

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Vliv lepku na střevní mikrobiom**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Petr Šmíd**

**Obor studia: Výživa a potraviny**

**Vedoucí práce: Ing. Ivo Doskočil, Ph.D.**

© 2019 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Vliv lepku na střevní mikrobiom" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 18. 4. 2019

---

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D. za cenné rady, ochotu, trpělivost a pomoc při práci v laboratoři.

# Vliv lepku na střevní mikrobiom

## Souhrn

Lidé jsou kolonizováni celou řadou mikroorganismů již při narození. Tyto mikroorganismy spolu vytváří mikrobiom. Mikrobiom člověka obsahuje celou řadu probiotických organismů, jako jsou *Lactobacillus spp.* a *Bifidobacterium spp.* Střevní mikrobiom se podílí na trávení jinak nestravitelných složek potravy a hraje velmi významnou roli při nejrůznějších onemocněních. Jeho významnou vlastností je schopnost regulace lidského imunitního systému.

Probiotika musejí vykazovat několik základních vlastností, jako například schopnost projít lidským trávicím ústrojím až do střev nepozměněná a schopná se pomnožit. Nejdůležitější vlastností probiotik je schopnost adherovat na buňky střevní mukózy a to natolik, aby mohla interagovat se střevním epitelem a pomnožit se.

Potrava a celkové stravovací návyky střevní mikrobiom významně ovlivňují. Některé složky potravy mohou dokonce vést až k dysbióze střevní mikrobioty. Dysbióza spolu s dalšími okolními vlivy, jako například genetické predispozice, bývá původcem řady onemocnění. Složení střevního mikrobiomu je také významně narušeno při léčbě antibiotiky. Schopnost adherence mikroorganismů v prostředí, kam byl přidán lepek (v koncentracích 5; 2,5 a 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) byla cílem této práce. Testy byly provedeny v *in vitro* podmínkách na buněčném modelu skládajícího se z buněčných linií kolorektálního adenokarcinomu tlustého střeva HT29 a Caco-2. Testovány byly kmeny *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus brevis*.

Kmen *L. plantarum* adheroval v prostředí s lepkem při koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$  téměř o 7 % méně než v prostředí bez lepku. Kmen *L. brevis* adheroval celkově více než *L. plantarum* a při koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$ , byla jeho adherence dokonce o 4 % vyšší než v prostředí bez lepku. Výsledky nenaznačují výraznější ovlivnění schopnosti adherovat, a nelze s přesností říci, že lepek negativně, či pozitivně působí na aderenční vlastnosti testovaných kmenů ve větším měřítku. Můžeme však sledovat rozdílný vliv lepku na adherenci kmenů. Kmen *L. brevis* vykazoval větší aderenční schopnost v prostředí s lepkem než kmen *L. plantarum*. Zároveň se zjistilo, že s klesající koncentrací lepku adherují kmeny více.

Na základě výsledků vyplývá, že kmen *L. plantarum* adheruje v prostředí s lepkem méně, než kmen *L. brevis*. Můžeme pozorovat drobný vliv lepku na adherenci mikrobioty.

**Klíčová slova:** Lepek; probiotika; adherence; střevní model; *in vitro*.

# Effects of gluten on the gut microbiota

## Summary

Human is being colonised by a myriad of microorganisms soon after birth. Those microorganisms make up a human microbiome. Human microbiome consist of many probiotic organisms as *Lactobacillus spp.* and *Bifidobacterium spp.* Gut microbiome plays role in digestion of non-digestive parts of food and in prevention of many diseases. Its very important role is, that microbiome is capable of regulation of human immune system.

Probiotics must have some basic properties such as ability to went through human gastrointestinal tract non-changed and able to multiply themselves. The most important ability of probiotics is adhesion on intestinal mucose cells, moreover be albe to interact with intestinal epithel and to multiply.

Food and eating habits influence gut microbiome a lot. Some parts of food can even lead to dysbiosis of gut microbiota. Dysbiosis and other environmental influences such as genetical predispositions can cause many diseases. Composition of gut microbiome is havily disrupted by antibiotic treatment.

Ability of adhesion in the environment with gluten added (in concentrations 5; 2,5; 0,5 µg/ml) was the aim of this study. Tests were made *in vitro* conditions on the colorectal adenocarcinoma cell of colon HT29 and Caco-2. Tested strains were *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis*.

*L. plantarum* strain adhered in environment where gluten was added in concentration of 5 µg/ml almost by 7 % more, than in non-gluten environment. *L. brevis* strain adhered better than *L. plantarum* in total and its adhesion in environment with gluten concentration 5 µg/ml was even by 4 % higher than in non-gluten environment. Results doesn't suggest any significant interference of adhesion ability so we can't say, if gluten influences adhesion of tested strains positively or negatively for sure. However, we can prove, that there is a different effect on both strains. *L. brevis* strain adhered better than *L. plantarum* in gluten enriched environment. Moreover, we found out that as concentration of gluten lowers, strains adhered much better.

Based on our results, *L. plantarum* adhere lesser than *L. brevis* in environment enriched with gluten. We can see a small influence of gluten on mikrobita adhesion.

**Keywords:** Gluten; probiotics; adhesion; gut model; *in vitro*.

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>7</b>
<b>2 Cíl práce</b> .....	<b>8</b>
<b>3 Literární řešerše</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1 Střevní mikrobiom</b> .....	<b>9</b>
3.1.1 Kompozice střevního mikrobiomu .....	9
3.1.2 Probiotika.....	11
3.1.2.1 Vlastnosti probiotik .....	11
3.1.2.2 Význam probiotik.....	12
3.1.2.3 Adherence .....	13
3.1.2.4 Probiotické organismy .....	15
3.1.3 Funkce střevního mikrobiomu .....	17
3.1.4 Vliv stravy na střevní mikrobiom .....	20
<b>3.2 Zánětlivá onemocnění střev</b> .....	<b>21</b>
3.2.1.1 Crohnova choroba .....	24
3.2.1.2 Ulcerózní kolitida.....	25
3.2.1.3 Celiakie .....	27
<b>3.3 Lepek</b> .....	<b>30</b>
3.3.1 Vlastnosti lepku .....	31
3.3.2 Příjem potravin s lepkem .....	32
3.3.3 Nemoci spojené s lepkem .....	33
<b>4 Materiál a metodika</b> .....	<b>34</b>
<b>4.1 Materiál</b> .....	<b>34</b>
<b>4.2 Metodika</b> .....	<b>34</b>
4.2.1 Kultivace buněčných linií .....	34
4.2.2 Založení 24jamkové destičky .....	35
4.2.3 Adherence laktobacilů ke střevním buňkám.....	35
4.2.4 Statistická analýza.....	35
<b>5 Výsledky</b> .....	<b>36</b>
<b>6 Diskuze</b> .....	<b>38</b>
<b>7 Závěr</b> .....	<b>42</b>
<b>8 Literatura</b> .....	<b>43</b>

# 1 Úvod

Lidský gastrointestinální trakt je domovem obrovského množství mikroorganismů. Tyto mikroorganismy spolu vytváří mikrobiom, který je brán jako „samostatný orgán“. Tato struktura se během života mění, vyvíjí a je ovlivňována nejenom genetickými faktory, ale i environmentálními. Střevní mikrobiom ovlivňuje náš imunitní systém, pomáhá trávit pro nás jinak nestravitelné části potravin, napomáhá k udržování homeostázy. V posledních letech se ukázalo, že se podílí i na řadě onemocnění.

S vývojem potravin a technologií v potravinářství, je náš mikrobiom zatěžován a vyvíjejí se nejrůznější choroby spojené s jeho dysbiózou. Příkladem je Celiakie nebo různá zánětlivá onemocnění, jako je Crohnova choroba. Moderní výživa se začíná zabývat i tím, jak podporovat zdravý rozvoj mikrobioty, například pomocí probiotik.

## **2 Cíl práce**

Cílem práce je otestování několika probiotických kmenů na jejich schopnost adherovat za přítomnosti čistého lepku a lepku, který prošel trávením až po příslušnou střevní fázi. V teoretické části je cílem vypracování literární rešerše zaměřené na shrnutí základních poznatků z oblasti střevního mikrobiomu, probiotik, lepku a doplnění o některé nové studie.

Hypotéza: Lepek přítomný v potravinách může hrát významnou roli v adherenci probiotických bakterií v lidském střevě a potažmo v imunitním systému člověka.



## 3 Literární rešerše

### 3.1 Střevní mikrobiom

#### 3.1.1 Kompozice střevního mikrobiomu

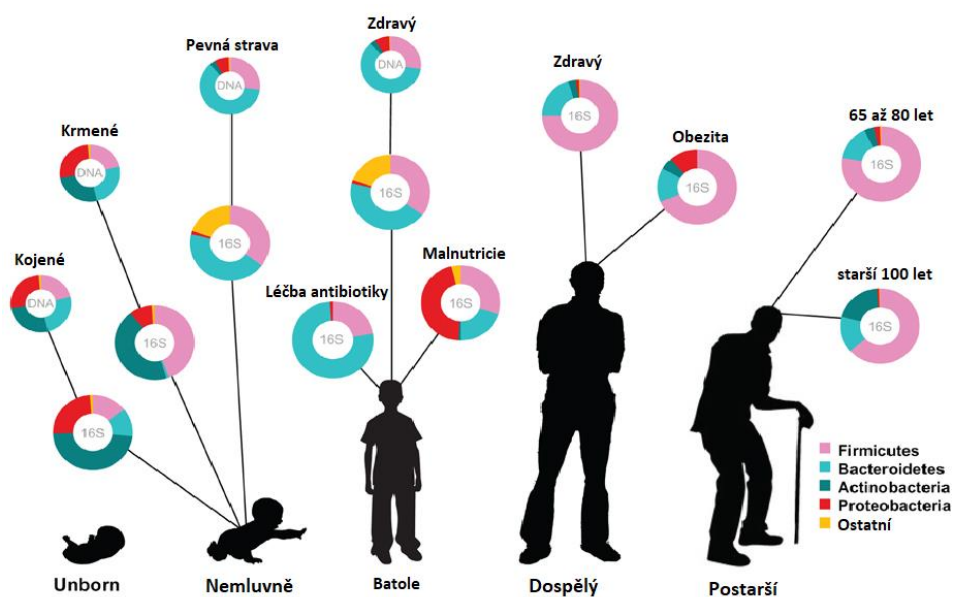
Lidé jsou během svého života osídleny více než bilionem symbiotických mikroorganismů. Tyto organismy žijí uvnitř i na povrchu člověka a mají zásadní vliv na lidské zdraví a prevenci onemocnění. Lidská mikrobiota, hlavně střevní mikrobiota, je považována za „nezbytný orgán“, který obsahuje přibližně  $150 \times$  víc genů, než lze najít v celém lidském genomu (Ursell et al. 2014). Během posledních let se stala bakteriální složka lidského mikrobiomu předmětem intenzivních studií. Mezi tyto studie se řadí například širokospektré projekty, jako jsou the Human Microbiome Project (Peterson et al. 2009) a MetaHIT (Qin et al. 2010). Genetika hostitele hraje důležitou roli při utváření a formování střevní mikrobioty. Bylo dokázáno, že složení bakteriálního společenství je ovlivněno specifickými genovými lokusy hostitele (Benson et al. 2010; Spor et al. 2011). Střevní mikroflóra typicky dominují bakterie, hlavně zástupci tříd *Bacteroidetes* a *Firmicutes*. Ačkoliv zde existuje široká variabilita taxonů vyskytujících se ve střevech a různorodost mikrobiální skladby, bylo naznačeno, že mikrobiota většiny jedinců může být kategorizována do jedné ze tří variant, nebo „enterotypů“ založených na dominantním rodu (*Bacteroides*, *Prevotella*, nebo *Ruminococcus*) (Arumugam et al. 2011). Zvýšená pozornost je věnována objasnění eukaryotické složky mikrobiomu (Ghannoum et al. 2010). Dosavadní výzkumy dokonce ukazují, že i zdravý člověk přechovává různorodé společenství virů, které pak utváří celkový lidský virom (Pride et al. 2012). Většina virových sekvencí identifikovaných u savců je pro nás nových, což naznačuje, že jsme teprve na začátku charakterizace rozmanitosti uvnitř lidského viromu (Virgin et al. 2009; Pride et al. 2012).

Tak jak se vyvíjíme a měníme z útlého dětského věku až do stáří, stejně tak se mění i naše mikrobiota (Clemente et al. 2012). Novorozenec je okamžitě po porodu vystaven obrovskému množství mikroorganismů. Tyto mikroorganismy ho velmi rychle kolonizují a podle způsobu porodu se tak utváří jeho základní mikrobiom (Adlerberth & Wold 2009; Dominguez-Bello et al. 2010). Novorozenci narození přirozenou cestou mají společenství podobné vaginální mikrobiotě matky. Naopak novorozenci porození císařským řezem, mají mikrobiotu charakteristickou pro kůži s dominantními taxony jako *Staphylococcus* a *Propionibacterium spp.* (Dominguez-Bello et al. 2010). Komezální bakterie kolonizují

hostitele krátce po narození. Tak jak hostitel roste a vyvíjí se, tak se i tato jednoduchá společenství postupně vyvíjejí do vysoce různorodého ekosystému (Rogier et al. 2014).

Jako první kolonizují střeva aerotolerantní mikroorganismy. Později jsou nahrazeni anaeroby, kteří jsou typičtí pro střevní mikrobiom dospělého (Clemente et al. 2012). Složení se velmi rychle mění. Sekvence přítomné v prvním týdnu, jsou v týdnu druhém nahrazené jinými a díky tomu se složení během prvních tří měsíců života člověka rozšiřuje a mění (Breitbart et al. 2008). Bakteriální složení střevního mikrobiomu se začíná podobat a přetvářet na složení podobné dospělému člověku již koncem prvního roku života. Plně připomíná mikrobiotu dospělého člověka po dvou a půl letech života (Koenig et al. 2011).

Přestože je mikrobiota u jedinců časem obecně stabilní, její skladba může být změněna vlivem vnějších narušení (obr. 1). Jeden z hlavních faktorů, který může narušit skladbu střevního mikrobiomu, je užívání antibiotik. Antibiotika mají hluboký vliv na mikrobiotu a jejich nadměrné užívání vede ke zvýšení počtu antibiotika-rezistentních patogenů (Dethlefsen et al. 2008). Některé taxony se nezotaví dokonce ani měsíce po dokončení léčby antibiotiky, a obecně pak převládá dlouhodobý pokles v bakteriální diversitě. Tak, jak se založené střevní bakteriální společenství znovu formuje po léčbě antibiotiky, je zde snižená rezistence ke kolonizaci. Snižovaná rezistence dovolí cizím mikrobům růst až přerůst komenzální bakterie a způsobit tak trvalé změny ve skladbě mikrobiomu, které mohou vyústit k řadě onemocnění. Byla vytvořena hypotéza, že opakované užívání antibiotik u lidí zvyšuje zásobu antibiotika-rezistentních genů v našem vlastním mikrobiomu (Sommer et al. 2009).



**Obrázek č. 1:** Složení mikrobiomu během života a poruch (Ottman et al. 2012)

### 3.1.2 Probiotika

Již ve starověkém Řecku léčitelé podávali dětem trpícím na průjemová onemocnění nápoj, který obsahoval probiotické organismy. Historie probiotických organismů jde paralelně s evolucí lidské rasy a díky dnešním pokročilým a sofistikovaným technickým metodám, můžeme vystopovat historii probiotik až do starověku téměř 10 000 let zpátky do minulosti. Mnohem dříve než byla probiotika objevena, byly fermentované produkty jako pivo, chléb, víno, kefir a sýr pravidelně užívány pro nutriční a terapeutické účely (Ozen & Dinleyici 2015).

Definice probiotik byla několikrát změněna. V současné době existuje několik definic probiotik. Termín probiotikum spatřil poprvé světlo světa, když ho v roce 1965 Stillwell a Lilly definovali jako látku, která je vylučována jedním organismem a stimuluje růst organismu druhého (Gupta & Garg 2009). Další definicí je, že probiotika jsou živé mikroorganismy, které při podávání v dostatečném množství, mají příznivý vliv na hostitele. Slovo „probiotikum“ vzniklo spojením dvou slov, latinského pro a řeckého βίος a doslova znamená „pro život“. V roce 1953 použil tuto definici Německý vědec Werner Kollath a označil tak aktivní látky, které jsou nezbytné pro zdravý rozvoj života (Gasbarrini et al. 2016). V roce 1992 celou definici upřesnil Fuller a definoval probiotika jako živý potravinový doplněk obsahující mikroorganismy, který pozitivně ovlivňuje střevní mikrobiální balanc hostitele (McFarland 2015). Světová zdravotnická organizace (WHO) spolu s organizací pro výživu a zemědělství (FAO) definuje probiotika jako živé mikroorganismy převážně lidského původu, které v určitém množství ovlivňují příznivě lidské zdraví.

#### 3.1.2.1 Vlastnosti probiotik

Aby mohla probiotika působit příznivě na zdraví člověka, musí být schopna se dostat do cílového místa, kterým je gastrointestinální trakt člověka. Probiotika se užívají převážně orální cestou. Musí tedy projít celým gastrointestinálním traktem. Překonávají žaludek a dvanáctník. V žaludku musí odolávat velmi kyselému pH, které v tomto prostředí panuje. Dvanáctník neboli duodenum je pak místem intenzivního působení pankreatické šťávy, některých enzymů a žlučových kyselin. Je tedy nanejvýš důležité, aby byla probiotika schopna všem těmto vlivům odolat a následně mohla úspěšně adherovat na střevní epitel (McFarland 2015).

Mikroorganismy, které se užívají jako probiotické, by měly splňovat několik faktorů. Musí mít prokazatelně pozitivní efekt na zdraví hostitele, musí být označena jako bezpečná,

tedy nesmí způsobovat nemoci, a nesmí uživateli způsobit zdravotní rizika. Jsou antikarcinogenní, stimulují imunitní systém hostitele a nevyvolávají alergické reakce (Butel 2014). Nesmí být patogenní a nemělo by se jednat o geneticky nestálé organismy (Pandey et al. 2015).

Probiotické organismy musí být schopny inhibice patogenních organismů a zároveň produkovat antimikrobiální látky. Není však pravidlem, že probiotika musí působit přímo proti patogenu. Mají schopnost regulace imunity hostitele a zároveň stabilizují střevní mikroflóru (McFarland 2015). Probiotické kmeny se nejčastěji přidávají do fermentovaných produktů. Obvykle zde najdeme více než jeden kmen, a proto se výsledné specifické účinky kmenů mohou lišit a nelze je tedy zobecnit. Kombinace různých kmenů probiotik může mít za následek různé projevy u kmenů v kombinaci s jiným kmenem probiotik (Fijan 2014).

### 3.1.2.2 Význam probiotik

Mezi nejčastěji používané mikroorganismy patří rody *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium*, určité kmeny Lactobacilů ze skupin *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus coagulans*, *Escherichia coli* kmen Nissle 1917, některé kmeny enterococů jako například *Enterococcus faecium SF68* a zástupce kvasinek *Saccharomyces boulardii*. Probiotika obsahující tyto mikroorganismy jsou přidávána do potravin, převážně do fermentovaných mléčných produktů.

Potraviny obsahující probiotické kultury mohou obsahovat jeden nebo směs více kmenů. Výsledné projevy probiotik záleží na druhu a množství použitých kmenů. Směs kmenů může vyvolávat jiné účinky než jeden kmen a naopak, a proto není jejich účinky možné generalizovat. Na základě několika provedených studií bylo zjištěno, že více-kmenová probiotika mají vyšší účinnost (Chapman et al. 2011). S vývojem vědy a technologií, užívaných nejen v potravinářství, se objevují nové kombinace a nové probiotické kmeny (Pandey et al. 2015). V potravinách obsahujících probiotika by mělo být alespoň  $10^9$  kolonií tvořících jedinců (KTJ).

Probiotické organismy mají celou řadu příznivých vlastností. Funkce probiotik a místa jejich působení jsou předmětem studia. Mají příznivý efekt na gastrointestinální trakt v případě průjemových a infekčních průjemových onemocněních. Zlepšují dostupnost živin a jejich syntézu v organismu hostitele. Jejich preventivní působení bylo zaznamenáno v případě prevence kolaterálního karcinomu a rotavirových onemocněních kojenců (Pandey et al. 2015). Pomáhají

při vaginální mykóze, kdy díky udržování nižšího pH a produkce antimikrobiálních látek napomáhají snížit četnost tohoto onemocnění u žen (Lee 2014).

Střevní dysbióza neboli nerovnováha střevních kmenů mikroorganismů, které se usídlily ve střevní sliznici, může způsobovat anebo podporovat rozvoj nemocí (Hooks & O'Malley 2017). Suplementace probiotiky dokáže tento disbalanc vrátit do rovnováhy. Případný disbalanc může nastat po léčbě antibiotiky. Lee (2014) tvrdí, že užívání probiotik obsahujících kmeny *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamosus*, *Lactobacillus delbrueckii* a *Lactobacillus fermentum* působí preventivně proti průjmovým onemocněním způsobeným užíváním antibiotik. Užívání probiotik v tomto případě je možné a projev probiotik je pro hostitele příznivý (Hempel et al. 2012).

Padney et al. (2015) uvádí, že mezi pravděpodobné mechanismy, kterými probiotické organismy zmírňují, nebo zabraňují průjmům, patří konkurence o vazebná místa ve střevním epitelu, stimulace imunitního systému a produkce látek, například bakteriocinů. Působí proti patogenním organismům i přímo ve střevech, a to díky produkování toxických metabolitů, které inhibují růst potenciálně patogenních bakterií. Díky tomu se zvýší hladina bakterií s protizánětlivým účinkem a zároveň předchází zánětům střev (Zhang et al. 2015). Kromě pozitivního účinku na hostitele při průjmových onemocněních, působí příznivě také v případě onemocnění střev hostitele. V tomto případě mezi pozitivní kmeny řadíme *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve* a *Streptococcus thermophilus* (Vieira et al. 2013). Podporují vstřebávání živin, hrají roli při syntéze vitamínů, zvyšují stravitelnost potravin a podílejí se na absorpci vápníku, železa a hořčíku (Nagpal et al. 2012). Probiotika jsou schopna snížit vysoký krevní tlak (Yeo & Liong 2010).

Probiotika by zároveň mohla působit v žaludku jako omezení kolonizace bakterií *Helicobacter pylori*. Například *Lactobacillus salivarius* je v tomto případě účinný díky produkci mléčné kyseliny (Amara & Shibl 2015).

### 3.1.2.3 Adherence

Jak již bylo výše zmíněno, schopnost adherovat je pro probiotika zcela nezbytná. Adherence na střevní buňky je nutná, aby mohla probiotika působit proti patogenům, a byla schopna kolonizovat celkový trávicí trakt hostitele (Zheng et al. 2013). Proces bakteriální adheze může být zprostředkován fyzikálně-chemickými silami, jako například hydrofobní

a elektrostatickou interakcí přes lipoteichovou kyselinu, nebo proteiny na povrchu střevní sliznice (Van Tassell & Miller 2011). Zároveň schopnost bakterií agregovat je spojována se schopností adherence a poukazuje na žádoucí charakteristiku probiotik, jelikož agregované bakterie inhibují adhezi patogenních bakterií (Celebioglu & Svensson 2018).

Aby byla adherence úspěšná, je důležitá přítomnost vrstvy hlenu mezi lumenem střeva a epiteliálními buňkami. Existence hlenu je obzvláště důležitá ve střevě tlustém. Zde je vrstva nejsilnější a je zde i mnohem vyšší výskyt mikroorganismů. Pro mikroorganismy vstupující do střev je tato vrstva prvním kontaktním místem, tím pádem adheze k této vrstvě je první krok, který je vyžadován pro interakci hostitelských buněk a probiotických organismů a pro následné vyvolání jakékoliv konkrétní reakce. Epiteliální tkáň, která tvoří obal střev, je složena z různých typů sloupcovitých buněk. Jeden z typů těchto buněk, rozptýlených napříč celou délkou střev a na všech slizničních tkáních, jsou pohárkové buňky. Tyto buňky jsou jednobuněčné žlázy, které produkují glykoprotein zvaný mucin, který dává sliznici její charakteristické viskoelastické fyzikální vlastnosti. Vyloučený mucin polymerizuje a vytváří matrix, který poskytuje strukturní základ slizniční vrstvy, která následně chrání před patogeny, enzymy, toxiny, dehydratací a oděru (Van Tassell & Miller 2011). Za normálních fyziologických podmínek produkují pohárkové buňky mucin na základní konstitutivní úrovni, aby udržely tuto ochrannou vrstvu sliznice, která je vystavována drsnému luminálnímu prostředí a je neustále erodována luminálními částicemi a střevní peristaltikou (Akiba et al. 2000).

Mucinu bylo identifikováno na 20 druhů, převládající je MUC2 (Kadlec et al. 2011). Muciny jsou vysoce glykosylované bílkoviny obsahující kolem 80 % a víc sacharidů. V proteinovém jádře se nachází aminokyseliny prolin, threonin a serin, které se označují pojmem PTS sekvence. Nachází-li se mucin na rozhraní, je předpokládáno, že orientuje svou hydrofilní glykosylovou část směrem k vodné fázi (polární fázi). Základní proteinový řetězec MUC2 obsahuje dvě PTS sekvence (peroxisomal targeting signal – peroxisomální cílová sekvence). Kromě toho obsahuje dalších 5200 aminokyselin. Celá proteinová kostra je hustě kryta glykany. Ty slouží jako ochranná a pojivová vrstva, díky níž má své gelové vlastnosti (Lousinian et al. 2018). Některé probiotické organismy dokáží stimulovat sekreci pohárkových buněk a tím zlepšují buněčnou obranu hostitele a brání vstupu patogenů (Gareau et al. 2010).

Adherence je obvykle testována v *in vitro* podmínkách, a to na modelech epiteliálních buněčných linií. Testy *in vivo* jsou velmi náročné a složité na provedení, a proto se namísto nich provádí velmi zjednodušující testy *in vitro*. Dostáváme tedy omezené závěry, které nemůžeme na tyto situace přímo aplikovat (Van Tassell & Miller 2011; Jensen et al. 2012).

### 3.1.2.4 Probiotické organismy

Naprostá většina mikroorganismů, které jsou dnes brány jako probiotické, jsou gram-pozitivní bakterie. Mezi nejpoužívanější patří bakterie mléčného kvašení (zkráceně LAB, z anglického lactic acid bacteria), které jsou již mnoho let využívány při výrobě potravin (Behnsen et al. 2013). Využívané jsou ale i gram-negativní bakterie. Jedná se například o *Escherichia coli* Nissle (Behnsen et al. 2013). Bakterie mléčného kvašení jsou mikroorganismy zbavené cytochromu, jsou aerotolerantní, náročné na okolí, tolerantní ke kyselinám a striktně fermentativní, jež hlavním produktem je mléčná kyselina.

Nejvýznamnějšími rody jsou: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pedococcus*, *Leuconostoc* a *Bifidobacterium* (Vasijevic & Shah 2008). Zástupci bakterií mléčného kvašení jsou rozděleni do dvou odlišných skupin založených na tom, jaký je jejich metabolismus uhlíku. Homofermentativní skupina skládající se z rodů *Lactococcus*, *Pedococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* a některých laktobacilů používá glykolytickou cestu k přeměně uhlíkového zdroje převážně na kyselinu mléčnou. Na rozdíl od homofermentativních bakterií, heterofermentativní bakterie produkují ekvimolární množství laktátu, oxidu uhličitého, ethanolu, nebo acetátu z glukózy využívající při tom fosfoketolázovou cestu. Zástupci této skupiny heterofermentativních bakterií jsou například *Leuconostoc*, *Weissella* a některé laktobacily (Vasijevic & Shah 2008).

#### ***Lactobacillus* spp.**

Jedná se o nesporotvorné, gram-pozitivní, anaerobní tyčinky s negativní reakcí katalázy (Salvetti et al. 2012). Shlukují se do krátkých řetězců, nebo palisád. Jsou fakultativně aerofilní nebo mikroaerofilní. Optimální podmínky pro jejich růst jsou v prostředí s pH 5,5 - 6,2 o teplotě mezi 30 - 40 °C. Kmeny laktobacilů, tradičně užívaných jako probiotika, jsou obvykle lidského, nebo zvířecího původu, protože takovéto kmeny by měly být daleko lépe adaptované na podmínky lidského gastrointestinálního traktu (Monteagudo-Mera et al. 2012). Ačkoli studie ukázaly dobrý projev kmenů laktobacilů izolovaných z přírodní nebo fermentované zeleniny v *in vivo* testech pro výběr probiotik (Naeem et al. 2012; Ilha et al. 2015), informace o probiotických vlastnostech kmenů laktobacilů izolovaných z ovoce nebo jejich výrobků jsou stále nedostačující (de Albuquerque et al. 2018).

*Lactobacillus* spp. řadíme pod kmen *Firmicutes*, třída *Bacilli*, řád *Lactobacillales* a čeleď *Lactobacillaceae*. Jejich nejbližšími příbuznými jsou rody *Paralactobacillus* a *Pedococcus*. Jedná se o nejpočetnější rod, zahrnující více než 100 popsáných druhů.

*Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. plantarum*., *L. fermentum*, *L. reuteri* a *L. brevis* jsou nejběžnější druhy laktobacilů izolovaných z lidského střeva. Funkční vlastnosti a bezpečnost jednotlivých druhů *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* a *L. johnsonii* byly značně zkoumány a dobře zdokumentovány (Vasijevic & Shah 2008). Vyskytují se přirozeně v dutině ústní, gastrointestinálním traktu a pochvě (Fijan 2014), obecně v místech bohatých na sacharidy.

Původně byly laktobacily rozděleny do skupin na základě jejich teploty růstu a fermentaci hexóz, a následně podle jejich homofermentativního nebo heterofermentativního potenciálu. Moderní rozdělení však vytvořili Hammes a Vogel, a Hammes a Hertel, kteří rozdělili laktobacily jako obligátně homofermentativní, fakultativně heterofermentativní a obligátně heterofermentativní na základě fermentovaného cukru a fermentačních produktů (Salvetti et al. 2012).

### ***Bifidobacterium* spp.**

Bifidobakterie byly objeveny a popsány v roce 1900 Tissierem. Představují jeden z nejbohatších a prvních druhů kolonizátorů střev novorozence a jsou známé pro svoje nesčetné benefity pro střeva hostitele, jeho imunitu a zdraví (Ventura et al. 2014; Nagpal et al. 2017). Ve střevech hostitele si drží stabilní zastoupení až do dospělosti, kdy jejich počet klesá (Shah 2007).

*Bifidobacterium* spp. řadíme do kmene *Actinobacteria*, třídy *Actinobacteria*, řádu *Bifidobacteriales* a čeledi *Bifidobacteriaceae*. Zprvu byly řazeny díky své podobnosti pod Laktobacily (Ventura et al. 2014). Jedná se o gram-pozitivní, anaerobní, plyny netvořící, nesporulující, polymorfní tyčinkovité bakterie přirozené obyvatele gastrointestinálního traktu člověka a zvířat. Jejich specifická metabolická cesta fermentace hexózy jim umožňuje produkovat kromě mléčné kyseliny také octovou kyselinu v molárním poměru 3:2. Díky jejich náročné povaze je obtížné pěstovat je v laboratořích (Vasijevic & Shah 2008). Rod *Bifidobacterium* se skládá z více než 50 druhů a poddruhů (Nagpal et al. 2017). V lidském střevě jsou nejčastějšími zástupci rodu *bifidobacterium* *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. longum*, *B. pseudocatenulatum* a *B. pseudolongum*, zatímco *B. animalis* subsp. *Lactis* je druh nejčastěji zastoupen ve funkčních potravinách a doplňcích stravy lidí. Bifidobakterie jsou dominantní skupinou mikroorganismů ve stravě kojenců (Tojo et al. 2014).



Optimální podmínky pro růst Bifidobakterií je prostředí s pH 6 - 7 a teplotou 37 - 41 °C (Shah 2007). Není zaznamenán růst při pH nižším než 4,5 a vyšším než 8,5 (Biavati et al. 2000).

### 3.1.3 Funkce střevního mikrobiomu

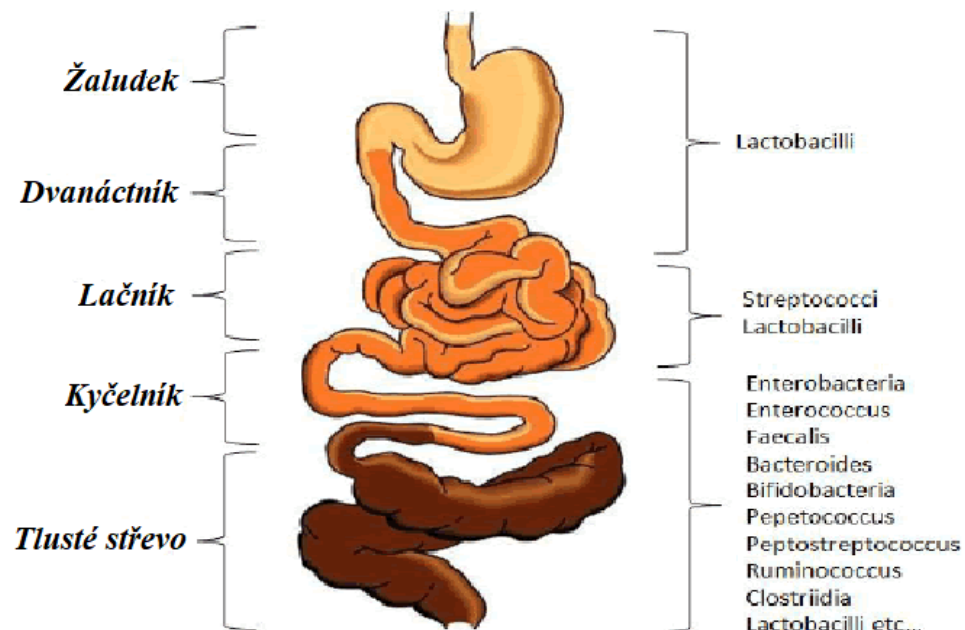
Savci se vyvíjí spolu se svým mikrobiomem po miliony let. Není tedy překvapením, že náš imunitní systém, a hlavně slizniční imunitní systém, si vytvořily spleť a složitá spojení s naší přídruženou mikrobiotou (Chow et al. 2010). Jak je člověk kolonizován velkým množstvím virů, eukaryot a bakterií, zjišťujeme, že jejich dysbióza je faktorem vyvolávajícím onemocnění spíše než jednotlivé mikroorganismy (Clemente et al. 2012). Mikrobiota má potenciál zvýšit získávání energie z potravy, zvýšit příjem živin a změnit chuťové vnímání (Perry et al. 2016; Wang et al. 2017). Lidská mikrobiota zároveň poskytuje fyziologickou bariéru. Brání hostitele proti cizím patogenům pomocí kompetice a produkce antimikrobiálních látek. A je nepostradatelná pro vývoj střevní mukózy a imunitního systému hostitele (Bouskra et al. 2008; Wang et al. 2017). Symbiotické bakterie metabolizují nestravitelné sloučeniny, zásobují esenciálními živinami, brání proti potencionální kolonizaci patogeny a přispívají k formování střevní architektury (Round & Mazmanian 2009).

Střevní mikrobiota je zapojena do trávení potravy, která nemohla být strávena žaludkem nebo tenkým střevem, a zároveň hraje klíčovou roli v udržování energetické homeostázy. Tuto určitou potravu představují primárně vlákna ve stravě, jako jsou xyloglukany, které jsou běžně k nalezení u zeleniny a které mohou být stráveny specifickými druhy z *Bacteroides spp.* (Larsbrink et al. 2014). Další nestravitelná vlákna, jako například fruktooligosacharidy a oligosacharidy, mohou být využita rody *Lactobacillus spp.* a *Bifidobacterium spp.* (Goh & Klaenhammer 2015). Studie potvrdily účast střevní mikrobioty na homeostáze lipidů a proteinů a stejně tak i na syntéze esenciálních vitamínů (Morowitz et al. 2011).

Normální střevní mikrobiom (obr. 2) produkuje 50-100 mmol·L<sup>-1</sup> mastných kyselin s krátkým řetězcem (short-chain fatty acids – SCFAs) za den, například octová, propionová a máselná kyselina a slouží jako energetický zdroj pro střevní epitel hostitele (Wang et al. 2017). Tyto kyseliny mohou být rychle vstřebány tlustým střevem a pomoci v mnoha různých procesech, například při regulaci motility střev, při zánětu, glukózové homeostáze a sběru energie (Flint et al. 2012; Cani et al. 2013). Mimoto bylo prokázáno, že střevní mikrobiota doručuje hostiteli vitamíny, jako jsou foláty, vitamín K, biotin, riboflavin (vit. B<sub>2</sub>), kobalamin (vit. B<sub>12</sub>) a pravděpodobně i další vitamíny skupiny B (Kang et al. 2012). Signály a metabolity

mikroorganismů mohou být zachyceny hematopoetickými i nehematopoetickými buňkami vrozeného imunitního systému a převedeny do fyziologických odpovědí (Thaiss et al. 2016). Nemůžeme však tvrdit, že všechny mikroorganismy mají benefiční účinky, některé mikroorganismy za jistých podmínek způsobují záněty (Wang et al. 2017).

### ***Mikrobiota v gastrointestinálním traktu***



**Obrázek č. 2:** Osídlení jednotlivých částí gastrointestinálního traktu mikrobiotou. Upraveno podle (Riasat et al. 2016).

Mnohobuněčné organismy existují jako meta-organismy, složené z makroskopického hostitele a jeho symbiotické komenzální mikrobioty. Při odhadovaném složení 100 bilionů buněk, převyšují symbionti hostitele počet jeho vlastních buněk minimálně o faktor 10 a exprimují tak  $10 \times$  více unikátních genů, než samotný genom jejich hostitele (Ley et al. 2006). Mikrobiota díky svým enzymatickým schopnostem hraje velmi významnou roli při kontrole většiny fyziologických aspektů hostitele. (Belkaid & Hand 2014).

Imunitní systém je komplexní síť vrozených a adaptivních složek s mimořádnou schopností se přizpůsobit a adaptovat na rozdílné situace. Tato síť působí jako regulátor homeostázy hostitele. Vývoj definovaných ramen imunitního systému, konkrétněji těch, která jsou spojena s adaptivní imunitou, se časově shoduje se získáváním komplexní mikrobioty, to podporuje koncept, že velká část tohoto aparátu se vyvinula jako prostředek na udržení symbiotických vztahů s touto vysoce různorodou mikrobiální komunitou. Mikrobiom zase kalibruje a podporuje všechny aspekty imunitního systému (Belkaid & Hand 2014).

Gastrointestinální trakt je sterilní do té doby, než dojde k porodu a imunitní systém je tak vystaven komenzálním mikroorganismům. Pozdější vývoj mikrobioty v rámci gastrointestinálního traktu je patrný na obrázku číslo 2. Předpokládá se, že tyto brzké interakce dlouhodobě udávají tón slizničního a systémového imunitního systému. Kolostrum a mateřské mléko obsahují metabolity, mikroorganismy, Imunoglobulin A (IgA), cytokiny a imunitní buňky. Tyto faktory synergicky ovlivňují mikrobiotu kojených dětí a odpověď hostitele na tyto mikroby, jako například *Bifidobacterium spp.* (Marcobal et al. 2010; Marcobal & Sonnenburg 2012). Schopnost přijmout mikrobiotu lze také vysvětlit relativně nezrálým imunitním systémem novorozence a tolerogenním prostředím, které definuje časný život savců. Vývoj imunitního systému je charakterizován tupou produkcí cytokinů a šikmým vývojem T a B buněk směrem ve prospěch regulačních odpovědí (Siegrist 2001; PrabhuDas et al. 2011). Nedávná studie ukázala, že definovaná populace erytroidních buněk obohacujících novorozence napomáhá k udržení tohoto imunoregulačního prostředí a omezuje zánětlivé reakce po kolonizaci mikrobiotou (Elahi et al. 2013).

Jeden z primárních způsobů dialogu mezi hostitelem a mikrobiotou je zprostředkován rozpoznáním konzervovaných molekulárních vzorců spojených s mikrobiálními procesy. Jak vrozený imunitní systém integruje mikrobiální signály, zůstává nejasné, ale nedávná zjištění podporují hypotézu, že exprese epigenom-modifikujících enzymů epiteliálními buňkami může být nezbytná pro koordinaci střevní homeostázy závislémi komenzály (Alenghat et al. 2013). Velká část imunitního systému je zaměřena na kontrolu našeho vztahu s mikrobiotou. Nejvyšší počet imunitních buněk v těle se nachází v místech kolonizovaných komenzály, například kůže nebo gastrointestinální trakt. Na druhou stranu, aby se ochránila ekologická nika mikrobiomu, je dominantní působení zdravé mikrobioty na imunitní systém zaměřeno na posílení bariérové imunity, a tedy i vlastní omezení. Centrální strategie používaná hostitelem k udržení homeostatického vztahu s mikrobiotou je minimalizace kontaktu mezi mikroorganismy a povrchem epitelových buněk, čímž se omezuje zánět tkáně a mikrobiální translokace. V gastrointestinálním traktu, který je domovem nejhustější populace komenzálních mikroorganismů, se této segregace dosahuje kombinovaným působením epiteliálních buněk, hlenu, IgA, antimikrobiálních peptidů a imunitních buněk. Souhrnně tyto strukturní a imunologické složky označujeme jako „mukózní firewall“ (Macpherson et al. 2009).

Během posledních let zaujaly regulační T buňky (Treg.) centrální postavení v chápání procesu imunologické tolerance. Tyto buňky udržují jak periferní, tak slizniční homeostázu po celý život hostitele. Narušení této homeostázy vede ke ztrátě orální tolerance a rozvoji

aberrantních efektorových odpovědí ve střevě (Mucida et al. 2005; Worbs et al. 2006; Weiner et al. 2011; Josefowicz et al. 2012). Ačkoliv Treg buňky mohou vznikat jako diferenciované buňky v brzlíku, prostředí gastrointestinálního traktu je privilegovaným místem pro indukci Treg buněk v odezvě na orální antigeny. Schopnost indukovat Treg buňky je specializovanou vlastností střeva (Mucida et al. 2005; Coombes et al. 2007; Sun et al. 2007). Význam této cesty pro regulaci homeostázy sliznic, je podporován zjištěním, že podíl indukovaných Treg buněk v tkáních tlustého střeva, je specifický pro antigeny odvozené z komenzální mikrobioty (Lathrop et al. 2011). Schopnost indukovat Treg buňky je navrhována jako jedna z mechanismů působení probiotik (Belkaid & Hand 2014).

### 3.1.4 Vliv stravy na střevní mikrobiom

Porozumění stabilitě mikrobioty uvnitř jedince napříč časem je velmi důležitý krok v umožnění předpovídání chorobných stavů a vývoji terapií na opravu dysbiózy (neboli nerovnováze mikrobiálního společenství). Časem nasbíraná data ukazují, že skladba mikrobioty člověka je u zdravých dospělých průběžně relativně stálá (pro bakterie, viry i eukaryota) (Reyes et al. 2010; Caporaso et al. 2011). Ačkoliv toto tvrzení předpokládá, že mnoho proměnných, jako jsou dieta, nemoci a prostředí, zůstávají beze změny konstantní (Clemente et al. 2012).

Změny stravovacích návyků vykazují značný dopad na mikrobiom (Reyes et al. 2010). Pokusy na myších ukázaly, že přechod z nízkotučné, rostlinné na polysacharidy bohaté stravy na vysokotučnou, tzv. „Západní“ dietu, s vysokým obsahem cukrů, dokáže změnit skladbu mikrobioty během jednoho dne (Turnbaugh et al. 2009). Studie podle Wu et al. 2011 provedená na lidech ukázala, že přechod ze stravy bohaté na tuk a chudé na vlákninu na stravu chudou na tuk a bohatou na vlákninu způsobil pozoruhodné a významné změny ve střevní mikrobiotě během 24 hodin (Wu et al. 2011). Zajímavostí je, že strava koreluje s enterotypem jedince. Zatímco u jedince se stravou bohatou na zvířecí tuky dominuje enterotyp s rodem *Bacteroides*, tak enterotyp jedince se stravou obsahující hodně sacharidů je spojen s dominancí rodu *Prevotella spp.*

Metagenomická analýza odhalila, jak je mikrobiom obohacen v genech, aby brzo po narození usnadnil využití laktátu u dětí kojených mateřským mlékem (Koenig et al. 2011). Velmi zajímavé je, že funkční kapacita k využití glykanů ze stravy založené na rostlinách je přítomná mnohem dříve, než dojde k přechodu na pevnou stravu, což naznačuje, že střeva

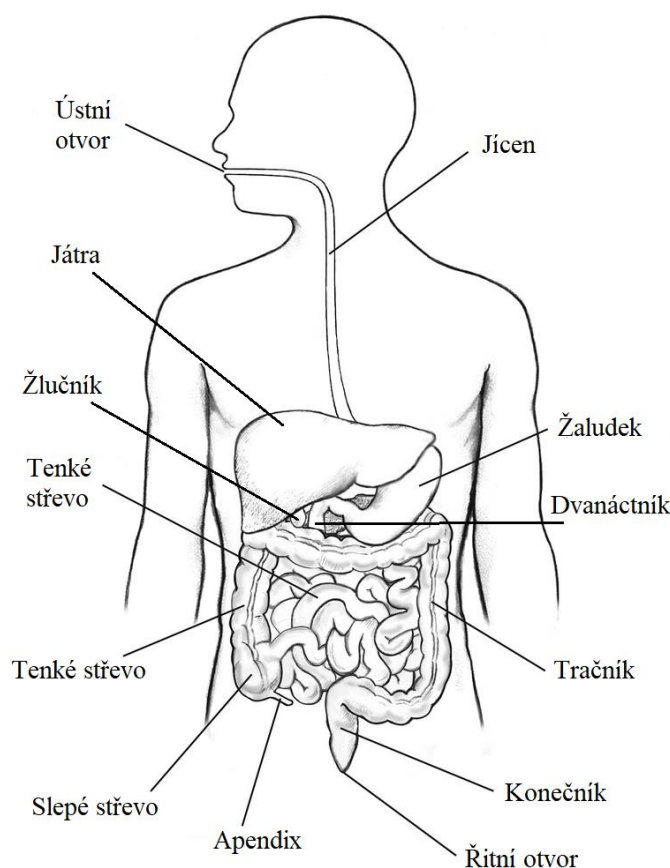
novorozenců jsou připravená využívat stravu, která není výhradně mléčná, ještě před tím, než se samotná změna odehraje (Koenig et al. 2011).

Tyto studie poskytly základní charakterizaci variability složení střevního mikrobiomu, připravily základy pro budoucí výzkum, aby bylo možné detekovat rozdíly v mikrobiotě, které jsou specifické pro určité nemoci a lépe tak předpovídat tyto stavy (Clemente et al. 2012).

### **3.2 Zánětlivá onemocnění střev**

Jedná se o společné označení několika nemocí, které jsou výsledkem složité součinnosti genetických, imunologických, mikrobiálních a environmentálních faktorů. V současnosti se mezi tyto faktory řadí i dysbióza střevní mikrobioty, která je ovlivňována složkami západního stylu života. Mezi tyto onemocnění patří ulcerózní kolitida a Crohnova choroba. Vyznačují se chronickými a opakujícími se záněty v gastrointestinálním traktu.

Gastrointestinální trakt má řadu sofistikovaných a autonomních funkcí, mezi které patří trávení, absorpce, vylučování a ochrana. Tyto funkce jsou plněny řadou orgánů s odlišnými rolami od úst až po řitní otvor (obr. 3). Žaludek a tenké střevo jsou zodpovědné za trávení potravy a vstřebávání živin. Tlusté střevo se v první řadě zabývá resorpcí vody a zahušťováním odpadu a skladováním této hmoty před samotným vyloučením z těla (Cheng et al. 2010). Často bývá nazýván jako jeden orgán sestávající se z menších jednotek, s délkou 6 metrů (Reed & Wickham 2009).



**Obrázek č. 3:** Jednotlivé části lidského gastrointestinálního traktu.

Mezi příznaky zánětů v gastrointestinálním traktu patří průjem, křeče v oblasti břicha, úbytek na hmotnosti, únava, anémie a další mimo intestinální příznaky jako alergie a artritida. Takto nemocný pacient má podstatně sníženou kvalitu života, obě tyto poruchy jsou charakterizovány přerušovanými aktivními (těžkými, středními, nebo lehkými) a neaktivními obdobími (remise, nebo úplný klid). Výskyt a prevalence Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy se během posledních 50 let zvýšila po celém světě, převážně pak v rozvojových a západních zemích. Jelikož se jedná o komplexní působení mnoha faktorů, je vývoj specifické léčby velmi náročný (Cosnes et al. 2011; Ananthakrishnan 2015; de Souza & Fiocchi 2016).

Střevní mikrobiota si získává stále větší pozornost jakožto faktor, který kontroluje střevní homeostázu u zdravých jedinců. Nejrůznější faktory životního stylu, jako je hygiena, léčba antibiotiky a spotřeba takzvané „západní stravy“, která je chudá na vlákninu, a naopak bohatá na tuky a cukry, jsou spojené s nerovnováhou střevní mikrobioty či dysbiózou. Nerovnováha a dysbióza mohou vést až k chronickým zánětům a metabolickým dysfunkcím (Sommer & Backhed 2013; Thorburn et al. 2014). Narušení mikrobiomu může vyvolat zánětlivé onemocnění v prostředí gastrointestinálního traktu, typické pro zánětlivá onemocnění

střev, které změni střevní homeostázu (Agus et al. 2016; Scott et al. 2018). Vrozené a adaptivní buňky infiltrující lamina propria mohou produkovat prozánětlivé cytokiny (jako jsou IFN- $\gamma$ , IL-17, TNF- $\alpha$  nebo IL-1  $\beta$ ) zhoršující zánětlivý proces, způsobující poškození epitelu a střevní a extraintestinální symptomy (Neurath 2014; de Souza & Fiocchi 2016). Podle Nie et al. (2017) však zůstává nadále nejasné, zdali je dysbióza střevní mikrobioty příčinou, nebo důsledkem zánětlivých střevních onemocnění.

Střevní mikrobiom je vyvážená komunita různých mikroorganismů, včetně bakterií (Koboziev et al. 2014). Tato bakteriální komunita se podílí na udržování homeostázy střeva prostřednictvím „tréninku“ imunitního systému a inhibicí množení a růstu patogenů a patobiontů (Rakoff-Nahoum et al. 2004; Kamada et al. 2013). Střevní zánětlivá onemocnění jsou regulována střevní mikrobiotou. Projevuje se například, když je střevní segment vyloučen z fekálního proudu vedoucího k odklonu kolitidy, nebo pouchitidy (Tominaga et al. 2018).

Zvláště důležité jsou bakteriální druhy, které se živý nestravitelnými vlákny z potravy a produkují metabolity, které mají pozitivní účinky na střevní sliznici, patří sem SCFA, zejména acetát, propionát a butyrát. Butyrát je primárním zdrojem energie pro kolonocyty a také udržuje střevní homeostázu prostřednictvím protizánětlivých účinků (Donohoe et al. 2011; Correa et al. 2016). Na buněčné úrovni mohou mít SCFA přímé, nebo nepřímé účinky na procesy jako buněčná proliferace, diferenciace a genová exprese. Mohou se vstřebávat pasivní difuzí, avšak vstřebávání střevními epiteliálními buňkami je díky vyhrazeným transportérům jako monokarboxylátový transportér 1 (MCT1) a monokarboxylátový transportér 1 s vázaným sodíkem (SMCT1), výrazně zvýšena. Navíc SCFA působí jako ligandy pro receptory vázané na G-protein (GPCR), včetně GPR109A, GPR43 a GPR41, čímž aktivují protizánětlivé signální kaskády (Brown et al. 2003; Le Poul et al. 2003; Miyauchi et al. 2004; Taggart et al. 2005; Thorburn et al. 2014). Důležité je, že pacienti trpící zánětlivými střevními onemocněními vykazují nejen snížené hladiny dominantních bakterií produkujících SCFA (například *Faecalibacterium prausnitzii* a *Roseburia intestinalis*) ve střevní sliznici a stolici, ale reálné hladiny SCFA v ustáleném stavu v porovnání se zdravými kontrolami jsou výrazně sníženy (Joossens et al. 2011; Takahashi et al. 2016; Pascal et al. 2017). Dochází u nich tedy dysbióze a ztrátě diverzity střevní mikrobioty, nejvýraznější je to u pacientů trpících Crohnovou chorobou (Pascal et al. 2017). Související změny hladin SCFA mohou být obnoveny novými léčebnými strategiemi. Jednou z metod, která se v současné době využívá je fekální mikrobiální transplantace, která je získávána od zdravých dárců a která účinně redukuje remisi u ulcerózní kolitidy (Paramsothy et al. 2017). Přesto je třeba stále stanovovat dlouhodobou trvanlivost

a bezpečnost. Dalšími strategiemi pro restituci mikrobioty je používání probiotik, nebo diet bohatých na vlákninu v kombinaci s probiotiky, protože jednotlivé mikroorganismy produkující SCFA nebo kombinace, mohou zmírnit symptomy zlepšením hladin butyrátu (Venegas et al. 2019).

### 3.2.1.1 Crohnova choroba

Crohnova choroba je chronické zánětlivé onemocnění vyskytující se v tlustém, nebo tenkém střevě, nebo v obou zároveň. Je charakterizována dvě hlavními mechanismy. Na jedné straně je aberantní a perzistentní zánětlivý proces, který je udržován nadbytkem prozánětlivých cytokinů a způsobuje transmurální léze střevní stěny. Na druhé straně je nadměrná fibrogenní reakce způsobená zejména fibroblasty a aktivací buněk hladkého svalstva, což vede k transmurální fibróze (Blobe et al. 2000; Hassan et al. 2005; Beddy et al. 2006). Zajímavou vlastností Crohnovi nemoci je její fenotypová heterogenita. To je zřejmé s ohledem na rozmanitost slizničních lézí (které jsou od normálních až po hluboké pronikavé vředy), střevní strukturu místa onemocnění a směs symptomů (Gasche et al. 2000; Silverberg et al. 2005). Předpokládá se, že přetrvávající zánět vyvolává poškození střev, které časem kulminuje ve vývoji chronických hlubokých ulcerací, fibrostenotických striktur, abscesů nebo píštělů. Tyto komplikace často vedou ke změně funkce střeva a představují hlavní příčinu opakovaných chirurgických resekcí (Pariante et al. 2011).

Pacient trpí nejen symptomy vyplývajícími ze zanícení střev, jako jsou křeče střev, bolesti břicha, nebo průjem, ale mohou se objevit některé extraintestinální projevy na kloubech, kůži, nebo očích. Mezi příznaky systémové nemoci patří podvýživa a určité anémie. Anémie je běžně doprovázeně komplikující onemocnění při Crohnově nemoci. Onemocnění pacientovi značně komplikuje kvalitu života, kognitivní funkce, pracovní schopnost a často přechází v komorbidní stav, který je spojen s jinými onemocněními, nebo dokonce i smrtí (Cucino & Sonnenberg 2001; Pizzi et al. 2006; Wells et al. 2006).

Nedávná zjištění, že Crohnova nemoc je progresivní a destruktivní onemocnění, vedlo k tomu, že se vyvinuli nové indexy onemocnění, jako Lemannův index, který měří kumulativní poškození střeva v čase (Pariante et al. 2015) a index invalidity IBD (Peyrin-Biroulet et al. 2012; Gower-Rousseau et al. 2017). Současně s tím se s léčebné paradigma u Crohnovi nemoci přesouvá z čisté kontroly příznaků a zlepšování kvality života pacientů, k blokáde progresu onemocnění a zlepšení výsledků dlouhodobého onemocnění snížením lumenálního



strukturálního poškození střeva, postižení a dlouhodobých následků této nemoci (Pariente et al. 2019).

Úprava přirozené historie Crohnovi nemoci zůstává stále klinickou výzvou, stejně tak i míra fibrostenotických a fistulizujících komplikací vedoucích k operaci zůstává vysoká (Pariente et al. 2011). Vzhledem k tomu, že v současnosti dostupné léky na Crohnovu nemoc nedokáží účinně léčit strukturální intestinální poškození, je nutné lépe pochopit základní patofyziologii pro umožnění další identifikace nových terapeutických cílů a vývoje nových možností léčby (Pariente et al. 2019).

### 3.2.1.2 Ulcerózní kolitida

Ulcerózní kolitida postihuje tlusté střevo a rektum a typicky zahrnuje pouze nejnvnitřnější sliznice a mukózní vrstvu. Projevuje se jako pospojované oblasti zánětu a ulcerace bez segmentů normální tkáně. Podle The Crohn's and Colitis Foundation of America je definováno několik druhů ulcerózní kolitidy. Nemoc, zahrnující pouze nejbližší části tlustého střeva a rektum se nazývá jako ulcerózní proktitida a nemoc týkající se části sestupné se označuje jako omezená, nebo distální kolitida. Onemocnění postihující celé tlusté střevo se označuje jako pancolitida (Head & Jurenka 2003).

Toto onemocnění může být zákeřné, s postupným nástupem symptomů, nebo může být hned první záchvat akutní a horlivý. Mezi mírnější symptomy patří progresivní uvolňování stolice, křeče v břiše a průjem. Jak nemoc postupuje z mírné po vážnější, pacient může trpět i závažnou ztrátou hmotnosti, únavou, ztrátou chuti k jídlu, která může mít za následek nedostatek živin. Dále se nemoc projevuje hlenem ve stolici, těžkým rektálním krvácením, horečkou a anémií (Head & Jurenka 2003; Lukas et al. 2006).

Ulcerózní kolitida se může vyvinout kdykoliv během života, obvykle však bývá diagnostikována u pacientů kolem 30. roku života. Přibližně 20 % lidí trpících tímto onemocněním má blízké příbuzně trpící některým dalším zánětlivým onemocněním střev (Corrao et al. 1998). Vzhledem k tomu, že časné příznaky ulcerativní kolitidy jsou podobné syndromu dráždivého tračníku, Crohnově nemoci a kolorektálnímu karcinomu, je naprosto nezbytné znát úplnou anamnézu pacienta. Zpočátku je nutné vyloučit infekční příčiny průjmů a křečí z kultur ze stolice a zároveň provést analýzu vajíčků a parazitů. Mezi další testy, kterým se pacient zřejmě nevyhne, a mohou být prováděny v časném stádiu nemoci, jsou testy na fekální okultní krev a kompletní krevní obraz kvůli kontrole ztráty krve ve střevech a anémii.

Pokud není Ulcerózní kolitida stále vyloučena, přichází na řadu flexibilní sigmoidoskopie, nebo kolonoskopie (Kurina et al. 2002; Head & Jurenka 2003).

Příčina vzniku ulcerózní kolitidy stále není přesně determinovaná, zdá se, že by se mohlo jednat o kombinaci genetických a environmentálních faktorů. Skenování celého genomu odhalilo geny citlivé pro ulcerózní kolitidu na chromosomech 1 a 4. Přesto tyto pozice nebyly stále úplně potvrzeny (Rutgeerts & Geboes 2001).

Mezi patologické nálezy spojené s touto nemocí patří zvýšení některých zánětlivých mediátorů, vyskytují se známky oxidačního stresu, abnormální obsah glykosaminoglykanů v sliznici, sníženou schopnost oxidace mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA), zvýšená propustnost střev a snížená methylace. Zatímco žádný konkrétní faktor nebyl identifikován jako spouštěč nemoci, jsou známy a objasněny kousky skládanky, avšak celý obraz ještě není dokončen (Head & Jurenka 2003). Konvenční léčba ulcerózní kolitidy zahrnuje aminosalicyláty, kortikosteroidy, antibiotika a imunomodulátory. Nejčastější protokoly léčby zahrnují právě aminosalicyláty kvůli udržení remise a kortikosteroidy až během akutního období (Cipolla et al. 2002).

Při ulcerativní kolitidě mohou hrát roli i probiotika, kdy pacienti s touto nemocí mají často snížené množství obligátních anaerobních mikroorganismů, jako například *Bifidobacterium*, *Eubacteria* a *Clostridium*. Stejně tak mají snížený počet fakultativních organismů a mikro-aerobů ve srovnání s pacienti v remisní fázi ulcerativní kolitidy (Hartley et al. 1992). V důsledku toho byly provedeny výzkum, zaměřující se na vliv probiotických organismů jako suplementů u pacientů trpících ulcerativní kolitidou. Probiotické bakterie mohou zahrnovat kmeny *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* a určité poddruhy *E. coli*. Probiotika by mohla vykazovat pozitivní účinky v případě tohoto onemocnění, protože produkují kyselinu mléčnou, která snižuje pH lumenálního obsahu, inhibuje růst hnilobných a patogenních bakterií. Další benefiční účinek je možný díky produkci bakteriocinů, což vede k přímému antibakteriálnímu účinku (Head & Jurenka 2003).

Moderní postupy léčby v případě středně těžké a těžké ulcerativní kolitidy zahrnují mezi léky imunosupresiva a biologická léčiva (Harbord et al. 2017). V poslední době jsou do terapeutického arzenálu začleněny nové malé perorální molekuly. Chirurgie je obvykle poslední možností. Ačkoliv je považována za „léčivou“, má negativní a trvalý vliv na kvalitu života pacientů. Léčba této nemoci je stále složitější a měla by být volena v závislosti na její účinnosti a preferencích pacienta (Trigo-Vicente et al. 2018). Porovnání příznaků zánětlivých střevních onemocnění je zdůrazněné v tabulce číslo 1.

**Tabulka č. 1:** Porovnání symptomů a projevů zánětlivých střevních onemocnění. Upraveno dle (Head & Jurenka 2003).

Příznak	Ulcerativní kolitida	Crohnova nemoc
Postižená oblast střev	Jakákoliv část nejvnitřnější výstelky střev; kontinuální bez „záplat“ normálního střeva	Nejčastěji dolní ileum, může se však vyskytnout kdekoliv včetně tlustého střeva; mezi ložisky jsou „záplaty“ normální tkáně; ovlivňuje celou šíři střevní stěny
Průjem	Typicky 4 epizody za den	Typicky 4 epizody za den
Bolesti a křeče břicha	Méně bolestivé, ve spodní oblasti břicha	Středně a silně bolestivé, ve spodním pravém kvadrantu břicha
Krev ve stolici	Přítomná, množství závisí na vážnosti a fázi onemocnění	Přítomná, množství závisí na vážnosti a fázi onemocnění
Vyčerpanost	Výsledkem ztráty krve a anémie	Výsledkem ztráty krve, anémie a špatnému vstřebávání živin
Horečka	Nízká, u těžkých případů	Nízká, u těžkých případů
Fyzické vyšetření	Rektální zkouška může ukázat perianální podráždění, praskliny, hemoroidy, píštěle a abscesy	Peritoneální podráždění, břišní a pánevní hmota
Ztráta hmotnosti, anorexie	Pouze u těžkých případů	Běžné, kvůli špatnému trávení a vstřebávání ve střevech
Chuť k jídlu	Často snižená s nástupem a průběhem onemocnění	Často snižená s nástupem a průběhem onemocnění
Riziko rakoviny střev	Zvýšené	Zvýšené

### 3.2.1.3 Celiakie

Celiakie je autoimunitní porucha tenkého střeva, kterou způsobuje lepek indukující záněty u některých jedinců citlivých ke genetickým a environmentálním vlivům. Celiakie se také kromě zánětů projevuje destrukcí střevních klků (viliální atropie), prodloužením Lieberkühnovo krypt (hyperplazie krypt) (Schuppan et al. 2009) a změnou střevní bariéry (Schulzke et al. 1998).

Rozšíření celiakie je různé od 0,006 do 5,6 % napříč různými populacemi ve světě. Na základě nedávných výsledků je rozšíření celiakie ve Spojených státech Amerických 0,79 % (Mardini et al. 2015). V Evropských zemích je potom rozšíření celiakie 4 % ve Španělsku (Cilleruelo et al. 2016), 2,4 % ve Finsku (Mustalahti et al. 2010), 0,9 % v Německu (Laass et al. 2015), 0,6 % ve Švédsku a Maďarsku (Enroth et al. 2013; Burger et al. 2014), 0,01 % ve Skotsku (White et al. 2013) a nejméně v Nizozemsku 0,006 % (Burger et al. 2014). V Asijských zemích je rozšíření celiakie následující: 0,3 % v Íránu, 0,5 % v Turecku, 0,7 %

v Izraeli (Shamir et al. 2002; Singh et al. 2016) a 0,73 % napříč regiony Indie (Ramakrishna et al. 2016). Nejvíce ze všech má pak populace Saharawi v Africe a to 5,6 % (Teresi et al. 2010).

Doposud není zcela objasněna patofyziologie celiakie ve vztahu ke střevní mikrobiotě. Je hypotéza, že by celiakie mohla být vyvolána aditivními vlivy imunotoxických lepkových bílkovin a střevní dysbiózou (mikrobiální nerovnováha) u lidí s anebo bez genetických náchylností, kde by antibiotika mohla být odvozeným dysbiotickým činidlem. V porovnání se střevní dysbiózou se genetické faktory zdají být až sekundárními ve výsledném působení nemoci. To tedy naznačuje, jak důležitá je interakce mezi mikroby a výživovými faktory v imunitní regulaci ve střevní mukóze. Kromě toho sdružení některých komenzálních mikrobu v nevyrovnaném počtu v tenkém střevě u pacientů trpících celiakií otevírá prostor pro probiotickou terapii. Laktobacilly a určité kmeny ústních bakterií a bakterií tenkého střeva jsou potenciálními zdroji lepek degradujících enzymů (glutanáz), které mohou přispět ke komercializaci nové glutanázové terapie. Přítomnost různých forem lidského komplexu genů HLA (Human Leukocyte Antigen) je spojována se střevními záněty při celiakii, ale všechny typy genetických variací mohou ovlivnit risk onemocnění celiakií pouze ze 48 %, to znamená, že jsou zde i jiné faktory, které jsou spojené s patogenezi celiakie (Gutierrez-Achury et al. 2015). Bylo prokázáno, že sekvence gliadinu obsahuje oblasti, které hrají zvláštní úlohu v patogenezi celiakie. Tyto oblasti vykazují cytotoxickou aktivitu, nebo imunomodulační aktivitu. Některé z těchto oblastí vyvolávají oxidační stres a indukují uvolňování prozánětlivých cytokinů, což má za následek vyvolání zánětu ve střevě (Ciccocioppo et al. 2005; Ferretti et al. 2012). Rozsah příjmu lepku je silněji spojen s rozšířením celiakie, spíše než genetika HLA (Ramakrishna et al. 2016), avšak lepek jako takový nevysvětluje důvod navyšování četnosti případů onemocnění celiakií ani její vývoj, tím pádem je nezbytné se zabývat dalšími environmentálními faktory nejenom lepkem (Pozo-Rubio et al. 2012; Lerner et al. 2015; Lerner & Matthias 2015).

Je tomu už několik dekad, co je celiakie známá jako komplexní onemocnění. Navzdory znalostem spouštění antigenů, neexistuje žádná jiná úspěšná terapie léčby, která by nahradila bezlepkovou dietu. Celoživotní bezlepková dieta bývá pro pacienty vždycky výzvou. Povolené potraviny často bývají velmi specifické (tab. 2). Kromě toho neúmyslné požití potravy kontaminované lepkem usnadňuje opakovaný výskyt zánětů vyvolaných lepkem, protože rovnováha střevního mikrobiomu není obnovena ani poté, co byla aplikována bezlepková dieta (Nadal et al. 2007; Collado et al. 2008, 2009).

To naznačuje přetrvávající střevní prostředí, které je náchylné k onemocnění a neumožňuje obnovu střevní sliznice. Probiotika jsou prospěšná v řadě gastrointestinálních poruch (Cheng et al. 2013; de Meij et al. 2013; Sanchez et al. 2013). Genetické faktory jsou sice důležité v patogenezi celiakie, ale faktory životního prostředí slouží jako klíčové pro vznik a postup onemocnění (Chander et al. 2018).

**Tabulka č. 2:** Povolené a zakázané potraviny při bezlepkové dietě. Upraveno dle (Saturni et al. 2010).

<b>ROSTLINNÉ ZDROJE – POVOLENÉ</b>	<b>ROSTLINNÉ ZDROJE – ZAKÁZANÉ</b>
Kukuřice	Pšenice setá
Rýže	Pšenice tvrdá
Čirok	Semolinová mouka
Oves	Ječmen
Rosička útlá	Žito
Milička habešská	Kamut
Proso	Slad
Teosinte (divoká odrůda kukuřice ze středního Mexika)	Triticale
Slzovka obecná	
Pohanka	
Merlík čilský	
Amarant	
Tapioc	
Sója	
Kořenová zelenina	
Brambory	
Fazole	

Mezi zakázané potraviny v rámci bezlepkové diety patří také řada živočišných výrobků, jakákoliv úprava masa zahrnující obalování v mouce, úprava ryb na způsob surimi a marinovaná sledi. Mléčné výrobky obsahující obiloviny, sušenky a křupinky jsou také nevhodné pro konzumaci pacienty na bezlepkové dietě. Instantní pokrmy, hotová jídla a obecně dehydratované pokrmy jsou také nevhodné. Z rostlinných zdrojů, se nedoporučuje ani

konzumace sušeného ovoce. V rámci bezlepkové diety by se pacienti měli vyhnout také piškotům, sušenkám, oplatkám, všem druhům cukroví, tyčinkám a pečivu vyrobenému z nevhodných obilovin (Akobeng & Thomas 2008; Fric et al. 2011; Fric & Keil 2011).

### 3.3 Lepek

Lepek je hlavní zásobní bílkovinou pšeničných zrn. Pšeničná zrna jsou složená z 8 - 15 % bílkovinami, z těch pak 10 -15 % tvoří albuminy a globuliny a ze zbylých 85 - 90 % lepek. Lepek je složitá směs stovek příbuzných, ale navzájem se lišících bílkovin, především pak gliadinu a gluteninu. Obdobné proteiny jako lepek existují i v jiných obilovinách, například secalin v žitu, hordein v ječmeni, avenin u ovsa. Těchto lepkových bílkovin tvoří přibližně 80 % zrna. Různé odrůdy pšenice se vzájemně liší v bílkovinném složení a ve složení a rozdělení lepkových bílkovin. Obecně gliadin a glutenin jsou označovány jako prolaminy, což jsou bílkoviny zrn nerozpustné ve vodě, ale extrahovatelné ethanolom, charakteristické vysokým obsahem zbytků glutaminu (38 %) a prolinu (20 %) (Wieser 2007). Lepkové bílkoviny můžeme rozdělit na několik podskupin podle jejich klíčových odlišností, jako například molekulová hmotnost, obsah síry, a dále podle jejich různé primární struktury na alfa, beta, gama a omega gliadiny. Jednotlivé lepkové bílkoviny jsou k sobě poutány pevnou kovalentní vazbou a nekovalentními silami, které dohromady se strukturou a interakcemi těchto bílkovin, přispívají k jedinečným vlastnostem lepku (Biesiekierski 2017).

Lepek je velmi složitá sloučenina, charakterizována vysokým alelickým polymorfismem kódovaným jeho specifickými proteiny gluteninem a gliadinem. Navíc, každý genotyp pšenice produkuje unikátní typy a množství těchto sloučenin, které se také mohou lišit v závislosti na podmínkách pěstování a technologických procesech. Bílkovinná exprese jednoho genotypu se může měnit v závislosti na prostředí, kde byla rostlina pěstována. Například obsah  $\omega$ -5 gliadinu se zvyšuje s hnojením a teplotou během dospělosti (Kucek et al. 2015). Některé  $\alpha$  gliadiny nacházející se v subaleurónové vrstvě pšeničných jader může být částečně odstraněn na válcové mlecí stolici (Biesiekierski 2017).

Gliadin obsahuje sekvence peptidů (označované jako epitopy), které jsou vysoce resistantní vůči proteolytickému štěpení žaludeční a pankreatickou šťávou a střevním šťávám v gastrointestinálním traktu. Díky tomu uniká degradaci v lidském střevě. Gliadin je takto složitě trávit díky jeho vysokému obsahu aminokyselin, prolinu a glutaminu, které je mnoho

proteáz neschopno štěpit (Hausch et al. 2002). Tyto na prolin bohaté zbytky tvoří pevnou a kompaktní strukturu, která může zprostředkovat nepříznivou imunitní reakci u celiakie.

Mnoho sekvencí od  $\alpha$ ,  $\gamma$  a  $\omega$  gliadinů a stejně tak od gluteninů bylo identifikováno jako spouštěče celiakie. Nicméně se předpokládá, že pár stovek lepkových bílkovin je imunogenních a spouštějí zprostředkovanou odpověď T-lymfocytů (Arentz-Hansen et al. 2002). Nejvíce epitop imunodominantních T-lymfocytů je z  $\alpha$  gliadinu, ačkoliv byla potvrzena zkřížená reaktivita T-lymfocytů proti peptidům odvozeným od lepku, secalinu a hordeinu. Dodatečně zde existuje s každým zrnem odlišná hierarchie imunostimulačních lepkových peptidů (Arentz-Hansen et al. 2002). Ze všech známých peptidů stimulujících T-lymfocyty zodpovědné za celiakii, může daný pacient reagovat pouze na některé (Biesiekierski 2017).

### 3.3.1 Vlastnosti lepku

Lepek je termostabilní látka vznikající v těstě během procesu hnětení, kdy se smíchá mouka s vodou, a vytváří se vazby mezi bílkovinami do podoby mřížky. Těstu udává jeho tažnost a elasticitu. Lepek se používá pro své vlastnosti jako poutající a vázající činidlo v potravinářství, kde se běžně přidává jako aditivní látka pro zlepšení struktury, zlepšení chuti a lepšímu zadržování vlhkosti zpracovávaných produktů. Z těchto důvodů je řazen mezi nejkompexnější bílkovinné struktury a hraje klíčovou roli v determinaci reologických vlastností těsta (Biesiekierski 2017). Méně zřejmým zdrojem lepku je díky jeho vlastnostem i zpracované maso, rekonstituované mořské plody a vegetariánské masové směsi. Jako zahušřovadlo, emulgátor, nebo želírovací činidlo se užívá při výrobě bonbonů, zmrzliny, másla, koření, nádivek, marinád a dressingů. Využití našel i jako povlaky a obaly ve výrobě léků a cukrovinek. Navíc lepek je stále více separován z pšenice (pod názvem „vitální pšeničný lepek“) nebo modifikován pro specifické použití (pod názvem „izolovaný pšeničný lepek“) ke zlepšení strukturální integrity pekárenských produktů a k fortifikaci nízko bílkovinných mouk (Kucek et al. 2015).

Neobvyklé reologické a funkční vlastnosti lepku jsou závislé na obsahu gluteninů a gliadinů a na jejich vzájemné interakci. Každá z těchto složek má mírně odlišné funkce rozhodující při určování viskoelastických vlastností (zachycení oxidu uhličitého uvolněného během kynutí chleba) a kvalitě výsledného produktu. Například čisté hydratované gliadiny přispívají více k viskozitě a roztažlivosti těsta, zatímco hydratované gluteniny jsou přilnavé,

přispívají k síle a elasticitě těsta (Wieser 2007). Mnoho prací se zaměřuje na zlepšení síly těsta, například zvýšením elasticity gluteninu (Biesiekierski 2017).

### **3.3.2 Příjem potravin s lepkem**

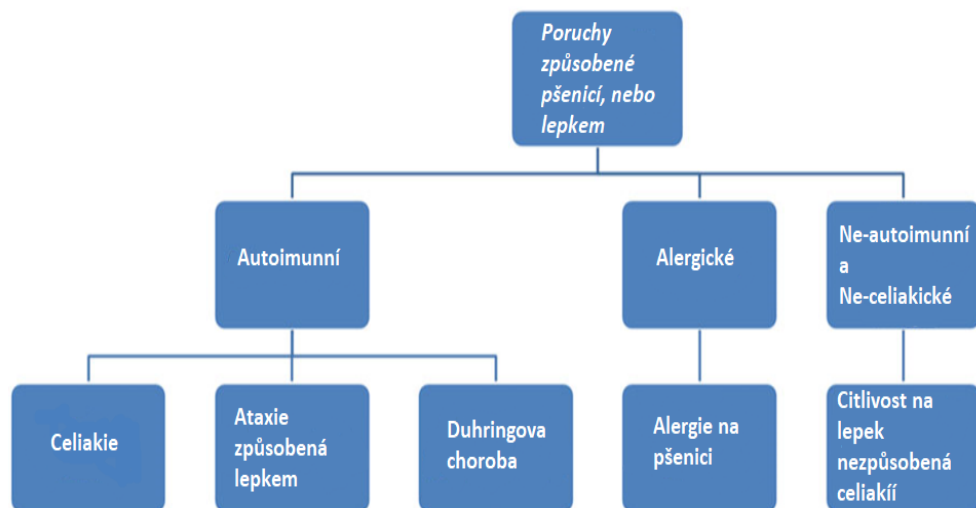
Dle Hoppe et al. (2017) je pšenice velmi důležitou složkou potravy díky své vysoké výživové hodnotě, technologickým vlastnostem a dlouhé trvanlivosti. Pšenice je dobrým zdrojem mnoha živin a představuje fermentovatelný substrát pro střevní mikrobiotu, která přináší svému hostiteli mnoho benefitů. Pšenice může tvořit základ všech jídel během dne a je tedy celosvětově konzumována ve velkém množství. Informace ohledně příjmu lepku v obecné populaci je velmi řídká, protože je zde nedostatek detailních informací popisujících obsah lepku v některých potravinových výrobcích. Výpočty příjmu množství lepku jsou přibližné, jelikož jsou odhadovány dle výpočtů množství všech cereálních proteinů, nebo dle informací v receptu. Průměrný denní příjem lepku se v západní dietě pohybuje mezi 5 až 20 g/den. Poslední provedená studie na toto téma byla provedena v Dánsku, v rámci celonárodního průzkumu, a zjistila, že průměrný denní příjem lepku v populaci lidí od 20 do 75 let činí 10,4 g/den (Hoppe et al. 2017).

Chléb obsahující pšenici je jedním z hlavních zdrojů lepku (udává se, že jeden plátek může obsahovat zhruba 4 g lepku). Existuje několik důkazů o tom, že vystavení lepku se může zvyšovat se změnami v cereálních technologiích. Moderní pečící postupy zkrátily chlebové kvašení, zvýšily použití chemických/kvasnicových kvasných prostředků a zvýšily vstupy dusíkatých hnojiv a agrochemikálií kvůli vyššímu výtěžku bílkovinné složky, která je následně důležitá pro tvorbu chleba (Shewry 2009).



### 3.3.3 Nemoci spojené s lepkiem

Hodnocení stravy historicky a důsledně poukazuje na to, že pšenice je jedním z nejčastějších faktorů indukujících gastrointestinální symptomy. Specifické diagnózy spojené s pšenicí (zahrnující alergii na pšenici, celiakii a citlivost na lepek nezpůsobenou celiakií) mohou sledovat algoritmus vyobrazený v obrázku číslo 3 (Biesiekierski 2017).



**Obrázek č. 3:** Klasifikace nemocí spojených s lepkiem (Biesiekierski 2017).

## 4 Materiál a metodika

### 4.1 Materiál

Byly použity dva bakteriální kmeny, získané z České sbírky mikroorganismů: *Lactobacillus brevis* (CCM 3805; lidská stolice) a *Lactobacillus plantarum* (lidský kmen). Buněčná kultura Caco-2 a HT29 získaná z American Type Tissue Collection (Rockville, Maryland, USA), fosfátový pufr (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline DPBS), Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM/F12 – doplněno 10% FBS, 1% hydrogenuhličitanem sodným, 1% pyruvátém sodným, 1% neesenciálními aminokyselinami a 1% penicilinem a streptomycinem), fetální bovinní sérum (FBS), neesenciální aminokyseliny, penicilin, streptomycin, dimethylsulfoxid (DMSO) a Triton-X100 od Sigma-Aldrich (USA). Rogosa agar od Oxoid (UK). Pšeničná bílkovina (gluten) jedlá vitální (VEGA PROVITA, s.r.o). Dále byly použity Reader infinite M200 (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria), vodní lázeň (Huber Kältemnsaschinenbau AG, DE), termostat (JEIO TECH), centrifuga Universal 320 (Hettich), laboratorní míchačka Vortex (IKA®, DE), CO<sub>2</sub> inkubátor (Panasonoc), kultivační láhve, serologické pipety, 24-jamkové kultivační destičky, Petriho misky byly pořízeny od ThermoFisher (UK).

### 4.2 Metodika

#### 4.2.1 Kultivace buněčných linií

V 15 ml DMEM media byly kultivovány buněčné linie Caco-2 a HT29 kolorektálního adenokarcinomu tlustého střeva. Kultivace probíhala v inkubátoru v kultivačních láhvích o velikosti 75 cm<sup>2</sup> po dobu 7 dní, přičemž každý druhý až třetí den se medium měnilo za čerstvé.

Po sedmi dnech byly buňky sklizeny. V prvním kroku se buňky propláchly 5 ml PBS, které se následně odstranilo. Dále se na dobu 3 – 5 min přidalo 5 ml tripsinu. Po uplynutí doby se trypsin neutralizoval přidáním 5 ml DMEM media. Obsah lahví byl pomocí plastové škrabky uvolněn a převeden do 15 ml centrifugačních zkumavek typu Falcon a centrifugován 10 minut. Staré medium se vyměnilo za nové v objemu 5 ml, ve kterém byly buňky rozpuštěny. V nové kultivační lahvi bylo připraveno 15 ml DMEM media a následně přidán 1 ml suspenze ze zkumavky. Tato nová kultivační láhev byla opět na 7 dní uložena do inkubátoru s 5 % CO<sub>2</sub> atmosférou při teplotě 37 °C.

#### 4.2.2 Založení 24jamkové destičky

Na Bürkerovu komůrku byla z důkladně rozpuštěné buněčné suspenze nanesena kapka, a následně spočítán obsah buněk v 1 ml suspenze. Poté byla výpočtem zjištěna přesná koncentrace sklizených buněk. Dále byla pipetována směsná kultura buněčných linií Caco-2 a HT29 o hustotě  $3,6 \times 10^4$  Caco-2 a  $0,4 \times 10^4$  HT29 v objemu 500  $\mu$ l na 24jamkovou destičku. Připravená destička se následně uložila do kultivačního boxu. Každé 2 – 3 dny se se měnilo medium za čerstvé. Po 14 dnech došlo k plné diferenciaci buněk.

#### 4.2.3 Adherence laktobacilů ke střevním buňkám

Pro zjišťování adhezních vlastností byla užitá modifikovaná metodika dle Jensena et al. (2012). Staré medium se odstranilo odsáním a následovalo 3 $\times$  promytí PBS a centrifugace po dobu 10 minut. Následně se kmeny naředily pomocí PSB na koncentraci  $1 \times 10^8$  KTJ/ml. Do testované jamky bylo přidáno 800  $\mu$ l DMEM bez suplementů spolu se to 100  $\mu$ l buněčné suspenze (finální koncentrace  $1 \times 10^7$  KTJ/ml) a 100  $\mu$ l lepku o koncentraci 50, 25 a 5  $\mu$ g/ml rozpuštěného v roztoku vody a ethanolu (70 : 30) (finální koncentrace byla 5; 2,5; 0,5  $\mu$ g/ml). Po dvou hodinách byl odstraněn zbytek lepku s mediem a neadherovanými bakteriemi a následně byla buněčná monovrstva již bez neadherovaných bakterií narušena a sklizena pomocí 300  $\mu$ l 1% Triton-X100 na 1 minutu a zředěna 700  $\mu$ l PBS. V dalším kroku byl obsah jamky převeden do mikrozkušavek typu eppendorf a desetinasobně ředěn na požadované koncentrace. Suspenze byla v objemu 100  $\mu$ l pipetována do Petriho misky, kam byl poté přidán Rogosový agar.

Petriho misky se zatuhnutým agarem se obrácené dnem vzhůru vložily do inkubátoru s teplotou 37 °C. Následovala 3denní kultivace v aerobním prostředí. Misky byly po 3 dnech kultivace vyhodnocovány, aby se zjistila celková adhezní schopnost testovaných kmenů laktobacilů. Adhezní schopnost je vyjádřena v procentech, jako podíl adherovaných bakterií k celkovému počtu bakterií v inokulační dávce.

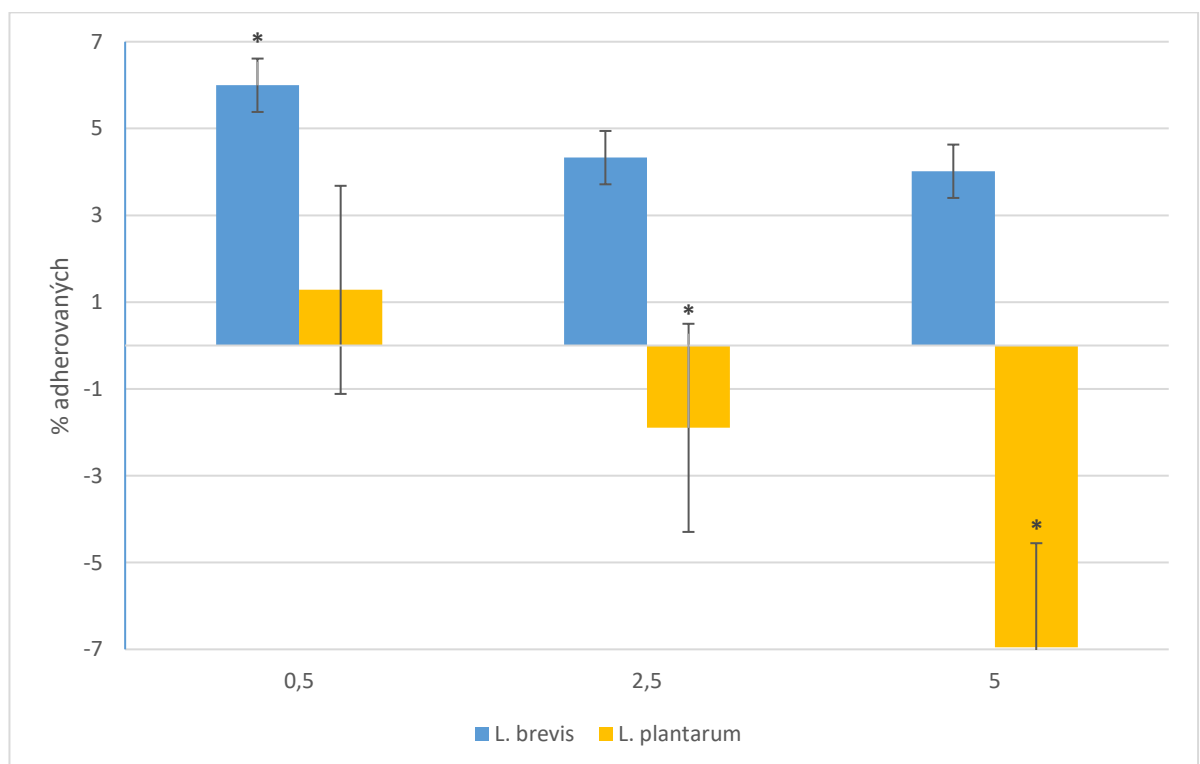
#### 4.2.4 Statistická analýza

Každý kmen byl zkoumán ve dvou měřeních v duplikátu. Výsledky jsou tedy vyjádřeny průměrem se směrodatnou odchylkou. Pro statistické vyhodnocení byl použit program GraphPad Prism a nepárový *t*-test. Statistická významnost byla posouzena na hladině významnosti  $p < 0,5$ .

## 5 Výsledky

Cílem práce bylo zjistit, jak lepek v potravinách ovlivňuje schopnost probiotik adherovat na buňky střevního epitelu. Vybrány byly dva kmeny, a to *L. brevis* a *L. plantarum*, které byly kultivovány na buněčné monovrstvě s přítomností a bez přítomnosti lepku.

*L. brevis* vykázal schopnost adherovat za přítomnosti lepku výrazně lépe a při koncentraci 5 µg/ml lepku adheroval o 4 % lépe než v kontrole bez lepku. Při koncentraci lepku 2,5 µg/ml byla adherence dokonce 4,3 % a při koncentraci 0,5 µg/ml o 6 % lepší než v kontrole bez lepku. Naopak *L. plantarum* vykazoval sníženou schopnost adherovat, a to při koncentraci 5 µg/ml lepku o 7 %, při koncentraci lepku 2,5 µg/ml byla adherence stále o 1% horší, ale s klesající koncentrací lepku se adhezenční schopnost zlepšovala a při koncentraci 0,5 µg/ml byla adherence již o 1 % lepší v porovnání se vzorkem bez lepku (graf. 1). Kmen *L. brevis* v prostředí s lepkem adheroval mnohem lépe, než kmen *L. plantarum*.



**Graf 1:** Vliv lepku (při koncentracích 0,5; 2,5; 5 µg/ml) na adhezenční vlastnost kmenů *L. plantarum* a *L. brevis*. Na buněčných liniích kolorektálního karcinomu tlustého střeva Caco-2 a HT29 v *in vitro* podmínkách. Výsledky jsou vyjádřeny jako procento, o které adherují kmeny více, či méně oproti blanku ± standartní chyba; \* - statisticky významný rozdíl  $p < 0,05$ .

Na základě nepárového *t*-testu bylo zjištěno, že statisticky významný rozdíl pro *L. brevis* je pouze při koncentracích lepku 0,5 µg/ml. Statisticky významný rozdíl pro *L. plantarum* byl pro koncentrace lepku 5 µg/ml a 2,5 µg/ml. U ostatních koncentrací statisticky významný rozdíl nebyl pozorován.

## 6 Diskuze

Adheze, adhezenční schopnosti a schopnost kolonizace je podle (Zheng et al. 2013) zcela nezbytnou vlastností pro probiotické kmeny a bakteriální kmeny kolonizující gastrointestinální trakt aby mohly tyto kmeny vykazovat pozitivní účinky na zdraví hostitele. Adheze je totiž nezbytným předpokladem kolonizace (Alander et al. 1999), stimulace imunitního systému (Schiffrin et al. 1995) a antagonistické aktivity proti enteropatogenům (Coconnier et al. 1993).

Naše výsledky potvrdili, že právě lepek je jeden z faktorů, který adhezi negativně, či částečně pozitivně ovlivňuje. Testovali jsme dva probiotické kmeny *L. brevis* a *L. plantarum*, které se v lidském gastrointestinálním traktu normálně vyskytují. Testy probíhali na směsných buněčných liniích kolorektálního adenokarcinomu tlustého střeva Caco-2 a HT29. Výsledky potvrdili, že lepek má vliv na adhezi testovaných kmenů. U kmene *L. plantarum* jsme zaznamenali nižší adhezenční schopnosti v prostředí s přítomností lepku. Pokud tedy lepek ovlivňuje schopnost probiotických organismů adherovat, může výrazně snižovat, nebo zvyšovat účinek některých doplňků stravy zaměřujících se na doplnění probiotických organismů v gastrointestinálním traktu, převážně pak střevech člověka. Zjištěné výsledky by se mohly změnit, pokud bychom zkusili simulovat průchod testovaných kmenů celým trávicím traktem, protože různě bakteriální probiotické kmeny různě reagují na jednotlivé části trávení v lidském gastrointestinálním traktu. Podle (Cotter & Hill 2003) je totiž nativní rezistence vůči žaludeční kyselině vzácnou vlastností probiotik a je nezbytné, aby právě tyto bakterie měly ochranné systémy pro nízké pH, které místy v gastrointestinálním traktu panuje. Zároveň dle studie, kterou provedl (Begley et al. 2005) se žlučí, je patrné, že výsledek vystavení probiotických kmenů žluči závisí na podmínkách, kterým čelili probiotika před vstupem do tenkého střeva. Expozice jednomu typu stresu však může bránit před jiným typem stresu, se kterým se probiotika při cestě traktem setkávají (Begley et al. 2005).

Adheze námi testovaných kmenů byla prováděna v podmínkách *in vitro*. V podmínkách *in vivo* by se výsledky mohli zásadně lišit, protože je velmi složité extrapolovat adhezi bakterií k liniím epitelálních buněk z *in vitro* podmínek do situace v lidském gastrointestinálním traktu. Adheze bakterií je zde pravděpodobně modifikována hostitelskými obrannými systémy, konkurencí s rezidentní mikrobiotou, sekrety sliznic a peristaltickým tokem (Lebeer et al. 2008). Přesto jsou testy *in vitro* zcela nezbytné pro pochopení mechanismu adheze a zároveň nám poskytují důležité informace o rozdílech, které mezi druhy a kmeny probiotických organismů panují (Jensen et al. 2012).

Sníženou schopností adheze, například kvůli interakci s lepkem, se zabrání probiotikům, aby mohla poskytovat zdravotní benefity. Mezi tyto benefity lze dle (de Vrese & Marteau 2007) patřit schopnost inhibice růstu, adheze na střevní epitel a omezení metabolické aktivity enteropatogenních bakterií, mezi které řadíme například Salmonellu. Způsob, jak proti nim bojují je převážně schopnost snižovat hodnotu pH v lumenu střev, produkce baktericidních sloučenin (organické kyseliny), bakteriociny a v neposlední řadě peroxid vodíku. Existují, ale i další mechanismy účinku probiotik, produkce metabolitů chránících střeva, imunologické mechanismy, střevní motilita a také produkce hlenu epitelem střev (de Vrese & Marteau 2007).

Citlivost na lepek a celiakie jsou gastrointestinální poruchy vyplývající z rozpadu orální tolerance a následné nevhodné imunitní reakce proti pšeničným bílkovinám (Verhasselt 2010). Většina z takto nemocných pacientů má specifické protilátky, namířené proti tkáňové transglutamináze, různým gliadinům, gluteninům, gluteomorfinům, aglutininům z pšeničných klíčků a peptidům (Vojdani et al. 2014). Pokud v takovýchto případech není pacient léčen, mohou se vyvinout autoimunitní poranění střeva, kůže, mozku, kloubů, jater, štítné žlázy, kostí, reprodukčních orgánů a dalších částí lidského těla (Hadjivassiliou et al. 2004). Zhruba u 30 % pacientů však léčba ve formě bezlepkové diety nezabírá a jejich odpověď je příliš nízká. Pacienti tak mohou začít vykazovat přetrvávající, nebo recidivující symptomy (Lebwohl et al. 2018). Dle (Hadjivassiliou et al. 1997), může být toto nedostatečné zlepšení v histopatologii a klinické symptomatologii u pacientů na bezlepkové dietě spojeno s dietními neadherenčními, nebo křížově reaktivními epitopy, které spouštějí stav zvýšené imunologické reaktivity u osob citlivých na lepek.

Některé z těchto křížově reaktivních protilátek může změnit integritu intestinální bariéry, která hraje klíčovou roli při časných stádiích celiakie a autoimunitních poruch (Zanoni et al. 2006; Fasano 2011). Navzdory obrovskému pokroku v chápání patogeneze celiakie a dobře známých environmentálních spouštěčů, jako je právě gliadin v lepku, byla věnována jen malá pozornost úloze, kterou hrají křížově reaktivní epitopy z různých antigenů potravy u zmíněné skupiny pacientů trpících celiakií, jejichž příznaky se ani po bezlepkové dietě nezlepšují (Vojdani 2013). V roce 2013 byla provedena studie identifikující antigeny a peptidy z mléka, kvasinek, prosa, kukuřice, rýže, ovsa a tkání, které silně reagovaly s protilátkami produkovanými proti gliadinu, který je základní složkou právě lepku. Reaktivita mezi gliadinovými peptidy a různými potravinovými antigeny je patogeneticky relevantní, protože hrozí, že pokud zůstane přítomnost těchto zkříženě reaktivních látek neošetřena, může se u jedince vyvinout mnoho autoimunitních reakcí (Vojdani 2013).

Obecně platí, že pokud je zjištěna citlivost na lepek nebo celiakie, okamžitě se jako léčba volí bezlepková dieta. Dodržování bezlepkové diety může být ale značně komplikované, protože používání lepku v potravinových přípravcích se velmi rozšířilo a právě tyto potraviny kontaminované lepkem velmi ztěžují stravovací návyky (Husby et al. 2012).

Dle (Vojdani 2013) stačí, aby byla potravina běžně dostupná pro pacienty na bezlepkové dietě kontaminována lepkem ve stopovém množství. Již v takto malém množství má lepek a křížově reaktivní epitopy schopnost vyvolávat u těchto pacientů zvýšenou imunologickou reaktivitu. Podle jeho laboratorní studie byla křížová reakce potravinových antigenů nejvýznamnější u  $\alpha$ - a  $\beta$ - kaseinu, následně kvasinek, kasomorfinu, čerstvé kukuřice, mléka, prosa, mléčné čokolády, kávy, rýže a nakonec syrovátkového proteinu.

V souvislosti s vazbou peptidu anti- $\alpha$ -gliadinu na  $\alpha$ - a  $\beta$ - kasein, mléko a mléčnou čokoládu bylo prokázáno, že existuje vysoký stupeň homologie, nebo zkřížené reaktivity mezi bovinním  $\alpha$ - a  $\beta$ - kaseinem a peptidovou sekvencí  $\alpha$ -gliadinu (Darewicz et al. 2007). Tato homologie mezi mléčnými proteiny je prokázána nejen imunitní reaktivitou IgA-anti-gliadinových protilátek s mléčnými proteiny (Berti et al. 2003), ale také reaktivitou IgA na  $\alpha$ - a  $\beta$ - kasein u pacientů trpících celiakií (Cabrera-Chavez & de la Barca 2009) a v neposlední řadě indukci lokálních zánětlivých reakcí po expozici proteiny pšenice (Kristjansson et al. 2007). Z těchto důvodů by kasein a produkty obsahující mléko, jako je právě mléčná čokoláda, měly být považovány za přípravky obsahující lepkové peptidy, přinejmenším u jedinců, jejichž příznaky se ani po nasazení několikaměsíční bezlepkové diety nezlepšují (Vojdani 2013).

V případě pivovarských kvasnic se opět projevila značná reakce gliadinové protilátky, ačkoliv v tomto případě nelze s jistotou potvrdit, zdali je tato reakce mezi  $\alpha$ -gliadinovým peptidem a pivovarskými kvasnicovými antigeny skutečná, nebo je spojena s nečistotami a kontaminací komerčních produktů potravinami obsahujícími lepek (Zanoni et al. 2006; Vojdani 2013).

Oves byl vyloučen z bezlepkové diety převážně kvůli zkřížené kontaminaci lepkovými zrny (Thompson 2004). Existují klinické důkazy o tom, že někteří z řad pacientů trpících celiakií mají slizniční T-buňky, které reagují na ovesný prolamin avenin, což ve finále vede až k zánětu sliznic, podobně jako u lepku z pšenice. Tato odpověď slizničních T-buněk na avenin by mohla být důvodem atrofie klků střev u pacientů, kteří mají bezlepkovou dietu, která oves zahrnuje (Arentz-Hansen et al. 2004; Comino et al. 2011). Toto naznačuje, že osoby trpící celiakií nesmějí konzumovat oves, protože deamidace, nebo přeměna glutaminu



na glutamovou kyselinu tkáňovou transglutaminázou se podílí na tvorbě aveninového epitopu (Thompson 2004; Srinivasan et al. 2006). Podobně je i proso považováno za bezlepkové.

Studie, kterou provedl (Vojdani 2013) se také zabývala propojením celiakie s různými extraintestinálními autoimunitami, kam zahrnuje štítnou žlázu, klouby, srdce, kůži, slinivku, kosti, játra, reprodukční orgány a nervový systém. Ačkoliv nejsou mechanismy indukce autoimunit zcela známy, existuje stále více důkazů o tom, že tato onemocnění mohou být výsledkem molekulární mimikry mezi gliadinem, nebo transglutaminázou a různými tkáňovými antigeny, včetně proteinů nervového systému (Vojdani et al. 2004; Hadjivassiliou et al. 2006; Zanoni et al. 2006; Naiyer et al. 2008). Cirkulující protilátky přítomné při celiakii interagují s ubikviními transglutaminázami v různých tkáních, což může vyvolat tvorbu proteinových agregátů, které mohou vyvolat zánět (Naiyer et al. 2008).

Mnoho zemí tradičně umožňuje označovat potraviny jako „bezlepkové“ kontaminované až do 0,3 % bílkovinami z obilnin obsahujících glutein (Faulkner-Hogg et al. 1999). Avšak (Vojdani 2013) ve své studii uvádí, že povolený obsah 0,3 % bílkovin z obilnin obsahujících glutein není z hlediska imunologie racionální, protože gliadinové specifické T-buňky mohou reagovat na mikrogramy proteinu a produkovat tak protizánětlivé cytokiny, které mohou přispívat ke gastrointestinálním a extra-gastrointestinálním symptomům. Pacienti s bezlepkovou dietou by měli dodržovat přísnou bezlepkovou dietu s politikou nulové tolerance. Tento krok vyžaduje abstinenci od bezlepkových potravin, podrobné čtení etikety a zároveň informace, zdali podnik vyrábějící bezlepkovou potravinu nezpracovává zároveň pšenici, obecně lepek a mléčné výrobky.

Můžeme s jistotou tvrdit, že vliv potravy a převážně pak některých jejích částí, jako například lepek, hrají velmi významnou roli v lidském zdraví. Probiotické organismy představují do budoucna zajímavý prostředek, jak regulovat lidský mikrobiom, který je právě nejvíce ovlivněn potravou. Jejich zásadní a nejdůležitější vlastností je schopnost adheze a následné kolonizace, které vedou k utvoření celkového mikrobiomu. Mikrobiom poté funguje jako samostatná jednotka, která zásadně ovlivňuje lidskou imunitu, podporuje trávení a brání před rozvoji gastrointestinálních poruch. V této práci jsme otestovali lepek, avšak v budoucnu se nabízí provést studie daleko širší a s lepšími prostředky. Většina studií je prováděna v *in vitro* podmínkách, které představují velmi zjednodušené *in vivo* podmínky, nelze tedy jejich výsledky zcela implementovat na větší měřítko.

## 7 Závěr

Cílem práce bylo otestovat adhezenční schopnosti dvou probiotických kmenů, a sice *L. plantarum* a *L. brevis*, společně s lepkem na buňky střevního epitelu. Výsledky naznačují, že zvýšené koncentrace lepku mají negativní vliv na adhezenční vlastnosti probiotik, čímž je naše hypotéza potvrzena. Ukazuje se, že lepek má negativní vliv nejen na sliznici střeva, ale zároveň negativně ovlivňuje probiotika, kterým v případě, že jsou konzumovány jako potravinový doplněk společně s potravinou bohatou na lepek, snižují účinnost probiotického potravinového doplňku.

Námi testovaná koncentrace lepku odpovídá zhruba polovině běžné sušenky. Do budoucna by bylo zajímavé dále otestovat širší rozpětí koncentrací lepku s větším portfoliem probiotik. Zejména z toho důvodu, aby došlo k poznání, jak běžné porce potravin s běžnou koncentrací lepku ovlivňují střevní mikrobiom. Pro toto testování bude zapotřebí optimalizovat použitou metodu a přípravu lepku, aby nedocházelo k jeho agregaci při přidání do vodného roztoku.

## 8 Literatura

- Adlerberth I, Wold AE. 2009. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatrica* **98**:229-238.
- Agus A, Denizot J, Thevenot J, Martinez-Medina M, Massier S, Sauvanet P, Bernalier-Donadille A, Denis S, Hofman P, Bonnet R, Billard E, Barnich N. 2016. Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive *E. coli* infection and intestinal inflammation. *Scientific Reports* **6**.
- Akiba Y, Guth PH, Engel E, Nastaskin I, Kaunitz JD. 2000. Dynamic regulation of mucus gel thickness in rat duodenum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **279**:G437-G447.
- Akobeng AK, Thomas AG. 2008. Systematic review: tolerable amount of gluten for people with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* **27**:1044-1052.
- Alander M, Satokari R, Korpela R, Saxelin M, Vilpponen-Salmela T, Mattila-Sandholm T, von Wright A. 1999. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:351-354.
- Alenghat T, Osborne LC, Saenz SA, Kobuley D, Ziegler CG, Mullican SE, Choi I, Grunberg S, Sinha R, Wynosky-Dolfi M, Snyder A, Giacomini PR, Joyce KL, Hoang TB, Bewtra M, Brodsky IE, Sonnenberg GF, Bushman FD, Won KJ, Lazar MA, Artis D. 2013. Histone deacetylase 3 coordinates commensal-bacteria-dependent intestinal homeostasis. *Nature* **504**:153-+.
- Amara AA, Shibl A. 2015. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharmaceutical Journal* **23**:107-114.
- Ananthakrishnan AN. 2015. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **12**:205-217.
- Arentz-Hansen H, Fleckenstein B, Molberg O, Scott H, Koning F, Jung G, Roepstorff P, Lundin KEA, Sollid LM. 2004. The molecular basis for oat intolerance in patients with Celiac disease. *Plos Medicine* **1**:84-92.
- Arentz-Hansen H, McAdam SN, Molberg O, Fleckenstein B, Lundin KEA, Jorgensen TJD, Jung G, Roepstorff P, Sollid LM. 2002. Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology* **123**:803-809.
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borrueal N, Casellas F, Fernandez L, Gautier

- L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J, G Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P, Kristiansen K. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome (vol 473, pg 174, 2011). *Nature* **474**:1.
- Beddy D, Mulsow J, Watson RWG, Fitzpatrick JM, O'Connell PR. 2006. Expression and regulation of connective tissue growth factor by transforming growth factor beta and tumour necrosis factor alpha in fibroblasts isolated from strictures in patients with Crohn's disease. *British Journal of Surgery* **93**:1290-1296.
- Begley M, Gahan CGM, Hill C. 2005. The interaction between bacteria and bile. *Fems Microbiology Reviews* **29**:625-651.
- Behnsen J, Deriu E, Sassone-Corsi M, Raffatellu M. 2013. Probiotics: Properties, Examples, and Specific Applications. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **3**:15.
- Belkaid Y, Hand TW. 2014. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell* **157**:121-141.
- Benson AK, Kelly SA, Legge R, Ma FR, Low SJ, Kim J, Zhang M, Oh PL, Nehrenberg D, Hua KJ, Kachman SD, Moriyama EN, Walter J, Peterson DA, Pomp D. 2010. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:18933-18938.
- Berti C, Trovato C, Bardella MT, Forlani F. 2003. IgA anti-gliadin antibody immunoreactivity to food proteins. *Food and Agricultural Immunology* **15**:217-223.
- Biavati B, Vescovo M, Torriani S, Bottazzi V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology* **50**:117-131.
- Biesiekierski JR. 2017. What is gluten? *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **32**:78-81.
- Blobe GC, Schieman WP, Lodish HF. 2000. Mechanisms of disease: Role of transforming growth factor beta in human disease. *New England Journal of Medicine* **342**:1350-1358.
- Bouskra D, Brezillon C, Berard M, Werts C, Varona R, Boneca IG, Eberl G. 2008. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* **456**:507-U534.
- Breitbart M, Haynes M, Kelley S, Angly F, Edwards RA, Felts B, Mahaffy JM, Mueller J, Nulton J, Rayhawk S, Rodriguez-Brito B, Salamon P, Rohwer F. 2008. Viral diversity and dynamics in an infant gut. *Research in Microbiology* **159**:367-373.

- Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, Muir AI, Wigglesworth MJ, Kinghorn I, Fraser NJ, Pike NB, Strum JC, Steplewski KM, Murdock PR, Holder JC, Marshall, FH, Szekeres PG, Wilson S, Ignar DM, Foord SM, Wise A, Dowell SJ. 2003. The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *Journal of Biological Chemistry* **278**:11312-11319.
- Burger JPW, Roovers EA, Drenth JPH, Meijer JWR, Wahab PJ. 2014. Rising incidence of celiac disease in the Netherlands; an analysis of temporal trends from 1995 to 2010. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **49**:933-941.
- Butel MJ. 2014. Probiotics, gut microbiota and health. *Medecine Et Maladies Infectieuses* **44**:1-8.
- Cabrera-Chavez F, de la Barca AMC. 2009. Bovine milk intolerance in celiac disease is related to IgA reactivity to alpha- and beta-caseins. *Nutrition* **25**:715-716.
- Cani PD, Everard A, Duparc T. 2013. Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism. *Current Opinion in Pharmacology* **13**:935-940.
- Caporaso JG, Lauber CL, Costello EK, Berg-Lyons D, Gonzalez A, Stombaugh J, Knights D, Gajer P, Ravel J, Fierer N, Gordon JI, Knight R. 2011. Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biology* **12**:8.
- Celebioglu HU, Svensson B. 2018. Dietary Nutrients, Proteomes, and Adhesion of Probiotic Lactobacilli to Mucin and Host Epithelial Cells. *Microorganisms* **6**:17.
- Chander AM, Yadav H, Jain S, Bhadada SK, Dhawan DK. 2018. Cross-Talk Between Gluten, Intestinal Microbiota and Intestinal Mucosa in Celiac Disease: Recent Advances and Basis of Autoimmunity. *Frontiers in Microbiology* **9**:16.
- Chapman CMC, Gibson GR, Rowland I. 2011. Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? *European Journal of Nutrition* **50**:1-17.
- Cheng J, Kalliomaki M, Heilig H, Palva A, Lahteenoja H, de Vos WM, Salojarvi J, Satokari R. 2013. Duodenal microbiota composition and mucosal homeostasis in pediatric celiac disease. *Bmc Gastroenterology* **13**:13.
- Cheng LK, O'Grady G, Du P, Egbuji JU, Windsor JA, Pullan AJ. 2010. Gastrointestinal system. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Systems Biology and Medicine* **2**:65-79.
- Chow J, Lee SM, Shen Y, Khosravi A, Mazmanian SK. 2010. Host-Bacterial Symbiosis in Health and Disease. Pages 243-274 in Fagarasan S, and Cerutti A, editors. *Mucosal Immunity*. Elsevier Academic Press Inc, San Diego.

- Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Corazza GR. 2005. The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clinical and Experimental Immunology* **140**:408-416.
- Cilleruelo ML, Fernandez-Fernandez S, Jimenez-Jimenez J, Rayo AI, de Larramendi CH. 2016. Prevalence and Natural History of Celiac Disease in a Cohort of At-risk Children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **62**:739-745.
- Cipolla G, Crema F, Sacco S, Moro E, De Ponti F, Frigo G. 2002. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and inflammatory bowel disease: Current perspectives. *Pharmacological Research* **46**:1-6.
- Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. 2012. The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell* **148**:1258-1270.
- Coconnier MH, Bernet MF, Kerneis S, Chauviere G, Fourniat J, Servin AL. 1993. INHIBITION OF ADHESION OF ENTEROINVASIVE PATHOGENS TO HUMAN INTESTINAL CACO-2 CELLS BY LACTOBACILLUS-ACIDOPHILUS STRAIN LB DECREASES BACTERIAL INVASION. *Fems Microbiology Letters* **110**:299-305.
- Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. 2008. Imbalances in faecal and duodenal Bifidobacterium species composition in active and non-active coeliac disease. *Bmc Microbiology* **8**:9.
- Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. 2009. Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *Journal of Clinical Pathology* **62**:264-269.
- Comino I, Real A, de Lorenzo L, Cornell H, Lopez-Casado MA, Barro F, Lorite P, Torres MI, Cebolla A, Sousa C. 2011. Diversity in oat potential immunogenicity: basis for the selection of oat varieties with no toxicity in coeliac disease. *Gut* **60**:915-922.
- Coombes JL, Siddiqui KRR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, Powrie F. 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103(+) DCs induces Foxp3(+) regulatory T cells via a TGF-beta- and retinoic acid-dependent mechanism. *Journal of Experimental Medicine* **204**:1757-1764.
- Corrao G, Tragnone A, Caprilli R, Trallori G, Papi C, Andreoli A, Di Paolo M, Riegler G, Rigo GP, Ferrau O, Mansi C, Ingrosso M, Valpiani D. 1998. Risk of inflammatory bowel disease attributable to smoking, oral contraception and breastfeeding in Italy: a nationwide case-control study. *International Journal of Epidemiology* **27**:397-404.
- Correa RO, Fachi JL, Vieira A, Sato FT, Vinolo MAR. 2016. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clinical & Translational Immunology* **5**.

- Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. 2011. Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* **140**:1785-U1118.
- Cotter PD, Hill C. 2003. Surviving the acid test: Responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**:429-+.
- Cucino C, Sonnenberg A. 2001. Cause of death in patients with inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* **7**:250-255.
- Darewicz M, Dziuba J, Minkiewicz P. 2007. Computational Characterisation and Identification of Peptides for in silico Detection of Potentially Celiac-Toxic Proteins. *Food Science and Technology International* **13**:125-133.
- de Albuquerque TMR, Garcia EF, Araujo AD, Magnani M, Saarela M, de Souza EL. 2018. In Vitro Characterization of Lactobacillus Strains Isolated from Fruit Processing By-Products as Potential Probiotics. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **10**:704-716.
- de Meij TGJ, Budding AE, Grasman ME, Kneepkens CMF, Savelkoul PHM, Mearin ML. 2013. Composition and diversity of the duodenal mucosa-associated microbiome in children with untreated coeliac disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **48**:530-536.
- de Souza HSP, Fiocchi C. 2016. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **13**:13-27.
- de Vrese M, Marteau PR. 2007. Probiotics and prebiotics: Effects on diarrhea. *Journal of Nutrition* **137**:803S-811S.
- Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. 2008. The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. *Plos Biology* **6**:2383-2400.
- Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:11971-11975.
- Donohoe DR, Garge N, Zhang XX, Sun W, O'Connell TM, Bunger MK, Bultman SJ. 2011. The Microbiome and Butyrate Regulate Energy Metabolism and Autophagy in the Mammalian Colon. *Cell Metabolism* **13**:517-526.
- Elahi S, Ertelt JM, Kinder JM, Jiang TT, Zhang XZ, Xin LJ, Chaturvedi V, Strong BS, Qualls JE, Steinbrecher KA, Kalfa TA, Shaaban AF, Way SS. 2013. Immunosuppressive CD71(+) erythroid cells compromise neonatal host defence against infection. *Nature* **504**:158-+.

- Enroth S, Dahlbom I, Hansson T, Johansson A, Gyllensten U. 2013. Prevalence and sensitization of atopic allergy and coeliac disease in the Northern Sweden Population Health Study. *International Journal of Circumpolar Health* **72**:484-490.
- Fasano A. 2011. Zonulin and Its Regulation of Intestinal Barrier Function: The Biological Door to Inflammation, Autoimmunity, and Cancer. *Physiological Reviews* **91**:151-175.
- Faulkner-Hogg KB, Selby WS, Loblay RH. 1999. Dietary analysis in symptomatic patients with coeliac disease on a gluten-free diet: The role of trace amounts of gluten and non-gluten food intolerances. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **34**:784-789.
- Ferretti G, Bacchetti T, Masciangelo S, Saturni L. 2012. Celiac Disease, Inflammation and Oxidative Damage: A Nutrigenetic Approach. *Nutrients* **4**:243-257.
- Fijan S. 2014. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **11**:4745-4767.
- Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. 2012. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **9**:577-589.
- Fric P, Gabrovská D, Nevoral J. 2011. Celiac disease, gluten-free diet, and oats. *Nutrition Reviews* **69**:107-115.
- Fric pMP, Keil dMR. 2011. Celiakie pro praxi. *Medicine for practice* **8**:354-359.
- Gareau MG, Sherman PM, Walker WA. 2010. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **7**:503-514.
- Gasbarrini G, Bonvicini F, Gramenzi A. 2016. Probiotics History. *Journal of Clinical Gastroenterology* **50**:S116-S119.
- Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, Jewell DP, Rachmilewitz D, Sachar DB, Sandborn WJ, Sutherland LR. 2000. A simple classification of Crohn's disease: Report of the Working Party for the world congresses of gastroenterology, Vienna 1998. *Inflammatory Bowel Diseases* **6**:8-15.
- Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, Gillevet PM. 2010. Characterization of the Oral Fungal Microbiome (Mycobiome) in Healthy Individuals. *Plos Pathogens* **6**:8.
- Goh YJ, Klaenhammer TR. 2015. Genetic Mechanisms of Prebiotic Oligosaccharide Metabolism in Probiotic Microbes. Pages 137-156 in Doyle MP, and Klaenhammer TR, editors. *Annual Review of Food Science and Technology*, Vol 6. Annual Reviews, Palo Alto.



- Gower-Rousseau C, Sarter H, Savoye G, Tavernier N, Fumery M, Sandborn WJ, Feagan BG, Duhamel A, Guillon-Dellac N, Colombel JF, Peyrin-Biroulet L. 2017. Validation of the Inflammatory Bowel Disease Disability Index in a population-based cohort. *Gut* **66**:588-596.
- Gupta V, Garg R. 2009. Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology* **27**:202-209.
- Gutierrez-Achury J, Zhernakova A, Pulit SL, Trynka G, Hunt KA, Romanos J, Raychaudhuri S, van Heel DA, Wijmenga C, de Balcker PIW. 2015. Fine mapping in the MHC region accounts for 18% additional genetic risk for celiac disease. *Nature Genetics* **47**:577-578.
- Hadjivassiliou M, Chattopadhyay AK, Davies-Jones GAB, Gibson A, Grunewald RA, Lobo AJ. 1997. Neuromuscular disorder as a presenting feature of coeliac disease. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* **63**:770-775.
- Hadjivassiliou M, Maki M, Sanders DS, Williamson CA, Grunewald RA, Woodroffe NM, Korponay-Szabo IR. 2006. Autoantibody targeting of brain and intestinal transglutaminase in gluten ataxia. *Neurology* **66**:373-377.
- Hadjivassiliou M, Williamson CA, Woodroffe N. 2004. The immunology of gluten sensitivity: beyond the gut. *Trends in Immunology* **25**:578-582.
- Harbord M, Eliakim R, Bettenworth D, Karmiris K, Katsanos K, Kopylov U, Kucharzik T, Molnar T, Raine T, Sebastian S, de Sousa HT, Dignass A, Carbonnel F. 2017. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 2: Current Management. *Journal of Crohns & Colitis* **11**:769-784.
- Hartley MG, Hudson MJ, Swarbrick ET, Hill MJ, Gent AE, Hellier MD, Grace RH. 1992. THE RECTAL MUCOSA-ASSOCIATED MICROFLORA IN PATIENTS WITH ULCERATIVE-COLITIS. *Journal of Medical Microbiology* **36**:96-103.
- Hassan C, Zullo A, Campo SMA, Morini S. 2005. New insights into the biological therapy of Crohn's disease. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **15**:409-419.
- Hausch F, Shan L, Santiago NA, Gray GM, Khosla C. 2002. Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **283**:G996-G1003.
- Head KA, Jurenka JS. 2003. Inflammatory bowel disease Part 1: ulcerative colitis-- pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Altern Med Rev* **8**:247-283.
- Hempel S, Newberry SJ, Maher AR, Wang Z, Miles JNV, Shanman R, Johnsen B, Shekelle PG. 2012. Probiotics for the Prevention and Treatment of Antibiotic-Associated

- Diarrhea A Systematic Review and Meta-analysis. *Jama-Journal of the American Medical Association* **307**:1959-1969.
- Hooks KB, O'Malley MA. 2017. Dysbiosis and Its Discontents. *Mbio* **8**:11.
- Hoppe C, Gobel R, Kristensen M, Lind MV, Matthiessen J, Christensen T, Trolle E, Fagt S, Madsen ML, Husby S. 2017. Intake and sources of gluten in 20-to 75-year-old Danish adults: a national dietary survey. *European Journal of Nutrition* **56**:107-117.
- Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, Giersiepen K, Branski D, Catassi C, Lelgeman M, Maki M, Ribes-Koninckx C, Ventura A, Zimmer, K. 2012. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **54**:136-160.
- Ilha EC, da Silva T, Lorenz JG, Rocha GD, Sant'Anna ES. 2015. *Lactobacillus paracasei* isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey. *European Food Research and Technology* **240**:977-984.
- Jensen H, Grimmer S, Naterstad K, Axelsson L. 2012. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **153**:216-222.
- Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, Vandamme P, Vermeire S. 2011. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut* **60**:631-637.
- Josefowicz SZ, Niec RE, Kim HY, Treuting P, Chinen T, Zheng Y, Umetsu DT, Rudensky AY. 2012. Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal T(H)2 inflammation. *Nature* **482**:395-U1510.
- Kamada N, Chen GY, Inohara N, Nunez G. 2013. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nature Immunology* **14**:685-690.
- Kang Z, Zhang JL, Zhou JW, Qi QS, Du GC, Chen J. 2012. Recent advances in microbial production of delta-aminolevulinic acid and vitamin B-12. *Biotechnology Advances* **30**:1533-1542.
- Koboziev I, Webb CR, Furr KL, Grisham MB. 2014. Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. *Free Radical Biology and Medicine* **68**:122-133.
- Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE. 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**:4578-4585.
- Kristjansson G, Venge P, Hallgren R. 2007. Mucosal reactivity to cow's milk protein in coeliac disease. *Clinical and Experimental Immunology* **147**:449-455.
- Kucek LK, Veenstra LD, Amnuaycheewa P, Sorrells ME. 2015. A Grounded Guide to Gluten: How Modern Genotypes and Processing Impact Wheat Sensitivity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **14**:285-302.
- Kurina LM, Goldacre MJ, Yeates D, Seagroatt V. 2002. Appendicectomy, tonsillectomy, and inflammatory bowel disease: a case-control record linkage study. *Journal of Epidemiology and Community Health* **56**:551-554.
- Laass MW, Schmitz R, Uhlig HH, Zimmer KP, Thamm M, Koletzko S. 2015. The Prevalence of Celiac Disease in Children and Adolescents in Germany Results From the KiGGS Study. *Deutsches Arzteblatt International* **112**:553-+.
- Larsbrink J, Rogers TE, Hemsworth GR, McKee LS, Tauzin AS, Spadiut O, Klintner S, Pudlo NA, Urs K, Koropatkin NM, Creagh AL, Haynes CA, Kelly AG, Cederholm SN, Davies GJ, Martens EC, Brumer H. 2014. A discrete genetic locus confers xyloglucan metabolism in select human gut Bacteroidetes. *Nature* **506**:498-+.
- Lathrop SK, Bloom SM, Rao SM, Nutsch K, Lio CW, Santacruz N, Peterson DA, Stappenbeck TS, Hsieh CS. 2011. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature* **478**:250-U142.
- Le Poul E, Loison C, Struyf S, Springael JY, Lannoy V, Decobecq ME, Brezillon S, Dupriez V, Vassart G, Van Damme J, Parmentier M, Detheux, M. 2003. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *Journal of Biological Chemistry* **278**:25481-25489.
- Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. 2008. Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **72**:728-+.
- Lebwohl B, Sanders DS, Green PHR. 2018. Coeliac disease. *Lancet* **391**:70-81.
- Lerner A, Jeremias P, Matthias T 2015. The World Incidence and Prevalence of Autoimmune Diseases is Increasing.
- Lerner A, Matthias T. 2015. Possible association between celiac disease and bacterial transglutaminase in food processing: a hypothesis. *Nutrition Reviews* **73**:544-552.
- Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* **124**:837-848.

- Lousinian S, Mackie AR, Rigby NM, Panayiotou C, Ritzoulis C. 2018. Microcalorimetry of the intestinal mucus: Hydrogen bonding and self-assembly of mucin. *International Journal of Biological Macromolecules* **112**:555-560.
- Lukas M, Bortlik M, Maratka Z. 2006. What is the origin of ulcerative colitis? Still more questions than answers. *Postgraduate Medical Journal* **82**:620-625.
- Macpherson AJ, Slack E, Geuking MB, McCoy KD. 2009. The mucosal firewalls against commensal intestinal microbes. *Seminars in Immunopathology* **31**:145-149.
- Marcobal A, Barboza M, Froehlich JW, Block DE, German JB, Lebrilla CB, Mills DA. 2010. Consumption of Human Milk Oligosaccharides by Gut-Related Microbes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**:5334-5340.
- Marcobal A, Sonnenburg JL. 2012. Human milk oligosaccharide consumption by intestinal microbiota. *Clinical Microbiology and Infection* **18**:12-15.
- Mardini HE, Westgate P, Grigorian AY. 2015. Racial Differences in the Prevalence of Celiac Disease in the US Population: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2009-2012. *Digestive Diseases and Sciences* **60**:1738-1742.
- McFarland LV. 2015. From Yaks to Yogurt: The History, Development, and Current Use of Probiotics. *Clinical Infectious Diseases* **60**:S85-S90.
- Miyauchi S, Gopal E, Fei YJ, Ganapathy V. 2004. Functional identification of SLC5A8, a tumor suppressor down-regulated in colon cancer, as a Na<sup>+</sup>-coupled transporter for short-chain fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* **279**:13293-13296.
- Monteagudo-Mera A, Rodriguez-Aparicio L, Rua J, Martinez-Blanco H, Navasa N, Garcia-Armesto MR, Ferrero MA. 2012. In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of Functional Foods* **4**:531-541.
- Morowitz MJ, Carlisle EM, Alverdy JC. 2011. Contributions of Intestinal Bacteria to Nutrition and Metabolism in the Critically Ill. *Surgical Clinics of North America* **91**:771-+.
- Mucida D, Kutchukhidze N, Erazo A, Russo M, Lafaille JJ, de Lafaille MAC. 2005. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *Journal of Clinical Investigation* **115**:1923-1933.
- Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A, Fabiani E, Heier M, McMillan S, Murray L, Metzger MH, Gasparin M, Bravi E, Maki M. 2010. The prevalence of celiac disease in Europe: Results of a centralized, international mass screening project. *Annals of Medicine* **42**:587-595.

- Nadal I, Donant E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. 2007. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *Journal of Medical Microbiology* **56**:1669-1674.
- Naeem M, Ilyas M, Haider S, Baig S, Saleem M. 2012. ISOLATION CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM FRUIT JUICES AND THEIR EFFICACY AGAINST ANTIBIOTICS. *Pakistan Journal of Botany* **44**:323-328.
- Nagpal R, Kumar A, Kumar M, Behare PV, Jain S, Yadav H. 2012. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *Fems Microbiology Letters* **334**:1-15.
- Nagpal R, Kurakawa T, Tsuji H, Takahashi T, Kawashima K, Nagata S, Nomoto K, Yamashiro Y. 2017. Evolution of gut Bifidobacterium population in healthy Japanese infants over the first three years of life: a quantitative assessment. *Scientific Reports* **7**:11.
- Naiyer AJ, Shah J, Hernandez L, Kim SY, Ciaccio EJ, Cheng J, Manavalan S, Bhagat G, Green PH. 2008. Tissue transglutaminase antibodies in individuals with celiac disease bind to thyroid follicles and extracellular matrix and may contribute to thyroid dysfunction. *Thyroid* **18**:1171-1178.
- Neurath MF. 2014. New targets for mucosal healing and therapy in inflammatory bowel diseases. *Mucosal Immunology* **7**:6-19.
- Nie Y, Lin QL, Luo FJ. 2017. Effects of Non-Starch Polysaccharides on Inflammatory Bowel Disease. *International Journal of Molecular Sciences* **18**.
- Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. 2012. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **2**:11.
- Ozen M, Dinleyici EC. 2015. The history of probiotics: the untold story. *Beneficial Microbes* **6**:159-165.
- Pandey KR, Naik SR, Vakil BV. 2015. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology-Mysore* **52**:7577-7587.
- Paramsothy S, Paramsothy R, Rubin DT, Kamm MA, Kaakoush NO, Mitchell HM, Castano-Rodriguez N. 2017. Faecal Microbiota Transplantation for Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Crohns & Colitis* **11**:1180-1199.
- Pariente B, Cosnes J, Danese S, Sandborn WJ, Lewin M, Fletcher JG, Chowers Y, D'Haens G, Feagan BG, Hibi T, Hommes DW, Irvine EJ, Kamm MA, Loftus EV, Louis E, Michetti

- P, Munkholm P, Oresland T, Panes J, Peyrin-Biroulet L, Reinisch W, Sands BE, Schoelmerich J, Schreiber S, Tilg H, Travis S, van Assche G, Vecchi M, Mary JY, Colombel J, Lemann, M. 2011. Development of the Crohn's Disease Digestive Damage Score, the Lemann Score. *Inflammatory Bowel Diseases* **17**:1415-1422.
- Pariente B, Hu SR, Bettenworth D, Speca S, Desreumaux P, Meuwis MA, Danese S, Rieder F, Louis E. 2019. Treatments for Crohn's Disease-Associated Bowel Damage: A Systematic Review. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **17**:847-856.
- Pariente B, Mary JY, Danese S, Chowers Y, De Cruz P, D'Haens G, Loftus EV, Louis E, Panes J, Scholmerich J, Schreiber S, Vecchi M, Branche J, Bruining D, Fiorino G, Herzog M, Kamm MA, Klein A, Lewin M, Meunier P, Ordas I, Strauch U, Tontini GE, Zagdanski AM, Bonifacio C, Rimola J, Nachury M, Leroy C, Sandborn W, Colombel JF, Cosnes J. 2015. Development of the Lemann Index to Assess Digestive Tract Damage in Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology* **148**:52-63.
- Pascal V, et al. 2017. A microbial signature for Crohn's disease. *Gut* **66**:813-822.
- Perry RJ, Peng L, Barry NA, Cline GW, Zhang DY, Cardone RL, Petersen KF, Kibbey RG, Goodman AL, Shulman GI. 2016. Acetate mediates a microbiome-brain-beta-cell axis to promote metabolic syndrome. *Nature* **534**:213-+.
- Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, Bonazzi V, McEwen JE, Wetterstrand KA, Deal C, Baker CC, Di Francesco V, Howcroft TK, Karp RW, Lunsford RD, Wellington CR, Belachew T, Wright M, Giblin C, David H, Mills M, Salomon R, Mullins C, Akolkar B, Begg L, Davis C, Grandison L, Humble M, Khalsa J, Little AR, Peavy H, Pontzer C, Portnoy M, Sayre MH, Starke-Reed P, Zakhari S, Read J, Watson B, Guyer M. 2009. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res* **19**:2317-2323.
- Peyrin-Biroulet L, Cieza A, Sandborn WJ, Coenen M, Chowers Y, Hibi T, Kostanjsek N, Stucki G, Colombel JF, Int Programme Dev New Indexes C. 2012. Development of the first disability index for inflammatory bowel disease based on the international classification of functioning, disability and health. *Gut* **61**:241-247.
- Pizzi LT, Weston CM, Goldfarb NI, Moretti D, Cobb N, Howell JB, Infantolino A, DiMarino AJ, Cohen S. 2006. Impact of chronic conditions on quality of life in patients with inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* **12**:47-52.

- Pozo-Rubio T, Olivares M, Nova E, De Palma G, Mujico JR, Ferrer MD, Marcos A, Sanz Y. 2012. Immune Development and Intestinal Microbiota in Celiac Disease. *Clinical & Developmental Immunology*:12.
- PrabhuDas M, Adkins B, Gans H, King C, Levy O, Ramilo O, Siegrist CA. 2011. Challenges in infant immunity: implications for responses to infection and vaccines. *Nature Immunology* **12**:189-194.
- Pride DT, Salzman J, Haynes M, Rohwer F, Davis-Long C, White RA, Loomer P, Armitage GC, Relman DA. 2012. Evidence of a robust resident bacteriophage population revealed through analysis of the human salivary virome. *Isme Journal* **6**:915-926.
- Qin J, Li RQ, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li JH, Xu JM, Li SC, Li DF, Cao JJ, Wang B, Liang HQ, Zheng HS, Xie YL, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu HM, Yu C, Li ST, Jian M, Zhou Y, Li YR, Zhang XQ, Li SG, Qin N, Yang HM, Wang J, Brunak S, Dore J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Bork P, Ehrlich SD, Wang, J. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**:59.
- Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* **118**:229-241.
- Ramakrishna BS, Makharia GK, Chetri K, Dutta S, Mathur P, Ahuja V, Amarchand R, Balamurugan R, Chowdhury SD, Daniel D, Das A, George G, Gupta SD, Krishnan A, Prasad JH, Kaur G, Pugazhendhi S, Pulimood A, Ramakrishna K, Verma A. 2016. Prevalence of Adult Celiac Disease in India: Regional Variations and Associations. *American Journal of Gastroenterology* **111**:115-123.
- Reed KK, Wickham R. 2009. Review of the gastrointestinal tract: from macro to micro. *Semin Oncol Nurs* **25**:3-14.
- Reyes A, Haynes M, Hanson N, Angly FE, Heath AC, Rohwer F, Gordon JI. 2010. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* **466**:334-U381.
- Riasat GN, Riasat Z, Aslam I. 2016. Effects of nanoparticles on gastrointestinal disorders and therapy. *J. Clin. Toxicol* **6**:313.
- Rogier EW, Frantz AL, Bruno MEC, Wedlund L, Cohen DA, Stromberg AJ, Kaetzel CS. 2014. Lessons from mother: Long-term impact of antibodies in breast milk on the gut

- microbiota and intestinal immune system of breastfed offspring. *Gut Microbes* **5**:663-668.
- Round JL, Mazmanian SK. 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology* **9**:313-323.
- Rutgeerts P, Geboes K. 2001. Understanding inflammatory bowel disease - The clinician's perspective. *European Journal of Surgery* **167**:66-72.
- Salvetti E, Torriani S, Felis GE. 2012. The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **4**:217-226.
- Sanchez E, Donat E, Ribes-Koninckx C, Fernandez-Murga ML, Sanz Y. 2013. Duodenal-Mucosal Bacteria Associated with Celiac Disease in Children. *Applied and Environmental Microbiology* **79**:5472-5479.
- Saturni L, Ferretti G, Bacchetti T. 2010. The Gluten-Free Diet: Safety and Nutritional Quality. *Nutrients* **2**:16-34.
- Schiffrin EJ, Rochat F, Linkamster H, Aeschlimann JM, Donnethughes A. 1995. IMMUNOMODULATION OF HUMAN BLOOD-CELLS FOLLOWING THE INGESTION OF LACTIC-ACID BACTERIA. *Journal of Dairy Science* **78**:491-497.
- Schulzke JD, Bentzel CJ, Schulzke I, Riecken EO, Fromm M. 1998. Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue. *Pediatric Research* **43**:435-441.
- Schuppan D, Junker Y, Barisani D. 2009. Celiac Disease: From Pathogenesis to Novel Therapies. *Gastroenterology* **137**:1912-1933.
- Scott NA, Andrusaitė A, Andersen P, Lawson M, Alcon-Giner C, Leclaire C, Caim S, Le Gall G, Shaw T, Connolly JPR, Roe AJ, Wessel H, Bravo-Blas A, Thomson CA, Kastele V, Wang P, Peterson DA, Bancroft , Li XH, Grencis R, Mowat AM, Hall LJ, Travis MA, Milling SWF, Mann, ER. 2018. Antibiotics induce sustained dysregulation of intestinal T cell immunity by perturbing macrophage homeostasis. *Science Translational Medicine* **10**.
- Shah NP. 2007. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal* **17**:1262-1277.
- Shamir R, Lerner A, Shinar E, Lahat N, Sobel E, Bar-or R, Kerner H, Eliakim R. 2002. The use of a single serological marker underestimates the prevalence of celiac disease in Israel: A study of blood donors. *American Journal of Gastroenterology* **97**:2589-2594.
- Shewry PR. 2009. Wheat. *Journal of Experimental Botany* **60**:1537-1553.



- Siegrist CA. 2001. Neonatal and early life vaccinology. *Vaccine* **19**:3331-3346.
- Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott IDR, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel JF, Gasche C, Geboes K, Jewell DP, Karban A, Loftus EV, Pena AS, Riddell RH, Sachar DB, Schreiber S, Steinhart AH, Targan SR, Vermeire S, Warren BF. 2005. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology* **19**:5A-36A.
- Singh P, Arora S, Singh A, Strand TA, Makharia GK. 2016. Prevalence of celiac disease in Asia: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **31**:1095-1101.
- Sommer F, Backhed F. 2013. The gut microbiota - masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology* **11**:227-238.
- Sommer MOA, Dantas G, Church GM. 2009. Functional Characterization of the Antibiotic Resistance Reservoir in the Human Microflora. *Science* **325**:1128-1131.
- Spor A, Koren O, Ley R. 2011. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nature Reviews Microbiology* **9**:279-290.
- Srinivasan U, Jones E, Carolan J, Feighery C. 2006. Immunohistochemical analysis of coeliac mucosa following ingestion of oats. *Clinical and Experimental Immunology* **144**:197-203.
- Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, Belkaid Y. 2007. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *Journal of Experimental Medicine* **204**:1775-1785.
- Taggart AKP, Kero J, Gan XD, Cai TQ, Cheng K, Ippolito M, Ren N, Kaplan R, Wu K, Wu TJ, Jin L, Liaw C, Chen RP, Richman J, Connolly D, Offermanns S, Wright SD, Waters MG. 2005. (D)-beta-hydroxybutyrate inhibits adipocyte lipolysis via the nicotinic acid receptor PUMA-G. *Journal of Biological Chemistry* **280**:26649-26652.
- Takahashi K, Nishida A, Fujimoto T, Fujii M, Shioya M, Innaeda H, Lnatorni O, Bamba S, Andoh A, Sugimoto M. 2016. Reduced Abundance of Butyrate-Producing Bacteria Species in the Fecal Microbial Community in Crohn's Disease. *Digestion* **93**:59-65.
- Teresi S, Crapisi M, Vallejo MDC, Castellaneta SP, Francavilla R, Iacono G, Ravelli A, Menegazzi P, Louali M, Catassi C. 2010. Celiac Disease Seropositivity in Saharawi Children: A Follow-up and Family Study. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **50**:506-509.

- Thaiss CA, Zmora N, Levy M, Elinav E. 2016. The microbiome and innate immunity. *Nature* **535**:65-74.
- Thompson T. 2004. Gluten contamination of commercial oat products in the United States. *New England Journal of Medicine* **351**:2021-2022.
- Thorburn AN, Macia L, Mackay CR. 2014. Diet, Metabolites, and "Western-Lifestyle" Inflammatory Diseases. *Immunity* **40**:833-842.
- Tojo R, Suarez A, Clemente MG, de los Reyes-Gavilan CG, Margolles A, Gueimonde M, Ruas-Madiedo P. 2014. Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World Journal of Gastroenterology* **20**:15163-15176.
- Tominaga K, Kamimura K, Takahashi K, Yokoyama J, Yamagiwa S, Terai S. 2018. Diversion colitis and pouchitis: A mini-review. *World Journal of Gastroenterology* **24**:1734-1747.
- Trigo-Vicente C, Gimeno-Ballester V, Garcia-Lopez S, Lopez-Del Val A. 2018. Systematic review and network meta-analysis of treatment for moderate-to-severe ulcerative colitis. *International Journal of Clinical Pharmacy* **40**:1411-1419.
- Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. 2009. The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Science Translational Medicine* **1**:10.
- Ursell LK, Haiser HJ, Van Treuren W, Garg N, Reddivari L, Vanamala J, Dorrestein PC, Turnbaugh PJ, Knight R. 2014. The Intestinal Metabolome: An Intersection Between Microbiota and Host. *Gastroenterology* **146**:1470-1476.
- Van Tassell ML, Miller MJ. 2011. Lactobacillus Adhesion to Mucus. *Nutrients* **3**:613-636.
- Vasijevic T, Shah NP. 2008. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal* **18**:714-728.
- Venegas DP, De la Fuente MK, Landskron G, Gonzalez MJ, Quera R, Dijkstra G, Harmsen HJM, Faber KN, Hermoso MA. 2019. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Frontiers in Immunology* **10**.
- Ventura M, Turrone F, Lugli GA, van Sinderen D. 2014. Bifidobacteria and humans: our special friends, from ecological to genomics perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **94**:163-168.
- Verhasselt V. 2010. Oral tolerance in neonates: from basics to potential prevention of allergic disease. *Mucosal Immunology* **3**:326-333.

- Vieira AT, Teixeira MM, Martins FS. 2013. The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. *Frontiers in Immunology* **4**:12.
- Virgin HW, Wherry EJ, Ahmed R. 2009. Redefining Chronic Viral Infection. *Cell* **138**:30-50.
- Vojdani A. 2013. Cross-Reaction between Gliadin and Different Food and Tissue Antigens.
- Vojdani A, Kharrazian D, Mukherjee SP. 2014. The Prevalence of Antibodies against Wheat and Milk Proteins in Blood Donors and Their Contribution to Neuroimmune Reactivities. *Nutrients* **6**.
- Vojdani A, O'Bryan T, Green JA, McCandless J, Woeller KN, Vojdani E, Nourian AA, Cooper EL. 2004. Immune response to dietary proteins, gliadin and cerebellar peptides in children with autism. *Nutritional Neuroscience* **7**:151-161.
- Wang BH, Yao MF, Lv LX, Ling ZX, Li LJ. 2017. The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering* **3**:71-82.
- Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F, Wu H. 2011. Oral tolerance. *Immunological Reviews* **241**:241-259.
- Wells CW, Lewis S, Barton JR, Corbett S. 2006. Effects of changes in hemoglobin level on quality of life and cognitive function in inflammatory bowel disease patients. *Inflammatory Bowel Diseases* **12**:123-130.
- White LE, Bannerman E, McGrogan P, Kastner-Cole D, Carnegie E, Gillett PM. 2013. Childhood coeliac disease diagnoses in Scotland 2009-2010: the SPSU project. *Archives of Disease in Childhood* **98**:52-56.
- Wieser H. 2007. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology* **24**:115-119.
- Worbs T, Bode U, Yan S, Hoffmann MW, Hintzen G, Bernhardt G, Forster R, Pabst O. 2006. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* **203**:519-527.
- Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R, Sinha R, Gilroy E, Gupta K, Baldassano R, Nessel L, Li HZ, Bushman FD, Lewis, JD. 2011. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science* **334**:105-108.
- Yeo SK, Liong MT. 2010. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and bioconversion of isoflavones by probiotics in soymilk supplemented with prebiotics. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **61**:161-181.
- Zanoni G, Navone R, Lunardi C, Tridente G, Bason C, Sivori S, Beri R, Dolcino M, Valletta E, Corrocher R, Puccetti A. 2006. In celiac disease, a subset of autoantibodies against

transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes. *Plos Medicine* **3**:1637-1653.

Zhang YJ, Li S, Gan RY, Zhou T, Xu DP, Li HB. 2015. Impacts of Gut Bacteria on Human Health and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* **16**:7493-7519.

Zheng YC, Lu YL, Wang JF, Yang LF, Pan CY, Huang Y. 2013. Probiotic Properties of Lactobacillus Strains Isolated from Tibetan Kefir Grains. *Plos One* **8**:8.