butyrate prevents lethality of severe sepsis in rats. *Shock Augusta Ga.* 2007; 27(6): 672–7.
68. Scheiwiller J, Arrigoni E, Brouns F, Amadò R. Human faecal microbiota develops the ability to degrade type 3 resistant starch during weaning. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2006; 43(5): 584–91.
69. Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature.* 2011; 469(7331): 543–7.
70. Ye H, Liu J, Feng P, Zhu W, Mao S. Grain-rich diets altered the colonic fermentation and mucosa-associated bacterial communities and induced mucosal injuries in goats. *Sci. Rep.* 2016; 6: 20329.
71. Nafday SM, Chen W, Peng L, Babyatsky MW, Holzman IR, Lin J. Short-chain fatty acids induce colonic mucosal injury in rats with various postnatal ages. *Pediatr. Res.* 2005; 57(2): 201–4.

72. Al-Lahham SH, Peppelenbosch MP, Roelofsen H, Vonk RJ, Venema K. Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010; 1801(11): 1175–83.
73. Lawhon SD, Maurer R, Suyemoto M, Altier C. Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol. Microbiol.* 2002; 46(5): 1451–64.
74. Tjellström B, Högberg L, Stenhammar L, Fälth-Magnusson K, Magnusson K-E, Norin E, et al. Faecal short-chain fatty acid pattern in childhood coeliac disease is normalised after more than one year's gluten-free diet. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2013; 24.
75. Tjellström B, Stenhammar L, Högberg L, Fälth-Magnusson K, Magnusson K-E, Midtvedt T, et al. Gut microflora associated characteristics in first-degree relatives of children with celiac disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 2007; 42(10): 1204–8.
76. Tjellström B, Högberg L, Stenhammar L, Magnusson K-E, Midtvedt T, Norin E, et al. Effect of exclusive enteral nutrition on gut microflora function in children with Crohn's disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 2012; 47(12): 1454–9.
77. James SP. Prototypic disorders of gastrointestinal mucosal immune function: Celiac disease and Crohn's disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115(1): 25–30.
78. Lauret E, Rodrigo L. Celiac disease and autoimmune-associated conditions. *BioMed Res. Int.* 2013; 2013: 127589.
79. Hall NJ, Rubin G, Charnock A. Systematic review: adherence to a gluten-free diet in adult patients with coeliac disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2009; 30(4): 315–30.
80. Kaukinen K, Peräaho M, Lindfors K, Partanen J, Woolley N, Pikkarainen P, et al. Persistent small bowel mucosal villous atrophy without symptoms in coeliac disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2007; 25(10): 1237–45.
81. Ghazzawi Y, Rubio-Tapia A, Murray JA, Absah I. Mucosal healing in children with treated celiac disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2014; 59(2): 229–31.
82. Galli G, Esposito G, Lahner E, Piloizzi E, Corleto VD, Di Giulio E, et al. Histological recovery and gluten-free diet adherence: a prospective 1-year follow-up study of adult patients with coeliac disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2014; 40(6): 639–47.
83. Tuire I, Marja-Leena L, Teea S, Katri H, Jukka P, Päivi S, et al. Persistent duodenal intraepithelial lymphocytosis despite a long-term strict gluten-free diet in celiac disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2012; 107(10): 1563–9.
84. Kaukinen K, Lindfors K, Mäki M. Advances in the treatment of coeliac disease: an immunopathogenic perspective. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2014; 11(1): 36–44.
85. McAllister CS, Kagnoff MF. The immunopathogenesis of celiac disease reveals possible therapies beyond the gluten-free diet. *Semin. Immunopathol.* 2012; 34(4): 581–600.

86. Rashtak S, Murray JA. Review article: coeliac disease, new approaches to therapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2012; 35(7): 768–81.
87. Bakshi A, Stephen S, Borum ML, Doman DB. Emerging therapeutic options for celiac disease: potential alternatives to a gluten-free diet. *Gastroenterol. Hepatol.* 2012; 8(9): 582–8.
88. Tavakkoli A, Green PH. Probiotic therapy for celiac disease. *J. Clin. Gastroenterol.* 2013; 47(2): 101–3.
89. Vécsei E, Steinwendner S, Kogler H, Innerhofer A, Hammer K, Haas OA, et al. Follow-up of pediatric celiac disease: value of antibodies in predicting mucosal healing, a prospective cohort study. *BMC Gastroenterol.* 2014; 14: 28.
90. Bannister EG, Cameron DJ, Ng J, Chow CW, Oliver MR, Alex G, et al. Can celiac serology alone be used as a marker of duodenal mucosal recovery in children with celiac disease on a gluten-free diet? *Am. J. Gastroenterol.* 2014; 109(9): 1478–83.
91. Mäki M. Celiac disease treatment: gluten-free diet and beyond. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2014; 59 Suppl 1: S15–7.
92. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food (Report of a Joint FAO/WHO Working group on Drafting Guidelines) Dosegljivo 16. 1. 2016 s spletne strani: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf?ua=1
93. Rijkers GT, Bengmark S, Enck P, Haller D, Herz U, Kalliomaki M, et al. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: current status and recommendations for future research. *J. Nutr.* 2010; 140(3): 671S – 6S.
94. Vanderpool C, Yan F, Polk DB. Mechanisms of probiotic action: Implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 2008; 14(11): 1585–96.
95. Kverka M, Tlaskalova-Hogenova H. Two faces of microbiota in inflammatory and autoimmune diseases: triggers and drugs. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 2013; 121(5): 403–21.
96. Generally Recognized as Safe (GRAS). Dosegljivo 16. 1. 2016 s spletne strani: <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/>
97. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). Dosegljivo 16. 1. 2016 s spletne strani: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/3449.pdf
98. Vandenas Y, De Greef E, Devreker T, Veereman-Wauters G, Hauser B. Probiotics and prebiotics in infants and children. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 2013; 15(3): 251–62.
99. Mičetić-Turk D., Šikić-Pogačar M. Klinična uporaba probiotikov v pediatriji. *Zdrav Vestn* 2011; 80:933-43

100. De Palma G, Cinova J, Stepankova R, Tuckova L, Sanz Y. Pivotal Advance: Bifidobacteria and Gram-negative bacteria differentially influence immune responses in the proinflammatory milieu of celiac disease. *J. Leukoc. Biol.* 2010; 87(5): 765–78.
101. Laparra JM, Sanz Y. Bifidobacteria inhibit the inflammatory response induced by gliadins in intestinal epithelial cells via modifications of toxic peptide generation during digestion. *J. Cell. Biochem.* 2010; 109(4): 801–7.
102. López P, Gueimonde M, Margolles A, Suárez A. Distinct Bifidobacterium strains drive different immune responses in vitro. *Int. J. Food Microbiol.* 2010; 138(1-2): 157–65.
103. He F, Morita H, Ouwehand AC, Hosoda M, Hiramatsu M, Kurisaki J, et al. Stimulation of the secretion of pro-inflammatory cytokines by Bifidobacterium strains. *Microbiol. Immunol.* 2002; 46(11): 781–5.
104. D'Arienzo R, Maurano F, Lavermicocca P, Ricca E, Rossi M. Modulation of the immune response by probiotic strains in a mouse model of gluten sensitivity. *Cytokine.* 2009; 48(3): 254–9.
105. Aloisio I, Santini C, Biavati B, Dinelli G, Cencič A, Chingwaru W, et al. Characterization of Bifidobacterium spp. strains for the treatment of enteric disorders in newborns. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012; 96(6): 1561–76.
106. Mogna L, Del Piano M, Mogna G. Capability of the Two Microorganisms Bifidobacterium breve B632 and Bifidobacterium breve BR03 to Colonize the Intestinal Microbiota of Children. *J. Clin. Gastroenterol.* 2014; 48 Suppl 1: S37–9.
107. Simone M, Gozzoli C, Quartieri A, Mazzola G, Di Gioia D, Amaretti A, et al. The probiotic Bifidobacterium breve B632 inhibited the growth of Enterobacteriaceae within colicky infant microbiota cultures. *BioMed Res. Int.* 2014; 2014: 301053.
108. Jeon SG, Kayama H, Ueda Y, Takahashi T, Asahara T, Tsuji H, et al. Probiotic Bifidobacterium breve induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon. *PLoS Pathog.* 2012; 8(5): e1002714.
109. Zheng B, van Bergenhenegouwen J, Overbeek S, van de Kant HJG, Garssen J, Folkerts G, et al. Bifidobacterium breve attenuates murine dextran sodium sulfate-induced colitis and increases regulatory T cell responses. *PloS One.* 2014; 9(5): e95441.
110. Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, Yonezawa T, Kimura T. Reduced expression of the regulatory CD4+ T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43(3): 617–27.
111. Smecuol E, Hwang HJ, Sugai E, Corso L, Chernavsky AC, Bellavite FP, et al. Exploratory, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the effects of Bifidobacterium infantis naten life start strain super strain in active celiac disease. *J. Clin. Gastroenterol.* 2013; 47(2): 139–47.
112. Olivares M, Castillejo G, Varea V, Sanz Y. Double-blind, randomised, placebo-controlled intervention trial to evaluate the effects of Bifidobacterium longum CECT 7347 in children with newly diagnosed coeliac disease. *Br. J. Nutr.* 2014; 112(1): 30–40.

113. Laparra JM, Olivares M, Gallina O, Sanz Y. *Bifidobacterium longum* CECT 7347 modulates immune responses in a gliadin-induced enteropathy animal model. *PloS One*. 2012; 7(2): e30744.
114. Torii T, Kanemitsu K, Wada T, Itoh S, Kinugawa K, Hagiwara A. Measurement of short-chain fatty acids in human faeces using high-performance liquid chromatography: specimen stability. *Ann. Clin. Biochem*. 2010; 47(Pt 5): 447–52.
115. Kekkonen R-A, Lummela N, Karjalainen H, Latvala S, Tynkkynen S, Jarvenpaa S, et al. Probiotic intervention has strain-specific anti-inflammatory effects in healthy adults. *World J. Gastroenterol. WJG*. 2008; 14(13): 2029–36.
116. Myśliwiec M, Balcerska A, Zorena K, Myśliwska J, Wiśniewski P. Immunologic and biochemical factors of coincident celiac disease and type 1 diabetes mellitus in children. *Pediatr. Res*. 2008; 64(6): 677–81.
117. Branski D, Fasano A, Troncone R. Latest developments in the pathogenesis and treatment of celiac disease. *J. Pediatr*. 2006; 149(3): 295–300.
118. Sullivan KE, Cutilli J, Piliero LM, Ghavimi-Alagha D, Starr SE, Campbell DE, et al. Measurement of cytokine secretion, intracellular protein expression, and mRNA in resting and stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 2000; 7(6): 920–4.
119. Wang C, Shoji H, Sato H, Nagata S, Ohtsuka Y, Shimizu T, et al. Effects of oral administration of *bifidobacterium breve* on fecal lactic acid and short-chain fatty acids in low birth weight infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*. 2007; 44(2): 252–7.
120. Norin E, Midvedt T, Bjorksten B. Development of faecal short-chain fatty acid pattern during the first year of life in estonian and swedish infants. *Microbial ecology in health and disease* 2004; 16: 8-12.
121. Kopečný J, Mrázek J, Fliegerová K, Frühauf P, Tucková L. The intestinal microflora of childhood patients with indicated celiac disease. *Folia Microbiol. (Praha)*. 2008; 53(3): 214–6.
122. Wild D, Robins GG, Burley VJ, Howdle PD. Evidence of high sugar intake, and low fibre and mineral intake, in the gluten-free diet. *Aliment. Pharmacol. Ther*. 2010; 32(4): 573–81.
123. Caminero A, Nistal E, Arias L, Vivas S, Comino I, Real A, et al. A gluten metabolism study in healthy individuals shows the presence of faecal glutenase activity. *Eur. J. Nutr*. 2012; 51(3): 293–9.
124. Bertini I, Calabrò A, De Carli V, Luchinat C, Nepi S, Porfirio B, et al. The metabonomic signature of celiac disease. *J. Proteome Res*. 2009; 8(1): 170–7.
125. Hao Q, Dong BR, Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst. Rev*. 2015; 2: CD006895.

126. King S, Glanville J, Sanders ME, Fitzgerald A, Varley D. Effectiveness of probiotics on the duration of illness in healthy children and adults who develop common acute respiratory infectious conditions: a systematic review and meta-analysis. *Br. J. Nutr.* 2014; 112(1): 41–54.

7. PRILOGE

7.1. Priloga 1



KOMISIJA REPUBLIKE SLOVENIJE ZA MEDICINSKO ETIKO

Martina Babič, dr. med.
Klinika za pediatrijo
Univerzitetni klinični center Maribor
Ljubljanska 5, 2000 Maribor

Štev.: 63/03/13
Datum: 23. 4. 2013

Spoštovana gospa dr. Babič,

Komisiji za medicinsko etiko (KME) ste 4. 3. 2013 poslali nove dokumente v zvezi z raziskavo z naslovom:

“Vpliv probiotične bakterije Bifidobacterium breve (BR 03) na nivo¹ protivnetnih in provnetnih citokinov ter profil kratkoverižnih maščobnih kislin pri otrocih s celiakijo.” Doktorska naloga. KME 44/11/12.

Gre za:

- spremembo naslova, prej *“Vpliv probiotične bakterije Bifidobacterium longum subsp. longum na znižanje inflamatornih citokinov pri otrocih s celiakijo”*;
- zamenjavo odgovornega zdravnika, zdaj doc. dr. Tomaž Langerholz, univ. dipl. inž. kem.;
- zamenjavo probiotičnega seva (zaradi boljših lastnosti), ki bo uporabljen v raziskavi;

KME je na seji 19. marca 2013 spremembo naslova in zamenjavo odgovornega zdravnika vzela na znanje, zamenjavo probiotičnega seva

Lep pozdrav,

prof. dr. Jože Trontelj
predsednik Komisije RS za medicinsko etiko

¹ Poročevalec predlaga jezikovno izboljšanje v naslovu: ...raven...

7.2. Članki kot sestavni del doktorske disertacije

KLEMENAK, Martina, DOLINŠEK, Jernej, LANGERHOLC, Tomaž, DI GIOIA, Diana, MIČETIĆ-TURK, Dušanka. Administration of Bifidobacterium breve decreases the production of TNF-[alfa] in children with celiac disease. *Digestive diseases and sciences*, ISSN 1573-2568, Nov. 2015, vol. 60, iss. 11, str. 3386-3392. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10620-015-3769-7>, doi: [10.1007/s10620-015-3769-7](https://doi.org/10.1007/s10620-015-3769-7). [COBISS.SI-ID [512528696](https://www.cobiss.si/urn:nbn:si:coibis:512528696)].

BABIČ, Martina, CENCIČ, Avrelija, MIČETIĆ-TURK, Dušanka. Organizacija in funkcija črevesne flore = (Organization and function of gut microflora). *Zdravniški vestnik*, ISSN 1318-0347. [Tiskana izd.], sep. 2013, letn. 82, št. 9, str. 573-579. [COBISS.SI-ID [4776511](https://www.cobiss.si/urn:nbn:si:coibis:4776511)].

Administration of *Bifidobacterium breve* Decreases the Production of TNF- α in Children with Celiac Disease

Martina Klemenak¹ · Jernej Dolinšek¹ · Tomaž Langerholc² · Diana Di Gioia³ · Dušanka Mičetič-Turk⁴

Received: 15 April 2015 / Accepted: 11 June 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract

Background Increasing evidence suggests that not only genetics, but also environmental factors like gut microbiota dysbiosis play an important role in the pathogenesis of celiac disease (CD).

Aim The aim of our study was to investigate the effect of two probiotic strains *Bifidobacterium breve* BR03 and *B. breve* B632 on serum production of anti-inflammatory cytokine interleukin 10 (IL-10) and pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in children with CD.

Methods The study was a double-blinded, placebo-controlled trial that included 49 children with CD on gluten-

free diet (GFD) randomized into two groups and 18 healthy children in the control group. The first group (24 children with CD) daily received *B. breve* BR03 and B632 (2×10^9 colony-forming units) and the second group (25 children with CD) received placebo for 3 months.

Results TNF- α levels were significantly decreased in the first group after receiving *B. breve* for 3 months. On follow-up, 3 months after receiving probiotics, TNF- α levels increased again. Children with CD who were on GFD for less than 1 year showed similar baseline TNF- α levels as children who were on GFD for more than 1 year. IL-10 levels were in all groups of patients below detection level. **Conclusions** Probiotic intervention with *B. breve* strains has shown a positive effect on decreasing the production of pro-inflammatory cytokine TNF- α in children with CD on GFD.

✉ Martina Klemenak
martina.klemenak@gmail.com

Jernej Dolinšek
jernej.dolinsek@hotmail.com

Tomaž Langerholc
tomaz.langerholc@um.si

Diana Di Gioia
diana.digioia@unibo.it

Dušanka Mičetič-Turk
dusanka.micetic@um.si

¹ Department of Paediatrics, University Clinical Center Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor, Slovenia

² Department of Microbiology, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture and Life Sciences, University of Maribor, Pivola 10, 2311 Hoče, Slovenia

³ Department of Agricultural Sciences, University of Bologna, Viale Fanin 42, 40127 Bologna, Italy

⁴ Department of Paediatrics, Faculty of Medicine, University of Maribor, Tahovska ulica 8, 2000 Maribor, Slovenia

Keywords Celiac disease · *Bifidobacterium breve* · Cytokines · TNF- α · Children

Introduction

Celiac disease (CD) is an immune-mediated systemic disorder elicited by gluten and related prolamines in genetically susceptible individuals [1]. HLA-DQ2/DQ8 molecules of antigen-presenting cells bind and present gluten peptides to lamina propria CD4+ T cells that induce the production of pro-inflammatory cytokines, mainly interferon gamma (IFN- γ), which enhances tumor necrosis factor alpha (TNF- α) production and plays a crucial role in damaging of intestinal mucosa [2]. IL-10 is an important immunoregulatory cytokine in the intestinal tissue that suppresses gliadin-induced T cell activation *ex vivo* in organ biopsy culture samples from the small bowel of

patients with CD [3]. It has also been shown that the levels of cytokine elevations correlate with disease activity [4, 5].

Celiac disease is strongly associated with human leukocyte antigens DQ2 and DQ8 genotype [6]. However, several studies suggest that gut microbiota imbalance may play an important role in CD pathogenesis. Children with CD have an increased number of *Bacteroides* and a reduced number of *Bifidobacterium* species in feces and duodenal biopsies when compared to controls [7–9]. These differences in the microbiota composition are only partially restored after long-term treatment with a gluten-free diet (GFD) [8].

Currently, GFD is the only effective treatment for CD. Different studies showed that celiac patients have problems with full compliance to GFD, which leads to numerous complications of the disease [10]. Moreover, inflammation in the long term is still present in 40–50 % of the patients [11]. Consequently, various alternatives to strict GFD have been investigated; however, no novel drugs nor new treatments are available on the market [12].

The immunomodulatory effects of probiotics have been studied in many inflammatory and autoimmune diseases [13]. In vitro studies showed that some strains of bifidobacteria induce low amounts of pro-inflammatory cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-2) and high amounts of anti-inflammatory cytokines (IL-10) and can therefore suppress pro-inflammatory milieu triggered by the large intestinal microbiota of CD patients [14–16]. *B. breve* strains have shown in vitro and in vivo immunomodulatory properties [17, 18] and possess the Qualified Presumption of Safety status [19]. Two recent studies showed that *B. breve* strains prevent intestinal inflammation by inducing the production of intestinal IL-10-producing T regulatory 1 (Tr1) cells [20, 21]. Importantly, gliadin-specific Tr1 cell clones suppressed proliferation of pathogenic T cells in CD. Moreover, dysregulation of Tr1 cells seems to be relevant in the pathogenesis of autoimmune diseases in humans [22]. The incidence of autoimmune disorders is increased in individuals with CD [23].

To sum up, studies available up to now show that *B. breve* probiotic supplements along with GFD could counteract pro-inflammatory environment in the gut of CD patients and could therefore have an influence on decreasing the incidence of complications of the disease. For this reason, we studied the impact of a combination of *B. breve* BR03 and B632 on immunological status of children with CD on GFD by assessing serum production of IL-10 and TNF- α .

Methods

Study Design

The study was a double-blinded, placebo-controlled intervention study including 49 patients with CD and 18 healthy

children for the control group (Fig. 1). Children were recruited at a single center, Department of Paediatrics, University Clinical Center Maribor in a period from October 2013 to June 2014. Parents or caregivers of children with CD were asked to participate in the study at their regular celiac checkup. The informed written consent was signed by parents or caregivers at the beginning of the study. Patients were randomly allocated into first or second group. Healthy children were included in the third group. The random allocation sequence was generated with blocks of 8, and done using a computer model (<http://www.randomization.com>). Randomization and labeling of the intervention products were done by scientific personnel not involved in the study, and kept unavailable until data analysis was completed. The number of children in each group was based on similar clinical trials testing probiotics. The study was registered at <https://www.clinicaltrials.gov> (registration number: NCT02244047).

The first group of children with CD daily received the formulation containing the *B. breve* strains for 3 months and the second group of children with CD received placebo for 3 months. Blood samples for cytokine analysis and serologic markers for CD (EMA, tTG) were taken three times, on enrollment, at the end of intervention with probiotic/placebo and on follow-up (3 months after the intervention period). In addition, each time patients had a clinical examination to exclude any acute illness. Healthy children selected for the control group were clinical examined to exclude any acute illness and then blood samples for cytokine analysis were taken only once on enrollment.

Inclusion/Exclusion Criteria

Children with CD aged between 1 and 19 years were invited to participate in the study (Table 1). All patients had previously positive serologic markers for CD and positive small bowel biopsy. The diagnosis of CD was based on ESPGHAN criteria for CD [1, 24]. They were on GFD for different periods of time (from half of year to 15 years). Exclusion criteria were acute or chronic diseases, permanent use of medication, and ingestion of antibiotics at least 1 month prior to study. Patients who met those criteria were invited to participate in the study. Children selected for control group were age and gender matched, on gluten containing diet, did not have any acute or chronic disease or any clinically significant disorder, and were not on any medication or antibiotics at least one month prior to study.

Probiotic Cultures

Packages of powder with lyophilized probiotic strains composed of 50 % *B. breve* BR03 and 50 % *B. breve*

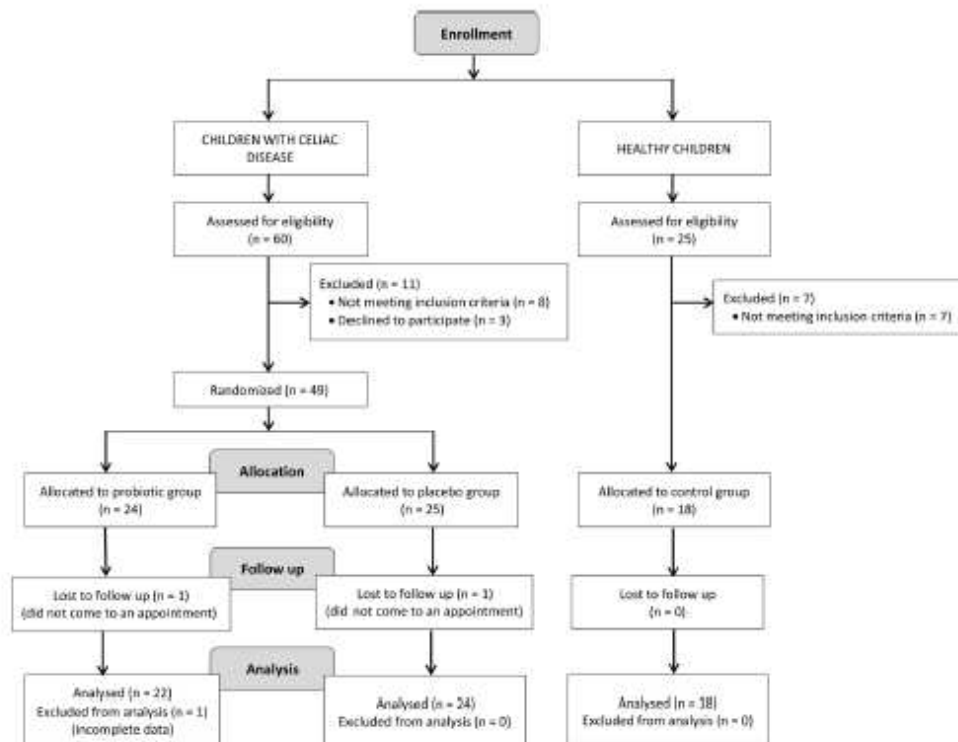


Fig. 1 Flowchart of participants

Table 1 Characteristics of children in the study groups at the start of intervention

	Placebo group	Probiotic group	Control group
No. patients	24	22	18
Sex (M/F)	10/14	6/16	7/11
Age (year)	10.81 ± 4.99	10.43 ± 4.19	8.83 ± 5.95
Time on GFD (year)	7.06 ± 5.49	5.59 ± 3.73	–
Compliance to GFD	80 %	91 %	–

Data are expressed as mean ± standard deviation

Age differences between groups were determined by Mann-Whitney *U* test: “the placebo group” versus “the probiotic group” ($p = 0.758$), “the probiotic group” versus “the control group” ($p = 0.262$), and “the placebo group” versus “the control group” ($p = 0.241$). Differences of time on GFD between the placebo and the probiotic group ($p = 0.501$) was determined by Mann-Whitney *U* test

B632, and placebo packages were kindly provided by Probiotical S.p.A, Novara, Italy. Probiotic cultures and placebo were packed in identical forms and labeled with different codes, which ensured that the study was blinded for investigators and patients. Each package of 2 g powder containing probiotic cultures or placebo was mixed with fluids and ingested in the morning before breakfast during a period of 3 months. Each package of probiotic contained *B. breve* BR03 and B632 in a daily dosage of 10^9 CFU of each strain/g of powder.

Blood Samples and Cytokine Detection

Blood samples were drawn from a peripheral vein and collected in a plastic tube without anticoagulant. Serum was obtained by centrifugation at 800g for 10 min, aliquoted, and stored at -85°C until the analysis. A solid-phase enzyme-labeled chemiluminescent immunometric assay was used for cytokine TNF-alpha and IL-10 measurement according to the manufacturer’s instruction (Immulite One, Siemens Healthcare Diagnostics). Results were

expressed in pg/ml. Assay detection limit for TNF- α and IL-10 was 5 pg/ml.

Statistical Analyses

Data were analyzed with SPSS Statistics 21.0 (IBM Inc., Armonk, New York) using Mann–Whitney U test after Kolmogorov–Smirnov or Shapiro–Wilk distribution test for the comparison of the subjects with CD versus the control group and paired Wilcoxon signed rank test after Shapiro–Wilk distribution test for the comparison of obtained data before and after the treatment with probiotic and placebo. Values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

Ethical Issues

The protocol was approved by the Republic of Slovenia National Medical Ethics committee. A written informed consent was given to parents or caregivers after the explanation of the study. Patients rejecting participation in the study received a standard care.

Results

At the beginning of the study, 24 children with CD were allocated to the probiotic group and 25 children to the placebo group. However, two children (one from the probiotic group and one from the placebo group) did not come to their follow-up appointment and were for that reason excluded from the study. In addition, one child from the probiotic group was lost due to incomplete data. Therefore, 22 children from the probiotic group and 24 children from the placebo group completed the study (Fig. 1). There was no significant difference in age or duration of GFD between the placebo and the probiotic group (Table 1).

Changes in the TNF- α levels before and after probiotic/placebo consumption and on follow-up (3 months after the intervention) are shown in Fig. 2. The baseline levels of pro-inflammatory cytokine TNF- α in serum were significantly ($p = 0.015$) higher in the probiotic group (14.78 ± 6.43) when compared to levels in the placebo group (10.58 ± 3.57). Compliance to GFD measured by serologic markers was 91 % in the probiotic group and 80 % in the placebo group. There was no correlation between positive serologic markers of CD and levels of TNF- α and IL-10 in individual patient with CD. The baseline levels of TNF- α in serum were significantly ($p = 0.022$) lower in the placebo group (10.58 ± 3.57) when compared to levels in the control group (13.25 ± 3.97). Taken together, data of baseline TNF- α levels from the placebo and the probiotic group

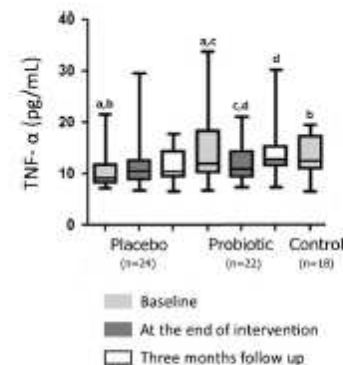


Fig. 2 Effect of administration of probiotic or placebo in children with celiac disease on the serum TNF- α level and on comparison of TNF- α level from healthy children (control group). Bars represent medians and interquartile ranges. The same letters above bars indicate statistically significant differences ($p < 0.05$). Statistical analysis was done by paired Wilcoxon signed rank test

(12.58 ± 5.49) were similar to levels from healthy children in the control group (13.25 ± 3.97). Celiac patients in both groups were throughout the study without any symptoms regarding CD. No side effects upon probiotics administration were shown. In particular, it did not have any influence on stool consistency or frequency of bowel movements.

At the end of intervention with probiotics, TNF- α levels (11.97 ± 3.58) in children with CD significantly decreased ($p = 0.020$) from baseline levels. Moreover, on follow-up (3 months after the intervention period) serum TNF- α level was again significantly higher in the probiotic group. There was no difference in TNF- α levels in the placebo group (Fig. 2). Almost all values for anti-inflammatory cytokine IL-10 in serum were under detection limit (5 pg/ml) and were therefore not further analyzed.

Effect of Duration of Gluten-Free Diet

Next, we determined whether the baseline serum levels of TNF- α changed with the duration of GFD. For that reason, we divided children with CD from our study to group where children were on GFD for less than 1 year ($n = 9$) and to group on GFD for more than 1 year ($n = 37$). In the latter group, children were on the GFD from 1 to 15 years, on average 7.8 years. Children with CD who were on GFD for less than 1 year showed similar baseline TNF- α levels (12.70 ± 3.95) as children on GFD for more than 1 year (12.62 ± 5.89). In children who were on GFD for more than 1 year and were daily receiving probiotics for 3 months, levels of TNF- α (11.64 ± 3.53) were reduced almost statistically significantly ($p = 0.055$) compared to the baseline levels (14.86 ± 7.00). On the other hand, in

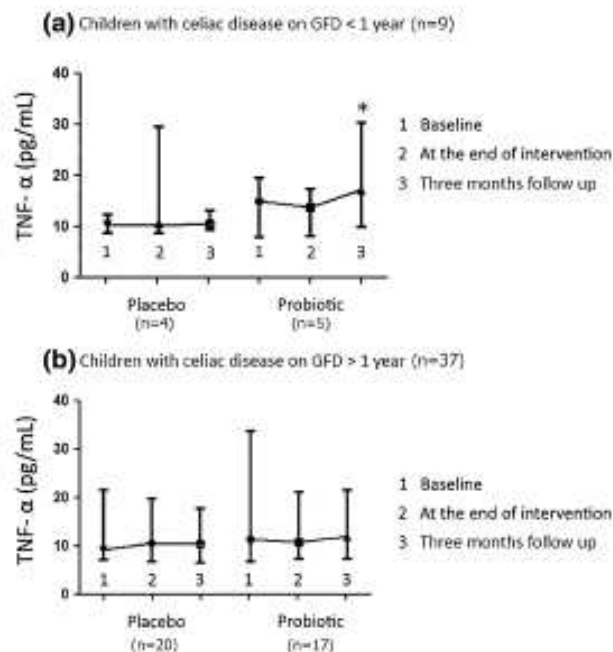


Fig. 3 Comparison of median TNF- α levels (pg/ml) between children with celiac disease **a** on GFD for less than 1 year and **b** on GFD more than 1 year. Lines represent medians and interquartile ranges. Statistical analysis was done by paired Wilcoxon signed rank test. **a** *Statistically significant difference in the probiotic group between “baseline” and “3 month follow-up” ($p = 0.046$)

children who received probiotics and were on GFD for less than 1 year, levels of TNF- α only slightly decreased after 3 months of probiotic administration (13.10 ± 3.90) compared to the baseline levels (14.50 ± 4.42). There was no decrease in TNF- α levels in the placebo group (Fig. 3).

Discussion

It is well known that in active CD, gluten induces a sustained pro-inflammatory cytokine production in vitro, as regulatory T cells are able to release variable amounts of anti-inflammatory cytokines. Previous studies suggested that after induction of GFD, levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines decrease [4, 5]. This is consistent with our results, as we found that serum baseline levels of TNF- α were similar in children with CD on GFD (from the probiotic and the placebo group) when compared to the control group. Reason why baseline levels of TNF- α were significantly higher in the probiotic group than in the placebo group, which was more compliant to GFD (91 vs. 80 %), is not known. Serum antibodies for CD have high disease specificity but inadequate sensitivity, and might therefore be unsuitable for monitoring the effects of low-to-moderate gluten consumption [25]. Children with celiac

disease were randomized to one of two groups and did not have any acute or other chronic inflammatory diseases, which could elevate TNF- α level [26].

Furthermore, levels of anti-inflammatory cytokine IL-10 were in all groups of children below detection level. This is in agreement with the results of Cataldo et al. [5], who did not observe significant difference in serum IL-10 levels in patients with CD on GFD in comparison with the control group. Moreover, we did not find significantly lower baseline levels of TNF- α in patients, who were on GFD for more than 1 year when compared with patients who were on the diet for less than 1 year. In contrast, Manavalan et al. [4] found significantly lower levels of all pro- and anti-inflammatory cytokines tested in patients on GFD for more than 1 year when compared with patients on the diet for less than 1 year. However, our results are based on a small number ($n = 9$) of patients who were on GFD for less than 1 year and can therefore invalidate statistical power.

To our knowledge, this is a first clinical trial assessing the effect of two *B. breve* strains (BR03 and B632) as complementary therapy along with GFD in children with CD. Our goal was to determine the effect of *B. breve* strains on immunological status of patients by assessing serum production of pro- and anti-inflammatory cytokines from samples obtained at enrollment, at the end of intervention, and on follow-up (3 months after the completion of intervention).

The effect of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains on the immune response in the pro-inflammatory milieu of CD has been explored by ex vivo studies, by in vivo animal models of gluten sensitivity, and more recently in clinical trials on adults and children with CD [27–31]. D’Arienzo et al. [27] studied the effect of different *Lactobacillus* strains and a *Bifidobacterium lactis* strain in transgenic mice expressing human DQ8 heterodimer and found that all these strains increased antigen-specific TNF- α secretion in vivo (following co-administration of probiotic bacteria in mice mucosally immunized with the gluten component gliadin). We found in our study significant decrease in serum TNF α levels in CD children following daily consumption of *B. breve* strains during the period of 3 months. On the contrary, Smecuol et al. [30] did not find any effect of administration of a *Bifidobacterium infantis* strain on TNF- α level in adult patient with active CD. Recently, Olivares et al. [31] tested the effect of a *Bifidobacterium longum* strain together with GFD in a clinical trial in children with newly diagnosed CD and found slightly reduced TNF- α concentration following probiotic administration. Therefore, from our results, we can conclude that *B. breve* strains in combination with GFD act on reduction in TNF- α production and consequently may have an effect on counteracting pro-inflammatory environment in children

with CD. However, effect of this probiotic supplement is only temporary, during consumption. We found that levels of TNF- α return almost to baseline levels 3 months after completion of intervention. TNF- α is responsible for damaging the intestinal mucosa in CD and also acts as an inflammatory mediator activating many types of cells at systemic level [32]. Therefore, lowering this pro-inflammatory cytokine could decrease intestinal and systemic complications of the disease. To support this important conclusion, more outcome measures like immune phenotype of peripheral blood cells, serum cytokine concentration, fecal secretory IgA content, and others should be tested. The reasons for the lack of influence on the production of IL-10 are not known.

The study has several strengths. The dosage and length of intervention were estimated as appropriate based on the existing literature of probiotic intervention trials within related research fields and strains [33]. However, serum cytokine measurements have two major limitations. Many cytokines often circulate as proteins bound to soluble receptors, carrier proteins, or inhibitors leading to falsely low levels. Furthermore, due to a local production and a very short half-life of some cytokines, they can be undetectable in the serum. Moreover, coexisting inflammatory processes from a different origin may also elevate serum levels of certain cytokines [26]. However, decrease in serum TNF α levels after probiotic consumption leads us to believe that such considerations do not significantly affect the serum levels of the cytokines analyzed. Currently, there are no universally accepted biomarkers for CD, which are specific for assessing a therapeutic response in clinical studies of CD. The best way to measure disease activity remains a biopsy of small intestine, which is invasive and expensive procedure in the context of controlled clinical trials. Non-invasive alternatives to small bowel biopsy are therefore needed in order to develop new drugs for CD [25].

In conclusion, our study demonstrates a lower production of the pro-inflammatory cytokine TNF- α after daily consumption of the probiotic *B. breve* BR03 and B632 strains in children with CD on GFD. Further studies with more outcome measures are necessary to confirm the potential benefit of this tested probiotic as a complementary therapy along with GFD in CD patients.

Acknowledgments We are grateful to Evgenija Homšak and Mateja Svetelj for laboratory assistance, nurses in pediatric hospital for assistance in the clinical management of patients and to Mario Gorenjak for statistical analysis. We are indebted to Maja Šikić Pogačar for critical evaluation of the manuscript and editing of the text. We are also grateful to Probiotical S.p.A. (Novara, Italy) for providing the intervention products free of charge and to parents of children with celiac disease and healthy children for cooperation in the research.

Conflict of interest This study was supported by the research programme group "Bio-psycho-social model of quality of life" P3-0036. The intervention products were produced and provided free of charge by Probiotical S.p.A (Italy). The authors declare no conflicts of interest.

Ethical standard All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

- Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, et al. European society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;54:136–160.
- McAllister CS, Kagnoff MF. The immunopathogenesis of celiac disease reveals possible therapies beyond the gluten-free diet. *Semin Immunopathol.* 2012;34:581–600.
- Salvati VM, Mazzarella G, Gianfrani C, et al. Recombinant human interleukin 10 suppresses gliadin dependent T cell activation in ex vivo cultured coeliac intestinal mucosa. *Gut.* 2005;54:46–53.
- Manavalan JS, Hernandez L, Shah JG, et al. Serum cytokine elevations in celiac disease: association with disease presentation. *Hum Immunol.* 2010;71:50–57.
- Cataldo F, Lio D, Marino V, et al. Plasma cytokine profiles in patients with celiac disease and selective IgA deficiency. *Pediatr Allergy Immunol.* 2003;14:320–324.
- Pallav K, Kabbani T, Tariq S, Vanga R, Kelly CP, Leffler DA. Clinical utility of celiac disease-associated HLA testing. *Dig Dis Sci.* 2014;59:2199–2206.
- Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *J Clin Pathol.* 2009;62:264–269.
- Sánchez E, Donat E, Ribes-Koninckx C, Fernández-Murga ML, Sanz Y. Duodenal-mucosal bacteria associated with celiac disease in children. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79:5472–5479.
- Di Cagno R, De Angelis M, De Pasquale I, et al. Duodenal and faecal microbiota of celiac children: molecular, phenotype and metabolome characterization. *BMC Microbiol.* 2011;11:219.
- Tursi A, Elisei W, Giorgetti GM, Brandimarte G, Aiello F. Complications in celiac disease under gluten-free diet. *Dig Dis Sci.* 2009;54:2175–2182.
- Tuire I, Marja-Leena L, Teea S, et al. Persistent duodenal intraepithelial lymphocytosis despite a long-term strict gluten-free diet in celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2012;107:1563–1569.
- Mäki M. Celiac disease treatment: gluten-free diet and beyond. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014;59:S15–S17.
- Kverka M, Tlaskalova-Hogenova H. Two faces of microbiota in inflammatory and autoimmune diseases: triggers and drugs. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 2013;121:403–421.
- De Palma G, Cinova J, Stepankova R, Tuckova L, Sanz Y. Pivotal Advance: Bifidobacteria and Gram-negative bacteria differentially influence immune responses in the proinflammatory milieu of celiac disease. *J Leukoc Biol.* 2010;87:765–778.

15. López P, Guéimonde M, Margolles A, Suárez A. Distinct *Bifidobacterium* strains drive different immune responses in vitro. *Int J Food Microbiol.* 2010;138:157–165.
16. He F, Morita H, Ouwehand AC, et al. Stimulation of the secretion of pro-inflammatory cytokines by *Bifidobacterium* strains. *Microbiol Immunol.* 2002;46:781–785.
17. Aloisio I, Santini C, Biavati B, et al. Characterization of *Bifidobacterium* spp. strains for the treatment of enteric disorders in newborns. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;96:1561–1576.
18. Mogna L, Del Piano M, Mogna G. Capability of the two microorganisms *Bifidobacterium breve* B632 and *Bifidobacterium breve* BR03 to colonize the intestinal microbiota of children. *J Clin Gastroenterol.* 2014;48:S37–S39.
19. EFSA publication. EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), 2013. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). Parma, Italy: European Food Safety Authority, 2013. (The *EFSA Journal.* 2013;11:3449). doi:10.2903/j.efsa.2013.3449. Accessed 10 Mar 2015.
20. Jeon SG, Kayama H, Ueda Y, et al. Probiotic *Bifidobacterium breve* induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon. *PLoS Pathog.* 2012;8:e1002714.
21. Zheng B, van Bergenhenegouwen J, Overbeek S, et al. *Bifidobacterium breve* attenuates murine dextran sodium sulfate-induced colitis and increases regulatory T cell responses. *PLoS One.* 2014;9:e95441.
22. Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, Yonezawa T, Kimura T. Reduced expression of the regulatory CD4+ T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43:617–627.
23. Lauret E, Rodrigo L. Celiac disease and autoimmune-associated conditions. *BioMed Res Int.* 2013;2013:127589.
24. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of working group of European society of paediatric gastroenterology and nutrition. *Arch Dis Child.* 1990;65:909–911.
25. Sollid LM, Khosla C. Novel therapies for coeliac disease. *J Intern Med.* 2011;269:604–613.
26. Sullivan KE, Cutilli J, Piliero LM, et al. Measurement of cytokine secretion, intracellular protein expression, and mRNA in resting and stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000;7:920–924.
27. D'Arienzo R, Maurano F, Lavernicocca P, Ricca E, Rossi M. Modulation of the immune response by probiotic strains in a mouse model of gluten sensitivity. *Cytokine.* 2009;48:254–259.
28. Medina M, De Palma G, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. *Bifidobacterium* strains suppress in vitro the pro-inflammatory milieu triggered by the large intestinal microbiota of coeliac patients. *J Inflamm Lond Engl.* 2008;5:19.
29. Laparra JM, Sanz Y. Bifidobacteria inhibit the inflammatory response induced by gliadins in intestinal epithelial cells via modifications of toxic peptide generation during digestion. *J Cell Biochem.* 2010;109:801–807.
30. Smeciol E, Hwang HJ, Sugai E, et al. Exploratory, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the effects of *Bifidobacterium infantis* naten life start strain super strain in active coeliac disease. *J Clin Gastroenterol.* 2013;47:139–147.
31. Olivares M, Castillejo G, Varea V, Sanz Y. Double-blind, randomized, placebo-controlled intervention trial to evaluate the effects of *Bifidobacterium longum* CECT 7347 in children with newly diagnosed coeliac disease. *Br J Nutr.* 2014;112:30–40.
32. Branski D, Fasano A, Troncone R. Latest developments in the pathogenesis and treatment of coeliac disease. *J Pediatr.* 2006;149:295–300.
33. Whorwell PJ, Altringer L, Morel J, et al. Efficacy of an encapsulated probiotic *Bifidobacterium infantis* 35624 in women with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:1581–1590.

Organizacija in funkcija črevesne flore

(Organization and function of gut microflora)

Martina Babič, Avrelija Cencič, Dušanka Mičetič Turk

Medicinska fakulteta
Univerze v Mariboru,
Slomškov trg 15, 2000
Maribor

**Korespondenca/
Correspondence:**
Martina Babič, Pivola 41,
2311 Hoče

Ključne besede:
mikrobiota,
gastrointestinalni trakt,
enterotipi, prehrana

Key words:
microbiota,
gastrointestinal tract,
enterotypes, diet

Citirajte kot/Cite as:
Zdrav Vestn 2013;
82: 573–9

Prispelo: 20. avg. 2012,
Sprejeto: 17. apr. 2013

Izvleček

Črevesna mikrobiota je sestavljena iz 10–100 trilijonov mikrobov s presnovno dejavnostjo, enako nekakemu virtualnemu organu v organu in igra ključno vlogo v vzdrževanju črevesne homeostaze. Sestava črevesne flore se spreminja vzdolž prebavne cevi. Dejavniki, ki vplivajo na kolonizacijo črevesne flore novorojenčkov, so način poroda, vrsta hranjenja dojenčkov, bolezen in nedonošenost. Prehrana igra prevladujočo vlogo glede na ostale okoljske dejavnike. Namen članka je predstaviti dosedanje znanje s področja organiziranosti in vloge črevesne flore.

Abstract

The human intestinal microbiota is composed of 10 to 100 trillion microbes whose metabolic activity equals to a virtual organ within an organ. Gut microflora have a crucial role in the maintenance of intestinal homeostasis. The composition of gut microflora is changing along the gastrointestinal tract. Factors that affect colonization of newborn's gut microbiota are delivery mode, type of feeding, illness and prematurity. Our diet has a dominant role in shaping the microbial composition of the gut over other environmental factors. The aim of this article is to introduce up-to-date knowledge of the organization and function of gut microflora.

Uvod

Prebavna cev predstavlja povezavo med zunanjim okoljem in preostalim telesom. Znotraj prebavne cevi živi kompleksni polimikrobni ekosistem, ki komunicira z zunanjim in notranjim okoljem in igra pomembno vlogo pri zdravju in boleznih.¹ Naše telo je dom za mikrobno skupnost, ki po številčnosti presega človeške somatske in zarodne celice. Večina teh 10–100 trilijonov mikrobov naseljuje prebavno cev, predvsem distalni del črevesa. Njihov genom (mikrobiom) vsebuje vsaj stokrat več genov kot človekov 2,85 bilijonov baznih parov velik genom.²

Mednarodni tim znanstvenikov, ki sta jih vodila Junji Qin in Ruiqiang Li, je ugotovil, da se v črevesju nahaja približno 160 različnih bakterijskih vrst.³

Črevesna mikrobiota ima številne vloge: skrbi za vzdrževanje črevesne homeostaze, tvori naravno pregrado pred naselitvijo patogenih bakterij, prebavlja in vpliva na resorpcijo hranil, vpliva na imunski sistem in modulira izražanje genov. Presnovna dejavnost črevesne flore je enaka dejavnosti organa – je nekak virtualni organ v organu.¹

Večine črevesnih bakterijskih vrst ni mogoče kultivirati. V zadnjih letih je z razvojem sodobnih molekularnih metod, kot je širokospektralno sekvencioniranje 16 S ribosomalne RNA s pomnoževanjem bakterijskih nukleinskih kislin, ki jih ekstrahiramo iz blata ali bioptov, mogoče prepoznati in klasificirati bakterije. Dostopnost podatkov o bakterijskih sekvencah je omogočilo razvoj molekularnih sond za fluorescenčno hibridizacijo, DNK mikromrež *in situ* in genskih čipov, ki lahko prepoznajo in količinsko opredelijo posamezne vrste bakterij.⁴

Enterotipi

Naše poznavanje vrst in vloge človeškega črevesnega mikrobioma se hitro širi, vendar še vedno temelji na nekaj kohortnih študijah, malo pa je znanega o variacijah po svetu. Mednarodni tim strokovnjakov je v Evropskem laboratoriju za molekularno biologijo (Arumugam, Raes in drugi, 2011) primerjal 22 na novo sekvenciranih fekalnih metagenomov posameznikov iz štirih evropskih držav (Danska, Španija, Francija, Italija) z dotlej objavljenimi podatki. Prepoznali so tri skupine – enterotipe, ki niso nacionalno in kontinentalno specifični (Tabela 1). Enterotipi se razlikujejo po različni vsebnosti enega od treh rodov *Bacteroides* (enterotip 1), *Prevotella* (enterotip 2) in *Ruminococcus* (enterotip 3). Korelacijske analize Sanger data so pokazale, da prevladujoča vrsta v vzorcu blata močno kolerira z drugimi vrstami, kar kaže na to, da so en-

terotipi skupina bakterij, ki skupaj tvorijo prevladujočo skupnost.⁵ Te enterotipe so potrdili v dveh že objavljenih velikih kohortnih študijah.^{6,7} Vsak enterotip se razlikuje v tvorbi energije, izdelovanju vitaminov in v različni dovzetnosti za posamezne bolezni.

Sestava črevesne flore vzdolž prebavnega trakta

Sestava črevesne flore je odraz naravne selekcije na ravni gostitelja in na mikrobiološki ravni. Kisline v želodcu, žolč in pankreatični encimi preprečujejo koloniziranje želodca in proksimalnega tankega črevesa z večino bakterij.⁸ Gostota bakterij v želodcu in proksimalnem delu tankega črevesa doseže koncentracijo 10^3 – 10^4 /ml tekočine, odvisno od sestave zaužite hrane. Epitel tankega črevesa pri zdravem človeku ni koloniziran. Bakterije v tem predelu ne tvorijo konglomeratov, prav tako so od sluznice ločene s slojem mukusa.⁹ V distalnem delu tankega črevesa in v debelem črevesu dosežejo bakterije koncentracijo 10^{11} – 10^{12} na gram vsebine črevesa, kar predstavlja 60 % fekalne mase. V debelem črevesu bakterije z razgradnjo neprebavljivih ostankov hrane tvorijo vitamine in kratkoveržne maščobne kisline in črevesne pline.¹⁰ Poleg tega, da obstajajo variacije v sestavi flore vzdolž črevesa, obstajajo tudi različne mikrobiološke populacije, ki so v svetlini, in tiste, ki se držijo površine črevesja. Razmerje anaerobov proti aerobom je manjše na površini sluznice kot v svetlini.¹¹

Tabela 1: Enterotipi³

	Enterotip 1	Enterotip 2	Enterotip 3
Prevladujoče bakterije	<i>Bacteroides</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Ruminococcus</i>
Ostale bakterije	<i>Parabacteroides</i> , <i>Clostridiales</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Alkaliphilus</i> , <i>Geobacter</i> , <i>Slackia</i> , <i>Methanobrevibacter</i> , <i>Cantenibacterium</i>	<i>Desulfovibrio</i> , <i>Rhodospirillum</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Shigella</i> , <i>Holdemania</i> , <i>Peptostreptococcaceae</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Helicobacter</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Akkermansia</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Eggerthella</i> .	<i>Staphylococcus</i> , <i>Dialister</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Marvinbryantia</i> , <i>Symbiobacterium</i> , <i>Sphingobacterium</i> , <i>Akkermansia</i> , <i>Gordonibacter</i> .
Značilnost	► širok saharolitski potencial, ► encimi za razgradnjo galaktozidaze, heksoaminidaze in proteaze	► razgrajujejo glikoproteine mucina v mukoznem sloju črevesja	► bogate v membranskem transportu za večino sladkorjev

Sprva so raziskovalci mislili, da se imunski sistem odziva na patogene črevesne bakterije in tolerira komenzialne bakterije. Vendar to ne drži. Bakterije ne moremo enostavno razdeliti na patogene ali nepatogene. Veliko avtohtonih bakterij je namreč znanih patogenov; npr. *E. coli* povzroča sepsa, *Bacteroides* povzroča abscese, *Enterococci* povzročajo endokarditis, *Clostridium histolyticum* povzroča plinsko gangreno. Te bakterije so prisotne v črevesni flori zdravih ljudi. Analiza mukozne flore FISH je pokazala, da gostitelj sicer ne tolerira lastne mikrobiote, ampak jo loči, da ne bi prišlo do stika s sluznico. V črevesnih kriptah se bakterije pri zdravih ljudeh ne pojavljajo.¹²

Kolonizacija prebavnega trakta novorojenčkov

Za sestavo črevesne mikrobiote v odrasli dobi so zelo pomembna prva tri leta življenja.¹³ Prevladujoča črevesna mikrobiota in mikrobiom naj bi bil med družinskimi člani podoben.¹⁴ Pri novorojenčkih so bakterije v črevesju ključne za razvoj črevesne mukoze in limfnega tkiva vzdolž črevesja po rojstvu.¹⁵ Prebavni trakt novorojenčka naj bi bila ob rojstvu večinoma sterilna. S pomočjo naprednih molekularnih analiz so pred kratkim odkrili bakterije v amnijski tekočini in mekoniju, kar nakazuje možnost izpostavljenosti bakterijam že pred rojstvom. Signifikantna in hitra kolonizacija se zgodi namreč nekaj ur po rojstvu. Prve bakterije, ki ga kolonizirajo, imajo veliko prostora in prehrane. Kolonizacija iz aerobnih v anaerobne bakterije naj bi zgodila med prvim in drugim tednom življenja.¹⁶ Znotraj prvih dni življenja so aerobne in fakultativno anaerobne bakterije prve, ki naj bi kolonizirale spodnji del prebavnega trakta (iz rodu *Escherichia* in Gram pozitivne bakterije rodov: *Streptococcus*, *Staphylococcus* in *Lactobacillus*). Te aerobne bakterije naj bi v prvih dneh življenja porabile kisik v spodnjem delu črevesja in ga pripravile za kolonizacijo dobrimi anaerobnimi bakterijami. Približno 99 % bakterij črevesne flore je anaerobov. Te so večinoma iz rodov *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Lactobacillus*.¹⁷

Znani dejavniki, ki vplivajo na kolonizacijo novorojenčkove prebavne cevi, so: način poroda, vrsta hranjenja dojenčkov, zdravljenje z antibiotiki in nedonošenost.¹⁸

Glavni dejavnik v kolonizaciji črevesa z bakterijami je način poroda. Novorojenčki, rojeni vaginalno, so kolonizirani z bakterijami iz matrine vagine, kože in blata, torej z enterobakterijami in laktobacili. Prebavila novorojenčkov, rojenih s carskim rezom, naseljujejo bakterije iz okolja, posebno iz rodov *Staphylococcus* in *Clostridium*. Pri teh otrocih nastopi kolonizacija z esencialnimi anaerobnimi bakterijami iz rodov *Bifidobacterium* in *Bacteroides* kasneje.¹⁹

Način hranjenja, dojenje ali mlečna formula, je naslednji pomembni dejavnik, ki vpliva na črevesno floro novorojenčka. *Bifidobacterium breve* je prevladujoča bifidobakterija v materinem mleku in blatu dojenih otrok.²⁰ Je kritično pomembna v imunološkem dogajanju po rojstvu in je prevladujoča bakterija pri 2–3 mesece starih dojenčkih, ki so dojeni.¹⁸ Med laktobacili, ki so jih osamili iz črevesne flore dojenih otrok, se najpogosteje pojavlja *L. acidophilus*.²⁰ Dojenčki, hranjeni z mlečno formulo, imajo bolj raznovrstno floro, v večji meri so prisotne po Gramu negativne bakterije: enterobakterije in bakteroides, v manjši meri pa so prisotne bifidobakterije. Obstaja več dejavnikov, ki pospešujejo kolonizacijo črevesja dojenih otrok z bifidobakterijami. Oligosaharidi v materinem mleku delujejo imunomodulacijsko z inhibicijo patogenih bakterij ter spodbujanjem kolonizacije z dobrimi bakterijami tako, da zagotavljajo hrano za rast bifidobakterij. Tudi samo materino mleko naj bi vsebovalo bifidobakterije in laktobacile.²¹

Uživanje antibiotikov v novorojenčkovem obdobju pomembno vpliva na razvoj mikrobiote. V prospektivni študiji²² so novorojenčki, ki so dalj časa bivali v bolnišnici, imeli večji odstotek koloniziranosti z *Clostridium difficile* ter manjši odstotek koloniziranosti z bifidobakterijami. Antibiotično zdravljenje pomembno spremeni floro novorojenčkove prebavnega trakta, zmanjša komenzialne bakterije in poveča tveganje za bakterijsko prevlado *C. difficile*.²³

Pri nedonošenčkih v primerjavi z novorojenčki, rojenimi ob roku, nastopi kolonizacija prebavnega trakta statistično značilno pozneje, še posebej z laktobacili in bifidobakterijami. Pri dojenčkih, starih manj kot 35 tednov gestacije, je kolonizacija močno povezana z gestacijsko starostjo otroka in ne toliko z načinom poroda ali vrsto hranjenja.²⁴ Čeprav se prebavni trakt nedonošenčka sčasoma kolonizira s podobnimi bakterijami, kot jih najdemo pri zdravih novorojenčkih, rojenih ob roku, je razmerje med deležem različnih bakterij drugačno. Stafilokoki so predstavljali 57 % mikrobiote pri nedonošenčkih in komaj 1,2 % so predstavljale bifidobakterije.²⁵ To je povsem drugače kot pri dominanci bifidobakterij pri dojenčkih, rojenih ob terminu. Dejavniki, ki naj bi prispevali k zamudni in neravnovesni kolonizaciji črevesja pri nedonošenčkih, so: nezrel prebavni trakt, enteralno prehranjevanje, manjši stik z materjo (kožo, prsi) in pogosto antibiotično zdravljenje. Črevesje nedonošenčka ob rojstvu še ni doseglo popolne dolžine in površine. Podaljšana izpostavljenost hospitalnim bakterijam poveča tudi tveganje za kolonizacijo s sevi, ki so specifični za bolnišnično floro, posebej iz rodu *Klebsiella* in *Enterobakter*.²⁶ Mikrobiota nedonošenčkov ni tako raznolika, kar naj bi negativno vplivalo na prehranjenost in vsesplošno zdravje otrok. Majhna raznolikost bakterijskih vrst je povezana s povečanim tveganjem za prehransko intoleranco, slabšim pridobivanjem na telesni teži in gastrointestinalnimi boleznimi (npr. nekrozantnim enterokolitisom – NEC).²⁷ Specifičnega patološkega mikroorganizma, ki bi povzročal NEC, niso ugotovili, zato prevladuje mnenje, da je za preprečevanje te bolezni ključno vzpostaviti ravnovesje zdrave mikroflore in povečati kolonizacijo črevesja z dobrimi bakterijami. Probiotiki naj bi te pomanjkljivosti nadomestili. V letu 2010 so 3 metaanalize,^{27,28,29} opravljene pri nedonošenčkih, ki so jim dodajali probiotike, pokazale, da se z uporabo probiotikov zmanjša incidenca NEC in splošna umrljivost, zato so predlagali rutinsko uporabo probiotikov pri nedonošenčkih. Nedavna metaanaliza²⁹ je proučevala razliko v učinkovitosti večsevnih proti enosevnim probiotikom. Ugotovi-

vili so, da so večsevni probiotiki bolj učinkoviti.

Ostali dejavniki, ki vplivajo na sestavo črevesne flore

Na sestavo črevesne flore vplivajo številni in raznoliki dejavniki, tako fiziološki (starost, okolje) kot tudi zunanji dejavniki (prehrana, antibiotiki, probiotiki).³⁰

Način prehrane je eden glavnih dejavnikov, ki prispevajo k sestavi črevesne mikrobiote. De Filippo³¹ je primerjal črevesno floro 14 otrok iz male vasice v Burkini Faso (BF) s 15 otroki iz urbanega področja Firenc v Italiji (EU). Prehrana afriških otrok je bogata z vlakninami, škrobom in rastlinskimi polisaharidi, revna pa z maščobami, živalskimi beljakovinami, torej je pretežno vegetarijanska. Otroci se povprečno doživijo do drugega leta starosti. Otroci iz urbanega področja Firenc jedo t. i. »zahodno« prehrano, bogato z živalskimi beljakovinami, sladkorjem, škrobom in maščobami, ter revno z vlakninami. Statistične analize so med obema skupinama otrok pokazale statistično značilno razliko v prisotnosti bakterij iz debel *Firmicutes* in *Bacteroidetes*. Otroci iz EU so imeli floro, bogato z bakterijami *Firmicutes* in *Proteobacteria*. Otroci iz BF so imeli floro, bogato z bakterijami *Bacteroidetes*, manj pa je bilo *Firmicutes*, imeli pa so tudi edinstvene bakterije, ki v flori otrok iz EU niso bile prisotne: *Prevotella spp.* in rod *Xylanibacter*, ki ju najdemo v riževi rastlini. Nasprotno pa so opažali podobno črevesno floro pri otrocih iz BF in EU v starosti, ko so bili oboji dojeni. Ti otroci so imeli floro, bogato z aktinobakterijami, večinoma iz rodu *Bifidobacterium*, ki je značilen rod pri dojenih otrocih.³² Ti rezultati kažejo na prevladujočo vlogo prehrane pri oblikovanju črevesne flore glede na ostale okoljske dejavnike. Ko dojenje zamenja mešana prehrana, se pojavijo razlike v črevesni flori obeh populacij, kar je posledica različne prehrane in okolja. Primerjali so tudi mikrobno bogastvo med obema populacijama otrok. Izpostavljenost raznolikim okoljskim mikrobom v kombinaciji s hrano, bogato z vlakninami, poveča raznolikost bakterijskih vrst in s tem bogati mikrobiom. Tudi zmanjšanje v mikrobiom

pestrosti je eden neželenih učinkov globalizacije in hranjenja z generično, neokuženo hrano, bogato z nutrienti. V zahodnem in razvijajočem se svetu je prehrana, bogata z maščobami, proteini in sladkorjem ter revna z vlakninami, povezana z naraščanjem incidence neinfekcijskih črevesnih bolezni.³¹ Varovalno vlogo pred pojavom teh bolezni naj bi imele bakterije, ki tvorijo kratkoverižne maščobne kisline (KVMK), ki so v veliki meri prisotne v blatu otrok iz BE.³⁵

Tudi starost človeka je dejavnik, ki vpliva na sestavo črevesne flore. Mariat in sod. (34) so pregledali zastopanost bakterijskih skupin *Clostridium leptum*, *Clostridium coccooides*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia coli* v blatu dojenčkov (3–10 mesecev), odraslih (25–45 let) in starejših ljudi (70–90 let). Za črevesno mikrobioto dojenčkov je značilno prevladovanje bifidobakterij ter tudi bakterij iz vrste *E. coli*; pri odraslih so prevladovali firmikuti in bakteroidete, pri starejših ljudeh pa se je spet povečal delež *E. Coli*.

Intravenska ali oralna antibiotična terapija pomembno zmanjša bakterijsko maso v prebavnem traktu dojenčkov³⁵ in starejših ljudi³⁶. Druge študije pa pravijo, da se po uporabi antibiotika spremeni samo sestava, skupna biomasa bakterij pa ostane enaka.³⁷

Na sestavo črevesne flore pri ljudeh vpliva tudi dodajanje probiotikov (živi mikroorganizmi, ki povzročajo pozitivne učinke na zdravje gostitelja, če jih uživamo v zadostnih količinah, FAO/WHO, 2002), prebiotikov (nerazgradljive sestavine hrane, ki spodbujajo rast in/ali aktivnost zdravju koristnih bakterij) ali simbiotikov (kombinacija prebiotikov in probiotikov). Natančnih podatkov, v kolikšni meri dodatek specifičnega probiotika spremeni črevesno floro, še ni na voljo. Potrebne so dobro kontrolirane klinične študije, ki bodo bolje opredelile mehanizme, ki se skrivajo za probiotičnem delovanjem in njihovim vplivom na ravnovesje kompleksnega ekosistema prebavnega trakta.³⁸

Vloga črevesne mikrobiote

Črevesna mikrobiota igra ključno vlogo pri vzdrževanju intestinalne homeostaze, vključno s prebavo in absorpcijo nutrientov

in imunološkimi mehanizmi. Bakterije v črevesju tvorijo naravno obrambno bariero in imajo zelo veliko protektivnih, strukturalnih in metabolnih učinkov na črevesnem epiteliju. Med njene dodatne funkcije štejemo še regulacijo metabolizma in biološke dostopnosti zdravil, razgradnjo toksinov, obnovo epitelialnih celic, razvoj in aktivacijo imunskega sistema.³⁹ Njihov vpliv na fiziologijo črevesja so raziskovali v primerjalnih študijah na živalih brez črevesnih bakterij in koloniziranih živalih. Živali brez črevesnih bakterij imajo zmanjšano vaskularnost, zmanjšano dejavnost prebavnih encimov, tanjšo mišično steno, manjšo tvorbo citokinov in raven serumskih imunoglobulinov, manjše Peyerjeve otočke in manj intraepitelialnih limfocitov. Zaradi naštetih vplivov črevesne mikrobiote na samega gostitelja večkrat poimenujemo črevesno floro kot metabolni organ, ki opravlja funkcije, ki jih sesalci med evolucijo nismo razvili.⁴⁰

Črevesne bakterije v debelem črevesu razgrajujejo kompleksne ogljikove hidrate do kratkoverižnih maščobnih kislin (KVMK); v glavnem do očetne, maslene in propionske kisline.⁴¹ KVMK predstavljajo glavne anione v črevesni vsebini in znižujejo pH vrednost vsebine debelega črevesa ter tako pomagajo vzdrževati kolonizacijo z dobrimi bakterijami in preprečujejo naselitev patogenih. Stimulirajo tudi absorpcijo vode in natrija iz črevesja ter vplivajo na morfolgijo in funkcijo črevesa. KVMK pozitivno vplivajo na diferenciacijo in proliferacijo epitelialnih celic. Normalne celice epitela debelega črevesa pridobijo 60–70 % energije iz KVMK, še posebej iz maslene kisline.⁴² Nizke koncentracije maslene kisline vplivajo na citokinski odgovor Th celic in tako spodbujajo črevesno epitelno integriteto, ki pomaga omejiti izpostavljenost bakterij mukoznemu imunskemu sistemu in preprečuje prekomeren vnetni odgovor. Nedavno so v študiji potrdili pomembno vlogo tvorjenja očetne kisline pri preprečevanju infekcije z enteropatogeno *Escherichia coli* (0157:H7). Očetna kislina namreč vzdržuje funkcijo črevesne pregrade.⁴³ Le ta vstopi v periferno cirkulacijo, metabolizira se v perifernih tkivih ter je substrat za sintezo holesterola.⁴⁴ Propionska kislina se v veliki meri absorbira v jetrih

in je dober prekurzor za glukoneogenezo, liponeogenezo in sintezo proteinov. Fekalne KVMK predstavljajo kompleksno interakcijo med vrsto in količino zaužite hrane, encimov povezanih z gostiteljem, mikrofloro v različnih razdelkih in njihovo sposobnostjo, da razgradijo hrano.⁴⁵

Zaključek

Za sestavo črevesne flore v odrasli dobi so zelo pomembna prva tri leta življenja. Način

prehrane igra ključno vlogo pri oblikovanju črevesne flore. Veliko je še neodkritega na področju, kaj pomenijo določeni enterotipi za človeka. Prav tako še ni natančno opredeljen pojem zdrave mikrobiote. Je lahko posameznik zaradi specifične sestave črevesne flore nagnjen k določenim boleznim? Veliko raziskav se ukvarja z vprašanjem, kako bi s pomočjo aktivnega spreminjanja mikrobiote, kot npr. z uporabo probiotikov, lahko dosegli boljše zdravje v prihodnosti.

Literatura

- Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson MH, Shi W. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007; 71: 653.
- Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS et al. Metagenomic analysis of the human Distal Gut Microbiome. *Science* 2006; 312: 1355
- Qin J, Li R, Reas J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464: 59–65
- Amann R, Fuchs BM. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6: 339.
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende D.R. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; 473: 174–180.
- Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS et al. Metagenomic analysis of human distal gut microbiome. *Science* 2006; 312: 1355–1359
- Kurokawa K., Itoh T, Kuwahara T, Oshima K, Toh H, Toyoda A et al. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res* 2007; 14: 169–181
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*; 2007 308: 1635–1638
- Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H. Spatial organization and composition of mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3380.
- Harmsen HJ, Raangs GC, He T, Degener JE, Welling GW. Extensive set of 16 S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 2982.
- Swidsinski A, Loening-Baucke V, Lochs H, Hale LP. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1131
- Swidsinski A, Sydora BC, Doerffel Y, Loening-Baucke V, Vaneechoutte M, Lupicki M et al. Viscosity gradient within the mucus layer determines the mucosal barrier function and the spatial organization of the intestinal microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 963
- Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011; 108: 4578–4585.
- Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009; 457: 480–484.
- Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9: 313–323
- Dominguez-Bello M, Blaser MJ, Ley RE, Knight R. Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. *Gastroenterology*. 2011; 140: 1713–1719
- Morelli L. Postnatal development of intestinal microflora as influenced by infant nutrition. *J Nutr*. 2008; 138: 1791S–1795S.
- Moore T A, Hanson C K, Anderson-Berry A. Colonization of the gastrointestinal tract in neonates; ICAN: infant, *Child & Adolescent Nutrition* 2011; 3: 291–294.
- Dominguez-Bello M, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2010; 107: 11971–11975.
- Krajnik K. Proučevanje populacij bifidobakterij in laktobacilov v materinem mleku in blatu dojenčka. Dipl.delo, Ljubljana, Biotehniška fakulteta; 2009.
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 2007; 5:e177
- Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*. 2006; 118: 511–521
- Savino F, Roana J, Mandras N, Tarasco V, Locatelli E, Tullio V. Faecal microbiota in breast-fed infants after antibiotic therapy. *Acta paediatr*. 2011; 100: 75–78.
- Butel MJ, Suau A, Campeotto F, Magne F, Aires J, Ferraris L et al. Conditions of bifidobacterial colo-

- nization in preterm infants: a prospective analysis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007; 44: 577–582.
25. Jacquot A, Neveu D, Aujoulat F, Mercier G, Marchandin H, Jumas-Bilak E, Picaud JC. Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *J Pediatr.* 2011; 158: 390–396.
 26. Feigin RD, Cherry JD, Demmler GJ, Kaplan SL. Feigin & Cherry's textbook of pediatric infectious diseases. 6th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 2009.
 27. Alfaleh K, Anabrees J, Bassler D. Probiotics reduce the risk of necrotizing enterocolitis in preterm infants: a meta-analysis. *Neonatology.* 2010; 97: 93–99.
 28. Deshpande G, Rao S, Patole S, Bulsara M. Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates. *Pediatrics.* 2010; 125: 921–930.
 29. Guthmann F, Kluthe C, Bührer C. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis: an updated meta-analysis. *Klin Pediatr.* 2010; 222: 284–290.
 30. Lagier JC, Million M, Hugon P, Armougom F, Raoult D. Human gut microbiota: repertoire and variations. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 2: 136.
 31. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massari S et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe in rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010 107: 14691–6.
 32. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JL. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006; 444: 1022–1023.
 33. Rook GAW, Brunet LR. Microbes, immunoregulation and the gut. *Gut.* 2005; 54: 317–320.
 34. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimaraes VD, Sokol H, Dore J et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiology.* 2009; 123–128.
 35. Palmer C, Bik EM, Di Giulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *Plos Biol.* 2007; e177.
 36. Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, McMurdo ME. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 3575–81.
 37. Sekirov I, Tam NN, Jogova M, Robertson ML, Li Y, Lupp C et al. Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection. *Infec. Immun.* 2008; 4726–36.
 38. Penna FJ, Péret LA, Vieira LQ, Nicoli JR. Probiotics and mucosal barrier in children. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008; 640–4.
 39. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JL. The Human Microbiome Project. *Nature.* 2007; 804–810.
 40. Shanahan F. The host-microbe interface within the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 915–931.
 41. Pomare EW, Branch WJ, Cummings JH. Carbohydrate fermentation in the human colon and its relation to acetate concentrations in venous blood. *J Clin Invest.* 1985; 1448–54.
 42. Scheppach W. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut.* 1994; 35: 338.
 43. Fukada S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 2011; 469: 543–547.
 44. Wolever TM, Brighenti F, Royall D, Jenkins AL, Jenkins DJ. Effect of rectal infusion of short chain fatty acids in human subject. *Am J Gastroenterol.* 1989; 84: 1027–1033.
 45. Wolever TM, Spadafora P, Eshuis H. Interaction between colonic acetate and propionate in humans. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 682–687.

8. Življenjepis



Življenjepis

OSEBNI PODATKI

Klemenak Martina

(Slovenija)

martina.klemenak@gmail.com

Datum rojstva 30/01/1986 | **Državljanstvo** slovensko

ŽELENO PODROČJE DELA

Pediatrična gastroenterologija, hepatologija in prehrana

IZOBRAŽEVANJE IN USPOSABLJANJE

01/09/2011–v teku

Doktorski študij Biomedicinska tehnologija
Medicinska fakulteta Univerza v Mariboru

24/3/2011

Strokovni izpit za poklic zdravnica

1/10/2004–18/6/2010

Dodiplomski študij Splošna medicina
Medicinska fakulteta Univerza v Mariboru

1/9/2000–15/6/2004

II. gimnazija Maribor

1/9/1992–15/6/2000

Osnovna šola Dušana Flisa, Hoče

DELOVNE IZKUŠNJE

11/12/2012–v teku

Izvolitev v raziskovalni naziv Asistent
UKC Maribor

1/9/2011–v teku

Specializantka pediatrije
UKC Maribor

1/7/2011–31/8/2011

Sobna zdravnica na Kliniki za pediatrijo
UKC Maribor

1/5/2011–30/6/2011

Voluntersko delo na Kliniki za pediatrijo
UKC Maribor

1/10/2010–31/3/2011

Zdravnica- pripravnica
UKC Maribor
Ljubljanska ulica 5, Maribor

KOMPETENCE

Materni jezik slovenščina

Drugi jeziki	RAZUMEVANJE		GOVORJENJE		PISNO SPOROČANJE
	Slušno razumevanje	Braino razumevanje	Govorno sporazumevanje	Govorno sporočanje	
angleščina	C2	C1	C1	C1	C1
nemščina	B2	B1	B1	B1	B2
španščina	C1	C1	B2	B2	B2

Stopnja: A1 in A2: Osnovni uporabnik - B1 in B2: Samostojni uporabnik - C1 in C2: Usposobljeni uporabnik
 Skupni evropski jezikovni okvir

Komunikacijske kompetence Tutorstvo študentom medicine v šol.letu 2008/09 in 2009/10

Organizacijske/vodstvene kompetence 2012 - 2014 Projekt LQ CELJAC - Izboljšanje kvalitete življenja bolnikov s celiakijo na obmejnem področju Slovenije in Madžarske - član delovne skupine
 2008 Organizacija mednarodne poletne izmenjave študentov medicine IFMSA, Maribor 2008 - glavni organizator

DODATNI PODATKI

BIBLIOGRAFIJA

Administration of *Bifidobacterium breve* decreases the production of TNF-alpha in children with celiac disease (Klemenak M, Dolinšek J, Langerholc T, Di Gioia D, Mičetič-Turk D), Digestive diseases and sciences, objavljeno julij 2015

Organizacija in funkcija črevesne flore (Babič M, Cencič A, Mičetič Turk D) Zdravniški vestnik, objavljeno september 2013

PREDAVANJA NA SIMPOZIJIH

Prikaz kliničnega primera bolnika s KVČB, predavanje na simpoziju KVČB za pediatre, 22.3.2013

Pregled ušesa z otoskopom in sodobne možnosti, predavanje na simpoziju Sodelovanje otolaringologa z zdravnikom družinske medicine, 18.11.2011 in objava v istoimenskem zborniku

DELO V UREDNIŠKEM/ORGANIZACIJSKEM ODBORU

Članica organizacijskega odbora Srečanje pediatrov v Mariboru 2012-2014, 2016

Članica uredniškega odbora Medicinskega mesečnika 2005-2010

Članica uredniškega odbora zbornika seminarjev z naslovom: Izzivi družinske medicine, 2007/2008

9. Zahvala

Iskreno se zahvaljujem svoji mentorici prof. dr. Dušanki Mičetić Turk za idejno zasnovano nalogo in vzpodbudo, usmerjanje ter motivacijo pri raziskovanju. Ste moja velika vzornica.

Doc. dr. Tomažu Langerholcu hvala za vse nasvete, pomoč in vzpodbudo čez vsa leta doktorskega študija. Za pomoč pri analizi kratkoverižnih maščobnih kislin se zahvaljujem tudi Maši in Sarah.

Asist. dr. Jerneju Dolinšku se zahvaljujem za vse organizacijske nasvete in da mi je približal pediatrično gastroenterologijo ter me navdušil za raziskovanje. Dipl. med. s. Eriki Macur in dipl. med. s. Valeriji Horvat sem hvaležna za vse odvzeme krvi in pomoč pri obravnavi otrok s celiakijo.

Zahvaljujem se tudi mag. Evgeniji Homšak in sodelavkam za pomoč pri analizi citokinov.

Dr. Maji Šikić Pogačar hvala za podporo, pomoč in številne nasvete v vseh letih doktorskega študija in prav tako hvala dr. Mariu Gorenjaku za vso pomoč in nasvete pri statistični obdelavi podatkov.

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Diani Di Gioia za pomoč pri pisanju članka in podjetju Probiotal za donacijo probiotika in placeba.

Prav tako se najlepše zahvaljujem otrokom s celiakijo in njihovim staršem ter vsem mojim prijateljem, ki so za namene raziskave pripeljali svoje zdrave otroke na odzem krvi in blata.

Za vso podporo pri nastajanju doktorske naloge sem neizmerno hvaležna tudi svoji družini. Dragemu možu Klemnu, ki mi je ves čas stal ob strani, me spodbujal in mi pomagal pri oblikovanju doktorske disertacije. Hvala dragi hčerki Juliji, ki mi je dala moč in zagon za dokončanje doktorske naloge. In ne nazadnje – hvala dragima staršema za privzgojene delovne navade in da sta s svojim zgledom v meni vzbudila željo po nenehnem raziskovanju in ustvarjanju.

UNIVERZA V MARIBORU
MEDICINSKA FAKULTETA

IZJAVA DOKTORSKEGA KANDIDATA

Podpisana Martina Klemenak, vpisna številka 30810490

izjavljam,

da je doktorska disertacija z naslovom

**VPLIV PROBIOTIKA *BIFIDOBACTERIUM BREVE BR03* NA RAVEN
PROVNETNIH IN PROTIVNETNIH CITOKINOV TER KRATKOVERIŽNIH
MAŠČOBNIH KISLIN PRI OTROCIH S CELIAKIJO**

- rezultat lastnega raziskovalnega dela,
- da predložena disertacija v celoti ali v delih ni bila predložena za pridobitev kakršnekoli izobrazbe po študijskem programu druge fakultete ali univerze,
- da so rezultati korektno navedeni in
- da nisem kršil-a avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Podpis doktorske kandidatke:
