



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI
MEDICINSKI FAKULTET

Nataša Stojaković

**UTICAJ PROBIOTIKA NA METABOLIZAM
SULFASALAZINA U OBOLJELIH OD
INFLAMATORNE BOLESTI CRIJEVA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Banja Luka, 2017.



UNIVERSITY OF BANJA LUKA
FACULTY OF MEDICINE

Nataša Stojaković

**THE INFLUENCE OF PROBIOTICS ON
SULFASALAZINE METABOLISM IN PATIENTS
WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE**

DOCTORAL DISSERTATION

Banja Luka, 2017.

MENTOR: Prof dr Momir Mikov, redovni profesor, Univerzitet Novi Sad, Medicinski fakultet

KOMENTOR: Prof dr Stevan Trbojević, redovni profesor, Univerzitet Istočno Sarajevo, Medicinski fakultet

UTICAJ PROBIOTIKA NA METABOLIZAM SULFASALAZINA U OBOLJELIH OD INFLAMATORNE BOLESTI CRIJEVA

UVOD: Normalna crijevna mikrofloraje kompleksna, balansirana zajednica mikroorganizama koji su normalni stanovnici probavnog trakta, a značajni su za fiziologiju ishrane domaćina i kontrolu imunog sistema. Enzimska aktivnost crijevnih bakterija je velika, a obzirom naraznolikost i broj mikroorganizama, razumljiv je snažan uticaj na vrstu i obim metaboličkih procesa, posebno onih vezanih za biotransformaciju ksenobiotika. Brojna istraživanja ukazuju da je crijevna flora uključena u patogenezu autoimunih bolesti, a među njima i u inflamatornu bolest crijeva. Molekula sulfasalazina je sačinjena od 5-aminosalicilne kiseline i sulfapiridina koji su vezani azo vezom, a za čije je cijepanje primarno odgovorna aktivnost bakterijske azoreduktaze u kolonu. Probiotike definišemo kao žive mikroorganizme, koji primjenjeni u adekvatnim količinama ispoljavaju povoljno dejstvo na ljudsko zdravlje, pri čemu su bakterije roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* najčešće korišteni probiotici. **CILJ:** U ovom istraživanju smo željeli ustanoviti da li peroralna primjene probiotika utiče na sastav i enzimsku aktivnost crijevne mikroflore kod pacijenata oboljelih od inflamatorne bolesti crijeva, kao i da li probiotici utiču na obim razgradnje sulfasalazina i nastanak njegovih metabolita, sulfapiridina i mesalazina. **ISPITANICI I METODE:** Ispitivanje je provedeno kao monocentrična, randomizovana, otvorena, kontrolisana studija faze IV sa paralelnim grupama u trajanju od 8 nedjelja u koju je uključeno 29 novooboljelih osoba. Ispitivana populacija je podijeljena u dvije grupe; grupu Sulfasalazin (sulfasalazin tablete od 500mg *Sulfasalazin*, Krka) sa 14 ispitanika i grupu Sulfasalazin i probiotik (sulfasalazin tablete od 500mg *Sulfasalazin*, Krka i probiotik *Normia*. Jadran Galenski Laboratorij) sa 15 ispitanika. Grupa Sulfasalazin je liječena samo sulfasalazinom tokom 8 nedjelja, a grupa Sulfasalazin i probiotik je uz sulfasalazin tokom 8 nedjelja dobijala i probiotik tokom 4 nedjelje. U ovoj grupi terapija sa probiotikom je počela 2 nedjelje poslije početka terapije sulfasalazinom, i trajala je 2 nedjelje. Nakon toga je terapija probiotikom prekinuta tokom slijedeće 2 nedjelje, da bi se potom ponovo uključila i trajala do isteka ispitivanja. Kontrolni pregledi ispitanika su vršeni svake dvije nedjelje, pri čemu su

sakupljani uzorci stolice i 24h urina. Uzorci mukusa zida crijeva su uzeti pri prvom endoskopskom pregledu te pri kontrolnoj endoskopiji, nakon završetka ispitivanja. Rađena je standardna mikrobiološka kultivacija crijevnih bakterija iz fekalnog sadržaja i crijevnog mukusa na pločama sa krvnim agarom, u aerobnim i anaerobnim uslovima. Broj bakterijskih kolonija je izražen kao log 10. Enzimska aktivnost crijevnih bakterija u fekalnom sadržaju (azoreduktaza, nitroreduktaza, beta-glukozidaza, beta-glukuronidaza) je određivana spektrofotometrijski. Mjerenje vrijednosti sulfasalazina i njegovih metabolita, SP i 5-ASA, nastalih *in vitro* fekalnoj suspenziji i iz uzorka 24-časovnog urina, je vršeno pomoću uređaja za tečnu hromatografiju sa masenim detektorom (LC-MS). Identifikacija probiotskih bakterija u fekalnom sadržaju pacijenata se vršila PCR metodom i elektroforezom na čipovima.

REZULTATI: *Enzimska aktivnost fekalne flore:* Aktivnost azoreduktaze pri aerobnim uslovima kultivisanja je statistički značajno opadala u obe eksperimentalne grupe. Pri anaerobnim uslovima kultivisanja statistički značajan pad aktivnosti azoreduktaze je postojao samo u grupi Sulfasalazin i probiotik. Aktivnost nitroreduktaze je statistički značajno rasla, u odnosu na vrijednosti prije početka liječenja, u obe ispitivane grupe i pri oba kultivacijska uslova. U grupi liječenoj kombinacijom sulfasalazina i probiotika je došlo do uočljiv pad aktivnosti nitroreduktaze nakon 2-sedmične primjene probiotika. Aktivnost beta-glukozidaze i beta-glukuronidaze je padala u odnosu na vrijednosti prije početka liječenja, u obe ispitivane grupe i pri oba kultivacijska uslova, pri čemu je kod pacijenata koji su dobijali i probiotike pad beta-glukuronidaze bio i statistički značajan. Aktivnost oba ova enzima je bila veća u grupi Sulfasalazin vs. Sulfasalazin i probiotik.

Broj bakterija u fekalnom sadržaju: Primjena sulfasalazina nije dovela do statistički značajne promjene broja fekalnih bakterija ni pri aerobnim niti anaerobnim uslovima kultivisanja, mada je bio prisutan trend rasta broja bakterija u odnosu na početne vrijednosti. Ni primjena kombinacije sulfasalazina i probiotika nije dovela do statistički značajne promjene broja fekalnih bakterija. I u ovoj eksperimentalnoj grupi pri aerobnim uslovima kultivisanja broj bakterija je rastao, ali je pri anaerobnim uslovima kultivisanja broj bakterija opadao u odnosu na početne vrijednosti.

Sulfasalazin i njegovi metaboliti izlučeni u urin: Količina sulfasalazina izlučenog u urinu nije pokazala statistički značajnu promjenu niti u jednoj ispitivanoj grupi, niti između grupa. Ni količina metabolita sulfapiridina se nije statistički značajno mijenjala niti u jednoj od grupa, iako je u grupi Sulfasalazin i probiotik prisutan blag pad na kontrolama provedenim poslije 2-sedmičnog davanja probiotika. Količine metabolita mesalazina takođe nisu pokazale statistički

značajne promjene niti u jednoj grupi ispitanika, ali su mu vrijednosti Sulfasalazin grupi rasle u odnosu na početne vrijednosti, dok su mu kod ispitanika tretiranih sulfasalazinom i probioticima vrijednosti opadale. *Sulfasalazin i njegovi metaboliti u fekalnom sadržaju-in vitro metabolizam:* Količina sulfasalazina izmjerenog u uzorku fecesa u obe eksperimentalne grupe je pokazala trend opadanja. Količina metabolita sulfapiridina kod ispitanika u grupi Sulfasalazin je rasla, dok u grupi liječenoj sulfasalazinom i probiotikom nije došlo do statistički značajnih promjena. Količina metabolita mesalazina, kod pacijenata liječenih samo sulfasalazinom se nije značajno mijenjala, a u grupi liječenoj sulfasalazinom i probiotikom je opala u odnosu na početne vrijednosti. *Identifikacija probiotskih bakterija u fekalnom sadržaju pacijenata:* Prolazna kolonizacija sa *Bifidobacterium*BB12 je potvrđena kod 22% ispitivanih uzoraka. Uočljivo je povećanje broja pozitivnih uzoraka na kontrolama koje su slijedile poslije 2-sedmične primjene probiotika. *Lactobacillus rhamnosus* LGG nije pokazala prolaznu kolonizaciju probavnog trakta. **ZAKLJUČAK:** Naši rezultati su pokazali da primjena probiotika utiče na smanjenje enzimske aktivnosti fekalnih bakterija kod oboljelih od inflamatorne bolesti crijeva. Iako u grupi liječenoj probioticima nismo uočili statistički značajne promjene u količinama sulfasalazina i njegovih metabolita u urinu, efekti uočeni u ovoj grupi ukazuju na moguće pozitivno dejstvo kod oboljelih od IBD.

Ključne riječi: sulfasalazin, probiotici, inflamatorna bolest crijeva

Naučna oblast: Farmakologija i toksikologija

Naučno polje: Medicina

Klasifikaciona oznaka za naučnu oblast prema CERIF šifrarniku: B740

MENTOR: Dr sc. Momir Mikov, Professor, University of Novi Sad, Medical faculty

CO-MENTOR: Dr sc. Stevan Trbojević, Professor, University of East Sarajevo, Medical faculty

THE INFLUENCE OF PROBIOTICS ON SULFASALAZINE METABOLISM IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

INTRODUCTION: The normal intestinal microflora is a complex, balanced community of microorganisms that are normal inhabitants of the gastrointestinal tract and are important for the physiology of nutrition and control of the host immune system. The enzymatic activity of intestinal bacteria is huge and considering the variety and number of microbial factors, comprehensible to a strong influence on the type and extent of metabolic processes, particularly those related to the biotransformation of xenobiotics. Numerous studies suggest that intestinal flora is included in pathogenesis of autoimmune diseases, including bowel inflammatory disease. Sulfasalazine is composed of the mesalazine and sulfapyridine linked by azo bond, and whose cleavage is primarily responsible bacterial azoreductase in the colon. Probiotics are defined as live microorganisms which, when used in adequate amounts exert beneficial effects on human health. The bacteria of the genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are most commonly used probiotics. **OBJECTIVE:** In this study, we wanted to explore whether oral administration of probiotics affects the composition and enzymatic activity of gut microflora in patients suffering from inflammatory bowel disease, and whether probiotics influence the extent of degradation of sulfasalazine and amount of its metabolites, sulfapyridine and mesalazine. **SUBJECTS AND METHODS:** The study was conducted as a mono-centric, randomized, open, controlled study phase IV with parallel groups for a period of 8 weeks which included 29 new cases of people. The study population was divided into two groups; sulfasalazine group (sulfasalazine tablets of 500 mg sulfasalazine, Krka) with 14 patients and a group of sulfasalazine and probiotic (sulfasalazine tablets of 500 mg sulfasalazine, Krka and probiotic Normia, Jadran Galenic Laboratory) with 15 patients. Participants in Sulfasalazine group were treated only with sulfasalazine for 8 weeks, while participants in Sulfasalazine and probiotic group were treated with sulfasalazine for 8 weeks and received probiotics during 4 weeks. In this group, therapy with probiotics is started 2 weeks after initiation with sulfasalazine therapy, and lasted two weeks. After that, probiotic therapy is interrupted during the following 2 weeks, then re-included and lasted until the end of the study. The controls are performed every two weeks, wherein the

samples of stool and 24 h urine were collected. Samples of mucus wall of the intestine were taken in the first endoscopic examination and in control endoscopy, after completion of the study. Standard microbiological cultivation of intestinal bacteria from fecal content and intestinal mucus on blood agar plates in aerobic and anaerobic conditions was performed. The number of bacterial colonies was expressed as a log 10. The enzymatic activity of intestinal bacteria in the fecal contents (azoreductase, nitroreductase enzyme, beta-glucosidase, betaglucuronidase) was determined spectrophotometrically. Measuring the value of sulfasalazine and its metabolites, SP and mesalazine, *in vitro* generated in faecal samples and in samples of 24-hour collected urine was performed by means of liquid chromatography with mass spectroscopy (LC-MS). Identification of probiotic bacteria in the fecal content of the patients was carried out by PCR method and microchips electrophoresis. RESULTS: *The enzymatic activity of fecal flora:* Azoreductase activity under aerobic culture conditions was significantly decreased in both experimental groups. Statistically significant decline in activity of azoreductase in anaerobic conditions existed only in the group of sulfasalazine and probiotic. Nitroreductase activity was significantly increased, compared to the values before the treatment, in both groups and in both of the cultivation conditions. In the group treated by a combination of sulfasalazine and probiotics there has been a noticeable decline in activity of nitroreductase after the application of probiotics during two weeks time. Activity of beta-glucosidase and beta-glucuronidase is decreasing in relation to the value before treatment, in both groups and in both of the cultivation conditions, in which the patients who received the probiotics had a statistically significant decrease of beta-glucuronidase activity. The activity of both enzymes was higher in the Sulfasalazine group vs. Sulfasalazin and probiotic group. *The number of bacteria in fecal content:* Application of sulfasalazine did not significantly change the number of fecal bacteria neither in aerobic nor anaerobic culture conditions, although there was a trend in increasing the number of bacteria in comparasion to pretreatment values. Applying a combination of sulfasalazine and probiotics did not significantly change the number of fecal bacteria. In this experimental group under aerobic condition the number of bacteria was decereasing, but in anaerobic conditions the number of bacteria was decreasing in baseline. *Sulfasalazine and its metabolites are excreted in the urine:* The amount of sulfasalazine excreted in the urine did not showed statistically significant change in any of the study group, or between groups. The amount of the metabolite sulfapyridine was not significantly changed in any of the groups, although the Sulfasalazine and probiotic group had a

slight decrease in the controls carried out after 2-weeks of treating with probiotics. The amount of the metabolite mesalazine did not showed statistically significant change in any of the study group, or between groups, but value in the Sulfasalazine group increased compared to baseline values, whereas the patients treated with sulfasalazine and probiotics showed decrease in the amount of mesalazine compared to baseline values. *Sulfasalazine and its metabolites in fecal content-in vitro metabolism:* The amount of sulfasalazine measured in fecal samples in both experimental groups showed a declining trend. The amount of the metabolite sulfapyridine in the Sulfasalazine group had increased, while in the Sulfasalazine and probiotic group there were no statistically significant changes. The amount of the metabolite mesalazine, in patients treated with sulfasalazine was not significantly changed, but in the Sulfasalazine and probiotic group decreased compared to baseline values. *Identification of probiotic bacteria in the fecal content:* Transient colonization with *Bifidobacterium* BB12 was confirmed in 22% of samples. There is a noticeable increase in the number of positive samples in the controls that followed after the two-week period of probiotics application. *Lactobacillus rhamnosus* LGG did not show transient colonisation of the digestive tract. **CONCLUSIONS:** Our results shows that administration of probiotic decrease the enzymatic activity of faecal bacteria in the patients with inflammatory bowel disease. Although in the group treated with probiotics we have not observe significant changes in the amounts of sulfasalazine and its metabolites in urine, the effects observed in this group indicate possible positive effect in patients with IBD.

Keywords: sulphasalazine, probiotics, inflammatory bowel disease

Scientific area: Pharmacology and toxicology

Scientific field: Medicine

Classification Code for the scientific field under CERIF code book: B740

ZAHVALNOST

Put do završetka ovog istraživanja i izrade disertacije je bio dug i težak. Samo istraživanje je bilo kompleksno i zahtijevalo je multidisciplinarni pristup. Upravo zato dugujem zahvalnost ovako velikom broj kolega i iznimno mi je drago da smo ovim istraživanjem pokazali da su mostovi između različitih disciplina mogući i održivi.

Prije svega, veliko, iskreno hvala mom mentoru prof dr Momiru Mikovu bez čije svesrdnepomoći i velikog razumijevanja ne bi ni bilo ovog rada.

Veliku zahvalnost dugujem i mom komentoru prof dr Stevanu Trbojeviću bez čije pomoći bi bionemoguće provesti ovo istraživanje, kao i dr Tanji Mitrić Glamočanin i ostalim kolegama sa Odjela za gastroenterologiju UKC Banja Luka.

Posebnu zahvalnost dugujem prof dr Svjetlani Stoisavljević Šatara i prof dr Ranku Škrbiću na podsticaju, podršci, savjetima, velikom razumijevanju i riječima ohrabrenja pruženim tokom istraživanja i pisanja disertacije.

Mnogo hvala kolegi doc dr Saši Vukmiroviću sa Zavoda za farmakologiju u Novom Sadu, kolegama sa Instituta za zaštitu zdravlja RS, koleginiци doc dr Dijani Jelić sa odsjeka farmacije Medicinskog fakulteta kao i koleginicama, tada studentima, a sada magistrama farmacije Dragani, Slavenki i Ivani kojisu svojim radom i pomoći omogućili nesmetano i uspješno izvođenje ovog istraživanja.

Mnogo se zahvaljujem i prof dr Vojislavu Trkulji i koleginicama Dragani Kovačić, Bojani Vuković i Jeleni Mihić Salapura sa Poljoprivrednog instituta Republike Srpske na nesebičnoj pomoći, stručnom vodstvu i upoznavanju sa tehnikama koje su bile jedan od temelja mog istraživačkog rada.

Hvala farmaceutskim kompanijama Krka i Jadran galenski laboratorij na donaciji lijekova koji su korišteni tokom istraživanja.

Hvala mojim najmilijim, mojoj porodici, na pomoći, razumijevanju i podršcikoju su mi pružili tokom ovog dugog puta.

SADRŽAJ

Lista skraćenica

1. UVOD

1.1. Crijevna mikroflora

1.1.1. Uloga crijevnne mikroflore u zdravlju i bolesti

1.1.2. Zajednica mukoznih mikroorganizama

1.2. Crijevno mukozna barijera

1.2.1. Građa i funkcija crijevnog epitela

1.2.2. Mukusni sloj

1.2.3. Antimikrobni peptidi

1.2.4. Limfno tkivo povezano sa crijevnim traktom

1.3. Metabolička aktivnost crijevnne flore

1.4. Inflammatorna bolest crijeva

1.5. Primjena probiotika

2. HIPOTEZE

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

4. ISPITANICI I METODE

5. REZULTATI

6. DISKUSIJA

7. ZAKLJUČAK

8. LITERATURA

Prilozi

LISTA SKRAĆENICA

5-ASA	aminosalicilne kiseline
AMP	antimikrobni proteini
APC	antigen prezentujuće ćelije
BBi	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
BBr	<i>Bifidobacterium breve</i>
CD	Kronova bolest (eng. <i>Chron disease</i>)
CYP P 450	citohrom P 450
DC	dendritične ćelije
DSS	supstanca dekstran eng. <i>Dextran sulphate sodium</i>
ECN	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
Fc- γ	vezujući protein gama(eng. <i>Fragment crystallizable region</i>)
GALT	limfno tkivo povezano sa crijevnim traktom (eng. <i>Gut Associated Lymphoid Tissue</i>)
GATA 3	transkriptivni faktor vezan za GATA 3 gen
GI	gastro-intestinalno
HBD-1	humani β -defenzin 1
HBD-2	humani β -defenzin 2
HBD-3	humani β -defenzin 3
IBD	inflamatorna bolest crijeva (eng. <i>Inflammatory bowel disease</i>)
IFN γ	interferon gama
IL	interleukin
ILF	izolovani limfoidni folikuli
LA	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
LGG-	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>
LPS	lipoproteinski polisaharidom
MAMC	mikroorganizmi blisko povezani sa epitelom (eng. <i>Mucosa-associated microbial community</i>)
MAMP	molekularni uzorci udruženi sa mikroorganizmima (eng. <i>Microbe-</i>

	<i>associated molecular pattern</i>)
MDR	multipla rezistencija na lijekove
MHC	glavni histokompatibilni kompleksa (eng. <i>Major histocompatibility complex</i>)
MLČ	mezenterijalni limfni čvorovi
MPO	mijeloperoksidaze
MUC2	membrana vezujući mucin 2
MUC3	membrana vezujući mucin 3
NF-κB	nuklearni faktor kapa B
NK ćelije	ćelije prirodne ubice (eng. <i>natural killers</i>)
NLR	intracelularni-NOD slični receptori
NSAIL	nesteroidni antiinflamatorni lijekovi
PepT 1	crijevni proton zavisni prenosioč
P-gp	P-glikoprotein
pIgR	polimerni imunoglobulinski receptori
PP	Pejerove ploče tankog crijeva
PRR	receptori koji prepoznaju uzorke (eng. <i>pattern-recognition receptors</i>)
RA	reumatoidni artritis
RORγ	transkriptorni faktor (eng. <i>RAR-related orphan receptor gamma</i>)
rRNK	ribosomalana ribonukleinska kiselina
sIgA	Sekretorni imunoglobulin A
SP	sulfapiridin
SSZ	sulfasalazin
T reg	regulatorni T limfociti
T-bet	transkriptivni faktor vezan za T ćelije (eng. <i>T-box transcription factor</i>)
TGF-α	transformišući faktor rasta alfa (eng. <i>transforming growth factor α</i>)
TGF-β	transformišući faktor rasta beta (eng. <i>transforming growth factor β</i>)
Th 0	naivni T limfociti
Th	pomoćnički T limfociti

TJ	proteini čvrstih veza (eng. <i>tight junctions</i>)
TLR	membranski-Toll slični receptori (eng. <i>Toll Like Receptors</i>)
TNF α	faktor tumorske nekroze alfa
UC	ulcerozni kolitis (eng. <i>ulceros colitis</i>)
UGT	UDP-glukoziltransferaze
Wnt signalni put	grupa glikoproteina odgovorna za ćelijsku diferencijaciju (eng. <i>Wingless-type MMTV integration site family member</i>)

1. UVOD

Probavni trakt čovjeka je kolonizovan velikim brojem različitih mikroorganizama, koji čine takozvanu normalnu crijevnu mikrofloru. Definišemo je kao kompleksnu, balansiranu zajednicu mikroorganizama koji su normalni stanovnici probavnog trakta, a značajni su za fiziologiju ishrane domaćina i kontrolu imunog sistema. Danas se smatra da broj bakterija koje naseljavaju čovjeka za deset puta prevazilazi ukupan broj svih somatskih i germinativnih ćelija domaćina [1]. Ljudska crijeva sadrže preko 500 bakterijskih vrsta i oko 10^{13} – 10^{14} bakterija, što analizu varijacija sastava i broja bakterija čini izuzetno teškom.

Enzimska aktivnost crijevnih bakterija je velika, te se crijevna flora, poslije jetre, smatra najvećim metaboličkim organom. Velika raznolikost i ogroman broj crijevnih bakterija snažno utiču na vrstu i obim metaboličkih procesa, posebno onih vezanih za biotransformaciju ksenobiotika [2], sintezu i aktivaciju karcinogena [3] te je zato od velike važnosti za zdravlje domaćina.

Brojna istraživanja ukazuju da je crijevna flora uključena u patogenezu autoimunih bolesti, a među njima i u inflamatornu bolest crijeva (*inflammatory bowel disease*-IBD). Sulfasalazin (SSZ) je lijek koji se koristi u liječenju IBD i reumatoidnog artritisa (RA). Molekula SSZ sadrži 5-aminosalicilnu kiselinu (5-ASA) i sulfapiridin (SP) vezane azo vezom, koja se primarno cijepa djelovanjem bakterijske azoreduktaze u kolonu. Najveći dio oralno unesenog SSZ ostaje nepromijenjen do dolaska u kolon. Smatra se da je SP aktivni princip djelotvoran u RA zbog svog antibakterijskog i imunomodulatornog dejstva, dok je 5-ASA aktivni princip u IBD.

U istraživanju na životinjama je dokazano da primjena probiotika povećava metabolizam SSZ posredovan enzimima crijeвне flore [4]. Obzirom da se ovi rezultati ne mogu direktno prenijeti na ljude, postoji potreba za sprovođenjem dobro kontrolisanih kliničkih ispitivanja na ljudima.

Probiotici se danas definišu kao živi mikroorganizmi, koji primjenjeni u adekvatnim količinama ispoljavaju povoljno dejstvo na ljudsko zdravlje [5]. Bakterije roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* su najčešće korišteni probiotici kod ljudi. Ispitivanje djelotvornosti probiotika u liječenju infekcija, inflamatornih i alergijskih bolesti je predmet mnogih istraživanja. I pored toga, tačan mehanizam djelovanja probiotika nije u potpunosti razjašnjen, te još ima dosta

kontroverznih mišljenja u literaturi. Mogući mehanizmi djelovanja uključuju inhibiciju adhezije i rasta

potencijalnih patogena, poboljšanje barijerne funkcije crijevne mukoze i rezistencija na kolonizaciju, te poboljšanje lokalnog mukoznog i sistemskog imunog odgovora[6].

IBD je hronična, relapsna inflamatorna bolest probavnog sistema, autoimune prirode, koja se manifestuje u vidu ulceroznog kolitisa (UC) i Kronove bolesti (CD). Nova istraživanja imunološke, mikrobiološke i genetičke osnove obe forme IBD podupiru trenutno važeći model bolesti koji kaže da IBD predstavlja oboljenje koje nastaje zbog poremećenog odgovora crijevno-mukoznog imunog sistema na antigene crijevnih komenzala kod genetski osjetljivih osoba [7]. Zbog povezanosti crijevne mikroflore i IBD, provode se brojne studije sa probioticima. Oni se pokušavaju uvesti kao novi lijekovi koji bi trebali zamijeniti ili barem pojačati djelovanje standardnih lijekova koji se koriste u terapiji IBD.

Glavi cilj istraživanja prikazanog u ovoj disertaciji je bio da istražimo da li peroralna primjene probiotika utiče na sastav i enzimsku aktivnost crijevne mikroflore kod pacijenata oboljelih od inflamatorne bolesti crijeva, kao i njihov uticaj na obim razgradnje sulfasalazina u crijevima i nastanak njegovih metabolita.

1.1. Crijevna mikroflora

1.1.1. Uloga crijevne mikroflore u zdravlju i bolesti

Crijevna mikroflora predstavlja složeni ekosistem, trajno ili prolazno naseljenih, različitih mikroorganizama. Čini je oko 10^{13} – 10^{14} mikroorganizama, što za 10 puta prevazilazi broj ćelija u ljudskom tijelu. Kolektivni genom crijevne mikroflore, nazvan mikrobiom, sadrži 100 do 150 puta više gena od kompletnog ljudskog genoma[8]. Procjenjivalo se, kultivacijskim tehnikama, da normalnu crijevnju mikrofloru čini oko 500 bakterijskih vrsta, pri čemu je 30-40 dominantno. Danas, uz pomoć modernih molekularnih metoda, možemo uspješno identifikovati i klasifikovati mnogo veći broj mikroorganizama nego ranije kada su korištene isključivo kultivacijske metode, jer je ustanovljeno da je jako veliki broj bakterija nekultivibilan. Broj bakterijskih vrsta, identifikovanih kultivacijsko nezavisnim rRNK sekvencionalnim analizama, se kreće od 15000 do 36000. Najčešće identifikovane bakterije su pripadale filumu *Firmicutes* (rod

Lactobacillus, Clostridium, Enterococcus), *Bacteroidetes* (rod *Bacteroides*), *Proteobacteria* (vrste kao *Escherichia coli*) i *Actinobacteria* (kao *Bifidobacteria*)[9,45].

Cijeli probavni trakt je naseljen mikrororganizmima pri čemu je populacija mikroorganizama najveća u njegovom distalnom dijelu. Takav raspored je rezultat odsustva antimikrobnih mehanizama domaćina, kao što su probavni enzimi i žučne soli u donjim partijama probavnog trakta, te crijevne peristaltike. Broj mikroorganizama u želucu i proksimalnom dijelu tankog crijeva je manji od 10^5 i uglavnom ih čine aerobne, gram pozitivne vrste. Distalno od ileocekalne valvule, broj mikrororganizama značajno raste i dominiraju fakultativni i striktni anaerobi, a u debelom crijevu broj bakterija dostiže 10^{11} – 10^{12} [4] što čini oko 70% svih bakterija u ljudskom tijelu [10].

Istraživanja su pokazala različitost broja aerobnih i anaerobnih mikrororganizama i u poprečnom presjeku crijeva. Uočeno je da je odnos anaeroba i aeroba niži na mukoznoj površini nego u lumenu crijeva [11]. Smatra se da je takav odnos posljedica povećanog prisustva kiseonika u mukusnom sloju koji potiče od oslobođenog kiseonika dopremljenog krvlju [12].

Jednom naseljeni mikrororganizmi, formiraju svoju zajednicu, koja u normalnim uslovima ostaje relativno stabilna tokom cijelog života individue. Svaki novouneseni mikroorganizam teško može istisnuti već postojeće, naseljene bakterije [13]. Crijevna flora je jedinstvena za svaku osobu i smatra se ekvivalentom otiska prsta [14] a čine je rezidentne (simbionti) i prolazne bakterije. Simbionti uspješno kolonizuju crijeva i umnožavaju se kontinuirano, za razliku od prolaznih bakterija kojima to uspijeva samo tokom kratkog vremena.

Simbiotske bakterije su se, radi osiguranja opstanka u probavnom traktu, prilagodile antimikrobnim mehanizmima domaćina. Sve veći broj podataka govori u prilog činjenici da simbiotski mikroorganizmi podstiču antimikrobne sisteme domaćina čime regulišu sopstveni rast i brojnost.

Na taj način ove bakterije štite domaćina, jer bi njihovo nekontrolisano umnožavanje, bez obzira što ne posjeduju faktore virulencije, moglo dovesti do prodiranja bakterija u intestinalno tkivo i do nekontrolisane imunološke reakcije intestinalnog tkiva, sistemske bakterijemije i sepe. Uspostavljanje negativne povratnesprege, u kojoj simbiotske bakterije kontrolišu sopstveni broj povećavajući efikasnost crijevno-mukozne barijere, domaćinu pruža dodatne prednosti, u smislu otpornosti na eventualno unošenje patogena ili toksina. Nasuprot nepatogenim simbiotima,

patogenimikroorganizmi posjeduju faktore virulencije kojima mogu prevazići zaštitne sisteme crijevnog tkiva domaćina, te narušiti integritet i homeostazu GI barijere [15].

Varijacije u sastavu crijevne flore zavise od ishrane, dobi, imunog odgovora mukoze, postojanja organskih bolesti domaćina, unosa antimikrobnih supstanci [16]. U studiji na ispitanicima određenog stepena srodnosti, istraživači su dokazali da je uticaj genotipa domaćina na sastav crijevne flore značajniji u odnosu na faktore okoline [17].

Kolonizacija mikroorganizmima počinje odmah po porođaju, a smatra se da su upravo ti mikroorganizmi odgovorni za razvoj imunog sistema [18]. Brojne studije sugerišu značaj tipa kolonizujućih bakterije na razvoj crijevnog imunog sistema [31]. Vrsta kolonizovanih mikroorganizama zavisi od načina porođaja, majčine mikroflore, ishrane djeteta, higijenskih navika [19].

Rani kolonizatori probavnog trakta su fakultativni anaerobi kao enterobakterije i laktobacilusi. Izgleda da upravo ove bakterije mogu modulisati ekspresiju gena u domaćina, kreirajući tako prikladnu okolinu za sebe, kao i spriječiti rast drugih bakterija koje se kasnije pokušavaju naseliti [20]. U zavisnosti da li je dojenče hranjeno majčinim mlijekom ili mliječnom formulom, razlikuje se vrste bakterija koje vrše dalju kolonizaciju. Kod dojene djece dominiraju bifidobakterija, dok djeca hranjena mliječnom formulom imaju mnogo kompleksniji sastav crijevne flore, sličniji onom kod odraslih osoba, sa dosta laktobacilusa i bifidobakterija, ali i enterobakterija, bakterioidea i streptokoka [21].

Smatra se da je kod odraslih prisustvo normalne mikroflore značajno i sa aspekta održavanja fizičkog integriteta, s obzirom da su ispitivanja na animalnim modelima pokazala da odsustvo mikroflore čini eksperimentalne životinje podložnijim hemijskom oštećenju intestinalne barijere i crijevnim infekcijama [22]. Intestinalni mikroorganizmi imaju veliku metaboličku aktivnost koja je i adaptabilna i obnovljiva. Proizvodnjom kratkih lanaca masnih kiselina, simbionti pozitivno utiču na ćelijsku diferencijaciju i proliferaciju epitela crijeva, te posreduju pri drugim metaboličkim efektima. Zahvaljujući toj kompleksnoj metaboličkoj aktivnosti, obezbjeđuje se dostupna energija i materije za domaćina, a lii energija i nutrienti za rast i proliferaciju bakterija.

Uticaj crijevnih bakterija na fiziologiju crijeva je dokazan u brojnim komparativnim studijama na *germ free* životinjama i životinjama kolonizovanim određenim bakterijama. *Germ-free* životinje su pokazale mnogo veću osjetljivost na infekciju, imale su smanjenu

vaskularizaciju, smanjenu enzimsku aktivnost probavnog trakta, smanjenu debljinu mišićnog zida, pad produkcije citokina i nivoa serumskih imunoglobulina, manje Pejerove ploče i manje intraepitelne limfocite [23]. Pokazalo se da kolonizacija *germ free* životinja samo sa jednom vrstom npr. *Bacteroides thetaiotaomicron*, pogoduje ekspresiji različitih genotipova koji utiču na unos hranjivih supstanci, metabolizam, angiogenezu, barijernu ulogu sluznice i razvoj crijevnog nervnog sistema [20].

U istraživanjima je otkriveno da imunomodulatorne molekule simbiotskih bakterija utiču na normalan razvoj i funkciju mukoznog imunog sistema [24-25]. Komenzali snažno utiču i na razvoj humoralnih komponenti crijevno mukoznog imuniteta [26], a omogućavaju i fino podešavanje T ćelija tipa 1 ili tip 2 citokinskih profila [23]. Na osnovu dosadašnjih istraživanja, možemo reći da sastav kolonizujuće flore utiče na individualne varijacije u imunitetu domaćina.

Sojevi bakterija za koje je dokazano da imaju korisne osobine po domaćina uglavnom pripadaju rodu laktobacilusa i bifidobakterija, a upravo ta dva roda se najčešće i koriste kao probiotici. Neki sojevi imaju dodatne korisne aspekte kao što je stimulacija imunog odgovora i kompetitivno isključivanje patogena [27].

1.1.2. Zajednica mukoznih mikroorganizama

Sloj epitelne ćelije koja oblažu crijeva je prekriven slojem mukusa koji sprečava većinu mikroorganizama da dosegnu epitelnu površinu crijeva. Komenzale nalazimo samo u luminalnom sloju mukusa koji je bitno rjeđi, što i omogućava prolazak i naseljavanje nekih luminalnih mikroorganizama, dok je unutrašnji, gusti sloj mukusa bez mikroorganizama. Mucinski glikani služe bakterijama kao izvor energije ali i kao mjesto vezivanja određenih bakterija, što govori u prilog hipotezi da svaki domaćin bira svoju vlastitu komenzalnu mikrofloru [28]. Jedna od hipoteza [29] je da vanjski sloj mukusa, koji sadrži razrijeđene odbrambene supstance domaćina, može služiti kao okolina u kojoj su mikroorganizmi zaštićeni od poremećaja koji se dešava u lumenu crijeva, i odakle mogu načiniti rekolonizaciju lumena crijeva. Zahvaljujući mukusu, formira se sloj koji omogućava rigoroznu selekciju mikroorganizama koji stupaju u kontakt sa tkivom domaćina- odnosno tako nastaje populacija mikroorganizama blisko povezanih sa epitelom (*mucosa-associated microbial community*-MAMC). Broj bakterija koje spadaju u zajednicu mukoznih mikroorganizama je za deset puta manji od broja luminalnih mikroorganizama.

Pretpostavlja se da je jedan od razloga za strogu selekciju MAMC mikroorganizamanjihova bliska interakcija sa epitelnim i imunim sistemom koja ostvaruje neposredan uticaj na fiziologiju probavnog trakta domaćina, a smatra se da drugih organa van probavnog sistema [22]. Laktobacili i predstavnici roda *Bacteroides* zauzimaju najznačajnije mjesto među MAMC [32], a u laktobacilnoj mikroflori kolona čovjeka, i u MAMC grupi i među luminalnim mikroorganizmima, dominira vrsta *Lactobacillus reuteri* [33].

Istraživanje ove zajednice mikroorganizama je veoma zahtjevno kod zdravih ljudi. Bioptički uzorci i uzorci koji se dobiju pri operativnim zahvatima, obično potiču od bolesnih osoba ili osoba koji su liječeni antibioticima ili pak od onih osoba kod kojih je kolon čišćen zbog endoskopskog ili kolonoskopskog pregleda [34] što za posljedicu vjerovatno ima nerealnu sliku sastava MAMC.

1.2. Crijevno mukozna barijera

Crijevno-mukozna barijera probavnog trakta obezbjeđuje domaćinu fizičku, hemijsku i imunološku zaštitu. Fizičku zaštitu od prodora luminalnih mikroorganizama obezbjeđuje sloj epitelnih ćelija i sloj mukusa koji ih prekriva, hemijsku barijeru čine antimikrobni proteini (AMP) koji se sintetisu od strane epitelnih i Panetovih ćelija, a imunološku barijeru probavnog trakta, prvenstveno čine sekretorni imunoglobulini (sIgA) koji oblažu i neutrališu luminalne mikroorganizme. U slučaju da nabrojani sistemi odbrane nisu dovoljno efikasni, dodatnu imunološku barijeru čine subepitelni limfociti i fagociti, uključujući i dendritične ćelije i makrofage [9, 35] smještene u lamini proprij crijeva.

1.2.1. Građa i funkcija crijevnog epitela

Crijevni epitel je građen od jednog sloja čvrsto priljubljenih ćelija koji čini efikasnu barijeru između sadržaja lumena crijeva i unutrašnjosti tijela. Najbrojnije tip ćelija u crijevnom epitelu su apsorpcioni enterociti. Osim njih postoje još tri različite vrste ćelija sa specifičnom funkcijom: peharaste ćelije, enteroendokrine i Panetove ćelije. Peharaste ćelije su odgovorne za proizvodnju mukusa, a enteroendokrine ćelije luče peptidne hormone koji su uključeni u ćelijski trofizam, obnavljanje tkiva, angiogenezu, diferencijaciju enterocita i polarizaciju po osovini kript-vilus. Panetove ćelije sadrže veliki broj granula koje sadrže antimikrobne supstance poput lizozima i α -defenzina. Osim toga epitel crijeva sadrži i mikrofild (M) ćelije koje su u stvari dio

epitela udruženog sa limfoidnim tkivom i odgovorne su za transport luminalnih bakterija i antigena do imunih ćelija lamine proprie[35].

Homeostaza epitela se održava zahvaljujući balansu ćelijske proliferacije i epitelne apoptoze. Brzina prometa enterocita zavisi od tempa sazrijevanja stem ćelija u kriptama crijeva, s jedne strane, i brzine ljuštenja površinskih ćelija crijevnih vila, s druge strane. Stem ćelije u kriptama crijeva podliježu proliferaciji i diferentovanju u enterocite sa velikom ekspresijom enzima i transportera četkaste granice; istovremeno podliježu migraciji na gore, prema vrhu vila, gdje dolazi do njihove apoptoze i ljuštenja. Stem ćelije se diferentuju i u Panetove ćelije, koje migriraju u dno kripti, kao i u peharaste ćelije, koje luče mukus, te crijevne endokrine ćelije koje migriraju na gore, prema vrhovima crijevnih vila. Tokom diferentovanja i migriranja, nastaju proteini čvrstih veza između enterocita, popunjavajući prostor između njih.

Fiziološka apoptoza i ekstruzija na vrhovima crijevnih vila ne narušava normalnu barijernu funkciju crijeva. Ukoliko dođe do velikog odumiranja epitelних ćelija, izazvanog npr. patogenim mikrororganizmima, može doći do ogoljavanja epitelne površine i pojačane propustljivosti crijeva. Ovo se dešava i ako proliferacija i migracija iz kripti nije dovoljna da pokrije oštećenu površinu.

S druge strane, velika ćelijska proliferacija i otpornost na apoptozu se smatraju jednako važnim faktorima u ranoj fazi kolorektalne karcinogeneze. Danas se ravnoteža između ćelijske smrti i proliferacije epitelnih ćelija smatra ključnom tačkom od koje zavisi crijevna homeostaza. Važan faktor regulacije je transformišući faktor rasta alfa (TGF- α), koji stimuliše proliferaciju, i transformišući faktor rasta beta (TGF- β) koji je inhibitor ćelijskog rasta. Bitan faktor za obnavljanje crijevnog epitela je Wnt signalni put koji preko β -katenina, svog glavnog signalnog prenosnika, odgovoran za diferencijaciju stem ćelija u kriptama crijeva.

Crijevni epitel ima funkciji selektivno propusne membrane koja omogućava prolazak vode, elektrolita i hranjivih materija, ali sprečava štetni prodor stranih antigena, mikrororganizama i njihovih toksina. Da bi održale svoju funkciju, crijevne epitelne ćelije su usko povezane različitim proteinskim kompleksima koji sadrže čvrste veze, veze prijanjanja i desmosome. Te ćelijske veze su odgovorne za stabilnost mehaničke kohezije ćelija, definisanje granice između apikalnog i bočnog regiona membrane, a neophodne su i u regulaciji paraćelijske propustljivosti. Crijevne epitelne ćelije su u apikalnom dijelu priljubljene zahvaljujući postojanju čvrstih veza (*tight junctions*-TJ) što sprečava paraćelijski prolazak bakterija. Glavne proteinske komponente

čvrstih veza čine četiri tipa integralnih membranskih protein koji se zovi okludin, klaudin, tricelulin i vezne adhezije molekule. Transćelijska epitelna propustljivost je ograničena endozomalnom razgradnjom u enterocitima.

Prehrambeni proteini se uglavnom probavljaju putem gastričnih i pankresanih proteaza, te enzima četkaste granice, i pretvaraju u male peptide i amino kiseline, koje bivaju apsorbirane preko enterocita putem određenih transportera. Iako male količine intaktnih proteina mogu endocitozom biti unijete u epitelne ćelije i pri fiziološkim uslovima, većina njih se smješta u lizosome radi razgradnje. Na taj način se sprečava transcitoza cijelih proteina.

Većina komenzala je mukusom odvojena od epitelne površine, i ne ulaze u epitelne ćelije. Međutim, u stanjima zapaljenja i metaboličkog stresa praćenih sa smanjenjem interferona gama ($\text{IFN}\gamma$), faktora tumorske nekroze alfa ($\text{TNF}\alpha$), hipoksijom, malim količinama azotnog oksida itd. može doći do povećane translokacije nepatogenih bakterija transćelijskim putem. Smatra se da je prolazak komenzala povećan i u prisustvu patogenih invazivnih bakterijskih sojeva.

1.2.2. Mukusni sloj

Sloj mukusa, koji pokriva crijevni epitel je među prvim odbrambenim sistemima sa kojim se suočavaju intestinalni mikroorganizmi. Osim funkcije mehaničke barijere, mukus ima i ulogu hemijske (sadrži AMP) i imunološke barijere (sekretorni IgA). Sloj mukusa je odgovoran i za hidrataciju mukozne površine.

Čine ga proteini, ugljeni hidrati, lipidi i velike količine vode. Za produkciju intaktnog i stabilnog sloja mukusa su odgovorni veliki glikoproteini koji spadaju u familiju sekretornih gel-formirajućih mucina. Mucinski glikoproteini mukusu daju želatinoznu konzistenciju što otežava prolazak antigena iz lumena ka sloju epitelnih ćelija te zajedno sa peristaltikom crijeva, učestvuje u eliminisanju adheriranih mikroorganizama sa površine epitela [36,30]. Mucin MUC2 je dominantan član ove familije u probavnom traktu, a čini glavni dio mukusnog sloja.

Mucin u kolonu ima negativno naelektrisanje, jer su njegovi ugljeni hidrati supstituisani sa brojnim sulfatnim i sialičnim ostacima, koji mucinu daju dodatnu zaštitu od napada bakterija i enzimske razgradnje. U debelom crijevu mukusni sloj je u formi dvofaznog gela; unutrašnji sloj je gust, čvrsto priljubljen uz epitel i može se ukloniti samo mehaničkim struganjem, dok vanjski sloj nije tako čvrsto priljubljen i može se aspirirati pomoću mikropipete. Unutrašnji sloj je

sterilan i efikasno sprečava direktni kontakt epitela i luminalnih mikroorganizama, dok je vanjski sloj kolonizovan komenzalima.

Studija na miševima koji su bili MUC2 negativni je pokazala da formiranje efikasnog mukusnog sloja nije izvodivo u odsustvu MUC2[37]. U drugoj studiji miševi koji su bili MUC2 negativni, su spontano razvili kolitis i pokazali mnogo veću osjetljivost na eksperimentalni kolitis izazvan primjenom dekstran sulfata. Kao jedan od sastojaka mukusa je identifikovan i Fc-gama vezujući protein koji osim što veže Fc dio IgG antitijela, stabilizuje i MUC2 mrežu [38].

1.2.3. Antimikrobni peptidi

Antimikrobni peptidi (AMP) su integralni dio urođenog imuniteta. Njihova ekspresija je sačuvana tokom evolucije kod biljaka, insekata, bakterija i kičmenjaka. Kod sisara, dva najbolje karakterisana AMP su defenzini i katelicidini. Kod ljudi su identifikovane dvije subfamilije defenzina, α i β . Dva defenzina α , defenzin 5 i 6, proizvode Panetove ćelije u tankom crijevu. Obzirom da su Panetove ćelije ograničene na tanko crijevo, u zdravom kolonu nema α defenzina. U slučaju IBD, može doći do razvoja metaplastičnih Panetovih ćelija u kolonu i posljedične pojave α defenzina.

β -defenzin je uglavnom epitelnog porijekla, a može se osim u probavnom traktu naći i u respiratornom traktu i koži. Faktor okoline ima veliki uticaj na funkcionalnu aktivnost humanog β -defenzina 1 (HBD-1). Antimikrobna aktivnost mu zavisi u velikoj mjeri od njegovog redoks-statusa, jer redukcija disulfidnih mostova snažno pojačava njegove antimikrobne efekte prema fakultativnim patogenima kao što je *Candida albicans* te prema nekim anaerobnim Gram pozitivnim bakterija kao npr. *Bifidobacteria* i *Lactobacilli*-i. Neki defenzini poput HBD-1, su konstitutivne prirode i omogućavaju stalnu odbranu domaćina. Alternativno, njihova ekspresija može biti izazvana proinflamatornim citokinima ili prisustvom mikroorganizama i njihovih produkata. Ovakva ekspresija je tipična za HBD-2 i HBD-3. Osim ovih tipičnih AMP, antimikrobne karakteristike su prisutne i kod nekoliko proteina, koji imaju druge klasične funkcije, kao npr. familija histona i ribozomalnih proteina kao i ubikvitin[39].

1.2.4. Limfno tkivo povezano sa crijevnim traktom

Imuni sistem crijeva, označen kao limfno tkivo povezano sa crijevnim traktom (GALT) predstavlja najveće limfoidno tkivo u organizmu. Čine ga neorganizovana efektorska mjesta (imune ćelije subepitelne lamine proprije i intraepitelni limfociti) kao i organizovane strukture poput mezenterijalnih limfnih čvorova (MLČ), Pejerovih ploča tankog crijeva (PP) i izolovanih limfoidnih folikula (ILF) koji su prisutni u tankom i debelom crijevu.

Odbrana domaćina zahtjeva tačnu i brzu interpretaciju mikroorganizama radi razlikovanja komenzala od prolaznih patogena i precizne regulacije imunog odgovora. Epitel crijeva je prva linija odbrane, a istovremeno i centar u kojem se odvija aktivno uzorkovanje rezidentnih bakterija, patogena i ostalih antigena. Enterociti reaguju na “opasnost” od luminalnih

mikroorganizama tako što luče hemokine i citokine koji pobuđuju i urođeni i stečeni imuni odgovor na mjestu infekcije. Specijalizovane epitelne, mikrofoidne (M) ćelije koje prekrivaju limfoidne folikule uzorkuju mikroorganizme i prenose luminalne antigene do dendritičnih ćelija i drugih antigen prezentujućih ćelija, koje ih dalje obrađuju i na kraju prezentuju naivnim T ćelijama.

I same po sebi dendritične ćelije imaju centralnu ulogu u imunoregulaciji, jer mogu direktno uzorkovati luminalne mikroorganizme bilo direktnim preuzimanjem antigena ili putem nastavaka koje pružaju između enterocita bez narušavanja proteina čvrste veze. Dendritične ćelije mogu progutati i zadržati žive komenzale, te ih kao takve prenijeti do mezenterijalnih limfnih čvorova, izazvavši lokalnu indukciju imunog odgovora na komenzalne bakterije. Mezenterijalni limfni čvorovi ovako obavljaju ulogu “čuvara prolaza”, čime sprečavaju prelazak mikroorganizama iz lumena u unutrašnjost crijeva[40].

Sposobnost imunoregulatornih ćelija da razlikuju patogene od komenzala se odvija preko receptorskog sistema. To su receptori koji prepoznaju uzorke (PRR) i dio su urođenog imuniteta, a odgovorni su za detekciju MAMP (molekularni uzorci udruženi sa mikroorganizmima). PRR postoje u različitim tipovima ćelija; razlikujemo transmembranske, citosolne i lučće receptore koji prepoznaju uzorke. Dvije najistraživanije familije PRR su citosolni ili intracelularni-NOD slični receptori (NLR) i membranski-Toll slični receptori (TLR). Ekspresija TLR i NOD proteina je na površini enterocita i dendritičnih ćelija [41].

PRR prepoznaju mikroorganizme zahvaljujući sačuvanom strukturnom motivu koji je za njih karakterističan, kao npr. lipopolisaharidi, peptidoglikani, bakterijska DNK i flagelin. Nakon vezivanje liganda, pokrenuta signalna kaskada na kraju dovodi do aktivacije signalnih molekula poput nuklearnog faktora kapa B i ekspresije proinflammatoryh citokina, hemokina ili antimikrobnih peptide [29]. U ispitivanju na miševima sa deficitom TLR je uočeno smanjenje proliferacije enterocita i nivoa citoprotektivnih faktora, što ukazuje na to da je za funkcionisanje i obnavljanje crijevno mukozne barijere nepohodan signalizacijski put između bakterija i domaćina preko TLR[42]. PRR ligandi koji potiču od komenzala, u zdravim crijevima neće izazvati inflamaciju kao odgovor na te bakterije. Neki komenzali, čak, ispoljavaju protektivno dejstvo umanjujući proinflammatory odgovor indukovani različitim enteropatogenim bakterijama [43].

Nakon što antigen prezentujuća ćelija (APC) proguta antigen procesom endocitoze i obradi njegove proteine i polisaharide lizozomima, na površini prikaže nastale kratke fragmente

klase I ili klase II glavnih histokompatibilnih kompleksa (MHC I ili II). Površinske molekule MHC klase II bivaju prepoznate putem T-ćelijskih receptora u kombinaciji sa CD4 receptorima na CD4⁺ T limfocitima (vežu se za CD4 receptor APC-a). Ukoliko antigen nastaje unutar ćelije (npr. virusni protein) degradacioni fragmenti spadaju u MHC klasu I, i oni bivaju prepoznati putem T ćelijskih receptora u kombinaciji sa CD8 receptorima na CD8⁺ T limfocitima. Poslije ovog prvog koraka, antigen prezentujuća ćelija mora da pošalje drugi i treći signal koji će aktivirati diferencijaciju i sazrijevanje subtipova T limfocita[29].

APC na svojoj površini može ispoljiti molekulu zvanu CD80/86 koja se veže za CD28 na T limfocitu. Ekspresija CD80/86 na APC će se desiti samo ako je ona preko PRR prethodno detektovala prisustvo MAMP. Konačno, treći signal uključuje lučenje citokina od strane APC što omogućava diferencijaciju T ćelija u efektorne subtipove.

Dendritične ćelije (DC), osim što funkcionišu kao antigen prezentujuće ćelije, su jedine ćelije koje mogu direktno da se vežu za naivne T limfocite (Th0) i produkcijom citokina dovedu do njihovog sazrijevanja u pomoćničke T limfocite kao što su Th1, Th2, Th17 ili regulatorne T limfocite (Treg). Šta više, DC snabdijevaju i B limfocite antigenima, a mogu i lokalno aktivirati stečeni imuni odgovor u limfnom tkivu Pejerovih ploča[29].

Th1 ćelije primarno luče citokine kao što su interferon (IFN) gama i faktor tumorske nekroze alfa (TNF alfa). One se preko T receptora vežu za DC ili makrofage, oslobađajući limfokine da bi privukle druge ćelije. Ovaj process dovodi do ćelijski-posredovanog imuniteta i zapaljenja. Th1 ćelijama za diferencijaciju je potreban T-bet kao transkriptivni faktor, dok je za diferencijaciju Th2 limfocita ključni regulator GATA-3.

Th2 primarno luče IL4, IL 5, IL13 IL25. Th2 međudejstvuje sa B-limfocitima, dovodeći do razvoja antitijelima posredovanog imuniteta. B limfociti se pomoću B receptora inicijalno vežu za topive antigene. Kao antigen prezentujuće ćelije, B limfociti endocitozom progutaju antigen i probave ga i na svojoj površini prikažu fragmente, na koje se preko T receptora vežu Th2 ćelije i počinju da proizvode limfokine. Ova sekrecija limfokina (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 i IL-10) od strane Th2 ćelija podstiče sazrijevanje B limfocita u plazma ćelije koje proizvode topive forme B-ćelijskih receptora tj. specifična antitijela usmjerenih protiv antigena [29]. Ravnoteža odnosa Th1/Th2 ćelija je veoma važna, jer od nje zavisi na koji način će imuni sistem reagovati na antigene na koje bude naišao. U slučaju da je više Th1, sposobnost za ubijanje od strane makrofaga i proliferacija CD8⁺ T-limfocita će biti maksimalna. Suprotno, ukoliko je više Th2

ćelija u većem stepenu se ispoljava humoralni imunitet. Ustanovljen je slijedeći postulat: povećanje broja Th1 limfocita povećava mogućnost razvoja autoimunih bolesti, a povećanje broja Th2 može izazvati astmu [44].

Za diferencijaciju Th17 ćelija je kao transkriptorni faktor potreban ROR γ . Th17 se vežu za DC, luče defenzin i privlače ćelije zadužene za eliminaciju preko ćelijski posredovanog imuniteta i zapaljenja. Upravo ove T ćelije mogu imati glavnu ulogu u zapaljenjskim bolestima. T reg limfocite dijelimo u Treg1 i CD4+CD25+ Treg ćelije. Ispoljavaju imunosupresivno dejstvo i nepohodne su za razvoj periferne tolerancije na vlastite i strane antigene.

Sekretorne imunoglobuline A (sIgA) stvaraju plazma ćelije koje se nalaze u subepitelnom sloju mukoznih žljezda i membrana. Otporni su na uobičajene proteaze iz crijeva. Obzirom da ne aktiviraju komplement, ne podstiču upalnu reakciju. Osim toga sIgA štite sluznicu tako što: inhibišu adherenciju patogena, neutrališu viruse, enzime, toksine, isključuju imunološki odgovor tako što odstranjuju antigen i sprečavaju prejak imunološki odgovor. Sekretorni imunoglobulini se prenose kroz epitelne ćelije crijeva i izlučuju zahvaljujući polimernim imunoglobulinskim receptorima (pIgR). Površina epitela je zaštićena mukusnim slojem, a sIgA se nalaze zajedno sa komezalima u vanjskom mukusnom sloju. U istraživanju na miševima sa genetskim deficitom pIgR i/ili mucin-2, ustanovljeno je da je za eliminaciju crijevnih bakterija iz unutrašnjeg sloja mukusa neophodno postojanje Muc 2 a ne sIgA [37]. Njihova istraživanja podupiru tvrdnju da sIgA usidrena u vanjskom sloju mukusa zahvaljujući interakciji sa mucinskim proteinima i crijevnim bakterijama, obezbjeđuju imunu zaštitu od patogena zadržavajući obostrano koristan odnos sa komezalima.

CD 8+ T limfociti, za razliku od CD4+, su citoksični i luče supstance koje uništavaju ćelije za koje su vezani. U ovu grupu spadaju intraepitelni limfociti crijevne sluznice. Nakon aktivacije luče interleukin 2 (IL-2), interferon (IFN) γ i faktor tumorske nekroze alfa (TNF α) te ispoljavaju citotoksične efekte. TNF α se ubraja u glavne citokine uključene u akutnu fazu inflamacije [46]. Pored epitelnih ćelija, glavni izvor TNF α u crijevnoj mukozi su makrofagi lamine proprije te Panetove ćelije i Th1-limfociti. TNF receptori se nalaze na velikom broju stromalnih, hematopoetskih i epitelnih ćelija [47]. TNF α učestvuje u regrutovanju neutrofila povećavanjem ekspresije adhezina na površini ćelija endotela i potpomaže biocidnu aktivnost makrofaga [46].

Odbrambeni mehanizmi koji ograničavaju prolazak mikroorganizma u crijevno tkivo istovremeno služe i kao mehanizmi tolerancije [48]. Aktivacija PRR na jedinstvenoj populaciji makrofaga i DC u lamini proprijri crijeva ne dovodi do lučenja proinflammatoryh citokina, suprotno sa sličnom aktivnosti u ćelijama urođenog imuniteta. Smatra se da sposobnost razlikovanja komenzalnih i patogenih bakterija može bitiposljedica kontinuirane izloženosti sluznica komenzalima.

Normalni domaćini, otporni na upale, kontrolišu ulazak antigena iz lumena crijeva preko mikrofoid (M) ćelija epitela što podstiče regulisani imunološki odgovor. Nakon prolaska kroz ove ćelije antigeni se prosljede unutar Pejerovih ploča do DC koje ih zatim razgrade i prikažu. Aktivacijom Th 0, pomoćničke T-ćelije diferentuju se u regulatorne T ćelija subpopulacija Th3 i Treg 1, kojeluče prvenstveno transformišući faktor rasta beta (TGF- β) i IL-10[49]. Ovi imunosupresivni citokini inhibišuaktivnost makrofaga i Th1 ćelija, čime se sprečava izlučivanje IL-12 i interferona γ (IFN γ) te tako suprimiraju patološki imunološki odgovor na komenzale i antigene iz hrane.

Signalni put koji se odvija preko TLR receptora se razlikuje u zavisnosti od vrste ćelije te ispoljava različite funkcije. Aktiviranje TLR na makrofazima ima za posljedicu indukciju zapaljenja, a aktiviranje TLR intrinzičkog signalnog puta na B limfocitima ima za posljedicu razvoj tolerancije[50]. Poremećaj oralne tolerancije može doprinijeti razvoju imunološki posredovanih bolesti kao što su inflamatorna bolest crijeva, reumatoidni artritis i ankilozirajući spondilitis [51].

1.3 Metabolička aktivnost crijevne flore

Presistemska metabolička aktivnost koja obuhvata metaboličku aktivnost enterocita i crijevne flore, se u novije vrijeme, prepoznaje kao važan faktor u metabolizmu lijekova[52, 53]. Uočeno je da enterociti, kao i hepatociti, ispoljavaju aktivnost citohroma P 450 (CYP P 450), posebno izoenzimima CYP 3A4 i CYP 2C kao i enzime odgovorne za fazu II metabolizma kao što su UDP-glukoziltransferaze (UGT) i sulfotransferaze [54]. Uprkos metaboličkoj aktivnosti CYP enzima u tankom crijevu, smatra se da je njihov doprinos sistemskom metabolizmu veoma nizak ili gotovo beznačajan u odnosu na onaj u jetri. S druge strane, aktivnost enzima faze II koji su odgovorni za konjugaciju, posebno sulfotransferaze, pokazuju za oko 250-300% veću aktivnost u jejunum nego u jetri [54].

Apsorpcija i metabolizam lijekova putem crijevnog zida se razlikuju od mehanizama uključenih u jetreni metabolizam, jer ne dolazi do vezivanja za bjelančevine i mnogi lijekovi trebaju ući u enterocite prije nego što uopšte podlegnu metabolizmu. Oni su uglavnom supstrat za CYP 3A4 što može dovesti do značajnog metabolizma prvog prolaska[55].

Drugi faktor koji utiče na metabolizam lijekova u enterocitima je topivost supstance. Liposolubilni lijekovi se brzo apsorbiraju u crijevima i podliježu daljem metabolizmu, a hidrosolubilne supstance obično zahtijevaju aktivni transport putem prenosioca koji ograničava stepen njihove apsorpcije. Na smanjenje sistemske apsorpcije utiče i metabolizma samog crijevnog zida, koji je vezan za potencijal izlučivanja metabolita nazad u crijevni lumen[54].

Porodica proteina odgovornih za multiplu rezistenciju na lijekove (MDR) je jako ispoljena na apikalnim krajevima enterocita. Dovode do smanjenja sistemske apsorpcije supstanci i njihovog metabolizma tako što izlučuje apsorbirane molekule nazad u crijevni lumen[56]. Najprisutniji MDR transporter je P-glikoprotein (P-gp), a upravo je veliki broj lijekova njegov supstrat [57]. Ovi transportni proteini funkcioniraju tako da izbacuju iz ćelije upravo apsorbirana jedinjenja, smanjujući na taj način njihovu sistemsku bioraspoloživost. Dokazano je da su neki lijekovi supstrat za ove enzime, dok drugi lijekovi inhibiraju ili indukuju aktivnost P-glikoproteina [58]. Time se dodatno komplikuje potencijal za interakcije lijekova i toksičnost posebno ako se supstrat za P-gp daje zajedno sa inhibitorom aktivnosti P-gp.

Raznolikost i broj bakterija je karakterističan za pojedine dijelove crijeva, pri čemu je najveći broj bakterija prisutan u silaznom dijelu kolona[59]. Uprkos velikoj raznolikosti bakterija u probavnom traktu, metabolički procesi su najvećim dijelom vezani za redukciju i hidrolizu, sa malom frakcijom odgovornom za cijepanje, razgradnju i reakcije povezivanja.

Redukcija je najčešći oblik metaboličke reakcije posredovane bakterijskim enzimima obzirom da je najveći broj bakterija u probavnom traktu anaerobno ili fakultativno anaerobno (kao npr. *Escherichia* i *streptococci*) [60]. Iako je u tankom crijevu broj bakterija niži i tranzitno vrijeme kraće, ipak, ogromno područje i velika apsorpcija lijekova iz tog dijela probavnog trakta, ga čini veoma značajnim mjestom u metabolizmu posredovanom putem crijevne flore[61]. S obzirom da je kolon dio crijeva sa najbrojnjom florom, danas se upravo on smatra mjestom gdje se odvija najviše metaboličkih reakcija [62].

Jedna od uobičajenih reakcija redukcija jeste azo redukcija jedinjenja koja sadrže azo veze, do uglavnom neaktivnih primarnih amina. Najistraživaniji su bili prontosil i sulfasalazin

kao i njihovi strukturni derivati [63, 64]. Azoreduktaza je enzim neophodan za aktiviranje nekih lijekova, npr. sulfasalazina. Sulfasalazin (SSZ) se smatra “prenosiocem” svojih metabolita, sulfapiridina (SP) i 5-aminosalicilne kiseline (5-ASA), do kolona. I intaktni SSZ djeluje kao aktivna supstanca, mada su glavni nosioci antinflatatorne aktivnosti SP i 5-ASA. Oni su vezani azo vezom koja se cijepa pod uticajem azoreduktaze. U ispitivanju provedenom na humanim uzorcima je ustanovljeno da su anaerobne bakterije, posebno iz grupe klostridija, odgovorne za produkciju crijevne azoreduktaze [65].

I nitro-grupe su uobičajeno mjesto redukcije posredovane bakterijskim enzimima, što takođe ima za posljedicu nastanak metabolita, uglavnom u formi neaktivnih primarnih amina. Ovakva izmjena je uočena kod nitrazepama, klonazepama i misonidazola [66, 67, 68]. U nekim slučajevima metabolička konverzija dovodi do nastanka aktivnih metabolita koji se mogu dalje apsorbovati i ispoljavati sistemske efekte ili djelovati lokalno u crijevima.

Redukcija sumpornih jedinjenja je takođe uobičajena u bakterijskom metabolizmu. Primjeri sumpor sadržujućih jedinjenja za koje je dokazan nastanak sulfitinih metabolita su omeprazol, sulindak i sulfinpirazon. Neke od tih studija provedene su samo na životinjama ali ne i na ljudima pa je moguće postojanje određenih razlika u metaboličkom profilu [59].

I hidroliza je veoma uobičajena metabolička reakcija katalizovana enzimima crijevnih mikroorganizama. Sorivudin je antivirusni lijek zbog čije hidrolize dolazi do ispoljavanja značajane toksičnosti [70]. Drugi primjer značaja hidrolize je laktuloza, čija aktivacija i dejstvo zavisi od hidrolize posredovane bakterijskim enzimima [71].

Osim toga postoji mnogo drugih reakcija katalizovanih crijevnim bakterijama kao što su uklanjanje sukcinatne grupe, dehidroksilacija, proteoliza, dekonjugacija i nastanka glukuronida i sulfata kao i N-demetilacija [69, 72, 73, 74, 75, 76, 77].

Dakle metabolička aktivnost crijevne flore, posebno onaj dio koji se odnosi na metabolizam stranih supstanci, može ispoljiti i pozitivne i negativne efekte po zdravlje domaćina [62]. Upravo su metaboličke reakcije odgovorne za proizvodnju toksičnih, karcinogenih ili mutagenih metabolita iz supstanci unesenih putem hrane ili onih koje nastaju endogeno. S druge strane, metaboličke reakcije crijevne flore su odgovorne i za detoksifikaciju prehrambenih toksikanata, kao i za enterohepatičku cirkulaciju lijekova, prehrambenih aditiva i steroida.

Lista najčešćih bakterijskih enzimskih reakcija koje izazivaju toksičnu izmjenu supstrata je u Tabeli 1.

Tabela 1. Bakterijski enzimi koji stvaraju toksične, genotoksične ili karcinogene produkte

Enzim	Supstrat
β-Glukozidaza	Biljni glikozidi -Rutin -Frangulozide
Nitroreduktaze	Nitro jedinjenja -Dinitrotoluene
Azoreduktaza	Azo jedinjenja -Boje bazirane na benzidinu
β-Glukuronidaza	Žučni glukuronidi -Benzopireni - amino-dimetil- imidazohinoline IQ -Benzidin
Imidazol hinolin IQ hidrataza-dehidrogenaza	IQ
Nitrat/nitrit reduktaze	Nitrati, nitriti
Dehidroksilaze žučnih kiselina	Holna i deoksiholna kiselina
Deaminaze amino kiselina	Tirozin i druge amino kiseline

Različiti su pristupi u izučavanju značaja crijevne flore kod bolesti poput inflamatorne bolesti crijeva. Jedan od njih je i proučavanje metaboličke funkcije crijevne flore [78]. Uočeni su brojni mogući mehanizmi kojima probiotici mogu postići korisne efekte djelujući na metabolizam crijevne flore: uklanjanje i razrjeđivanje broja crijevnih mikroorganizama sa visokom enzimskom aktivnošću, a koji su odgovorni za produkciju toksičnih i prokancerogenih materija, stvaranje novih uslova okoline koji mijenjaju bakterijsku aktivnost, proizvodnja potencijalno korisnih materija u crijevima kao što su antikarcinogeni flavonoidi [79].

Van de Wiel sa saradnicima je na modelu gastrointestinalnog simulatora dokazao da crijevna flora učestvuje u bioaktivaciji policikličnih aromatičnih ugljovodonika i njihovoj transformaciji do supstanci koje pokazuju estrogensku aktivnost [80]. U drugom istraživanju je uočeno postojanje razlike u farmakološkim efektima oralno unesenih tradicionalnih kineskih lijekova. Ustanovljeno je da intestinalni bakterijski metabolizam ginsenga, posebno ginsenozida Rb1 zavisi od sastava crijevne flore, posebno prisustva bakterija *Ruminococcus spp.*, *Bacteroides spp.* i *Bifidobacterium spp.* [81].

Otkriveno je da je endogena izloženost metilmerkuru (MeHG) u direktoj zavisnosti od njegove eliminacije, koja se odvija najvećim dijelom preko fecesa[62].U drugim studijama je dokazana sposobnost smrznutih crijevnih bakterija, posebno laktobacila, da vežu karcinogene iz hrane posebno aflatoksin B1 i kontaminante hrane AF2 [83, 84].Dosadašnja istraživanja su pokazala da *Bifidobacteriae* i *Lactobacillus*, koji se najčešće i koriste kao probiotici, imaju nisku proizvodnju enzima značajnih za metabolizam ksenobiotika kao što su azoreduktaza, nitroreduktaza i beta glukuronidaza, u odnosu na druge glavne anaerobe u crijevima [62].Suprotno tome pokazuju visoku aktivnost beta glukozidaze koja povećava proizvodnju flavonoidskih aglikona koji imaju genotoksične i antikarcinogene osobine.

Lactobacillus GG, koji je izolovan iz probavnog trakta zdrave osobe, djeluje tako što smanjuje aktivnost beta-glukuronidaze u ljudi [85].To ukazuje na korisne efekte ovih bakterija jer smanjuju izloženost domaćina toksičnim metabolitima nastalim u crijevima.

U istraživanju na zdravim dobrovoljkama koje su konzumirale jogurt sa *Lactobacillus GG* je uočeno smanjenje aktivnost fekalne beta glukuronidaze, nitroreduktaze i hidrolaze glikoholične kiseline, dok se aktivnost beta glukozidaze i ureaze nije značajnije mijenjala [86].Istraživanje provedeno na pacijentima oboljelim od iritabilnog kolona ili funkcionalne diajereje, a koji su tretirani samješavinom probiotika pod imenom VSL3, je pokazala povećanje aktivnosti fekalne beta galaktozidaze i smanjenje aktivnosti ureaze tokom primjene probiotika [87].

Savremeni način života podrazumijeva sve manju izloženost mikroorganizmima od ranog djetinjstva što, smatra se, povećava predispoziciju za pojavu alergija, veću podložnost infekcijama i nastanak inflamatornih oboljenja [88, 89].

1.5. Primjena probiotika

Ideja o pozitivnoj ulozi strogo odabranih bakterija datira još od početka XX vijeka. Mečinkof[30] je proučavajući humanu crijevnu floru zaključio da bi svakodnevna upotreba mliječnih proizvoda, fermentisanih uz pomoć laktičnih bakterija, mogla biti blagotvorna za ljudsko zdravlje. Nekako u isto vrijeme, i francuski pedijatar Tisijer[69] je uočio da u stolici djece sa prolivom, za razliku od zdrave djece, postoji nizak broj bakterija Y oblika tzv. “bifid” bakterija. Smatrao je da bi davanje tih bakterija, koje su poslije i nazvane bifidobakterije, doprinijelo ponovnom uspostavljanju zdrave crijevne flore u djece sa prolivom. Kako tad, tako i danas, gastrointestinalni trakt je i dalje glavno polje za istraživanja probiotika.

Najčešće korišteni probiotici uključuju određene tipove streptokoka, laktobacila i bifidobakterija, ali i neke druge nepatogene bacile kao što su *E coli* Nissle 1917 i gljivice poput *Saccharomyces boulardii*. Definišemo ih kroz 3 nivoa: rod, vrstu i soj, a karakterizacija svakog specifičnog probiotika zavisi od sva tri nivoa. Terapijska korist jednog soja, ne mora automatski da znači proširivanje korisnog efekta i na druge sojeve, te se svaki soj mora ispitivati odvojeno[90]. Iz tog razloga je identifikacija tačnog soja koji ima korisno djelovanje od posebne važnosti.

Da bi bili uspješni, probiotici trebaju imati sljedeće osobine:

- organizmi moraju biti u potpunosti identifikovani: rod, vrsta i soj,
- moraju biti sigurni za upotrebu: ne smiju biti toksični ili patogeni, niti smiju biti nosioci gena odgovornog za bakterijsku rezistenciju
- moraju biti sposobni preživjeti u crijevima, biti otporni na dejstvo želučne kiseline i dejstvo žučnih kiselina, te moći bar za kratko sposobnost da se adheriraju, umnože i održe u crijevima,
- moraju ostati vijabilne za vrijeme proizvodnje, skladištenja i korištenja,
- moraju imati dokazane korisne efekte po domaćina: proizvodnja antimikrobnih supstanci i antagonizam prema patogenim bakterijama te imati provedenu barem jednu kliničku studiju faze 2 sa dokumentovanim korisnim efektima[91].

Precizni mehanizmi dejstva probiotika još nisu u potpunosti razjašnjeni. Potencijalni mehanizmi (Slika 1.) uključuju:

- inhibiciju adhezije i rasta potencijalnih patogena (takmičenje za hranu i adheziona mjesta, produkcija antimikrobnih supstanci-defenzin, zakiseljavanje sredine produktima fermentacije hrane, uklanjanje gas produkujućih bakterija odgovornih za dekonjugaciju žučnih soli),
- poboljšanje barijerne funkcije crijevnog mukoznog i rezistencija kolonizacije (normalizacija crijevnog permeabilnosti, pojačanje produkcije mucina, poboljšanje mukozne regeneracije),
- poboljšanje lokalnog mukoznog i sistemskog imunog odgovora (stimulacija ili pojačanje produkcije sIgA, aktivnosti ćelija prirodnih ubica –NK, fagocitne aktivnosti leukocita,

proliferativne aktivnosti T i B ćelija, proizvodnje citokina, modulacija aktivnosti crijevnog proton zavisnog prenosioca (PepT1)[6, 93].



Slika 1. Shematski prikaz potencijalnog dejstva probiotika

Sve je više podataka da se pozitivni efekti probiotika ostvaruju čak i ukoliko probiotska bakterija nije živa, odnosno da su za pozitivne efekte probiotika dovoljni i integralni dijelovi bakterijske ćelije poput peptidoglikanskih fragmenata ili DNK [94].

Najviše korišteni probiotici su *Lactobacillus plantarum* 299v, *L. rhamnosus* LGG, *L. reuteri*, *L. acidophilus*, *L. casei* i *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, ili *Bifidobacterium brevis*[95]. Bakterije oba roda su prirodni stanovnici zdrave crijeвне flore čovjeka i relativno rijetko su uzročnici infekcija, te spadaju u grupu organizama koji se smatraju bezbjednim. Smatraju se glavnim mikrororganizmima odgovornim za održavanje balansa unutar zdrave crijeвне flore.

Rod *Lactobacillus*-a je izrazito heterogen. Laktobacili spadaju u grupu mliječno-kiselinskih bakterija, koju čini raznolika grupa Gram-pozitivnih bakterija, koje uglavnom ne stvaraju spore, većinom su katalaza-negativne, lišene citohroma, fakultativne anaerobe, otporne na dejstvo kiseline, a odgovorne za nastanak mliječne kiseline kao glavnog krajnjeg proizvoda fermentacije ugljikohidrata [96]. Zbog svoje probirljivosti bakterije mliječne kiseline zahtijevaju bogatu okolinu za rast, kao što su na primjer gastrointestinalni trakt ili vagina sisara. Laktobacili

za rast zahtjevaju prisustvo amino-kiselina, peptida, derivata nukleinskih kiselina, vitamina, soli, estara masnih kiselina. Imaju veoma ograničene sposobnosti korištenja složenih polisaharida. Pretpostavlja se da potrebnu energiju za rast i razmnožavanje obezbjeđuju korištenjem prebiotskih oligosaharida, iz tog razloga danas se često kombinuju probiotici i prebiotici.

Bifidobakterije su simbionti od posebnog značaja za ljudski organizam. Ove bakterije su među prvima koje naseljavaju probavni trakt svih novorođenih sisara. Iako posjeduju neke fenotipske karakteristike zajedničke za bakterije mliječne kiseline, rod *Bifidobacterium* spada u aktinomicete. Bifidobakterije su Gram pozitivne, anaerobne, nepokretne bakterije koje ne prave spore, ne produkuju gas, katalaza su negativne. U debelom crijevu razlažu ugljene hidrate i stvaraju umjereno kiselu sredinu koja suprimira rast bakterija i drugih patogenih mikroorganizama [97]. Utiču i na metabolizam masnih kiselina, žučnih kiselina, holesterola i steroidnih hormona u probavnom traktu. Stvaraju veliki broj vitamina, uključujući vitamine B grupe kao i vitamin K. Pored toga, masne kiseline kratkih lanaca koje stvaraju bifidobakterije iz ugljenih hidrata su primarni izvor energije za epitelne ćelije debelog crijeva. Proizvode bakteriocin i supstance slične antibiotiku. Rod *Bifidobacterium* sadrži više od 30 vrsta od čega je najmanje 11 izolovano kod čovjeka. Najčešće izolovani sojevi u dojenčadi su *B. bifidum*, *B. breve*, and *B. longum* [98].

Za potrebe proizvodnje izdvajaju se posebni sojevi rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacteria* sa probiotskim osobinama. Broj vijabilnih, bakterija u sastavu probiotika treba preći barem 10^6 mikroorganizama po gramu sadržaja [99]. Danas se smatra da se, radi ostvarenja odgovarajućeg terapijskog i profilaktičkog djelovanja, probiotici moraju konzumirati u opsegu od 10^8 do 10^{12} CFU dnevno, zavisno od soja, i tokom dužeg vremenskog perioda [6].

Stalni rast tržišta i povećanje potrošnje proizvoda koji sadrže žive probiotičke bakterije, izaziva polemike o mogućem zdravstvenom riziku po potrošače. Teoretski, obzirom da su u pitanju žive bakterije, njihova primjena ne može se smatrati potpuno bezbjednom. Probiotičke bakterije mogu biti odgovorne za četiri tipa neželjenih dejstava kao što su infekcija, pretjerana metabolička aktivnost, pretjerana imuna stimulacija i transfer gena [100].

Većina laktobacila u probiotičkim preparatima nije autohtona u probavnom traktu čovjeka što onemogućava njihovo duže zadržavanje u probavnom traktu nakon prestanka primjene [92]. Ova pojava je značajna u kontroli njihovog broja i sprečava moguće invazivno djelovanje kod

imunokompromitovanih osoba. Iako se probiotici konzumiraju u formi hrane ili dodataka hrani, koliko znamo već više od 100 godina, i to sa dobrim sigurnosnim profilom, najveću zabrinutost oko probiotske primjene imamo kod pacijenata koji boluju od teških bolesti.

Mnoge vrste iz rodova koji se koriste kao probiotici, uključujući i laktobacile, su prisutni u kliničkim izolatima iz inficiranih rana, iz krvi kod sistemskih infekcija i tkiva srca kod endokarditisa [101]. U ispitivanju provedenom u Finskoj sa *Lactobacillus rhamnosus* GG, koji se kao probiotik u ovoj zemlji koristi veoma široko još od 1990. godine, je utvrđeno da ovaj probiotik nije doveo do povećanja broja bakterijemija izazvane laktobacilusom [102].

Trenutno se na nizu različitih životinjskih modela, kao što su modeli endokarditisa, kolitisa, oštećenja jetre i imunodeficijencije, ispituje bezbjednost primjene probiotika kod imunokompromitovanih osoba. Dodatno se nalaže testiranje osjetljivost na antibiotike, prisustvo mobilnih genetičkih elemenata koji nose rezistenciju na antibiotike, eventualno toksično delovanje kao i osjetljivost na antimikrobne mehanizme domaćina [103].

Bifidobakterije se, uz laktobacile, takođe smatraju veoma sigurnim za primjenu, jer do sad nije prijavljena niti jedna infekcija izazvana ovim probiotskim bakterijama. Pri istovremenoj primjeni sa laktobacilusom ispoljavaju značajno sinergističko dejstvo. Probiotske bifidobakterije do sada nisu pokazale nikakvu štetnu enzimsku aktivnost niti neželjenu imunomodulaciju [104]. Radi potvrde sigurnosti upotrebe i podnošljivost bifidobakterija, provedeno je nekoliko dugotrajnih intervencijskih studija kod djece i nedonoščadi [105, 106, 107, 6] koje su potvrdile njihovu bezbjednost i dobru podnošljivost.

S obzirom da tretman probioticima ima za cilj da povрати ili održi ravnotežu u sastavu crijevne mikroflore, i time očuva homeostazu na nivou crijevne mukoze i očekivano je da su istraživanja na ovom polju tako brojna [108]. U posljednjih 20 godina istraživanja u području probiotika su značajno napredovala, a poseban napredak je učinjen u odabiru i karakterizaciji specifičnih probiotičkih kultura. Većina tih istraživanja ima za cilj ispitati fiziološke i funkcionalne osobine različitih probiotičkih sojeva, njihove mehanizme djelovanja, indikacije te zdravstvenu korist od njihove primjene [109].

Nekoliko studija je ukazalo na mogućnost da je jedan od mehanizama pojačanja integriteta crijevno mukozne barijere povećanje ekspresije gene odgovornih za signalni put ćvrstih veza (TJ) između ćelija crijevnog epitela. Na modelu ćelijske kulture je otkriveno da laktobacili utiču na regulaciju nekoliko gena koji kodiraju proteine odgovorne za adhezivne

međucelijske veze, kao što su katenin i β -kadherin [110].

U jednom istraživanju na zdravim dobrovoljcima koji su uzimali različite vrste probiotika je dokazano smanjenje nekih soj-specifičnih anti-inflamatornih efekata [111]. *Kuisma* i saradnici su u svom istraživanju ustanovili da je dodavanje *Lactobacillus rhamnosus* GG povećalo broj fekalnih laktobacila u odnosu na ukupne fekalne anaerobe mada nisu dokazali tačno terapijsko mjesto i doziranje u terapiji crijevnih džepova [112]. Dokazano je da *Lactobacillus rhamnosus* GG može da se *in vivo* adherira na mukozu debelog crijeva i da, iako je je to privremeno, ostaje na mukozu i nakon više od nedjelju dana od prestanka primjene probiotika [113].

Suplementacija probioticima ispitivana na zdravim dobrovoljcima je pokazala da određeni probiotski sojevi mogu poboljšati nespecifični imuni odgovor, ali je uticaj na adaptivni ćelijski i humoralni imuni odgovor zanemarljiv [91]. I drugi istraživači su ustanovili da unos laktobacila pojačava neimunološke odbrambene barijere domaćina, tako što pojačava lučenje defenzina, što se vidjelo na *in vitro* modelu, kao i produkcijumucina *in vivo* kod životinja [114, 115].

Imunološki efekti laktobacila povezuju se sa indukcijom sinteze brojnih citokina kao što su IL-10 (*interleukin-10*), IL-1 β , IFN γ (*interferon γ*), IL-6, IL-8; sa povećanjem fagocitne aktivnosti perifernih polimorfonukleara i mononukleara, sa povećanjem aktivnosti NK ćelija i sa povećanjem lučenja sIgA. Svi opisani mehanizmi dovode do jačanja nespecifičnih sistema odbrane bez posljedične aktivacije adaptivnog imunog odgovora. *Bibiloni* i saradnici su ustanovili da je, kod pacijenata sa blagim do umjereno teškim oblikom ulceroznog kolitisa koji nisu odgovarali na konvencionalnu terapiju, dodatak VSL3 probiotika doveo do remisije bolesti kod 77% oboljelih [116].

Prirodni stanovnici gastrointestinalne flore, posebno laktobacili, imaju sposobnost hidrolize konjugovanih žučnih kiselina koje su prisutne u velikim količinama u crijevima. Konjugovane žučne kiseline mnogo bolje omogućavaju emulzifikaciju, digestiju i apsorpciju lipida nego nekonjugovani oblici. Osim toga većina ksenobotika upravo se metaboliše i izlučuje putem žuči, a oni koji se ne apsorbuju podložni su dekonjugaciji od strane mikroorganizama. Ovaj ključni proces poznat je kao enterohepatični recirkulacija. Primjena antibiotika može da redukuje broj bakterija te da redukuje enterohepatičku recirkulaciju, dovodeći do redukcije koncentracije lijekova [52].

Ispitivanja sa *B. lactis* BB12 su pokazala da je preživljavanje pri prolasku kroz crijeva dozno zavisno [117]. Potvrda prisustva probiotika u fekalnom sadržaju pri oralnoj primjeni je

standardna metoda koja pokazuje njihovo preživljavanje u crijevima [118]. Međutim, potvrda prisustva ne mora da znači da su te bakterije i sposobne da se adheriraju za crijevni mukus. Do sad je dokazano isključivo prolazno naseljavanje probiotičkih bakterija u probavnom traktu, tako da nakon prestanka primjene probiotika, njihov broj rapidno pada [119] što bi i bilo u skladu sa novim kriterijumima o karakteristikama probiotika [120].

Posljednjih godina se intenzivno istražuje dejstvo probiotika u prevenciji i liječenju zaraznih bolesti i alergija u dječijoj dobi. Dokazano je, posebno u dječijoj dobi, da je *L. rhamnosus GG* efikasan u liječenju proliva, u prevenciji proliva izazvanih primjenom antibiotika i da je efikasna u modulaciji imunog odgovora [121].

Osim toga kombinacija *L. rhamnosus GG* i *B. lactis BB12* se pokazala uspješnom u prevenciji i liječenju atopijskog ekcema izazvanog alergijom na kravljje mlijeko [122]. U prvoj pedijatrijskoj randomizovanoj, placebo kontrolisanoj studiji kod oboljelih od ulceroznog kolitisa, došlo se do zapažanja da je primjena mješavine probiotika VSL 3, efikasna i sigurna te da je dokazna uloga probiotika u održavanju remisije [123].

Probiotici mogu poboljšati odbrambeni sistem domaćina pripremom i kondicioniranjem imunog odgovora sluznice [124]. Permeabilnost crijevne barijere se mijenja kod netolerancije pojedinih vrsta hrane, npr. celijakije ili enteropatije izazvane NSAIL kao i raznim inflamatornim oboljenjima uključujući i inflamatornu bolest crijeva [125]. Na nekoliko eksperimentalnih modela je pokazano da probioticima mogu da spriječe promjenu u ćelijskoj propusnosti, vjerovatno putem adhezije bakterija na crijevnu mukozu [126-128].

U ispitivanju sa *Lactobacillus acidophilus* NCFM je uočeno suprimirajuće dejstvo na imuni sistem. Ova bakterija se može vezati na površinski protein dendritičnih ćelija domaćina, što za posljedicu ima pojačnu produkciju antinflatarnog IL-10 [129]. Dokazano je da *Lactobacillus rhamnosus GG* i *Lactobacillus acidophilus* soj *LB* štite epitelne ćvrste veze od labavljenja tokom nekog vanjskog stresa [130,131]. Dokazano je i da mješavina sojeva *Lactobacillus reuteri* može dosegnuti epitel i prevenirati zapaljenje i translokaciju bakterija na modelu eksperimentalnog kolitisa izazvanog DSS (*Dextran Sulphate Sodium*), zahvaljujući jačanju ćvrstih veza ili pojačanom ekspresijom membrana vezujućih mucina (MUC3) [93].

Probiotici se osim toga vežu i za crijevni mukus, sprječavajući druge mucin-degradirajuće bakterije da se vežu za crijevni zid [132-134]. Probiotici djeluju na imuni odgovor djelujući direktno na imuni sistem, posebno na nastanak IgA [119] a i učestvuju u modulaciji medijatora

zapaljenja crijevnog epitela [135].

1.6.Inflamatorna bolest crijeva

Inflamatorna bolest crijeva (IBD) je autoimuno oboljenje koje se manifestuje kao ulcerozni kolitis ili Kronova bolest. Predstavljaju bolesti modernog društva i njihova frekvencija u razvijenim dijelovima svijeta raste još od sredine 20-ih godina prošlog vijeka. U opštoj populaciji, incidenca i prevalenca ulceroznog kolitisa su veće od incidence i prevalence Kronove bolesti, dok je u pedijatrijskoj populaciji prevalenca ulceroznog kolitisa manja od Kronove bolesti. Najveća pojavnost bolesti je uočena među stanovništvom sjeverne Evrope, a među narodima kontinentalne Azije je najniža.

Smatra se da je zapadnjački način života karakterisan sa pušenjem, ishranom bogatom mastima i šećerom, velikom upotrebom lijekova, stresom i visokim socioekonomskim statusom, visoko povezan sa pojavom inflamatorne bolesti crijeva. IBD je pokazao i određenu vezu sa apendektomijom. Uklanjanje zapaljenog crvuljka u ranoj životnoj dobi je udruženo sa smanjenjem incidence ulceroznog kolitisa, ali sa povećanjem incidence Kronove bolesti[136].

Nova istraživanja imunološke, mikrobiološke i genetičke osnove obe forme IBD podupiru trenutno važeći model bolesti koji kaže da IBD predstavlja oboljenje koje nastaje zbog poremećenog odgovora mukoznog imunog sistema na antigene crijevnih komenzala kod genetski osjetljivih osoba [7].U potpunosti je jasno da genetsku osnovu bolesti čine faktori od kojih zavisi komponente urođenog i stečenog imuniteta, kao i regulacija funkcije crijevno-epitelne barijere i sastav normalne crijevne flore. Na stanje genetske osjetljivosti za razvoj IBD utiču i već pomenuti faktori okoline, ali je i dalje ostala nepoznanica koji to okidač pokreće bolest.Uglavnom, jednom započeto oboljenje završi kao hronično oboljenje koje se karakteriše pretjeranim imunim odgovorom stečenog imuniteta. Taj pretjerani odgovor se manifestuje produkcijom agresivnih T i B limfocita. T ćelije koje su odgovorne za inflamaciju u IBD su već polarizovane pod uticajem različitih faktora urođenog imunog sistema, za lučenje određenih citokina, a B ćelije proizvodnjom IgA, IgM i IgG antitijela dovode organizam u stanje hronične inflamacije[137].

U novije vrijeme, poremećaji gastrointestinalnog trakta su direktno povezani sa početkom i razvojem raznih autoimunih bolesti; tu se posebno misli na poremećaj crijevnog motiliteta i pretjerano bujanje mikroorganizama (posebno fermentacijskih bakterija i gljivica zbog nešto kiselijeg sadržaja crijeva) [138].Pretpostavlja se da takvo bujanje remeti fiziološke i biohemijske

procesu i pogoršava zapaljenje udruženo sa autoimunošću. Ovo je takođe povezano i sa pojavom dugotrajnih komplikacija, te lošijom prognozom bolesti, slabijim terapijskim odgovorom i pogoršanjem kvaliteta života.

Smatra se da gubitak tolerancije prema vlastitom tkivu od strane imunog sistema može biti izazvan brojnim faktorima uključujući infekciju, pretjeranu aktivnost DC izazvanih crijevnim mikrororganizmima, neadekvatnom regulatornom funkcijom T i B limfocita ili genetskim faktorima. Savremena klinička i naučna istraživanja sugerišu, osim T limfocita, veliki značaj i B limfocita u razvoju i progresiji različitih autoimunih bolesti[139].

Dokazano je da i u dijabetesu, antitijela napadaju beta ćelije izazivajući zapaljenje i destrukciju pankresa [140].I u reumatoidnom artritisu antitijela reaguju sa gama globulinima formirajući komplekse koji služe kao okidači zapaljenja [141].

Imuni sistem crijeva normalno toleriše komenzalne mikroorganizme, pa je jedan od važećih postulata u etiologiji IBD, da je gubitak tolerancije, ključni momenat za početak bolesti. Istraživanja na životinjskim modelima IBD pokazuju gubitak tolerancije [142] ali potvrde istog događaja na humanom modelu u slučaju Kronove bolesti su vrlo ograničena ili ako je u pitanju ulcerozni kolitis, nisu ni ustanovljene.

Odgovor na pitanje šta to čini normalnu crijevnu floru, i kako izgleda sastav crijevne flore kod oboljelih od IBD ćemo dobiti tek završetkom projekta humanog mikrobioma [143].Koncenzusom je potvrđeno da je gustina crijevnih bakterija veća kod oboljelih od IBD nego kod zdravih osoba, ali nije ustanovljeno da li je takva promjena odgovorna za pojavu bolesti [144].Činjenica da antibiotska terapija ne donosi nikakvu korist kod oboljelih od ulceroznog kolitisa govori protiv toga da bakterije imaju važnu ulogu u ovoj bolesti. S druge strane, kod Kronove bolesti imamo pojavu pozitivnih efekata nakon primjene antibiotika [145].

Poremećaj u funkciji intestinalne barijere je jedna od karakteristika IBD. On može da zahvati različite nivoe zaštitnih mehanizama kao što su npr. poremećaj funkcije PRR, poremećaj u proizvodnji AMP, oštećenje mukusnog sloja, poremećaj procesa autofagije ili povećana intestinalna propustljivost, što za posljedicu ima invaziju patogena. Nastali kontakt bakterija sa epitelom i mukoznim imunim sistemom, dovodi do snažne aktivacije imunog sistema koja u konačnici izaziva hronično crijevno zapaljenje[136].

Za Kronovu bolest je tipična hipertrofija peharastih ćelija i povećanje debljinemukusnog sloja. Uočeno je i povećanje intestinalne propustljivosti, za kojuse pretpostavlja da je, kod

aktivne bolesti, izazvano povećanim lučenjem $\text{TNF}\alpha$ i $\text{IFN}\gamma$ koji su inače odgovorni za apoptozu epitelnih ćelija [146]. U zdravom tkivu, cjelovitost epitela održavaju adhezivne i pukotinaste međućelijske veze. Ove veze, u uslovima inflamacije, proinflammatorni citokini $\text{TNF}\alpha$ i $\text{IFN}\gamma$ čine propustljivim usljed smanjenja ekspresije proteina pukotinastih veza [147] što je uočeno kod obe forme IBD.

Pojačana epitelna propustljivost je uočena i kod srodnika oboljelih od Kronove bolesti što ovaj faktor dovodi u vezu sa ranom fazom oboljenja. Dokazana je i translokacija bakterija što se može povezati sa povećanom propustljivošću barijere, ali i pripisati defektu u obradi i prezentaciji bakterijskih antigena, odnosno smanjenom funkcionalnošću mijeloidnih ćelija koje učestvuju u njihovom uklanjanju [35].

Za razliku od Kronove bolesti, kod ulceroznog kolitisa je pronađeno smanjenje broja peharastih ćelija i smanjenje proizvodnje mucina 2 (MUC2) te smanjenje debljine mukusnog sloja. U ulceroznom kolitisu nije zapaženo povećanje propustljivosti crijevno-mukozne barijere niti translokacija luminalnih mikroorganizama, što je jedna od značajnih razlika u odnosu na Kronovu bolest. Takođe je primjećeno da, za razliku od Kronove bolesti gdje postoji transmuralna inflamacija, kod ulceroznog kolitisa zapaljenje ne prodire dublje od submukoze [146]. Smatra se da je početna promjena, koja započinje oboljenje, atipična aktivacija Th2 limfocita pri čemu u kolonu nastaju netipične T ćelije ubice.

Aktivirani Th2 limfociti počinju da luče značajne količine proinflammatornog interleukina IL 13 [148] koji je medijator u procesu epitelne citoksičnosti, apoptoze i disfunkciji crijevno-epitelne barijere. Osim toga kod UK su prisutni Th2 polarizovane ćelije koje proizvode interleukin-5. To čini sluznicu kolona osjetljivijom na komezale što dalje produbljuje zapaljenje. Iako je značaj poboljšavanja funkcije mukusne barijere tokom akutne faze IBD mali, tokom perioda remisije je veliki jer je značajno produžava.

Aplikacija probiotika u autoimunim bolestima je pobudila veliko interesovanje. Na životinjskom modelu dijabetes melitusa tip 1 je pokazan hipoglikemijski efekat probiotika [149]. Mogući mehanizam djelovanja uključuje i antiinflammatorne efekte probiotika koji su doveli do značajnog smanjenja napretka bolesti i komplikacija [138]. S obzirom da je u pacijenata oboljelih od IBD uočena izmjena sastava crijevne flore, zaključilo se da bi probiotici mogli biti korisni u liječenju simptoma IBD [108]. Uticaj *Bifidobacterium breve* i LGG na ekspresiju IL-17 i IL-23, koji imaju važnu ulogu u IBD, je ispitivan na 3D ko-kulturnom modelu, pri čemu su humane

intestinalne ćelije tretirane sa lipoproteinskim saharidom (LPS) u prisustvu i odsustvu bakterija. Istraživanje je pokazalo [150] da su *Bifidobacterium breve* and LGG smanjili LPS-om indukovanu ekspresiju IL-17, IL-23, NF- κ B i CD40 kao i histonsku acetilaciju te blago povećali DNK metilaciju.

Sahar i El-Bedewy su pokazali da je oralna suplementacija probiotika od pomoći u postizanju remisije i prevenciji relapse kod ulceroznog kolitisa. 8-nedeljna primjena probiotika je značajno smanjila koncentraciju IL-6, ekspresiju TNF- α i NF- κ B p65 te nakupljanje leukocita u kolonu i pokazala smanjenje aktivnosti mijeloperoksidaze (MPO) i nivoa fekalnog kalprotektina [151]. Kod pacijenata oboljelih od Kronove bolesti koji su dobijali *Lactobacillus rhamnosus* GG nije dokazano pozitivno dejstvo probiotika na postizanje i održavanje remisije [152].

Većina objavljenih istraživanja vezanih za uticaj probiotika na indukciju i održavanje remisije bolesti u ulceroznom kolitisu uglavnom nisu bila randomizovana klinička ispitivanja, provedena su sa različitim probiotskim formulacijama, uglavnom su kratko trajala i provedena su na relativno malom broju pacijenata. U tabelama 2. i 3. su navedene neke od studija koje su provedene kod oboljelih od obe forme IBD, a pratila se indukcija i održavanje remisije bolesti.

Kod većine studija (Tabela 2.) provedenih u pacijenata oboljelih od ulceroznog kolitisa je uočeno da probiotici ispoljavaju pozitivno dejstvo i na postizanje i na održavanje remisije u poređenju sa standardnom terapijom mesalazinom.

Tabela 2. Kontrolisane studije u kojima je ispitivan uticaj probiotika na postizanje i održavanje remisije u odraslih oboljelih od ulceroznog kolitisa

Studija	Dizajn studije	n	Terapijski režim	Trajanje u mjesecima	Ishod
Indukcija remisije					
[153]	randomi zovana	120	ECN 1917 1×10^{11} dnevno vs mesalazin 2.4 g dnevno (oba sa prednizonom i gentamicinom)	3	Nije uočena razlika u postizanju remisije
[154]	randomi zovana	90	VSL #39 $\times 10^{11}$ dnevno + 2.25 balsalazid dnevno vs 4.5 g balsalazid ili 2.4 g mesalazin dnevno	2	Probiotici su izazvali značajno više remisija
[155]	randomi zovana	20	100 ml dnevno probiotičkog mlijeka (BBr, BBi i LA 1×10^{10}) vs placebo	3	Značajno poboljšanje indeksa kliničke aktivnosti bolesti i histološkog skora u probiotičkoj grupi
[156]	randomi zovana	18	Simbiotik (2×10^{11} <i>Bifidobacterium longum</i> 6 g fruktooligosaharida/inulin mješavina) plus SD vs SD	1	Poboljšašan nalaz pri sigmoidoskopiji i nalaz citokina u poređenju sa placebo
Održavanje remisije					
[157]	randomi zovana	120	ECN 1917 5×10^{10} dnevno vs mesalazin 500 mg PO TID	3	Relaps bolesti 16% vs 11.3% statistički jednako
[158]	randomi zovana	21	100 ml dnevno probiotičkog mlijeka (BBr, BBi i LA 1×10^{10}) sa SD vs SD samo	12	Statistički manje relapse u probiotičkoj grupi
[159]	randomi zovana	327	ECN 1917 200 mg ($2.5 \cdot 10^9$) dnevno vs mesalazin 500 mg TID	12	Relaps bolesti 36.4 % vs 33.9 % statistički jednako
[160]	randomi zovana	187	LGG 18×10^9 dnevno vs mesalazina 2400 mg dnevno vs oboje	12	Bez razlike u obimu relapse poslije 6 ili 12 mjeseci ;LGG grupi značajno produženo vrijeme do relapsa

Još uvijek nema sigurnih podataka koji ukazuju na korisne efekte probiotika pripostizanju i/ili održavanju remisije u Kronovoj bolesti (Tabela 3.) i prevenciji relapsa nakon hirurške intervencije. Većina analiziranih studija su provedene na malom broju pacijenata što može smanjiti statističku snagu neophodnu za pokazivanje postojeće razlike, te su potrebna ispitivanja sa većim brojem ispitanika.

Tabela 3. Kontrolisane studije u kojima je ispitivan uticaj probiotika na postizanje i održavanje remisije u odraslih oboljelih od Kronove bolesti

Studija	Dizajn studije	n	Terapijski režim	Trajanje u mjesecima	Ishod
<i>Postizanje remisije</i>					
[161]	randomizovana	11	LGG 2×10^9 dnevno vs placebo (obe praćene sa kortikosteroidom i antibiotikom)	6	Nije uočeno povećanje remisije
<i>Održavanje remisije</i>					
[162]	randomizovana	28	ECNx 10^{10} dnevno vs placebo	12	Nema statistički značajne razlike
[163]	randomizovana	32	<i>Saccharomyces boulargii</i> 1g dnevno + mesalazin 1 g BID vs mesalazin 1 g TID	6	Probiotici sa mesalazinom su superiorni pri procjeni indeksa aktivnosti Kronove bolesti
<i>Prevencija relapse poslije hirurškog zahvata</i>					
[164]	randomizovana	45	LGG 12×10^9 dnevno vs placebo	12	Nema statistički značajne razlike
[165]	randomizovana	30	Simbiotik 2000 vs placebo	24	Nisu uočene razlike ni klinički ni endoskopski
[166]	randomizovana	70	<i>Lactobacillus johnsonii</i> LA1 10^{10} vs placebo	3	Nije uočena razlika u relapsu pri endoskopskom pregledu
[167]	randomizovana	98	<i>Lactobacillus johnsonii</i> LA14x 10^9 vs placebo	6	Nije uočena razlika u relapsu pri endoskopskom pregledu

2. HIPOTEZE

Osnovna pretpostavka istraživanja jeste da bi peroralna primjena probiotika koji sadrži 10^8 do 10^{10} bakterija/g *Lactobacillus rhamnosus* LG i *Bifidobacterium* BB-12 izmijenila sastav i uticala na enzimsku aktivnost crijeвне mikroflоре, te tako povećala obim razgradnje sulfasalazina u crijevima, i povećala nastanak njegovih metabolita mesalazina (5-ASA) i sulfapiridina (SP).

Iz navedenih pretpostavki su formulisane sljedeće hipoteze:

Nulta hipoteza

Kratkotrajno i dugotrajno peroralno primjenjeni probiotici ne utiču na sastav i enzimsku aktivnost crijeвне mikroflоре, te ne povećavaju obim razgradnje sulfasalazina u crijevima i ne povećavaju nastanak njegovih metabolite.

Istraživačka hipoteza

1. Kratkotrajna peroralna primjena probiotika utiče na sastav i enzimsku aktivnost crijeвне mikroflоре, te povećava obim razgradnje sulfasalazina u crijevima i povećava nastanak njegovih metabolite.
2. Dugotrajna peroralna primjena probiotika utiče na sastav i enzimsku aktivnost crijeвне mikroflоре, te povećava obim razgradnje sulfasalazina u crijevima i povećava nastanak njegovih metabolite.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Radi dokazivanja istraživačkih hipoteza formulisani su sljedeći ciljevi istraživanja:

1. Ispitati uticaj kratkotrajne peroralne primjene probiotika na sastav i enzimsku aktivnost crijeвне mikroflоре kod pacijenata oboljelih od inflamatorne bolesti crijeva, kao i uticaj na obim razgradnje sulfasalazina u crijevima i nastanak njegovih metabolita.
2. Ispitati uticaj dugotrajne peroralne primjene probiotika na sastav i enzimsku aktivnost crijeвне mikroflоре kod pacijenata oboljelih od inflamatorne bolesti crijeva, kao i uticaj na obim razgradnje sulfasalazina u crijevima i nastanak njegovih metabolita.

4. ISPITANICI I METODE

Ispitivanje na pacijentima oboljelim od inflamatorne bolesti crijeva se provelo kao monocentrična, randomizovana, otvorena, kontrolisana studija faze IV sa paralelnim grupama u trajanju od 8 nedjelja u koju je uključeno 29 novooboljelih, do tad neliječenih pacijenata. Ispitivana populacija je podijeljena u dvije grupe; grupu Sulfasalazin sa 14 ispitanika i grupu Sulfasalazin i probiotik sa 15 ispitanika. U ispitivanje je uključeno 15 osoba ženskog pola i 14 muškog pola. Ispitivanje je provedeno u Zavodu za farmakologiju i kliničku farmakologiju i u gastroenterološkoj ambulanti Univerzitetskog kliničkog centra Republike Srpske. Ispitivanje na oboljelim od inflamatorne bolesti crijeva se provodilo u periodu od aprila 2013. do januara 2014

Protokol studije je sproveden u skladu sa Helsinškom deklaracijom, kao i u skladu sa nacionalnim zahtjevima za sprovođenje kliničkih ispitivanja na ljudima. Protokol je razmotren i odobren od strane Etičkog odbora UKC Republike Srpske, a svi pacijenti su dali potpisanu saglasnost za dobrovoljno učestvovanje u studiji.

4.1. Ispitanici

Ispitanici oboljeli od inflamatorne bolesti crijeva su morali da ispune sljedeće uslove za uključivanje u ispitivanje:

- Potpisan informisani pristanak
- Dob od 18-70 godina
- Klinički indikovana donja endoskopija
- Endoskopski potvrđena inflamatorna bolest crijeva (IBD)-novotkrivena
- Patohistološki (PH) potvrđena IBD
- Ambulantni bolesnici

Kriterijumi za neuključivanje ispitanika u studiju

- Starost ispod 18 godina
- Pseudomembranozni kolitis
- Pozitivan nalaz stolice na patološke bakterije, gljivice, protozoe ili parazite
- Postojanje malignog oboljenja
- Postojanje srčane insuficijencije

- Postojanje bubrežne insuficijencije
- Postojanje insuficijencije jetre
- Ranija alergija ili nepodnošenje SSZ
- Ranija alergija ili nepodnošenje probiotika
- Ispitanici sa metaboličkom bolešću
- Trudnice, dojilje i žene u generativnom periodu koje ne primenjuju adekvatnu zaštitu od trudnoće
- Izražena anemija ($E < 2.5$ miliona $Hgb < 70$)
- Primjena sistemskih kortikosteroida duža od 10 dana u prethodna 2 mjeseca
- Sistolni pritisak veći od 160 mm Hg
- Dijastolni pritisak veći od 95 mm Hg
- Učešće u drugom kliničkom ispitivanju u prethodna 3 mjeseca.

Kriterijumi za isključivanje iz studije

- U slučaju akutne komplikacije ili potrebe za bilo kojom kliničkom intervencijom koja zahtjeva dodatnu terapiju
- Ako se razvila neželjena reakcija/događaj, koja sama po sebi uslovljava isključivanje iz studije
- Ako je došlo do nepoštovanja usvojenog plana kliničkog ispitivanja
- Na lični zahtjev
- Odlukom glavnog ispitivača

4.2.Primjenjeni lijekovi

U istraživanju su korišteni:

1. probiotik u obliku kapsula koje sadrže 10^8 do 10^{10} bakterija *Lactobacillus rhamnosus GG* i *Bifidobacterium BB 12* zaštićenog imena Normia proizvođača Jadran galenski laboratorij, Rijeka, Hrvatska.
2. sulfasalazin (SSZ) tablete od 500mg zaštićenog imena Sulfasalazin proizvođača Krka, Novo Mesto, Slovenija.

4.3. Metodologija istraživanja

Studija se sastojala od 3 faze: odabiranja, randomizacije i terapijske primjene lijeka.

Faza I-odabiranje

Ispitanici su bili osobe oba pola kod kojih je na osnovu anamneze, fizikalnog pregleda, laboratorijskih pretraga i endoskopske pretrage (kolonoskopije) potvrđena dijagnoza IBD.

Faza II-randomizacija

U fazi randomizacije, ispitanici su dijeljeni, u odnosu 1:1, u 2 grupe. Ukoliko se randomizacija odigrala u okviru od 14 dana od odabiranja, nisu ponavljane laboratorijske pretrage (uzimanje standardnih uzoraka krvi, urina i stolice).

Faza III-lijecenje

Prva grupa pacijenata (grupa A) je primala sulfasalazin 3 puta dnevno po dvije tablete od 500 mg, tokom 8 nedjelja, a druga grupa (grupa B) je primala sulfasalazin 3 puta dnevno po dvije tablete od 500 mg 8 nedjelja, i probiotik, 2 puta po 1 kapsulu (10^8 do 10^{10} /g *Lactobacillus rhamnosus* GG i *Bifidobacterium BB-12*) tokom 4 nedjelje. Terapija sa probiotikom u drugoj grupi (grupa B) je počela 2 nedjelje nakon početka terapije sulfasalazinom, trajala 2 nedjelje te se nakon toga prekinula na 2 nedjelje, da bi se potom ponovo uključila i trajala do isteka 8 nedjelja.

Pacijenti su obavješteni da tokom učešća u ispitivanju ne smiju konzumirati mliječne proizvode sa dodacima probiotičkih bakterijskih kultura.

Kontrolni pregledi ispitanika su vršeni svake dvije nedjelje, pri čemu su uzimani uzorci stolice i prikupljenog 24h urina. Uzorci mukusa zida crijeva su uzeti pri prvom endoskopskom pregledu te pri kontrolnoj endoskopiji, nakon završetka ispitivanja.

4.3.1. Analiza uzoraka stolice

4.3.1.1. Standardna mikrobiološka kultivacija crijevnih bakterija iz fekalnog sadržaja na pločama sa krvnim agarom, u aerobnim i anaerobnim uslovima i određivanje broja bakterijskih kolonija (CFU) koji će biti izražen kao log 10 CFU

Od dijela uzorka stolice (F) je priređena fekalna suspenzija sa sterilnim fiziološkim rastvorom (SF) u omjeru 1:10 (1g F+9 mL SF) te je promiješana na vortexu (30s/cycl u min oko 50% max). Suspenzija je dalje razrjeđivana sa SF do razrjeđenja od 10^{-13} . Na ploče sa krvnim agarom, u duplikatu, su zasijana razrjeđenja 10^{-9} , 10^{-11} , 10^{-13} , te su kultivisane u aerobnim i anaerobnim uslovima

na 37°C tokom 3 dana. Kao validne za brojanje uzimane su samo podloge koje su imale 30 do 300 CFU.

4.3.1.2. Spektrofotometrijsko određivanje enzimске aktivnosti crijevnih bakterija u fekalnom sadržaju: azo reduktaza, beta glukozidaza, beta glukuronidaza i nitroreduktaza se radila po metodi opisanoj u radu Goldina BR [168]

Azoreduktaza esej

Priređena je suspenzija fecesa i 0.1M kalijum fosfatnog pufera pH 7.2 u omjeru 1:10. Suspenzija je promiješana na vorteksu (30s/cycl u min oko 50% max). Reakcija je počinjala dodavanjem 0.9 ml fekalne suspenzije u 30 µl amarant rastvora (77.5 mM). Uzorci su promiješani na vorteksu i inkubirani na 37°C, u vodenom kupatilu, aerobno i anaerobno. Uzorci u količini od 0.1 ml su sakupljeni u 10., 20. i 30. minuti i reakcija je prekidana dodavanjem 0.9 ml natrium azida (1 mM). Uzorci su potom promiješani na vorteksu, centrifugirani 15000 obrtaja 3 min i određivana je UV apsorpcija supernatanta na 520 nm.

Kalibracioni standardi su priređeni pravljenjem serijskog razblaženja rastvora amaranta do koncentracije od 1.21, 2.42, 4.84, 9.68, 19.38, 38.75 i 77.5 µM. Poslije korekcije za razređivanje, aktivnost enzima je iskazana u mikromolovima amaranta razgrađenog po gramu fekalne suspenzije na sat.

Nitroreduktaza esej

Priređena je suspenzija fecesa i 0.1M kalijum fosfatnog pufera pH 7.2 u omjeru 1:10. Suspenzija je promiješana na vorteksu (30s/cycl u min oko 50% max). Reakcija je počinjala dodavanjem 0.9 ml fekalne suspenzije u 0.25 ml p-nitrobenzoiče kiseline (8.75 mM) rastvorene u dejonizovanoj HPLC vodi. Uzorci su promiješani na vorteksu i inkubirani na 37°C, u vodenom kupatilu, aerobno i anaerobno. Uzorci u količini od 0.1 ml su sakupljeni u 10., 20. i 30. minuti i reakcija je prekidana dodavanjem 0.1 ml trihloracetične kiseline (10%). Uzorci su promiješani na vorteksu, centrifugirani na 15000 obrtaja 3 min i potom se 0.1 mL supernatanta prenosilo u nove epruvete. U svaku od epruveta sa supernatantom je dodavano 0.1 ml rastvora natrijum nitrita (2.02 mM) a poslije 20 minuta se dodavalo 0.1 ml rastvora amonijum sulfamata (0.105). Pet minuta poslije, dodavalo se 0.1 ml rastvora N-1-naftil etilendiamin dihidrohlorida (54 mM) određivana je UV apsorpcija supernatanta na 540 nm.

Kalibracioni standardi su priređeni pravljenjem serijskog razblaženja rastvora p-aminobenzoiče

kiseline do koncentracije 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 i 100 μ M. Poslije korekcije za razređivanje, aktivnost enzima je iskazana u mikromolovima p-aminobenzoične kiseline nastale po gramu fekalne suspenzije na sat.

Beta glukuronidaza esej

Priređena je suspenzija fecesa i 0.1 M EDTA pufera pH 6.8 koji sadrži 0.02 M kalijum fosfatnog pufera u omjeru 1:10. Suspenzija je promiješana na vorteksu (30s/cycl u min oko 50% max). Reakcija je počinjala dodavanjem 0.9 ml fekalne suspenzije u 0.1 ml p-nitrofenil beta D-glukuronid (1 mM) rastvorenog u dejonizovanoj HPLC vodi. Uzorci su promiješani na vorteksu i inkubirani na 37°C, u vodenom kupatilu, aerobno i anaerobno. Uzorci u količini od 0.1 ml su sakupljeni u 5., 10. i 20. minuti. Reakcija je prekidana dodavanjem 0.5 ml glicinskog pufera (0.2 M, pH 10.4) a količina nastalog p-nitrofenolaja mjerena korištenjem UV apsorpcije na 420 nm. Kalibracioni standardi su priređeni pravljenjem serijskog razblaženja rastvora p-nitrofenola do koncentracije 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.50 i 1 mM. Poslije korekcije za razređivanje, aktivnost enzima je iskazana u mikromolovima p-nitrofenola nastalog po gramu fekalne suspenzije na sat.

Beta glukozidaza esej

Priređena je suspenzija fecesa i pufera 0.1 M EDTA pufera pH 6.8 koji sadrži 0.02 M kalijum fosfatnog pufera u omjeru 1:10. Suspenzija je promiješana na vorteksu (30s/cycl u min oko 50% max). Reakcija je počinjala dodavanjem 0.9 ml fekalne suspenzije 0.1 ml p-nitrofenil beta D-glukozida (1 mM) rastvorenog u dejonizovanoj HPLC vodi. Uzorci su promiješani na vorteksu i inkubirani na 37°C, u vodenom kupatilu, aerobno i anaerobno. Uzorci u količini od 0.1 ml su sakupljeni u 5., 10. i 15. minuti. Reakcija je prekidana dodavanjem 0.5 ml rastvora natrijum hidroksida (0.1M) a količina nastalog p-nitrofenola se mjerila korištenjem UV apsorpcije na 420 nm.

Kalibracioni standardi su priređeni pravljenjem serijskog razblaženja rastvora p-nitrofenola do koncentracije 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.50 i 1 mM. Poslije korekcije za razređivanje, aktivnost enzima je iskazana u mikromolovima p-nitrofenola nastalog po gramu fekalne suspenzije na sat.

4.3.1.3.Mjerenje vrijednosti koncentracija (ng/mL) sulfasalazina i njegovih metabolita sulfapiridina i mesalazina nastalih in vitro u fekalnoj suspenziji pacijenata pomoću uređaja za tečnu hromatografiju sa masenim detektorom (LC-MS) po metodi opisanoj u radu Guang-Zhi Gu et al.[169]

Od dijela uzorka fecesa (F) je priređena suspenzija sa sterilnim fiziološkim rastvorom (SF) u omjeru 1:10 (1g F+9 mL SF) koja je promiješana na vortexu (30s/cycl u min oko 50% max). U suspenzije je dodavano 100 µg standarda sulfasalazina(Sigma Aldrich) po 1 ml suspenzije, pa su stavljene u termostatski, pri aerobnim i anaerobnim uslovima, na 37°C 3 sata. Svaki pol sata je uzimano po 0.1 mL uzorka (6 uzimanja), auzeti uzorci su zamrznuti na -20°C do analize na uređaju za tečnu hromatografiju sa masenim detektorom (LCMS-Thermo Scientific LCQ-Fleet) po ranije opisanoj metodi[169].

4.3.1.4.Identifikaciju probiotskih bakterija u fekalnom sadržaju pacijenata PCR metodom i elektroforezom na čipovima po metodi opisanoj u radu Walter J. et al.[170]

Od dijela uzorka fecesa je priređena suspenzija sa litičkim puferom (LP) u omjeru 1:10 (1g F+9 mL LP) koja je promiješana na vortexu (30s/cycl u min oko 50% max). Litički pufer je priređen od 25 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 10 mmol/L EDTA i 50 mmol/L glukoze. U duplikatu je uzeto po 1 mL suspenzije i uzorci su zamrznuti na -80°C do molekularne analize.

Molekularna detekcija i identifikacija probiotskih bakterija

Detekcija i djelimična molekularna karakterizacija ispitivanih uzoraka fecesa obavljena je primjenom metode lančane reakcije polimeraze (Polymerase Chain Reaction, PCR). Iz ispitivanih uzoraka izvršena je ekstrakcija DNK, primjenjen je PCR sa setovima univerzalnih prajmera HDA1-GC – HDA2, kao i prajmeri specifični za vrste *Bifidobacter lactis* i *Lactobacillus rhamnosus*. Vizuelizacija dobijenih produkata je izvršena elektroforetskim razdvajanjem upotrebom elektroforeze na čipovima.

Ekstrakcija DNK

Ekstrakcija DNK je urađena upotrebom Norgen Stool DNA Isolation kita.

Lančana reakcija polimeraze (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Za detekciju bakterija iz izolovane DNK primjenjena je PCR metoda sa jednim parom prajmera za vrstu *Bifidobacter lactis* Lm3 i Lm26, kao i univerzalni set prajmera za detekciju bakterija u

fekalnim uzorcima HDA1-GC – HDA2, kao i set specifičnih prajmera PrI-RhaII za detekciju vrste *Lactobacillus rhamnosus*.

PCR miks zapremine 25 µl sadržao je: reakcioni pufer (u konačnoj koncentraciji od 10mM) Tris-HCl, 2.5mM MgCl₂, 50mM KCl, svaki dNTPs u koncentraciji od 200 µM, 20 pmol *forward* i *reverse* prajmera, 2.5U Taq DNA polimeraze i 1 µl fekalne DNK.

Specifični prajmeri Lm3 – Lm26

Ovaj par specifičnih prajmera omogućava detekciju konzervativnog regiona unutar 16S rDNK roda *Bifidobacterium*.

PCR amplifikacijauzoraka je izvedena u termosajkleru Eppendorf Mastercycler, (Eppendorf, Germany) prema sljedećem programu:

- Početna denaturacija pri 94°C u trajanju od 30 sekundi.
- 30 ciklusa (denaturacija pri 94°C u trajanju od 1 min; vezivanje prajmera pri 54°C u trajanju od 1 min i izduživanje prajmera pri 72°C u trajanju od 1 min i 30 sekundi)
- Finalno izduživanje pri 72°C u trajanju od 10 min.

Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka produkata očekivane veličine od oko 1350 bp.

Univerzalni prajmeri HDA1-GC – HDA2

Ovaj par univerzalnih prajmera omogućava umnožavanje V2-V3 regiona 16S rDNK bakterija[170]

PCR amplifikacijauzoraka je izvedena u termosajkleru Eppendorf Mastercycler, (Eppendorf, Germany)prema sljedećem programu:

- Početna denaturacija pri 93°C u trajanju od 30 sekundi.
- 30 ciklusa (denaturacija pri 93°C u trajanju od 1 min; vezivanje prajmera pri 56°C u trajanju od 1 min i izduživanje prajmera pri 68°C u trajanju od 1 min i 30 sekundi)
- Finalno izduživanje pri 68°C u trajanju od 7 min.

Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka produkata očekivane veličine od oko 200bp.

Specifični prajmeri PrI – RhaII

Ovaj par specifičnih prajmera omogućava umnožavanje 16S-23S regiona.

PCR amplifikacijauzoraka je izvedena u termosajkleru Eppendorf Mastercycler, (Eppendorf, Germany) prema sledećem programu:

- Početna denaturacija pri 92°C u trajanju od 30 sekundi.

- 30 ciklusa (denaturacija pri 94°C u trajanju od 1 min; vezivanje prajmera pri 58°C u trajanju od 1 min i 30 sekundi, izduživanje prajmera pri 72°C u trajanju od 1 min i 30 sekundi)
- Finalno izduživanje pri 72°C u trajanju od 10 min.

Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka produkata očekivane veličine od oko 762 bp.

Kao neophodna kontrola u svim PCR reakcijama korišćena je PCR čista voda (PCR smješa sa „DNase-free” vodom).

Vizuelizacija i analiza produkata PCR reakcije

Analiza PCR proizvoda urađena je nakon elektroforetskog razdvajanja dobijenih produkata upotrebom elektroforeze na čipovima MultiNA Shimadzu Biotech (Shimadzu, Japan).

4.3.2. Analiza mukusa zida crijeva

Uzorak mukusa sa zida završnog dijela kolona je uziman u dva navrata; prvi uzorak je uzet na rektoskopiji prije početka liječenja, a drugi na rektoskopiji nakon posljednje (4.) kontrole. Pacijenti su za pregled pripremani primjenom lijeka bisakodil. Uzorak mukusa je uziman pomoću četkica tokom rektoskopije. Od dobijenih uzoraka mukusa su priređene suspenzije sa sterilnim fiziološkim rastvorom (SF) u omjeru 1:10, a potom su promiješane na vortex-u (30s/cycl u min oko 50% max). Suspenzije su dalje razrjeđivane sa SF do razrjeđenja od 10^{-4} . Na ploče sa krvnim agarom, u duplikatu, su zasijana razrjeđenja 10^{-3} , 10^{-4} , te kultivisana u aerobnim i anaerobnim uslovima na 37°C tokom 3 dana. Broj bakterijskih kolonija (CFU) je izražen kao log 10 CFU.

4.3.3. Analiza 24-časovnog urina

4.3.3.1. Mjerenje vrijednosti koncentracija (ng/mL) sulfasalazina i njegovih metabolita sulfapiridina i mesalazina u 24 časovnom urinu čija je identifikacija vršena pomoću uređaja za tečnu hromatografiju sa masenim detektorom (LCMS) po metodi opisanoj u radu Guang-Zhi Gu et al. [169]

Prikupljeni 24 h urin je lagano promućkan i odliveno je u epruvete po 10 mL urina. Uzeti uzorci su zamrznuti na -20°C do analize na uređaju za tečnu hromatografiju sa masenim detektorom (LCMS-Thermo Scientific LCQ-Fleet).

4.4. Statistička analiza

Kvalitativni podaci su prikazani kroz broj pojava i procentualnu zastupljenost.

Za prikaz kvantitativnih podataka korišteni su pokazatelji deskriptivne statistike (broj ispitanika, aritmetička sredina, standardna devijacija, standardna greška aritmetičke sredine, 95%-tni interval povjerenja za aritmetičku sredinu, ekstremne vrijednosti, kvartili i medijana).

Normalnost raspodjele kod posmatranih obilježja je testirana *Kolmogorov-Smirnov*-im testom normalnosti.

Za upoređivanje srednjih vrednosti obilježja prema ispitivanoj grupi korišten je ANOVA test za ponavljajuća mjerenja (ako posmatrana obilježja imaju normalnu raspodjelu), te neparametarski *Friedman*-ov test za više nezavisnih uzoraka (ako posmatrana obilježja nemaju normalnu raspodjelu). U slučajevima kada je pomoću ANOVA testa za ponavljajuća mjerenja pokazana statistički značajna razlika u srednjim vrijednostima obilježja, rađen je i *Student*-ov *t* test za nezavisne uzorke radi upoređivanja srednjih vrijednosti obilježja za svaka dva mjerenja.

U slučajevima kada je pomoću *Friedman*-ovog testa za više nezavisnih uzoraka pokazana statistički značajna razlika u srednjim vrijednostima obilježja, rađen je i *Mann-Whitney U* test za dva nezavisna uzorka radi upoređivanja srednjih vrijednosti obilježja za svaka dva mjerenja.

Kod korištenja *Student*-ovog *t* testa za nezavisne uzorke, značajnost razlike u varijansama posmatranih obilježja testirana je *F* testom.

Za upoređivanje srednjih vrijednosti posmatranih obilježja na različitim kontrolama korišten je *Student*-ov *t* test za uparene uzorke (ako posmatrana obilježja imaju normalnu raspodjelu), odnosno neparametarski *Wilcoxon*-ov *W* test (ako posmatrana obilježja nemaju normalnu raspodjelu).

Za utvrđivanje stepena povezanosti (korelacije) različitih obilježja korištena je *Spearman*-ova neparametarska korelacija (u ovim tabelama *r* označava koeficijent povezanosti ili korelacije, a *p* označava značajnost korelacije).

Kao statistički značajne uzimane su vrijednosti u kojima je $p < 0.05$.

Za statističku analizu, te tabelarne i grafičke prikaze rezultata korišten je sljedeći *software*:

IBM SPSS Statistics 21.0; MS Office Word 2010 i MS Office Excel 2010.

Svi rezultati su predstavljeni tabelarnim prikazom i/ili grafički.

5. REZULTATI

5.1. Broj fekalnih bakterija

Metodom brojanja kolonija (CFU) određivan je ukupan broj aerobnih i anaerobnih bakterija u 1 gramu fecesa ispitanika, prije i poslije tretiranja u obje ispitivane grupe.

Broj CFU/g fecesa je potom izražen kao $\log_{10}$.

Kao granica statističke značajnosti uzet je $p < 0,05$.

5.1.1 Broj bakterija u aerobnim uslovima

Poređenjem broja fekalnih bakterija u aerobnim uslovima kultivisanja prije tretmana i na različitim kontrolama u grupi Sulfasalazin, nismo uočili statistički značajne razlike, mada je prisutan trend rasta broja mikroorganizama. Prosječne vrijednosti $\log$ CFU i značajnost promjene unutar grupe su prikazane u Tabeli 4.

Tabela 4. Prosječne vrijednosti $\log$ broja CFU u aerobnim uslovima u grupi Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		13	13	14	14	14
Aritmetička sredina		12.647	13.134	13.235	13.077	12.843
Standardna devijacija		1.948	2.248	1.825	2.171	2.761
Standardna greška aritmetičke sredine		0.540	0.624	0.488	0.580	0.738
95% interval povjerenja	Donja granica	11.588	11.912	12.279	11.940	11.397
	Gornja granica	13.706	14.356	14.190	14.215	14.290
Medijana - Q2		13.518	14.143	13.903	14.126	14.007
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.748				

$p < 0.05$

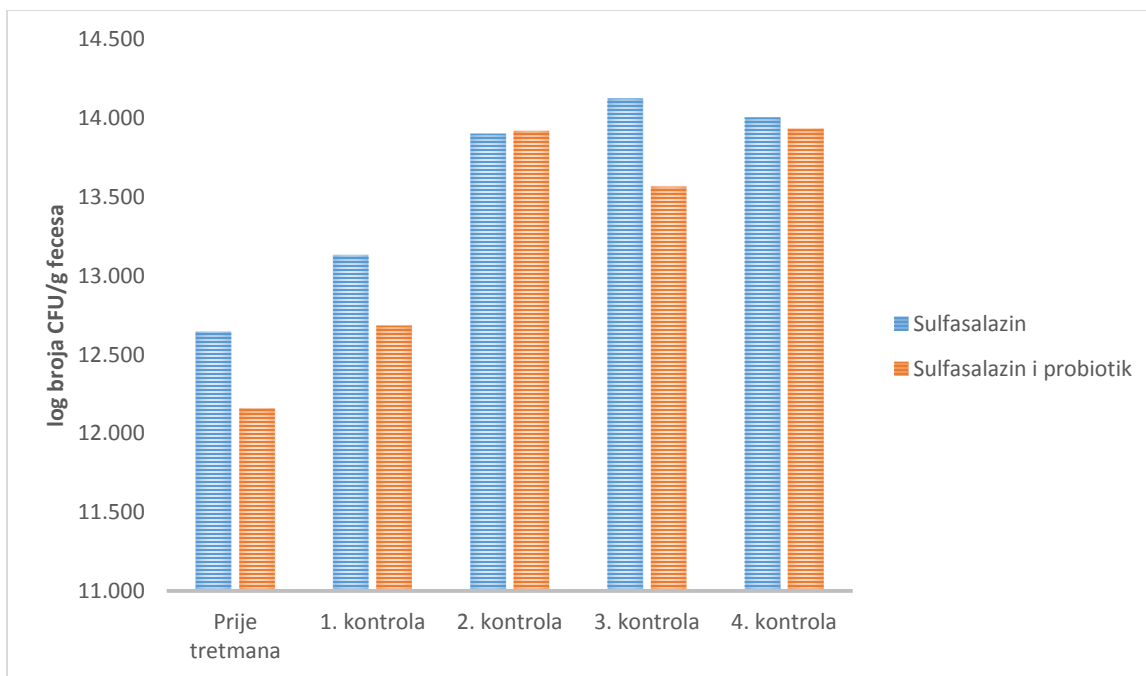
Poređenjem broja fekalnih bakterija u aerobnim uslovima kultivisanja prije tretmana i na različitim kontrolama u grupi Sulfasalazin i probiotik, nismo uočili statistički značajne razlike, mada je i u ovoj grupi prisutan trend rasta broja mikroorganizama. Prosječne vrijednosti log CFU i značajnost promjene unutar grupe su prikazane u Tabeli 5.

Tabela 5. Prosječne vrijednosti log broja CFU u aerobnim uslovima u grupi Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		12	14	14	14	14
Aritmetička sredina		12.160	12.684	13.156	12.405	12.736
Standardna devijacija		2.358	2.344	1.730	2.553	2.078
Standardna greška aritmetičke sredine		0.681	0.626	0.462	0.682	0.555
95% interval povjerenja	Donja granica	10.826	11.456	12.250	11.068	11.647
	Gornja granica	13.494	13.911	14.062	13.743	13.825
Medijana - Q2		12.130	13.191	13.918	13.566	13.932
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.745				

p<0.05

Poređenje broja bakterija između eksperimentalnih grupa, nije pokazalo statistički značajne razlike u broju fekalnih bakterijai u skladu su sa onim dobijenim poređenjem unutar grupa. (Grafikon 1).



Grafikon 1. Vrijednosti broja bakterijau aerobnim uslovimana različitim kontrolama prema ispitivanoj grupi

5.1.2 Broj bakterijskih kolonija u anaerobnim uslovima

Poređenjem broja fekalnih bakterija u anaerobnim uslovima kultivisanja prije tretmana i na različitim kontrolama u grupi Sulfasalazin, nismo uočili stastistički značajne razlike, mada je prisutan trend rasta broja mikroorganizama.

Prosječne vrijednosti log CFU i značajnost promjene unutar grupe su prikazane u Tabeli 6.

Tabela 6.Prosječne vrijednosti log broja CFU u anaerobnim uslovima u grupi Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		13	13	14	14	14
Aritmetička sredina		13.604	14.026	13.639	13.651	14.137
Standardna devijacija		1.351	1.869	1.843	1.779	1.356
Standardna greška aritmetičke sredine		0.375	0.518	0.493	0.476	0.362
95% interval povjerenja	Donja granica	12.869	13.010	12.673	12.719	13.427
	Gornja granica	14.339	15.042	14.604	14.583	14.847
Medijana - Q2		14.185	14.470	14.327	14.219	14.340
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.261				

p<0.05

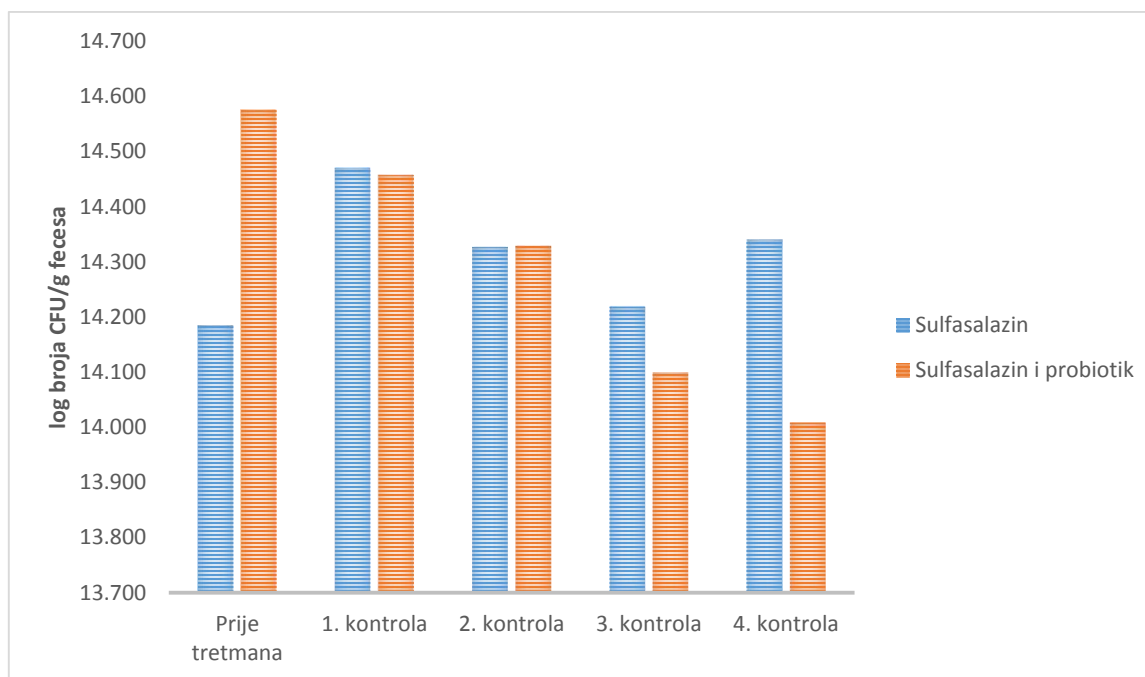
Poređenjem broja fekalnih bakterija u anaerobnim uslovima kultivisanja prije tretmana i na različitim kontrolama u grupi Sulfasalazin i probiotik, nismo uočili statistički značajne razlike, mada je na prve dve kontrole prisutan trend rasta broja mikroorganizama, a na trećoj i četvrtoj kontroli broj bakterija opada. Prosječne vrijednosti log CFU i značajnost promjene unutar grupe su prikazane u Tabeli 7.

Tabela 7.Prosječne vrijednosti log broja CFU u anaerobnim uslovima u grupi Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		12	14	14	14	14
Aritmetička sredina		13.613	14.062	14.185	12.938	13.017
Standardna devijacija		2.141	1.598	0.831	2.459	2.344
Standardna greška aritmetičke sredine		0.618	0.427	0.222	0.657	0.627
95% interval povjerenja	Donja granica	12.402	13.225	13.750	11.650	11.789
	Gornja granica	14.824	14.899	14.620	14.226	14.245
Medijana - Q2		14.575	14.457	14.329	14.100	14.009
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.317				

p<0.05

Poređenje između eksperimentalnih grupa, nije pokazalo statistički značajne razlike u broju anaerobnih fekalnih bakterija (Grafikon 2).



Grafikon 2. Vrijednosti broja bakterijau anaerobnim uslovimana različitim kontrolama prema ispitivanoj grupi

5.2 Analiza enzimske aktivnosti fekalne flore spektrofotometrijskom metodom

5.2.1. Azoreduktaza esej

Aktivnost enzima je iskazana u mikromolovima amaranta razgrađenog po gramu fekalne suspenzije na sat ($\mu\text{mol/g}$).

5.2.1.1 Aktivnost azoreduktaze u aerobnim uslovima

Ugrupi Sulfasalazin pri aerobnim uslovima kultivisanja, aktivnost azoreduktaze na svim mjerenjima pokazuje statistički značajan ($p=0.016$, $p=0.04$, $p=0.010$) pad vrijednosti (Tabela 8., Tabela 9. i Tabela 10.).

Srednje vrijednosti azoreduktaze mjerene u 5. minuti na četvrtoj kontroli su statistički značajno manje nego prije ispitivanja ($p = 0.013$), na prvoj ($p = 0.033$) i drugoj kontroli ($p = 0.011$).

Srednje vrijednosti azoreduktaze na trećoj kontroli su statistički značajno manje nego prije ispitivanja ($p = 0.022$) i na prvoj kontroli ($p = 0.009$).

Tabela 8.Aktivnosti azoreduktaze mjerena u 5.minuti pri aerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		4.13224	3.91434	3.69644	2.95228	2.93602
Standardna devijacija		1.29491	1.31090	0.81616	0.35662	0.34836
Standardna greška aritmetičke sredine		0.34608	0.35035	0.21813	0.09531	0.09662
95% interval povjerenja	Donja granica	3.45393	3.22765	3.26891	2.76547	2.74665
	Gornja granica	4.81056	4.60104	4.12397	3.13909	3.12539
Medijana - Q2		3.50779	3.43530	3.38194	*3.03148	*2.90882
Friedman test za više uparenih uzoraka		p 0.016				

p<0.05

Srednje vrijednosti azoreduktaze mjerene u 10. minuti na trećoj kontroli su statistički značajno manje nego prije ispitivanja ($p = 0.011$), na prvoj ($p = 0.021$) i drugoj kontroli ($p = 0.019$).

Srednje vrijednosti azoreduktaze mjerene u 10. minuti na četvrtoj kontroli su statistički značajno manje nego prije ispitivanja ($p = 0.007$), na prvoj ($p = 0.011$) i drugoj kontroli ($p = 0.035$).

Tabela 9.Aktivnosti azoreduktaze mjerena u 10.minuti pri aerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		2.05599	2.02982	1.83582	*1.54089	*1.52162
Standardna devijacija		0.64787	0.67019	0.51189	0.32109	0.15648
Standardna greška aritmetičke sredine		0.17315	0.17912	0.13681	0.08581	0.04340
95% interval povjerenja	Donja granica	1.71662	1.67876	1.56767	1.37269	1.43656
	Gornja granica	2.39537	2.38089	2.10397	1.70908	1.60669
Medijana - Q2		1.72761	1.71725	1.67265	1.50658	1.54123
ANOVA test za ponovljajuća mjerenja		p 0.004				

p<0.05

Srednje vrijednosti azoreduktaze mjerene u 20. minuti na trećoj kontroli su statistički značajno

manje nego prije ispitivanja ($p = 0.022$), na prvoj kontroli ($p = 0.048$) i na drugoj kontroli ($p = 0.030$). Srednje vrijednosti azoreduktaze mjerene u 20. minuti na četvrtoj kontroli su statistički značajno manje nego prije ispitivanja ($p = 0.009$) i na prvoj kontroli ($p = 0.033$).

Tabela 10. Aktivnosti azoreduktaze mjerena u 20. minuti pri aerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		1.02970	1.00881	0.94438	0.76790	0.78290
Standardna devijacija		0.32432	0.33374	0.27183	0.14946	0.12113
Standardna greška aritmetičke sredine		0.08668	0.08920	0.07265	0.03994	0.03360
95% interval povjerenja	Donja granica	0.85981	0.83399	0.80199	0.68961	0.71705
	Gornja granica	1.19958	1.18363	1.08678	0.84619	0.84874
Medijana - Q2		0.83224	0.89339	0.83264	*0.76092	*0.74658
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.010				

$p < 0.05$

Pri poređenju vrijednosti procentualne promjene azoreduktaze u aerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin, nema ($p = 0.641$) statistički značajnih razlika (vidi Prilozi -Prilog 1).

I u grupi Sulfasalazin i probiotik pri aerobnim uslovima kultivisanja aktivnost azoreduktaze na svim mjerenjima pokazuje statistički značajan ($p = 0.001$, $p = 0.002$, $p < 0.001$) pad vrijednosti (Tabela 11., Tabela 12. i Tabela 13.).

Srednje vrijednosti azoreduktaze mjerene u 5. minuti (Tabela 11.) na drugoj kontroli su statistički značajno manje nego na prvoj kontroli ($p = 0.039$) a srednje vrijednosti azoreduktaze na trećoj kontroli su statistički značajno manje nego na prvoj ($p = 0.001$) i drugoj kontroli ($p = 0.022$). Srednje vrijednosti azoreduktaze mjerene u 5. minuti na četvrtoj kontroli su statistički značajno manje nego prije ispitivanja ($p = 0.021$), na prvoj kontroli ($p < 0.001$) i na drugoj kontroli ($p = 0.043$).

Tabela 11. Aktivnosti azoreduktaze mjerena u 5. minuti pri aerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	15	14
Aritmetička sredina		3.90519	4.41367	*3.80079	*3.29337	*3.10191
Standardna devijacija		1.10141	1.05806	1.08540	0.86000	0.30579
Standardna greška aritmetičke sredine		0.28438	0.27319	0.28025	0.22205	0.08173
95% interval povjerenja	Donja granica	3.34780	3.87822	3.25150	2.85815	2.94173
	Gornja granica	4.46257	4.94912	4.35008	3.72859	3.26210
Medijana - Q2		3.35804	4.40305	3.38672	3.24176	3.07768
ANOVA test za ponovljajuća mjerenja		p				
		0.001				

p<0.05

Srednje vrijednosti azoreduktaze mjerene u 10. minutu na četvrtoj kontroli su statistički značajno manje nego prije ispitivanja ($p = 0.009$), te na prvoj ($p = 0.008$) i drugoj kontroli ($p = 0.006$). Srednje vrijednosti azoreduktaze mjerene u 10. minutu na trećoj kontroli su statistički značajno manje nego prije ispitivanja ($p = 0.017$) i na drugoj kontroli ($p = 0.009$) (Tabela 12.)

Tabela 12. Aktivnosti azoreduktaze mjerena u 10. minuti pri aerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	15	14
Aritmetička sredina		2.16536	2.07733	2.04929	1.70993	1.51358
Standardna devijacija		0.58344	0.58457	0.58454	0.35786	0.17564
Standardna greška aritmetičke sredine		0.15064	0.15094	0.15093	0.09240	0.04694
95% interval povjerenja	Donja granica	1.87010	1.78149	1.75347	1.52882	1.42157
	Gornja granica	2.46063	2.37316	2.34511	1.89103	1.60558
Medijana - Q2		2.07966	2.05178	1.81283	*1.60813	*1.49224
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.002				

p<0.05

Srednje vrijednosti azoreduktaze mjerene u 20. minutu na četvrtoj kontroli su statistički značajno manje nego prije ispitivanja ($p = 0.009$), te na prvoj ($p = 0.001$) i drugoj kontroli ($p = 0.009$). Srednje vrijednosti azoreduktaze mjerene u 20. minutu na trećoj kontroli su statistički značajno

manje nego na prvoj ($p = 0.002$) i drugoj kontroli ($p = 0.002$) (Tabela 13.)

Tabela 13. Aktivnosti azoreduktaze mjerena u 20. minuti pri aerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin i probiotik

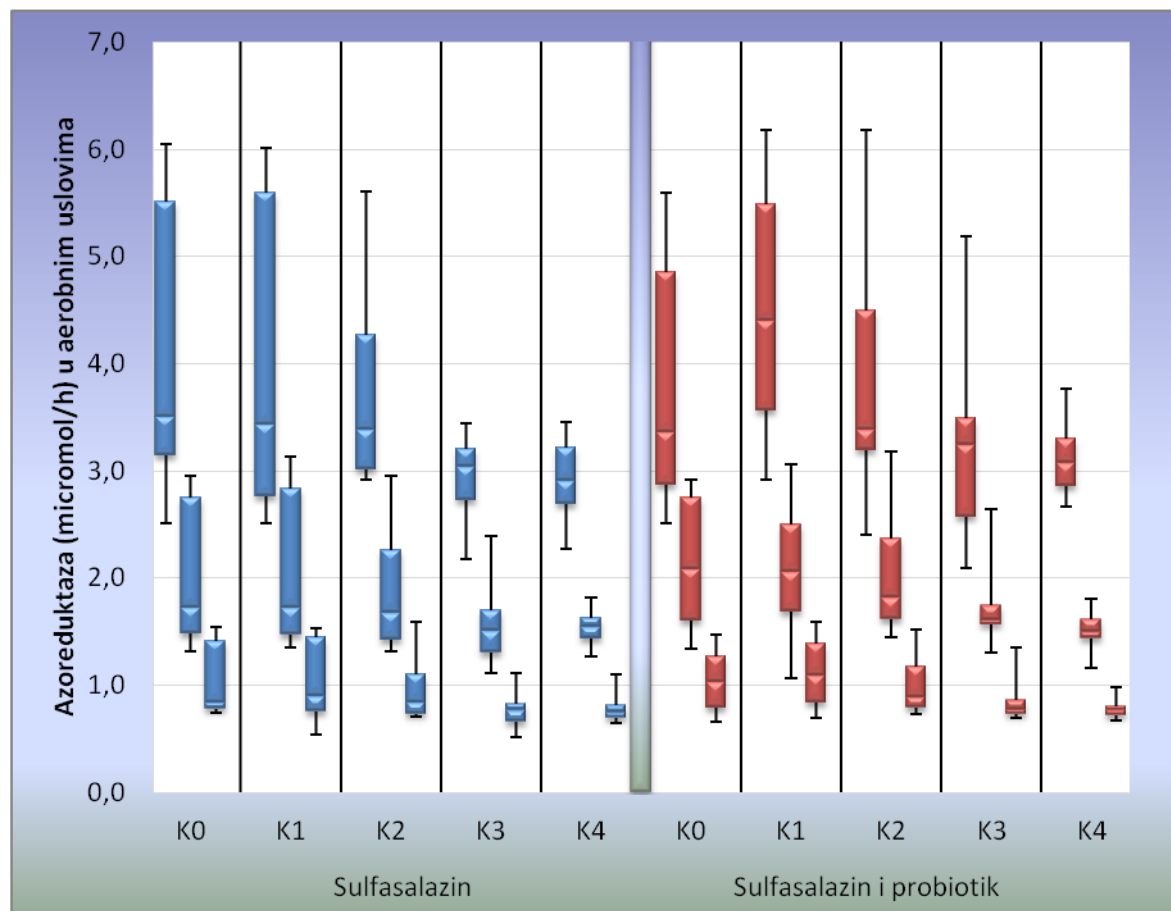
		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	15	14
Aritmetička sredina		1.01682	1.09709	1.00254	0.84897	0.77342
Standardna devijacija		0.26958	0.29179	0.29240	0.19210	0.07748
Standardna greška aritmetičke sredine		0.06961	0.07534	0.07550	0.04960	0.02071
95% interval povjerenja	Donja granica	0.88040	0.94942	0.85456	0.75175	0.73283
	Gornja granica	1.15325	1.24475	1.15051	0.94619	0.81400
Medijana - Q2		1.02705	1.08880	0.88721	*0.76889	*0.76869
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		< 0.001				

$p < 0.05$

Pri poređenju vrijednosti procentualne promjene azoreduktaze u aerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik, se ne uočavaju ($p=0.978$) statistički značajne razlike (vidi Prilozi-Prilog 2).

Razlike u srednjim vrijednostima azoreduktaze u aerobnim uslovima između ispitivanih grupa nisu bile statistički značajne ni u jednom mjerenju prije ispitivanja, kao ni na jednom mjerenju na kontrolama ($p= 0.614, p= 0.636, p= 0.861, p= 0.150$ itd.) (vidi Prilozi-Prilog 3.)

Vrijednosti azoreduktaze pri aerobnim uslovima kultivisanja mjerene pri svim kontrolama su prikazane na grafikonu 3.



Grafikon 3. Vrijednosti azoreduktaze pri aerobnim uslovima na različitim kontrolama prema ispitivanoj grupi

5.2.1.2 Aktivnost azoreduktaze u anaerobnim uslovima

U grupi Sulfasalazin pri anaerobnim uslovima kultivisanja, aktivnost azoreduktaze pokazuje niže vrijednosti na svim kontrolama u odnosu na vrijednosti prije ispitivanja ali bez ($p=0.264$, $p=0.250$, $p=0.089$) statističke značajnosti (vidi Prilozi-Prilog 4, 5 i 6.).

Pri poređenju vrijednosti procentualne promjene azoreduktaze u anaerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin se ne uočavaju ($p=0.820$) statistički značajne razlike (vidi Prilozi-Prilog 7).

U grupi Sulfasalazin i probiotik pri anaerobnim uslovima kultivisanja, vrijednosti azoreduktaze opadaju na svim kontrolama u odnosu na vrijednosti prije ispitivanja, a statistički značajne razlike ($p=0.030$, $p=0.007$) su uočljive pri mjerenju u 5. i 10. minuti (Tabela 14, Tabela 15.). Vrijednosti azoreduktaze mjerene u 20. minuti, su takođe opadale u odnosu na vrijednosti prije tretmana, ali bez ($p=0.485$) statistički značajne razlike (vidi Prilozi-Prilog 8.).

Vrijednosti azoreduktaze mjerene u 5. minuti (Tabela 14.) na prvoj kontroli su statistički značajno veće nego na trećoj ($p=0.002$) i četvrtoj kontroli ($p=0.013$).

Tabela 14. Aktivnosti azoreduktaze mjerena u 5. minuti pri anaerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	15	14
Aritmetička sredina		4.04888	4.38107	3.83467	3.39606	3.14435
Standardna devijacija		1.35446	1.17534	1.23463	0.72997	0.44868
Standardna greška aritmetičke sredine		0.34972	0.30347	0.31878	0.18848	0.11991
95% interval povjerenja	Donja granica	3.36343	3.78627	3.20986	3.02665	2.90932
	Gornja granica	4.73432	4.97587	4.45948	3.76548	3.37939
Medijana - Q2		3.39150	3.96179	3.47752	3.16370	3.13980
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.030				

$p < 0.05$

Vrijednosti azoreduktaze mjerene u 10. minuti (Tabela 15.) na četvrtoj kontroli su statistički značajno manje nego na prvoj kontroli ($p=0.002$) dok su vrijednosti azoreduktaze na trećoj kontroli statistički značajno manje od onih na prvoj ($p < 0.001$) i drugoj kontroli ($p=0.036$).

Tabela 15. Aktivnosti azoreduktaze mjerena u 10. minuti pri anaerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin i probiotik

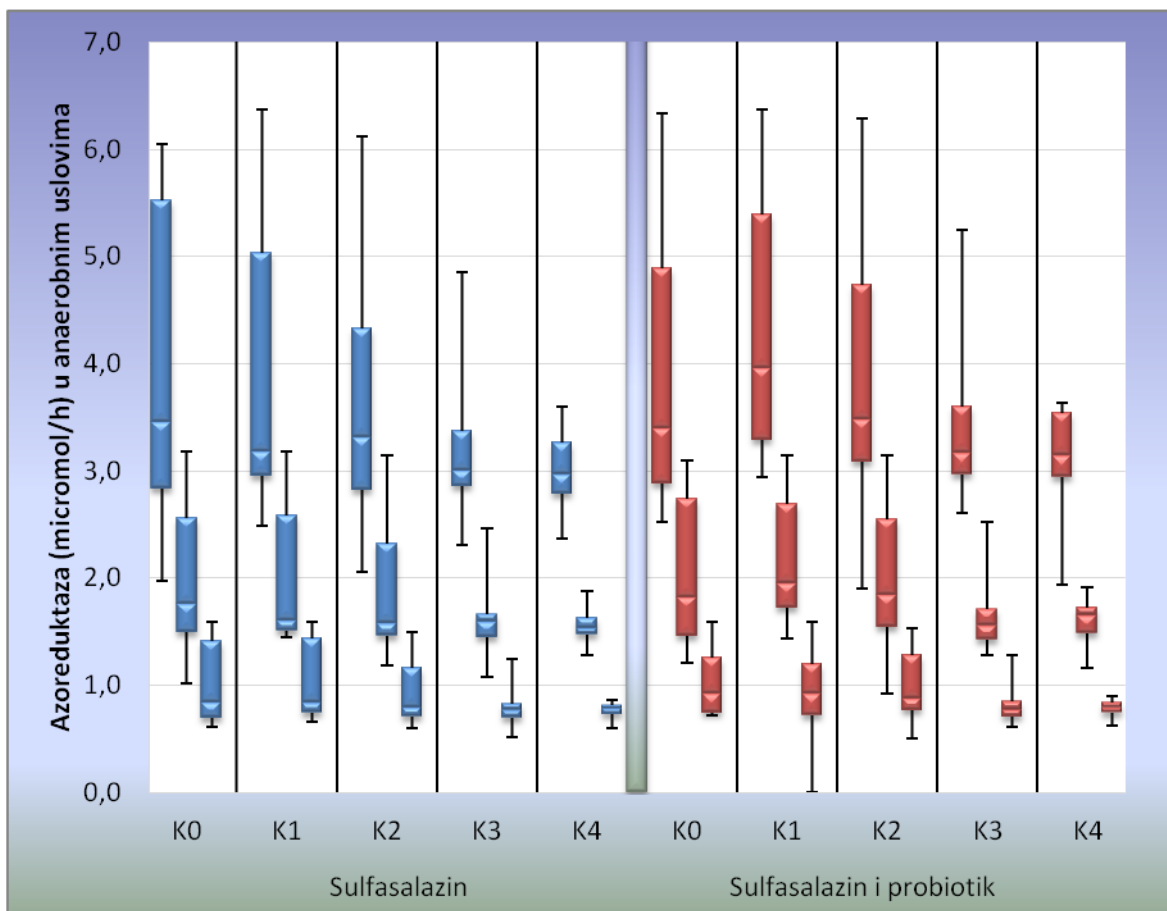
		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	15	14
Aritmetička sredina		2.04621	2.17046	1.98775	1.65704	1.61018
Standardna devijacija		0.66912	0.53064	0.63312	0.32750	0.21724
Standardna greška aritmetičke sredine		0.17277	0.13701	0.16347	0.08456	0.05806
95% interval povjerenja	Donja granica	1.70758	1.90192	1.66734	1.49130	1.49639
	Gornja granica	2.38483	2.43900	2.30815	1.82278	1.72398
Medijana - Q2		1.82160	1.95381	1.83753	1.55716	1.64557
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.007				

p<0.05

Pri poređenju vrijednosti procentualne promjene azoreduktaze u anaerobnim uslovima unutar grupe Sulfasalazin i probiotik, nema statistički značajne razlike(p=0.931)između kontrola (vidi Prilozi-Prilog 9.).

Razlike u srednjim vrijednostima azoreduktaze u anaerobnim uslovima između ispitivanih grupa nisu bile statistički značajne ni u jednom mjerenju prije ispitivanja, kao ni na jednom mjerenju na kontrolama (p= 0.098,p= 0.925,p= 0.861,p= 0.098 itd.) (vidi Prilozi-Prilog 10.).

Vrijednosti azoreduktaze pri anaerobnim uslovima kultivisanja mjerene pri svim kontrolama su prikazane na grafikonu 4.



Grafikon 4. Vrijednosti azoreduktaze pri anaerobnim uslovima na različitim kontrolama prema ispitivanoj grupi

5.2.2. Nitroreduktaza esej

Aktivnost enzima je iskazana u mikromolovima p-aminobenzoične kiseline stvorene po gramu fekalne suspenzije na sat ($\mu\text{mol/g}$).

5.2.2.1. Aktivnost nitroreduktaze u aerobnim uslovima

Ugrupi Sulfasalazin pri aerobnim uslovima kultivisanja, vrijednosti nitroreduktaze su statistički značajno rastle kroz kontrole u odnosu na vrijednosti prije ispitivanja.

Na mjerenju u 5. minuti, srednje vrijednosti nitroreduktaze prije ispitivanja su statistički značajno manje nego na prvoj ($p < 0.001$), drugoj ($p = 0.003$), trećoj ($p = 0.001$) i četvrtoj kontroli ($p = 0.002$) (Tabela 16.).

Tabela 16. Aktivnosti nitroreduktaze mjerena u 5. minuti pri aerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		0.07637	0.20299	0.18474	0.21980	0.20754
Standardna devijacija		0.02053	0.08681	0.10329	0.10179	0.11174
Standardna greška aritmetičke sredine		0.00549	0.02320	0.02761	0.02720	0.03099
95% interval povjerenja	Donja granica	0.06562	0.15752	0.13063	0.16648	0.14680
	Gornja granica	0.08713	0.24847	0.23885	0.27312	0.26829
Medijana - Q2		0.06722	0.18329	0.15984	0.20126	0.17430
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		< 0.001				

$p < 0.05$

U 10. minuti srednje vrijednosti nitroreduktaze prije ispitivanja su statistički značajno manje nego na prvoj ($p < 0.001$), drugoj ($p < 0.001$), trećoj ($p < 0.001$) i četvrtoj kontroli ($p = 0.001$). Srednje vrijednosti nitroreduktaze na drugoj kontroli su statistički značajno manje nego na trećoj kontroli ($p = 0.041$) (Tabela 17.).

Tabela 17. Aktivnosti nitroreduktaze mjerena u 10. minuti pri aerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		0.04996	0.14430	0.13641	0.17000	0.14687
Standardna devijacija		0.01592	0.06505	0.05907	0.08580	0.08489
Standardna greška aritmetičke sredine		0.00426	0.01739	0.01579	0.02293	0.02354
95% interval povjerenja	Donja granica	0.04162	0.11022	0.10547	0.12506	0.10072
	Gornja granica	0.05830	0.17838	0.16735	0.21495	0.19301
Medijana - Q2		0.04687	0.12109	0.12499	0.15103	0.11145
ANOVA test za ponovljajuća mjerenja		p				
		< 0.001				

$p < 0.05$

U 20. minuti srednje vrijednosti nitroreduktaze prije ispitivanja su statistički značajno manje nego na prvoj ($p < 0.001$), drugoj ($p < 0.001$), trećoj i ($p < 0.001$) i četvrtoj kontroli ($p = 0.004$) (Tabela 18.).

Tabela 18. Aktivnosti nitroreduktaze mjerena u 20. minuti pri aerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		0.03959	0.11461	0.11380	0.13554	0.11814
Standardna devijacija		0.01694	0.04358	0.05215	0.06399	0.07427
Standardna greška aritmetičke sredine		0.00453	0.01165	0.01394	0.01710	0.02060
95% interval povjerenja	Donja granica	0.03072	0.09179	0.08649	0.10202	0.07777
	Gornja granica	0.04846	0.13744	0.14112	0.16906	0.15852
Medijana - Q2		0.03554	0.11484	0.10820	0.12812	0.09413
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		< 0.001				

$p < 0.05$

Pri poređenju vrijednosti procentualne promjene nitroreduktaze u aerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin, se uočava statistički značajna razlika ($p=0.026$). Vrijednost prije tretmana su veće u odnosu na one izmjerene na trećoj kontroli (Tabela 19.). Procentualna promjena nitroreduktaze na mjerenju prije tretmana u svakoj minuti pokazuje smanjenje za 4.12 %, a na 3. kontroli 3.21 %.

Tabela 19. Procentualna promjena nitroreduktaze po minuti u aerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		-4.20874	-3.39954	-2.85391	-3.07205	-3.66730
Standardna devijacija		1.95766	1.37509	1.43601	0.89295	1.60543
Standardna greška aritmetičke sredine		0.52321	0.36751	0.38379	0.23865	0.44527
95% interval povjerenja	Donja granica	-5.23423	-4.11985	-3.60614	-3.53980	-4.54002
	Gornja granica	-3.18326	-2.67922	-2.10169	-2.60429	-2.79458
Medijana - Q2		-4.12172	-3.30579	-3.10001	-3.21087	-3.22065
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.026				

$p < 0.05$

I u grupi Sulfasalazin i probiotik pri aerobnim uslovima kultivisanja, aktivnost nitroreduktaze statistički značajno raste kroz kontrole u odnosu na vrijednosti prije ispitivanja. Međutim, aktivnost nitroreduktaze pokazuje statistički značajan pad na 2. kontroli u 5. i 10. minuti mjerenja (Tabela 20. i Tabela 21.) u odnosu na vrijednosti pri prvoj kontroli. Na mjerenju u 20. minuti (Tabela 22.) se više ne uočava statistički značajno smanjenje, ali su vrijednosti mjerene i na 2. i na 4. kontroli niže od onih na 1. i 3. kontroli.

Pri mjerenju u 5. minuti (Tabela 20) srednje vrijednosti nitroreduktaze prije ispitivanja su statistički značajno manje nego na prvoj ($p = 0.017$), drugoj ($p = 0.020$), trećoj ($p = 0.020$) i četvrtoj kontroli ($p = 0.012$). Srednje vrijednosti nitroreduktaze na drugoj kontroli su statistički značajno manje nego na prvoj ($p = 0.047$) i na trećoj kontroli ($p = 0.031$).

Tabela 20. Aktivnosti nitroreduktaze mjerena u 5. minuti pri aerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	15	14
Aritmetička sredina		0.08884	0.21348	0.15257	0.22031	0.20500
Standardna devijacija		0.07308	0.13059	0.06261	0.15551	0.17137
Standardna greška aritmetičke sredine		0.01887	0.03372	0.01617	0.04015	0.04580
95% interval povjerenja	Donja granica	0.05186	0.14740	0.12088	0.14161	0.11523
	Gornja granica	0.12582	0.27957	0.18425	0.29900	0.29477
Medijana - Q2		0.06175	0.17820	0.14069	0.16726	0.12310
Friedman test za više uparenih uzoraka		p 0.003				

p<0.05

Pri mjerenju u 10. minuti (Tabela 21), srednje vrijednosti nitroreduktaze prije ispitivanja su statistički značajno manje nego na prvoj (p = 0.004), drugoj (p = 0.011), trećoj (p = 0.005) i četvrtoj kontroli (p = 0.002). Srednje vrijednosti nitroreduktaze na drugoj kontroli su statistički značajno manje nego na prvoj kontroli (p = 0.027).

Tabela 21. Aktivnosti nitroreduktaze mjerena u 10. minuti pri aerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	15	14
Aritmetička sredina		0.05628	0.17620	0.11836	0.16145	0.14724
Standardna devijacija		0.05157	0.09870	0.05148	0.09170	0.12741
Standardna greška aritmetičke sredine		0.01331	0.02548	0.01329	0.02368	0.03405
95% interval povjerenja	Donja granica	0.03018	0.12625	0.09231	0.11504	0.08050
	Gornja granica	0.08238	0.22615	0.14441	0.20786	0.21398
Medijana - Q2		0.04375	0.14999	0.10468	0.12135	0.09348
Friedman test za više uparenih uzoraka		p < 0.001				

p<0.05

Pri mjerenju u 20. minuti (Tabela 22) srednje vrijednosti nitroreduktaze prije ispitivanja su statistički značajno manje nego na prvoj ($p = 0.011$), drugoj ($p = 0.010$), trećoj ($p = 0.006$) i četvrtoj kontroli ($p = 0.002$).

Tabela 22. Aktivnosti nitroreduktaze mjerena u 20. minuti pri aerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	15	14
Aritmetička sredina		0.04252	0.11869	0.09364	0.13049	0.10828
Standardna devijacija		0.04228	0.07931	0.03935	0.08024	0.09173
Standardna greška aritmetičke sredine		0.01092	0.02048	0.01016	0.02072	0.02452
95% interval povjerenja	Donja granica	0.02113	0.07855	0.07373	0.08988	0.06023
	Gornja granica	0.06392	0.15883	0.11355	0.17109	0.15633
Medijana - Q2		0.03008	0.11249	0.08671	0.11288	0.06738
Friedman test za više uparenih uzoraka		p < 0.001				

$p < 0.05$

Pri poređenju vrijednosti procentualne promjene nitroreduktaze u aerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik, se uočavaju statistički značajne razlike ($p = 0.029$) (Tabela 23). Vrijednost prije tretmana je veća u odnosu na one izmjerene na drugoj ($p = 0.002$) i trećoj kontroli ($p = 0.008$). Na četvrtoj kontroli su uočljive statistički značajno veće vrijednosti nego na drugoj ($p = 0.016$) i trećoj kontroli ($p = 0.029$). Procentualna promjena nitroreduktaze na mjerenju prije tretmana u svakoj minuti pokazuje smanjenje za 4.521 %, a na 2. i 3. kontroli 3.115 %, i 3.072 %.

Tabela 23. Procentualna promjena nitroreduktaze po minuti u aerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	15	14
Aritmetička sredina		-4.52153	-4.04827	-3.11521	-3.07939	-4.02889
Standardna devijacija		1.38841	3.49186	0.82248	1.03958	0.65430
Standardna greška aritmetičke sredine		0.35849	0.90160	0.21236	0.26842	0.17487
95% interval povjerenja	Donja granica	-5.22416	-5.81540	-3.53144	-3.60549	-4.37163
	Gornja granica	-3.81889	-2.28115	-2.69898	-2.55329	-3.68615
Medijana - Q2		-4.00873	-3.91711	-3.27185	-3.23730	-3.92745
ANOVA test za ponovljajuća mjerenja		p 0.029				

$p < 0.05$

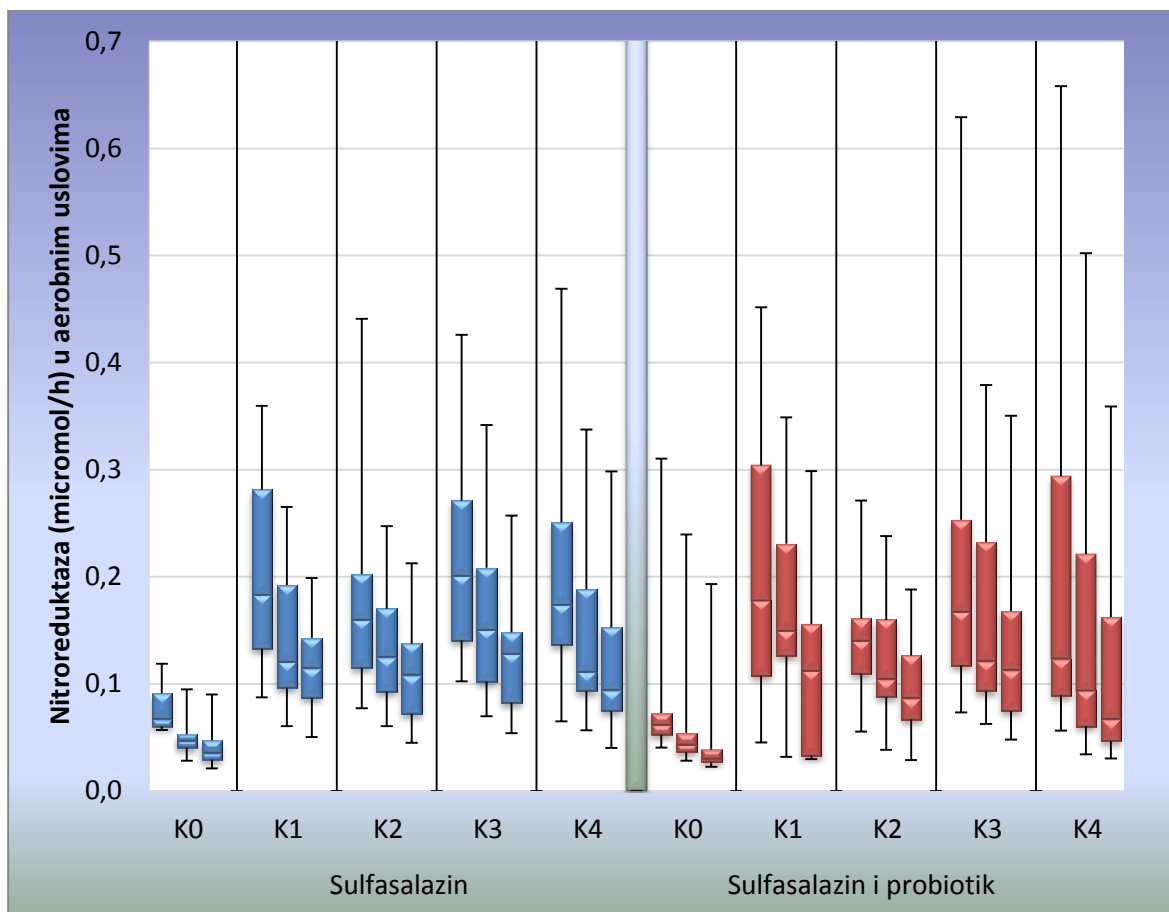
Razlike u srednjim vrijednostima nitroreduktaze u aerobnim uslovima između ispitivanih grupa nisu bile statistički značajne ni na jednom mjerenju. Međutim, srednje vrijednosti procentualnog pada nitroreduktaze po minuti na četvrtoj kontroli su statistički značajno veće u grupi Sulfasalazin i probiotik (Tabela 24).

Tabela 24. Poređenje aktivnosti nitroreduktaze u aerobnim uslovima između grupa

	Mjerenje	Sulfasalazin		Sulfasalazin i probiotik		p
		n	Srednja vrijednost	n	Srednja vrijednost	
Prije ispitivanja	5 min	14	0.06722 (0.06018 , 0.09145)	15	0.06175 (0.05237 , 0.07269)	M: 0.305
	10 min	14	0.04996 (0.04162 , 0.05830)	15	0.05628 (0.03018 , 0.08238)	S: 0.664
	20 min	14	0.03554 (0.02930 , 0.04726)	15	0.03008 (0.02734 , 0.03867)	M: 0.238
	Promjena	14	-4.12172 (-4.27912 , -3.54764)	15	-4.00873 (-4.94374 , -3.58290)	M: 0.760
Prva kontrola	5 min	14	0.20299 (0.15752 , 0.24847)	15	0.21348 (0.14740 , 0.27957)	S: 0.802
	10 min	14	0.14430 (0.11022 , 0.17838)	15	0.17620 (0.12625 , 0.22615)	S: 0.317
	20 min	14	0.11461 (0.09179 , 0.13744)	15	0.11869 (0.07855 , 0.15883)	S: 0.866
	Promjena	14	-3.39954 (-4.11985 , -2.67922)	15	-4.04827 (-5.81540 , -2.28115)	S: 0.522
Druga kontrola	5 min	14	0.15984 (0.11490 , 0.20243)	15	0.14069 (0.10942 , 0.16101)	M: 0.407
	10 min	14	0.13641 (0.10547 , 0.16735)	15	0.11836 (0.09231 , 0.14441)	S: 0.387
	20 min	14	0.11380 (0.08649 , 0.14112)	15	0.09364 (0.07373 , 0.11355)	S: 0.248
	Promjena	14	-2.85391 (-3.60614 , -2.10169)	15	-3.11521 (-3.53144 , -2.69898)	S: 0.558
Treća kontrola	5 min	14	0.20126 (0.14069 , 0.27122)	15	0.16726 (0.11724 , 0.25324)	M: 0.541
	10 min	14	0.17000 (0.12506 , 0.21495)	15	0.16145 (0.11504 , 0.20786)	S: 0.798
	20 min	14	0.13554 (0.10202 , 0.16906)	15	0.13049 (0.08988 , 0.17109)	S: 0.853
	Promjena	14	-3.07205 (-3.53980 , -2.60429)	15	-3.07939 (-3.60549 , -2.55329)	S: 0.984
Četvrta kontrola	5 min	13	0.17430 (0.13678 , 0.25089)	14	0.12310 (0.08910 , 0.29388)	M: 0.396
	10 min	13	0.11145 (0.09322 , 0.18853)	14	0.09348 (0.06041 , 0.22134)	M: 0.396
	20 min	13	0.09413 (0.07460 , 0.15272)	14	0.06738 (0.04687 , 0.16249)	M: 0.332
	Promjena	13	-3.22065 (-3.69156 , 3.01836)	14	-3.92745 (-4.41333 , -3.70687)	M: 0.015

p<0.05

Vrijednosti nitroreduktaze pri aerobnim uslovima kultivisanja mjerene pri svim kontrolama su prikazane na grafikonu 5.



Grafikon 5. Vrijednosti nitroreduktaze pri aerobnim uslovima na različitim kontrolama prema ispitivanoj grupi

5.2.2.2. Aktivnost nitroreduktaze u anaerobnim uslovima

Ugrupi Sulfasalazin pri anaerobnim uslovima kultivisanja, aktivnost nitroreduktaze statistički značajno raste na svim kontrolama u odnosu na vrijednosti prije ispitivanja (Tabela 25, Tabela 26 i Tabela 27).

Srednje vrijednosti nitroreduktaze mjerene u 5. minuti (Tabela 26) prije ispitivanja su statistički značajno manje nego na prvoj ($p = 0.002$), drugoj ($p = 0.001$), trećoj ($p < 0.001$) i četvrtoj kontroli ($p = 0.001$). Srednje vrijednosti nitroreduktaze na drugoj kontroli su statistički značajno manje nego na trećoj kontroli ($p = 0.001$).

Tabela 25. Aktivnosti nitroreduktaze mjerena u 5. minuti pri anaerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		0.07403	0.18267	0.18072	0.23794	0.19943
Standardna devijacija		0.02078	0.08930	0.08839	0.10429	0.10811
Standardna greška aritmetičke sredine		0.00555	0.02387	0.02362	0.02787	0.02998
95% interval povjerenja	Donja granica	0.06314	0.13589	0.13441	0.18331	0.14066
	Gornja granica	0.08491	0.22945	0.22702	0.29257	0.25820
Medijana - Q2		0.06722	0.16648	0.17586	0.22705	0.15945
ANOVA test za ponovljajuća mjerenja		p < 0.001				

p<0.05

Srednje vrijednosti nitroreduktaze mjerene u 10. minuti (Tabela 26) prije ispitivanja su statistički značajno manje nego na prvoj ($p < 0.001$), drugoj ($p = 0.001$), trećoj ($p < 0.001$) i četvrtoj kontroli ($p = 0.003$). Srednje vrijednosti nitroreduktaze na drugoj kontroli su statistički značajno manje nego na trećoj kontroli ($p = 0.041$).

Tabela 26. Aktivnosti nitroreduktaze mjerena u 10. minuti pri anaerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		0.04962	0.14229	0.13146	0.16658	0.14126
Standardna devijacija		0.01659	0.06887	0.06166	0.07365	0.07583
Standardna greška aritmetičke sredine		0.00443	0.01841	0.01648	0.01968	0.02103
95% interval povjerenja	Donja granica	0.04094	0.10622	0.09916	0.12800	0.10003
	Gornja granica	0.05831	0.17836	0.16377	0.20516	0.18248
Medijana - Q2		0.04557	0.11353	0.12838	0.15546	0.11249
Friedman test za više uparenih uzoraka		p < 0.001				

p<0.05

Srednje vrijednosti nitroreduktazemjerene u 20. minuti (Tabela 27) prije ispitivanja su statistički značajno manje nego na prvoj ($p < 0.001$), drugoj ($p = 0.002$), trećoj ($p < 0.001$) i četvrtoj kontroli ($p = 0.003$).

Tabela 27. Aktivnosti nitroreduktaze mjerena u 20. minuti pri anaerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		0.03981	0.11771	0.10490	0.13713	0.11213
Standardna devijacija		0.01571	0.05479	0.05198	0.06694	0.05853
Standardna greška aritmetičke sredine		0.00420	0.01464	0.01389	0.01789	0.01623
95% interval povjerenja	Donja granica	0.03158	0.08901	0.07767	0.10207	0.08032
	Gornja granica	0.04804	0.14641	0.13213	0.17219	0.14395
Medijana - Q2		0.03613	0.11523	0.08007	0.12109	0.09413
Friedman test za više uparenih uzoraka		p < 0.001				

$p < 0.05$

Pri poređenju vrijednosti procentualne promjene nitroreduktaze u anaerobnim uslovima unutar grupe Sulfasalazin, se uočava statistički značajna razlika ($p = 0.035$) između kontrola (Tabela 28). Procentualna promjena nitroreduktaze na mjerenju prije tretmana u svakoj minuti pokazuje smanjenje za 4.113%, a na 1., 2., 3. i 4. kontroli 2.75 %, 3.5 %, 3.38 % i 3.47 %.

Srednje vrijednosti procentualnog sniženjanitroreduktaze po minutu prije ispitivanja su statistički značajno veće nego na prvoj kontroli ($p = 0.035$).

Tabela 28. Procentualna promjena nitroreduktaze po minutu u anaerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		-3.90660	-2.63112	-3.36602	-3.48171	-3.51952
Standardna devijacija		1.27408	1.62892	1.43250	0.86951	0.89596
Standardna greška aritmetičke sredine		0.34051	0.43535	0.38285	0.23239	0.24849
95% interval povjerenja	Donja granica	-4.57400	-3.48440	-4.11641	-3.93719	-4.00657
	Gornja granica	-3.23919	-1.77784	-2.61563	-3.02624	-3.03247
Medijana - Q2		-4.11377	-2.75319	-3.50405	-3.38542	-3.47015
Friedman test za više uparenih uzoraka		p 0.035				

$p < 0.05$

I ugrupi Sulfasalazin i probiotik pri anaerobnim uslovima kultivisanja, aktivnost nitroreduktaze raste kroz kontrole u odnosu na vrijednosti prije ispitivanja (Tabela 29, Tabela 30, Tabela 31.). Prisutna je statistički značajna razlika kod većine mjerenih vrijednosti nitroreduktaze prije ispitivanja i na kontrolama. Takođe je uočljiv i pad aktivnosti enzima na drugoj i četvrtoj kontroli u odnosu na 1. i 3. kontrolu.

Srednje vrijednosti nitroreduktaze mjerene u 5. minuti (Tabela 29), prije ispitivanja su statistički značajno manje nego na prvoj ($p = 0.011$), trećoj ($p = 0.027$) i četvrtoj kontroli ($p = 0.022$).

Tabela 29. Aktivnosti nitroreduktaze mjerena u 5. minuti pri anaerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	15	14
Aritmetička sredina		0.09749	0.21822	0.15434	0.21452	0.21589
Standardna devijacija		0.08809	0.13405	0.06807	0.12576	0.18999
Standardna greška aritmetičke sredine		0.02274	0.03461	0.01758	0.03247	0.05078
95% interval povjerenja	Donja granica	0.05291	0.15038	0.11989	0.15088	0.11637
	Gornja granica	0.14207	0.28606	0.18879	0.27817	0.31541
Medijana - Q2		0.06175	0.21416	0.14694	0.16101	0.12467
Treći kvartil - Q3		0.08519	0.30170	0.18758	0.27903	0.30951
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.007				

$p < 0.05$

Srednje vrijednosti nitroreduktaze mjerene u 10. minuti (Tabela 30) prije ispitivanja su statistički značajno manje nego na prvoj ($p=0.004$), drugoj ($p=0.009$), trećoj ($p=0.006$) i četvrtoj kontroli ($p=0.002$).

Tabela 30. Aktivnosti nitroreduktaze mjerena u 10. minuti pri anaerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	15	14
Aritmetička sredina		0.05330	0.16909	0.11607	0.15464	0.14995
Standardna devijacija		0.05067	0.09770	0.05019	0.09495	0.13221
Standardna greška aritmetičke sredine		0.01308	0.02523	0.01296	0.02452	0.03533
95% interval povjerenja	Donja granica	0.02765	0.11964	0.09067	0.10659	0.08070
	Gornja granica	0.07894	0.21853	0.14147	0.20270	0.21921
Medijana - Q2		0.04323	0.15832	0.11197	0.12812	0.09010
Friedman test za više uparenih uzoraka		p < 0.001				

$p < 0.05$

Srednje vrijednosti nitroreduktaze mjerene u 20. minuti (Tabela 31) prije ispitivanja su statistički značajno manje nego na prvoj ($p=0.020$), trećoj ($p=0.036$) i četvrtoj kontroli ($p=0.013$). Srednje vrijednosti nitroreduktaze na drugoj kontroli su statistički značajno manje nego na trećoj kontroli ($p=0.025$).

Tabela 31. Aktivnosti nitroreduktaze mjerena u 20. minuti pri anaerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	15	14
Aritmetička sredina		0.05797	0.13731	0.09315	0.12635	0.11249
Standardna devijacija		0.07587	0.08611	0.04034	0.07132	0.09097
Standardna greška aritmetičke sredine		0.01959	0.02223	0.01042	0.01841	0.02431
95% interval povjerenja	Donja granica	0.01957	0.09373	0.07273	0.09025	0.06484
	Gornja granica	0.09636	0.18089	0.11356	0.16244	0.16014
Medijana - Q2		0.02969	0.11874	0.08476	0.10624	0.07070
Friedman test za više uparenih uzoraka		p 0.002				

$p < 0.05$

Pri poređenju vrijednosti procentualne promjene nitroreduktaze u anaerobnim uslovima unutar grupe Sulfasalazin i probiotik, se uočava statistički značajna razlika ($p=0.036$) između kontrola (Tabela 32). Procentualna promjena nitroreduktaze na mjerenju prije tretmana u svakoj minuti pokazuje smanjenje za 4.388 %, a na 1., 2., 3. i 4. kontroli 2.972 %, 3.166 %, 3.215 % i 3.772 %.

Srednje vrijednosti procentualnog sniženjanitroreduktaze po minutu prije ispitivanja su statistički značajno veće nego na drugoj kontroli ($p= 0.036$) i na trećoj kontroli ($p= 0.031$).

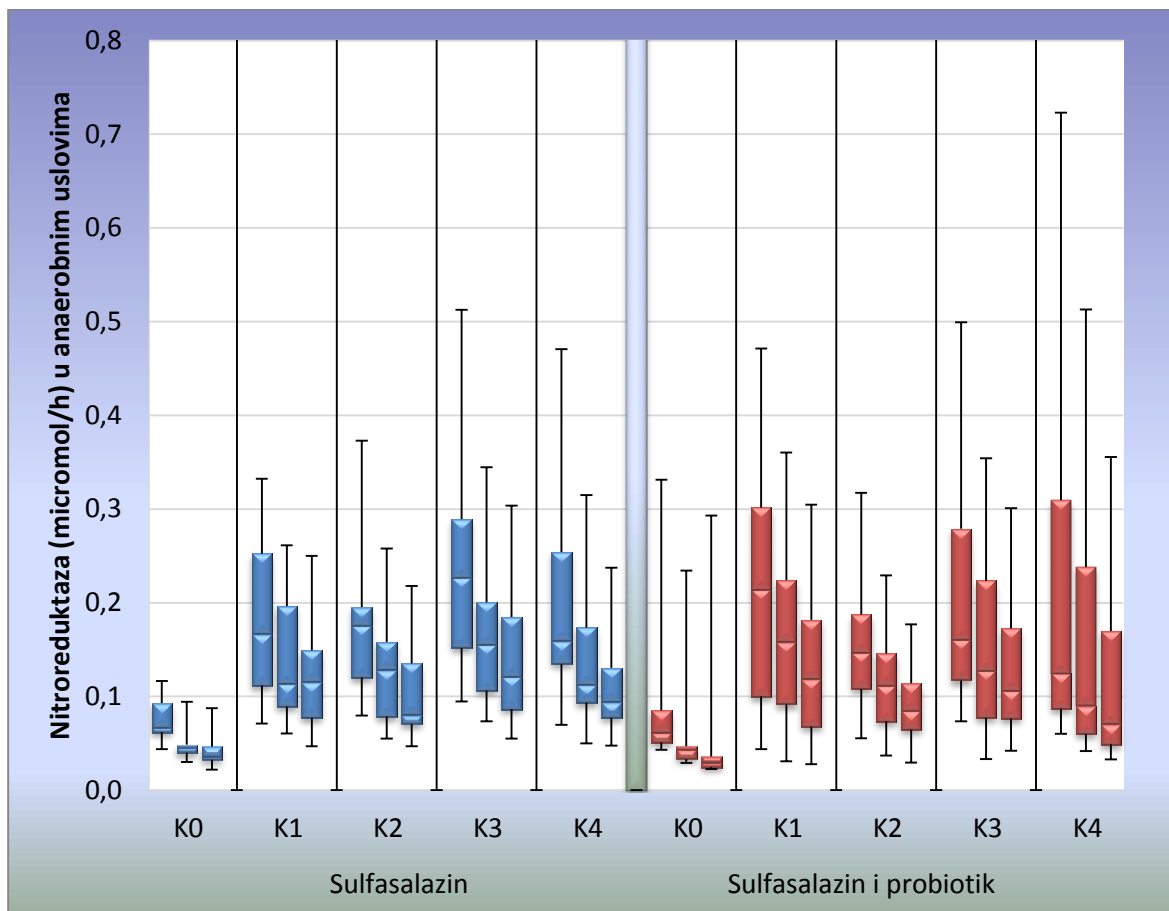
Tabela 32. Procentualna promjena nitroreduktaze po minutu u anaerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	15	14
Aritmetička sredina		-3.88906	-2.97280	-3.16624	-3.21530	-3.77243
Standardna devijacija		5.26913	1.79124	1.28167	1.27604	1.06593
Standardna greška aritmetičke sredine		1.36048	0.46250	0.33093	0.32947	0.28488
95% interval povjerenja	Donja granica	-6.55561	-3.87929	-3.81486	-3.86106	-4.33080
	Gornja granica	-1.22251	-2.06631	-2.51763	-2.56954	-3.21407
Medijana - Q2		-4.38810	-3.24383	-3.50819	-3.54241	-3.61284
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.036				

$p < 0.05$

Razlike u srednjim vrijednostima nitroreduktaze u anaerobnim uslovima između ispitivanih grupa nisu bile statistički značajne ni u jednom mjerenju prije ispitivanja, kao ni na jednom mjerenju na kontrolama (vidi Prilozi-Prilog 11.).

Vrijednosti nitroreduktaze pri anaerobnim uslovima kultivisanja mjerene pri svim kontrolama su prikazane na grafikonu 6.



Grafikon 6. Vrijednosti nitroreduktaze pri anaerobnim uslovima na različitim kontrolama prema ispitivanoj grupi

5.2.3 Betaglukozydaza esej

Aktivnost enzima betaglukozydaze je iskazana u mikromolovima p-nitrofenola stvorenog po gramu fekalne suspenzije na sat ($\mu\text{mol/g}$).

5.2.3.1 Aktivnost betaglukozydaze u aerobnim uslovima

U grupi Sulfasalazin pri aerobnim uslovima kultivisanja uočavamo pad aktivnosti betaglukozydaze na svim kontrolama u odnosu na vrijednosti prije ispitivanja (Tabela 33, Tabela 34 i Tabela 35). Srednje vrijednosti betaglukozydaze mjerene u 5. minuti (Tabela 33) prije ispitivanja su statistički

značajno veće nego na trećoj kontroli ($p = 0.026$) i na četvrtoj kontroli ($p = 0.003$).

Tabela 33. Aktivnosti betaglukozidaze mjerena u 5. minuti pri aerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		2.83233	2.45737	1.96397	1.77374	1.49692
Standardna devijacija		1.42625	2.28838	1.52321	0.85105	0.52979
Standardna greška aritmetičke sredine		0.38118	0.61160	0.40709	0.22745	0.14694
95% interval povjerenja	Donja granica	2.08521	1.25864	1.16606	1.32793	1.20893
	Gornja granica	3.57944	3.65610	2.76187	2.21954	1.78491
Medijana - Q2		2.70665	1.45094	1.52686	1.61122	1.48709
Friedman test za više uparenih uzoraka		p 0.043				

$p < 0.05$

Srednje vrijednosti betaglukozidaze mjerene u 10. (Tabela 34) i 20. minuti (Tabela 35) na kontrolama opadaju u odnosu na vrijednosti prije ispitivanja, ali između njih nema statistički značajne razlike.

Tabela 34. Aktivnosti betaglukozidaze mjerena u 10. minuti pri aerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		1.28954	1.14786	0.96287	0.87955	0.74633
Standardna devijacija		0.66556	1.00732	0.74747	0.41123	0.25826
Standardna greška aritmetičke sredine		0.17788	0.26922	0.19977	0.10991	0.07163
95% interval povjerenja	Donja granica	0.94090	0.62019	0.57133	0.66414	0.60593
	Gornja granica	1.63818	1.67552	1.35442	1.09497	0.88672
Medijana - Q2		1.20148	0.75741	0.72668	0.78633	0.79898
Friedman test za više uparenih uzoraka		p 0.098				

$p < 0.05$

Tabela 35. Aktivnosti betaglukozydaze mjerena u 20. minuti pri aerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		13	14	14	14	13
Aritmetička sredina		0.72222	0.54001	0.56153	0.57122	0.48833
Standardna devijacija		0.33533	0.22237	0.26390	0.26297	0.17517
Standardna greška aritmetičke sredine		0.09300	0.05943	0.07053	0.07028	0.04858
95% interval povjerenja	Donja granica	0.53993	0.42353	0.42328	0.43347	0.39311
	Gornja granica	0.90450	0.65650	0.69977	0.70897	0.58356
Medijana - Q2		0.75088	0.52321	0.50554	0.47582	0.49630
ANOVA test za ponovljajuća mjerenja		p				
		0.338				

p<0.05

Pri poređenju vrijednosti procentualne promjene betaglukozydaze u aerobnim uslovima unutar grupe Sulfasalazin, ne uočava se statistički značajna razlika ($p=0.842$) između kontrola (vidi Prilozi-Prilog 12). Procentualna promjena betaglukozydaze na mjerenju prije tretmana u svakoj minuti pokazuje smanjenje za 8.621 %, a na 1., 2., 3. i 4. kontroli 7.905 %, 7.047 %, 6.792 % i 6.799%.

I u grupi Sulfasalazin i probiotik pri aerobnim uslovima kultivisanja uočavamo pad aktivnosti betaglukozydaze na svim kontrolama u odnosu na vrijednosti prije ispitivanja (vidi Prilozi-Prilog 13, 14 i 15) ali bez statističke značajnosti ($p=0.106$, $p=0.216$, $p=0.110$).

Pri poređenju vrijednosti procentualne promjene betaglukozydaze u aerobnim uslovima ni unutar grupe Sulfasalazin i probiotik, se ne uočava statistički značajna razlika ($p=0.842$) između kontrola (vidi Prilozi-Prilog 16.). Procentualna promjena betaglukozydaze na mjerenju prije tretmana u svakoj minuti pokazuje smanjenje za 8.227 %, a na 1., 2., 3. i 4. kontroli 7.139 %, 7.388 %, 6.588 % i 6.951%.

Nakon poređenja aktivnosti betaglukoze izmeđ u grupa pri aerobnim uslovima, uočili smo statistički značajnu razliku u trećoj kontroli na mjerenjima u 5. i 10. minuti. Pokazatelji enzimske aktivnosti u grupi Sulfasalazin su bili statistički značajno veći od onih u grupi Sulfasalazin i probiotik (Tabela 36).

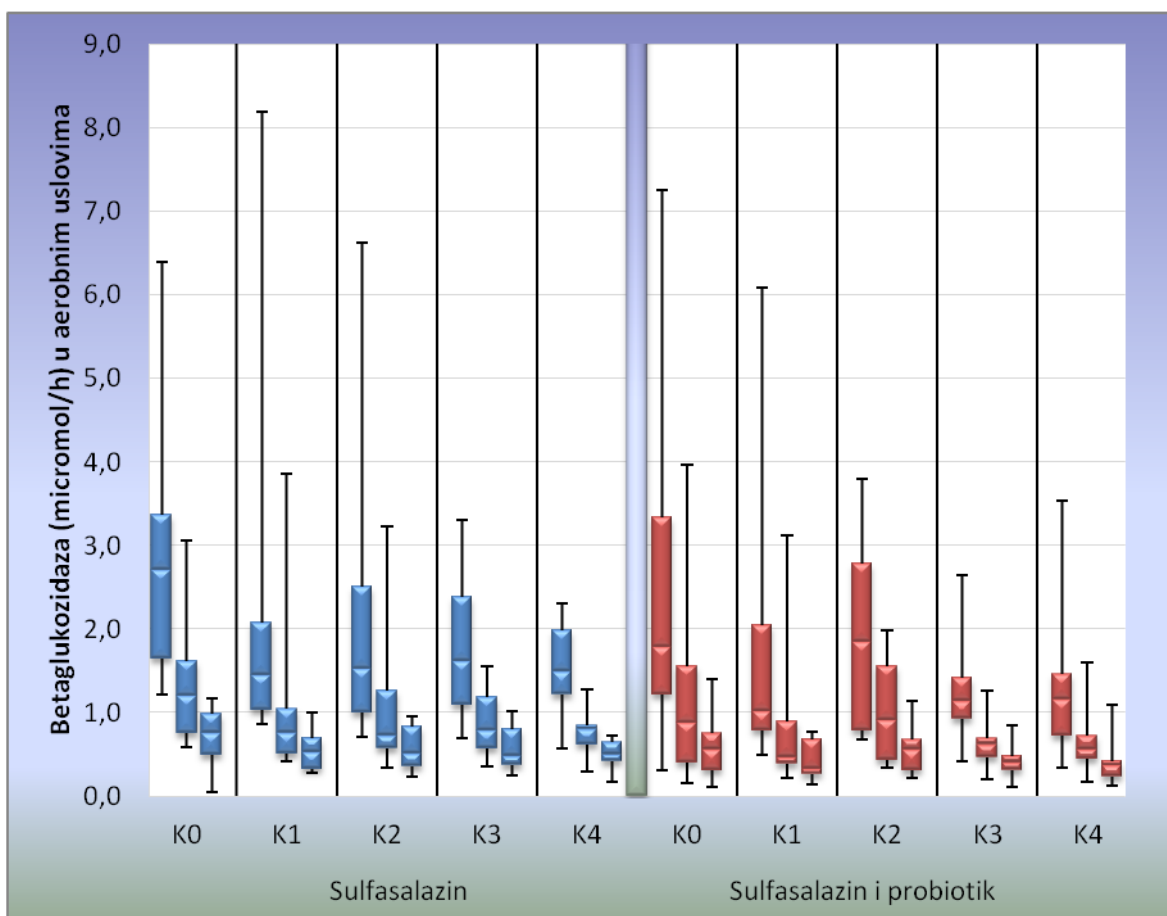
Tabela 36. Poređenje aktivnosti betaglukoze u aerobnim uslovima izmeđ u grupa

	Mjerenje	Sulfasalazin		Sulfasalazin i probiotik		p
		n	Srednja vrijednost	n	Srednja vrijednost	
Prije ispitivanja	5 min	14	2.83233 (2.08521 , 3.57944)	15	2.50098 (1.56482 , 3.43715)	0.595
	10 min	14	1.28954 (0.94090 , 1.63818)	15	1.14099 (0.65072 , 1.63126)	0.637
	20 min	13	0.72222 (0.53993 , 0.90450)	15	0.59187 (0.40591 , 0.77783)	0.339
	Promjena	14	-6.88113 (-7.18304 , -6.48754)	15	-6.77325 (-7.89605 , -6.53124)	1.000
Prva kontrola	5 min	14	1.45094 (1.02434 , 2.07277)	15	1.01228 (0.78090 , 2.04867)	0.163
	10 min	14	0.75741 (0.50373 , 1.03880)	15	0.46276 (0.38804 , 0.88936)	0.102
	20 min	14	0.52321 (0.31641 , 0.69707)	15	0.32605 (0.26100 , 0.67619)	0.116
	Promjena	14	-6.65770 (-9.31090 , -6.45244)	15	-6.58910 (-7.94279 , -6.40284)	0.896
Druga kontrola	5 min	14	1.52686 (1.00023 , 2.51143)	15	1.85103 (0.79055 , 2.78137)	0.896
	10 min	14	0.72668 (0.57724 , 1.25692)	15	0.90985 (0.43504 , 1.55819)	0.616
	20 min	14	0.56153 (0.42328 , 0.69977)	14	0.54064 (0.40854 , 0.67275)	0.832
	Promjena	14	-6.73468 (-7.05649 , -6.57415)	15	-6.78315 (-7.18807 , -5.81026)	0.727
Treća kontrola	5 min	14	1.77374 (1.32793 , 2.21954)	14	1.19443 (0.91794 , 1.47092)	0.042
	10 min	14	0.87955 (0.66414 , 1.09497)	14	0.59893 (0.46721 , 0.73066)	0.041
	20 min	14	0.57122 (0.43347 , 0.70897)	14	0.40326 (0.31364 , 0.49288)	0.057
	Promjena	14	-6.79204 (-7.02245 , -6.56162)	14	-6.58891 (-6.94566 , -6.23216)	0.357
Četvrta kontrola	5 min	13	1.49692 (1.20893 , 1.78491)	14	1.26415 (0.84565 , 1.68265)	0.385
	10 min	13	0.74633 (0.60593 , 0.88672)	14	0.61331 (0.42827 , 0.79835)	0.278

20 min	13	0.49630 (0.41359 , 0.64166)	14	0.36259 (0.23129 , 0.42242)	0.073
Promjena	13	-6.79952 (-7.47540 , -6.12364)	14	-6.95112 (-7.58440 , -6.31783)	0.751

p<0.05

Vrijednosti betaglukoizidaze pri aerobnim uslovima kultivisanja mjerene pri svim kontrolama su prikazane na grafikonu 7.



Grafikon 7. Vrijednosti betaglukoizidaze pri aerobnim uslovima na različitim kontrolama prema ispitivanoj grupi

5.2.3.2 Aktivnost betaglukoizidaze u anaerobnim uslovima

Aktivnost betaglukoizidaze u anaerobnim uslovima u grupi Sulfasalazin, na svim kontrolama opada u odnosu na vrijednosti prije tretmana (vidi Prilozi-Prilog 17 i 18) ali je pad statistički

značajan ($p=0.037$) samo na mjerenju u 10. minuti (Tabela 37). Srednje vrijednosti betaglukoizidaze prije ispitivanja su statistički značajno veće nego na trećoj kontroli ($p= 0.022$) i na četvrtoj kontroli ($p= 0.003$).

Tabela 37. Aktivnosti betaglukoizidaze mjerena u 10. minuti pri anaerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Standardna devijacija		0.76799	1.09781	0.72310	0.41199	0.26060
Standardna greška aritmetičke sredine		0.20525	0.29340	0.19326	0.11011	0.07228
95% interval povjerenja	Donja granica	0.97307	0.65362	0.57824	0.66925	0.55349
	Gornja granica	1.77766	1.80376	1.33580	1.10087	0.83682
Medijana - Q2		1.37080	0.81525	0.71944	0.77669	0.68570
Treći kvartil - Q3		1.62930	1.23643	1.33766	1.18702	0.79657
Maksimum		3.62615	3.85873	3.08626	1.56663	1.22438
Friedman test za više uparenih uzoraka		p 0.037				

$p<0.05$

I u anaerobnim uslovima kultivisanja u grupi Sulfasalazin pri poređenju vrijednosti procentualne promjene betaglukoizidaze, ne uočava se statistički značajna razlika ($p=0.587$) između kontrola (vidi prilozi-Prilog 19). Procentualna promjena betaglukoizidaze na mjerenju prije tretmana u svakoj minuti pokazuje smanjenje za 6.905 %, a na 1., 2., 3. i 4. kontroli 7.572 %, 6.637 %, 7.209 % i 6.575 %.

Aktivnost betaglukoizidaze pri anaerobnim uslovima u grupi Sulfasalazin i probiotik, na svim kontrolama opada u odnosu na vrijednosti prije tretmana (vidi Prilozi-Prilog 20, 21 i 22) ali bez statistički značajnih razlika ($p= 0.374$, $p= 0.122$, $p= 0.082$).

U anaerobnim uslovima kultivisanja u grupi Sulfasalazin i probiotik pri poređenju vrijednosti procentualne promjene betaglukoizidaze, ne uočava se statistički značajna razlika ($p=0.903$) između kontrola (vidi Prilozi-Prilog 23). Procentualna promjena betaglukoizidaze na mjerenju prije tretmana u svakoj minuti pokazuje smanjenje za 6.901 %, a na 1., 2., 3. i 4. kontroli 6.802%, 7.113 %, 6.502 % i 6.799 %

Pri poređenju vrijednosti betaglukoizidaze između grupa pri anaerobnim uslovima, opet, samo na

3. kontroli uočavamo statistički značajnu razliku na mjeranjima u 5. i 10. minuti. Dobijene vrijednosti u grupi Sulfasalazin su statistički značajno veće od onih u grupi Sulfasalazin i probiotik. Istu sliku imamo i na 4. kontroli na mjeranju u 20. minuti gdje je srednja vrijednost betaglukozydaze kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin statistički značajno veća nego kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik (Tabela 38.).

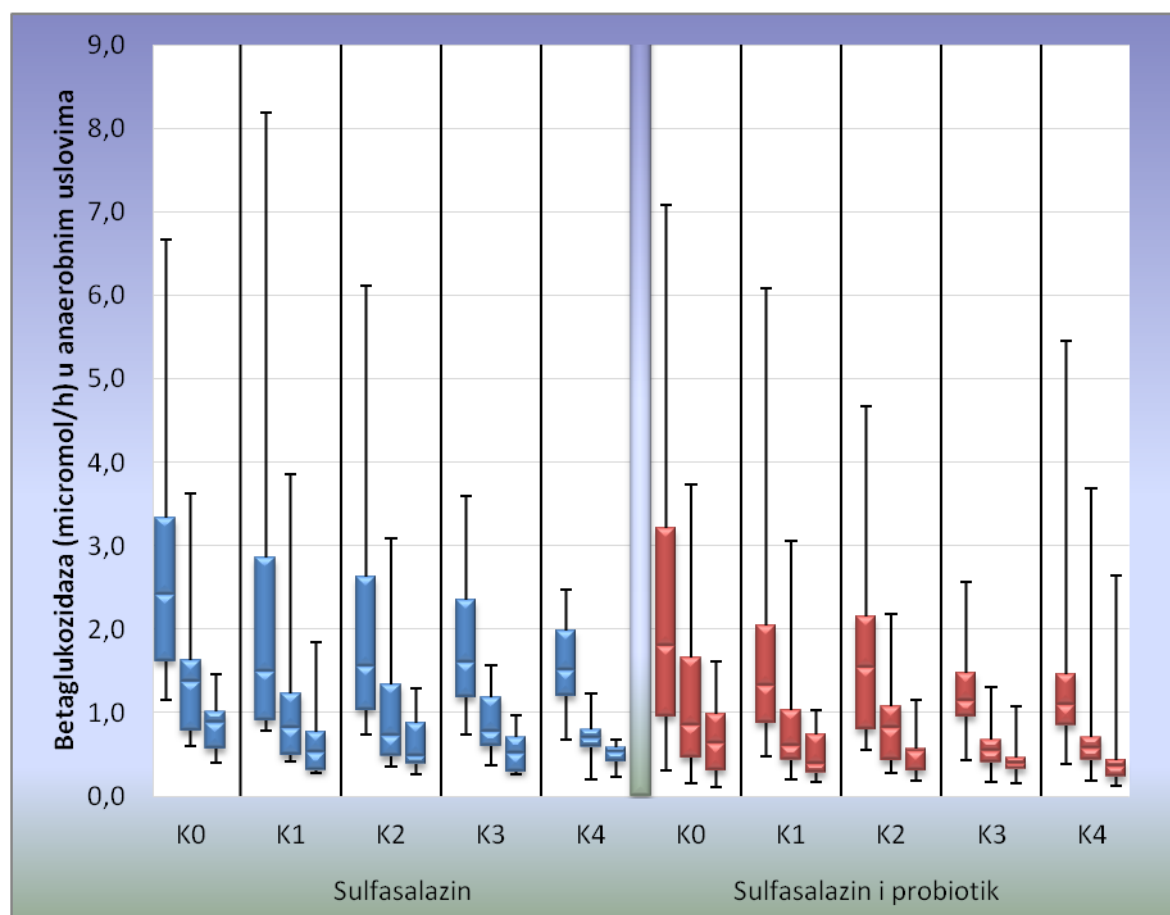
Tabela 38. Poređenje aktivnosti betaglukozydaze u anaerobnim uslovima između grupa

	Mjerenje	Sulfasalazin		Sulfasalazin i probiotik		p
		n	Srednja vrijednost	n	Srednja vrijednost	
Prije ispitivanja	5 min	14	2.67894 (1.92394 , 3.43393)	15	2.33082 (1.43723 , 3.22442)	0.567
	10 min	14	1.37080 (0.77729 , 1.62930)	15	0.85080 (0.45553 , 1.66063)	0.295
	20 min	14	0.81645 (0.66176 , 0.97113)	15	0.71019 (0.47965 , 0.94073)	0.466
	Promjena	14	-6.85206 (-6.96283 , -6.30055)	15	-6.62551 (-7.34967 , -6.16998)	0.541
Prva kontrola	5 min	14	1.49673 (0.90624 , 2.86332)	15	1.32320 (0.87972 , 2.05108)	0.432
	10 min	14	0.81525 (0.50012 , 1.23643)	15	0.60255 (0.43504 , 1.02795)	0.247
	20 min	14	0.61665 (0.40046 , 0.83284)	15	0.51402 (0.36604 , 0.66201)	0.444
	Promjena	14	-6.54659 (-9.10584 , -6.34519)	15	-6.49217 (-6.98344 , -6.30368)	0.631
Druga kontrola	5 min	14	1.97327 (1.22824 , 2.71830)	15	1.75559 (1.16915 , 2.34203)	0.654
	10 min	14	0.71944 (0.48204 , 1.33766)	15	0.80983 (0.43504 , 1.07013)	0.861
	20 min	14	0.48225 (0.39030 , 0.88018)	14	0.53887 (0.30196 , 0.57420)	0.448
	Promjena	14	-6.64638 (-6.83454 , -6.16020)	15	-6.31396 (-7.01537 , -5.99891)	0.793
Treća kontrola	5 min	14	1.80627 (1.34516 , 2.26738)	14	1.21061 (0.94017 , 1.48105)	0.040
	10 min	14	0.88506 (0.66925 , 1.10087)	14	0.58129 (0.43936 , 0.72322)	0.031
	20 min	14	0.51397 (0.29553 , 0.70671)	14	0.38146 (0.32043 , 0.45535)	0.215
	Promjena	14	-7.20990 (-7.78694 , -6.63285)	14	-6.50220 (-6.88004 , -6.12435)	0.055
Četvrta kontrola	5 min	13	1.50396 (1.20269 , 1.97877)	14	1.08580 (0.84357 , 1.46058)	0.109

	10 min	13	0.68570 (0.59170 , 0.79657)	14	0.56700 (0.43384 , 0.70619)	0.286
	20 min	13	0.52602 (0.41278 , 0.59026)	14	0.35014 (0.23129 , 0.43688)	0.047
	Promjena	13	-6.57566 (-6.88668 , -6.26465)	14	-6.79927 (-7.60860 , -5.98994)	0.620

p<0.05

Vrijednosti betaglukozidaze pri anaerobnim uslovima kultivisanja mjerene pri svim kontrolama su prikazane na grafikonu 8.



Grafikon 8. Vrijednosti betaglukozidaze pri anaerobnim uslovima na različitim kontrolama prema ispitivanoj grupi

5.2.4 Betaglukuronidaza esej

Aktivnost enzima betaglukuronidaze je iskazana u mikromolovima p-nitrofenola stvorenog po gramu fekalne suspenzije na sat ($\mu\text{mol/g}$).

5.2.4.1 Aktivnost betaglukuronidaze u aerobnim uslovima

Aktivnost betaglukuronidaze pri aerobnim uslovima kultivisanja u grupi Sulfasalazin, na svim kontrolama opada u odnosu na vrijednosti prije tretmana ali bez statistički značajnih razlika na mjerenjima u 5. i 10. minuti (vidi Prilozi-Prilog 24 i 25). Statistički značajna promjena ($p=0.041$) vrijednosti postoji samo na mjerenju u 20. minuti (Tabela 39) gdje susrednje vrijednosti betaglukuronidaze prije ispitivanja statistički značajno veće nego na prvoj ($p=0.042$) i četvrtoj kontroli ($p=0.005$).

Tabela 39. Aktivnosti betaglukuronidaze mjerena u 20. minuti pri aerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		0.92555	0.64132	0.65038	0.64797	0.54931
Standardna devijacija		0.40098	0.28277	0.33057	0.28658	0.21353
Standardna greška aritmetičke sredine		0.10717	0.07557	0.08835	0.07659	0.05922
95% interval povjerenja	Donja granica	0.71550	0.49319	0.47722	0.49785	0.43323
	Gornja granica	1.13560	0.78944	0.82355	0.79809	0.66538
Medijana - Q2		1.01951	0.63082	0.58464	0.61837	0.65371
ANOVA test za ponovljajuća mjerenja		p				
		0.041				

$p<0.05$

Pri poređenju vrijednosti procentualne promjene betaglukuronidaze u aerobnim uslovima unutar grupe Sulfasalazin, ne uočava se statistički značajna razlika ($p=0.382$) između kontrola (vidi Prilozi-Prilog 26). Procentualna promjena betaglukuronidaze na mjerenju prije tretmana u svakoj minuti pokazuje smanjenje za 9.884 %, a na 1., 2., 3. i 4. kontroli 8.152 %, 7.155 %, 6.585 % i 6.865 %.

I u grupi Sulfasalazin i probiotik je uočljiv pad aktivnosti betaglukuronidaze u svim mjerenjima a statistički je značajan ($p=0.050$, $p=0.029$) u 10. i 20. minuti (Tabela 40 i Tabela 41).

U 5. minuti pad nije statistički značajan (vidi Prilozi-Prilog 27).

U 10. minuti (Tabela 40) je uočljiv statistički značajan pad na trećoj ($p=0.036$) i na četvrtoj kontroli ($p=0.026$) u odnosu na vrijednosti betaglukuronidaze prije ispitivanja. Srednje vrijednosti betaglukuronidaze na drugoj kontroli su statistički značajno veće nego na četvrtoj kontroli ($p=0.048$).

Tabela 40. Aktivnosti betaglukuronidaze mjerena u 10. minuti pri aerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	15	14
Aritmetička sredina		1.48308	1.03928	1.14742	0.70522	0.65867
Standardna devijacija		1.21184	1.02322	0.76779	0.27397	0.43623
Standardna greška aritmetičke sredine		0.31290	0.26419	0.19824	0.07074	0.11659
95% interval povjerenja	Donja granica	0.86980	0.52146	0.75886	0.56658	0.43016
	Gornja granica	2.09635	1.55710	1.53597	0.84387	0.88718
Medijana - Q2		1.07615	0.82429	1.13400	0.63750	0.65557
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.050				

p<0.05

U 20. minuti (Tabela 41) je uočljiv statistički značajan pad na trećoj kontroli (p= 0.006) i na četvrtoj kontroli (p= 0.036) u odnosu na vrijednosti betaglukuronidaze prije ispitivanja. Srednje vrijednosti betaglukuronidaze na prvoj kontroli su statistički značajno veće nego na četvrtoj kontroli (p= 0.025).

Tabela 41. Aktivnosti betaglukuronidaze mjerena u 20. minuti pri aerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	15	14
Aritmetička sredina		0.83290	0.61334	0.59460	0.43168	0.45976
Standardna devijacija		0.48580	0.26088	0.36279	0.21800	0.28529
Standardna greška aritmetičke sredine		0.12543	0.06736	0.09367	0.05629	0.07625
95% interval povjerenja	Donja granica	0.58705	0.48132	0.41100	0.32136	0.31032
	Gornja granica	1.07875	0.74536	0.77820	0.54201	0.60921
Medijana - Q2		0.72839	0.55413	0.62078	0.41921	0.44852
ANOVA test za ponovljajuća mjerenja		p				
		0.029				

p<0.05

U aerobnim uslovima kultivisanja u grupi Sulfasalazin i probiotik pri poređenju vrijednosti procentualne promjene betaglukuronidaze, nema statistički značajne razlike (p=0.725) između kontrola (vidi Prilozi-Prilog28.). Procentualna promjena betaglukuronidaze na mjerenju prije tretmana u svakoj minuti pokazuje smanjenje za 7.113 %, a na 1., 2., 3. i 4. kontroli 6.873 %, 9.306 %, 9.306% i 6.482 %.

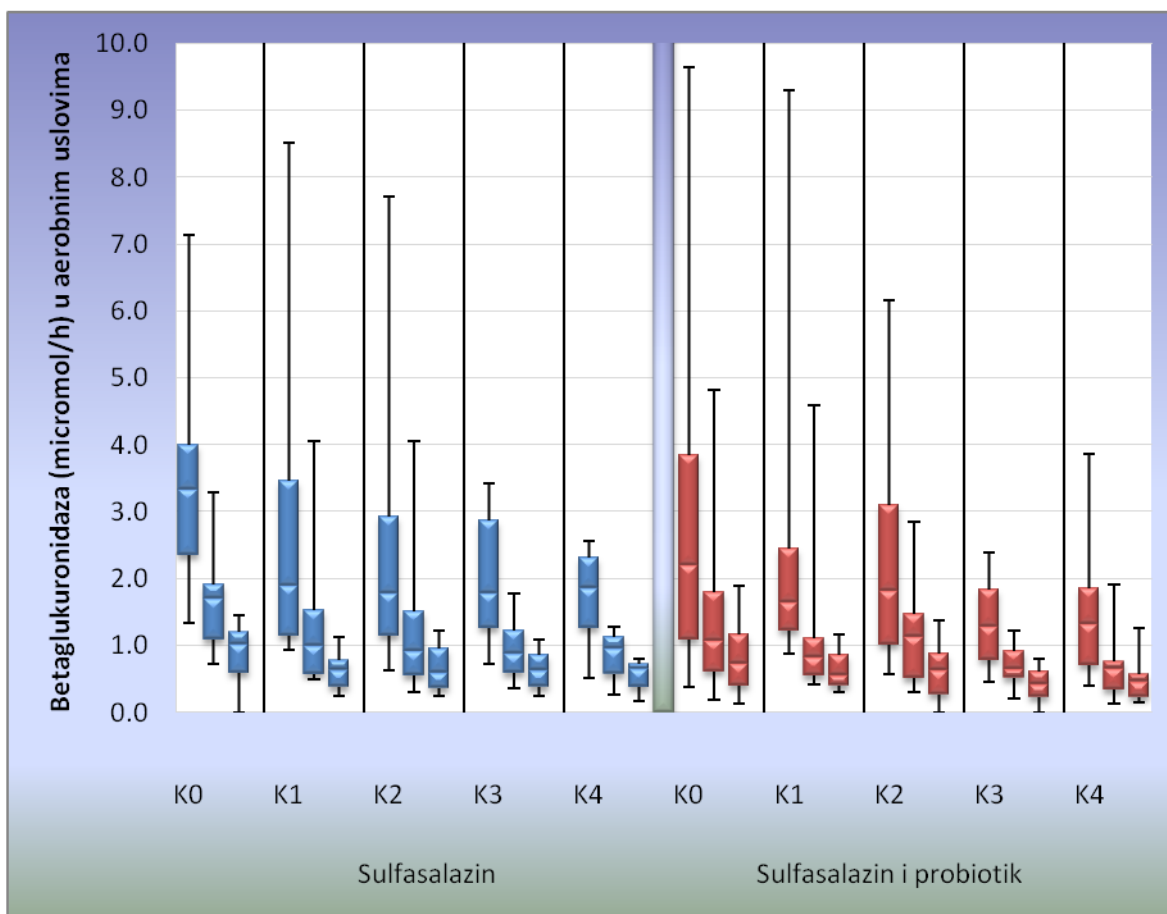
Pri poređenju aktivnosti betaglukuronidaze između grupa pri aerobnim uslovima, postoje statistički značajne razlike na mjerenjima u 5. i 20. minutina trećoj i četvrtoj kontroli (Tabela 42).

Tabela 42. Poređenje aktivnosti betaglukuronidaze u aerobnim uslovima između grupa

	Mjerenje	Sulfasalazin		Sulfasalazin i probiotik		<i>p</i>
		n	Srednja vrijednost	n	Srednja vrijednost	
Prije ispitivanja	5 min	14	3.28149 (2.48179 , 4.08119)	15	3.03701 (1.79411 , 4.27992)	0.752
	10 min	14	1.59495 (1.24098 , 1.94892)	15	1.48308 (0.86980 , 2.09635)	0.764
	20 min	14	0.92555 (0.71550 , 1.13560)	15	0.83290 (0.58705 , 1.07875)	0.582
	Promjena	14	-6.63416 (-7.04464 , -5.67678)	15	-6.66282 (-7.20411 , -6.24428)	0.896
Prva kontrola	5 min	14	1.89321 (1.13761 , 3.45864)	15	1.63894 (1.22679 , 2.44876)	0.600
	10 min	14	0.99481 (0.56881 , 1.52204)	15	0.82429 (0.55194 , 1.11351)	0.337
	20 min	14	0.64132 (0.49319 , 0.78944)	15	0.61334 (0.48132 , 0.74536)	0.784
	Promjena	14	-6.61550 (-8.52790 , -6.24740)	15	-6.50778 (-6.97057 , -6.01414)	0.315
Druga kontrola	5 min	14	1.77752 (1.14002 , 2.91634)	15	1.81247 (1.01228 , 3.09229)	0.965
	10 min	14	1.18599 (0.69162 , 1.68036)	15	1.14742 (0.75886 , 1.53597)	0.904
	20 min	14	0.65038 (0.47722 , 0.82355)	15	0.59460 (0.41100 , 0.77820)	0.669
	Promjena	14	-6.59499 (-6.92201 , -6.27732)	15	-6.50729 (-6.99509 , -6.15041)	0.896
Treća kontrola	5 min	14	1.96380 (1.48367 , 2.44392)	15	1.35807 (1.06878 , 1.64735)	0.046
	10 min	14	0.96408 (0.72982 , 1.19834)	15	0.70522 (0.56658 , 0.84387)	0.069
	20 min	14	0.64797 (0.49785 , 0.79809)	15	0.43168 (0.32136 , 0.54201)	0.030
	Promjena	14	-6.63138 (-6.72940 , -6.39701)	15	-6.54120 (-6.70043 , -6.30956)	0.663
Četvrta kontrola	5 min	13	1.71514 (1.35161 , 2.07866)	14	1.39017 (0.91961 , 1.86073)	0.300
	10 min	13	0.85154 (0.66363 , 1.03945)	14	0.65867 (0.43016 , 0.88718)	0.217
	20 min	13	0.54931 (0.43323 , 0.66538)	14	0.45976 (0.31032 , 0.60921)	0.368
	Promjena	13	-6.86523 (-7.07856 , -6.65190)	14	-6.48272 (-6.75522 , -6.21023)	0.042

p<0.05

Vrijednosti betaglukuronidaze pri aerobnim uslovima kultivisanja mjerene pri svim kontrolama su prikazane na grafikonu 9.



Grafikon 9. Vrijednosti betaglukuronidaze pri aerobnim uslovima na različitim kontrolama prema ispitivanoj grupi

5.2.4.2 Aktivnost betaglukuronidaze u anaerobnim uslovima

U grupi Sulfasalazin pri anaerobnim uslovima kultivisanja uočavamo pad aktivnosti betaglukuronidaze na svim kontrolama u odnosu na vrijednosti prije ispitivanja (vidi Prilozi-Prilog 29, 30 i 31) ali taj pad aktivnosti nije bio statistički značajan ($p=0.063$, $p=0.120$, $p=0.127$). U anaerobnim uslovima kultivisanja u grupi Sulfasalazin pri poređenju vrijednosti procentualne promjene betaglukuronidaze, nema statistički značajne razlike ($p=0.390$) između kontrola (vidi Prilozi-Prilog 32). Procentualna promjena betaglukuronidaze na mjerenju prije tretmana u svakoj minuti pokazuje smanjenje za 10.121 %, a na 1., 2., 3. i 4. kontroli 7.244%, 6.811%, 6.759% i 6.826 %.

U grupi Sulfasalazin i probiotik pri anaerobnim uslovima kultivisanja uočavamo pad aktivnosti betaglukuronidaze na svim kontrolama u odnosu na vrijednosti prije ispitivanja (Tabela 43, Tabela 44 i Tabela 45) koji je statistički značajan pri svim tačakam mjerenja ($p=0.019$, $p=0.023$, $p=0.011$).

U 5. minuti je (Tabela 43) uočljiv statistički značajan pad na trećoj kontroli ($p=0.023$) i četvrtoj kontroli ($p=0.035$) u odnosu na vrijednosti betaglukuronidaze prije ispitivanja. Vrijednosti betaglukuronidaze na prvoj kontroli su statistički značajno veće nego na četvrtoj kontroli ($p=0.019$). Srednje vrijednosti betaglukuronidaze na drugoj kontroli su statistički značajno veće nego na četvrtoj kontroli ($p=0.030$).

Tabela 43. Aktivnosti betaglukuronidaze mjerena u 5. minuti pri anaerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	15	14
Aritmetička sredina		2.84661	2.04321	2.28744	1.35967	1.35161
Standardna devijacija		2.37998	1.63486	1.34774	0.57301	0.85674
Standardna greška aritmetičke sredine		0.61451	0.42212	0.34799	0.14795	0.22897
95% interval povjerenja	Donja granica	1.64217	1.21586	1.60539	1.06969	0.90282
	Gornja granica	4.05104	2.87056	2.96949	1.64966	1.80039
Medijana - Q2		2.17641	1.56904	2.21979	1.19305	1.26053
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.019				

$p<0.05$

U 10. minuti (Tabela 44) je uočljiv statistički značajan pad na trećoj kontroli ($p=0.015$) i četvrtoj kontroli ($p=0.030$) u odnosu na vrijednosti betaglukuronidaze prije ispitivanja. Vrijednosti betaglukuronidaze na prvoj i drugoj kontroli su statistički značajno veće nego na četvrtoj kontroli ($p=0.022$, $p=0.041$).

Tabela 44 .Aktivnosti betaglukuronidaze mjerena u 10. minuti pri anaerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	15	14
Aritmetička sredina		1.45512	1.01510	1.14493	0.67775	0.67770
Standardna devijacija		1.19003	0.81691	0.68654	0.29764	0.39881
Standardna greška aritmetičke sredine		0.30726	0.21093	0.17726	0.07685	0.10659
95% interval povjerenja	Donja granica	0.85288	0.60168	0.79749	0.52712	0.46879
	Gornja granica	2.05735	1.42851	1.49236	0.82837	0.88661
Medijana - Q2		1.09062	0.80621	1.16654	0.62786	0.67486
Friedman test za više uparenih uzoraka		p 0.023				

$p<0.05$

U 20. minuti (Tabela 45) je uočljiv statistički značajan pad na trećoj kontroli ($p=0.005$) i četvrtoj kontroli ($p=0.013$) u odnosu na vrijednost betaglukuronidaze prije ispitivanja. Vrijednost betaglukuronidaze na prvoj kontroli je statistički značajno veće nego na četvrtoj kontroli ($p=0.007$).

Tabela 45. Aktivnosti betaglukuronidaze mjerena u 20. minuti pri anaerobnim uslovima kod grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	15	14
Aritmetička sredina		0.91872	0.60070	0.61259	0.46450	0.44927
Standardna devijacija		0.50126	0.25600	0.38009	0.19604	0.27234
Standardna greška aritmetičke sredine		0.12943	0.06610	0.09814	0.05062	0.07279
95% interval povjerenja	Donja granica	0.66505	0.47115	0.42024	0.36529	0.30660
	Gornja granica	1.17240	0.73026	0.80494	0.56371	0.59193
Medijana - Q2		0.88098	0.53003	0.58143	0.42162	0.44531
ANOVA test za ponovljajuća mjerenja		p 0.011				

$p<0.05$

U anaerobnim uslovima kultivisanja u grupi Sulfasalazin i probiotik pri poređenju vrijednosti procentualne promjene betaglukuronidaze, postoji statistički značajna razlike ($p=0.036$) između kontrola (Tabela 46). Procentualna promjena betaglukuronidaze na mjerenju prije tretmana u svakoj minuti pokazuje smanjenje za 6.114%, a na 1., 2., 3. i 4. kontroli 6.796 %, 10.055 %, 6.401 % i 6.605 %. Srednje vrijednosti procentualnog sniženjabetaglukuronidaze po minuti prije ispitivanja su statistički značajno manje nego na četvrtoj kontroli ($p= 0.016$).

Tabela 46.Procentualna promjena betaglukuronidaze po minuti u anaerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	15	14
Aritmetička sredina		-6.11444	-6.79616	-10.05538	-6.40185	-6.60568
Standardna devijacija		2.09768	1.60588	11.98124	0.42799	0.51966
Standardna greška aritmetičke sredine		0.54162	0.41464	3.09354	0.11051	0.13889
95% interval povjerenja	Donja granica	-7.17601	-7.60885	-16.11873	-6.61844	-6.87790
	Gornja granica	-5.05286	-5.98348	-3.99204	-6.18526	-6.33347
Medijana - Q2		-6.15524	-6.52355	-6.40410	-6.45775	-6.63951
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.036				

$p<0.05$

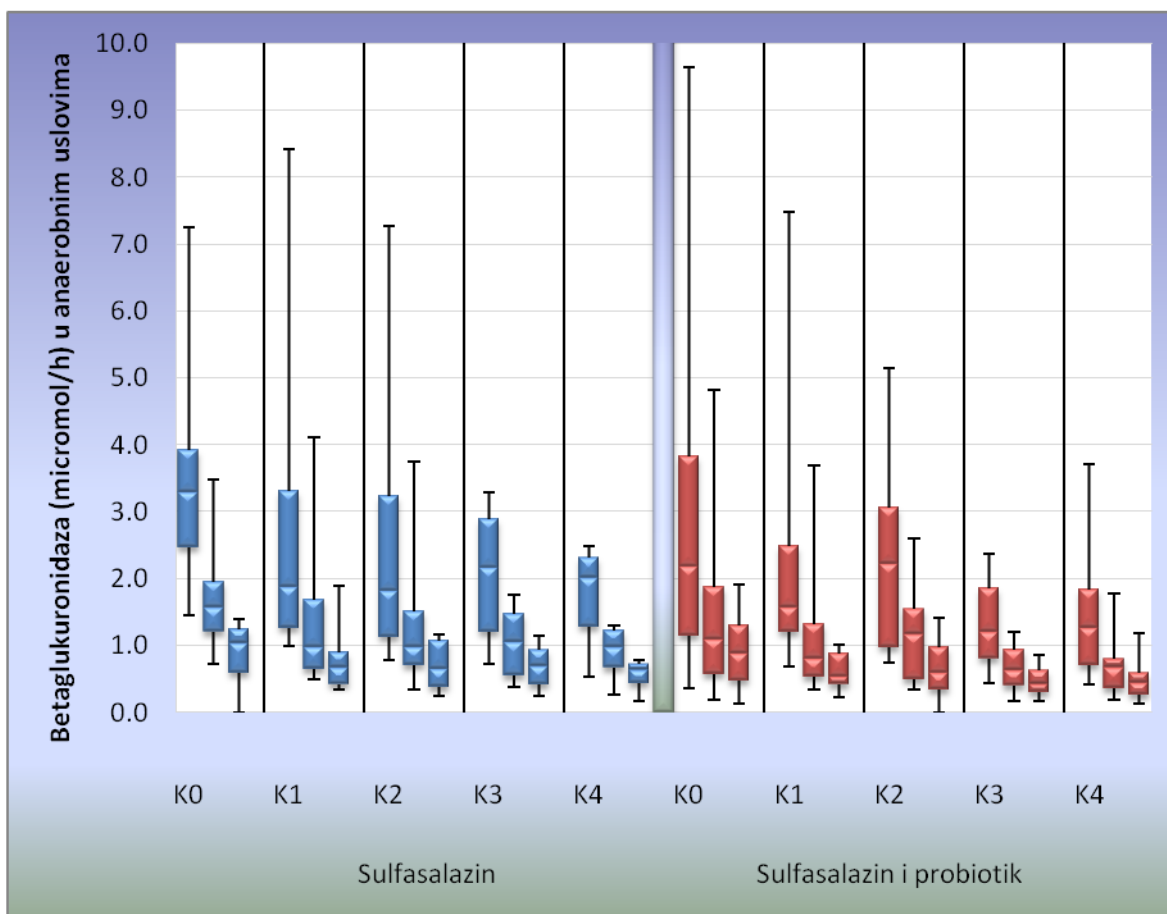
Pri poređenju vrijednosti betaglukuronidaze između grupa pri anaerobnim uslovima, samo na trećoj kontroli uočavamo statistički značajnu razliku na mjerenjima u 5., 10. i 20. minuti. Vrijednosti enzima u grupi Sulfasalazin su statistički značajno veće od onih u grupi Sulfasalazin i probiotik. Istu sliku imamo i na 4. kontroli gdje je vrijednost procentualne promjene u grupi Sulfasalazin statistički značajno veća nego kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik (Tabela 47). Takođe je i srednja vrijednost procentualnog smanjenja betaglukuronidaze po minuti prije ispitivanja kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin statistički značajno veća nego kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik.

Tabela 47. Poređenje aktivnosti betaglukuronidaze u anaerobnim uslovima između grupa

	Nakon	Sulfasalazin		Sulfasalazin i probiotik		p
		n	Srednja vrijednost	n	Srednja vrijednost	
Prije ispitivanja	5 min	14	3.36120 (2.58477 , 4.13763)	15	2.84661 (1.64217 , 4.05104)	0.494
	10 min	14	1.61604 (1.24563 , 1.98645)	15	1.45512 (0.85288 , 2.05735)	0.664
	20 min	14	0.92698 (0.71461 , 1.13936)	15	0.91872 (0.66505 , 1.17240)	0.962
	Promjena	14	-6.65005 (-7.08868 , -6.49436)	15	-6.15524 (-6.46502 , -5.32587)	0.001
Prva kontrola	5 min	14	1.87273 (1.26536 , 3.30197)	15	1.56904 (1.20269 , 2.48010)	0.432
	10 min	14	0.96529 (0.64232 , 1.68111)	15	0.80621 (0.53988 , 1.31958)	0.359
	20 min	14	0.80015 (0.54225 , 1.05806)	15	0.60070 (0.47115 , 0.73026)	0.178
	Promjena	14	-6.40673 (-7.04563 , -6.13727)	15	-6.52355 (-6.70845 , -6.14205)	0.896
Druga kontrola	5 min	14	2.37542 (1.49123 , 3.25962)	15	2.28744 (1.60539 , 2.96949)	0.877
	10 min	14	1.19666 (0.73751 , 1.65582)	15	1.14493 (0.79749 , 1.49236)	0.860
	20 min	14	0.71686 (0.53866 , 0.89507)	15	0.61259 (0.42024 , 0.80494)	0.444
	Promjena	14	-6.45842 (-6.86285 , -6.02090)	15	-6.40410 (-7.03288 , -6.10578)	0.694
Treća kontrola	5 min	14	2.06554 (1.59908 , 2.53201)	15	1.35967 (1.06969 , 1.64966)	0.020
	10 min	14	1.03406 (0.79138 , 1.27674)	15	0.67775 (0.52712 , 0.82837)	0.023
	20 min	14	0.67149 (0.52024 , 0.82274)	15	0.46450 (0.36529 , 0.56371)	0.031
	Promjena	14	-6.63129 (-6.89468 , -6.56452)	15	-6.45775 (-6.85185 , -6.14619)	0.055
Četvrta kontrola	5 min	13	1.74109 (1.37053 , 2.11166)	14	1.35161 (0.90282 , 1.80039)	0.205
	10 min	13	0.88269 (0.68903 , 1.07635)	14	0.67770 (0.46879 , 0.88661)	0.173
	20 min	13	0.55938 (0.44752 , 0.67124)	14	0.44927 (0.30660 , 0.59193)	0.250
	Promjena	13	-6.82697 (-7.10918 , -6.54476)	14	-6.60568 (-6.87790 , -6.33347)	0.279

p<0.05

Vrijednosti betaglukuronidaze pri anaerobnim uslovima kultivisanja mjerene pri svim kontrolama su prikazane na grafikonu 10.



Grafikon 10. Vrijednosti betaglukuronidaze pri anaerobnim uslovima na različitim kontrolama prema ispitivanoj grupi

5.3. In vitro metabolizam sulfasalazina

Koncentracije sulfasalazina, sulfapiridina i mesalazina su izražena u nanogramima po mililitru fekalne suspenzije (ng/mL).

5.3.1. Aerobni uslovi kultivisanja

5.3.1.1 Sulfasalazin

U grupi Sulfasalazin pri aerobnim uslovima kultivisanja nije uočena statistički značajna razlika u vrijednostima koncentracija izmjerenog sulfasalazina ($p=0.444$, $p=0.268$, $p=0.849$, $p=0.874$, $p=0.673$, $p=0.381$) niti na jednoj kontroli ni u jednom vremenu mjerenja (vidi Prilozi-Prilog 33, 34, 35, 36, 37 i 38)

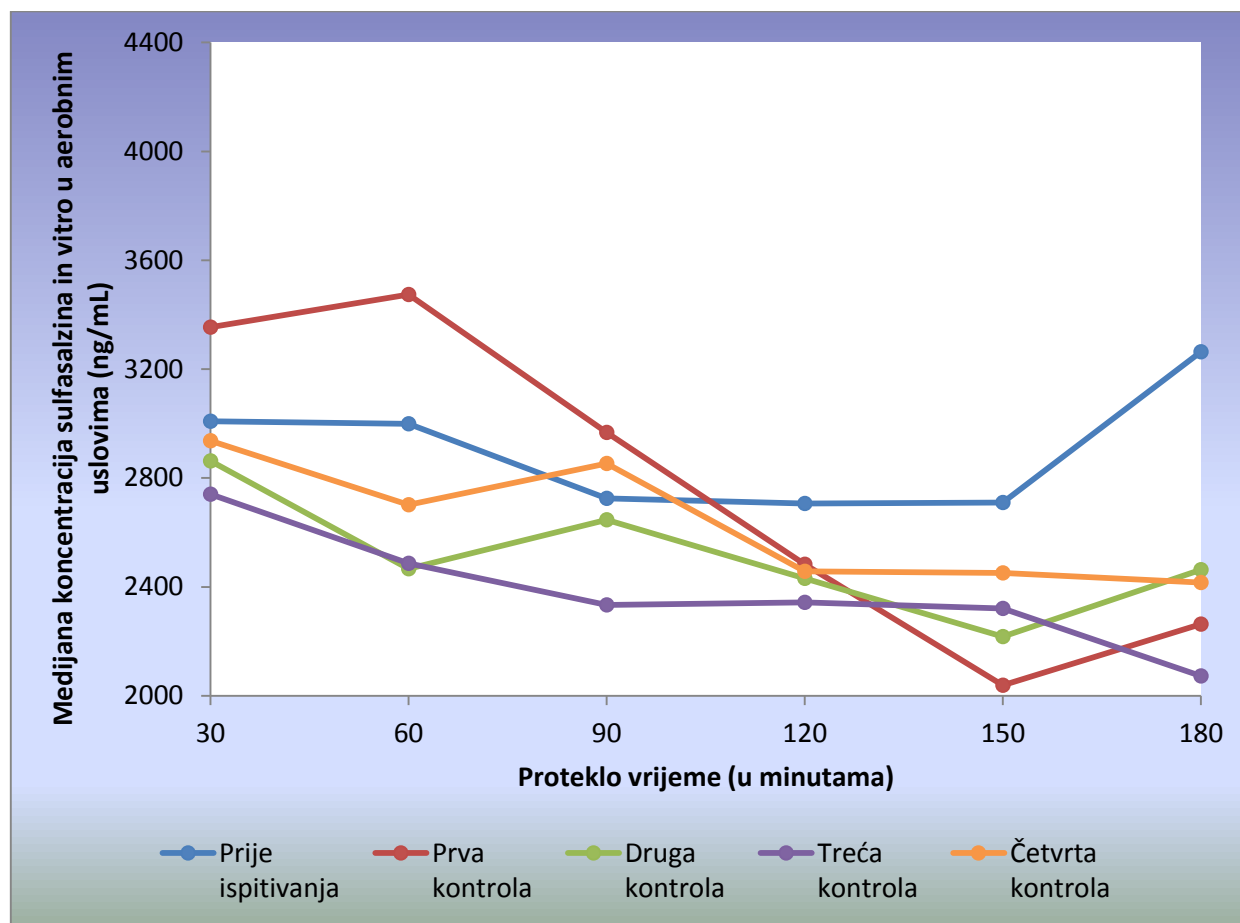
Medjutim, pri poređenju vrijednosti procentualne promjene sulfasalazina, postoji statistički značajna razlike ($p=0.033$) između kontrola (Tabela48). Srednje vrijednosti procentualnog smanjenjakoncentracija sulfasalazina po minuti na prvoj kontroli su statistički značajno veće nego na drugoj kontroli ($p= 0.016$).

Tabela 48. Procentualna promjenakoncentracijasulfasalazina*in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovimakod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	14
Aritmetička sredina		-0.26267	-0.44312	-0.32485	-0.35592	-0.23948
Standardna devijacija		0.54554	0.46907	0.70154	0.44386	0.43873
Standardna greška aritmetičke sredine		0.14580	0.12536	0.18750	0.11863	0.11725
95% interval povjerenja	Donja granica	-0.54845	-0.68883	-0.69234	-0.58843	-0.46930
	Gornja granica	0.02310	-0.19740	0.04264	-0.12341	-0.00966
Medijana - Q2		-0.01987	*-0.32293	-0.10082	-0.20682	-0.13994
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.033				

$p<0.05$

Vrijednosti koncentracija sulfasalazina nađene *in vitro* u fekalnim suspenzijama ispitanika pri aerobnim uslovima u svim tačakama mjerenja u grupi Sulfasalazin su prikazane na grafikonu 11.



Grafikon 11. Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima kultivisanja u grupi Sulfasalazin

U grupi Sulfasalazin i probiotik pri aerobnim uslovima kultivisanja statistički značajna razlika u vrijednostima koncentracija sulfasalazina ($p=0.017$) je uočena na mjerenju u 90 minuti (Tabela 49), dok u ostalim vremenima mjerenja nema statistički značajnih razlika (vidi Prilozi-Prilog 39, 40, 41, 42 i 43)

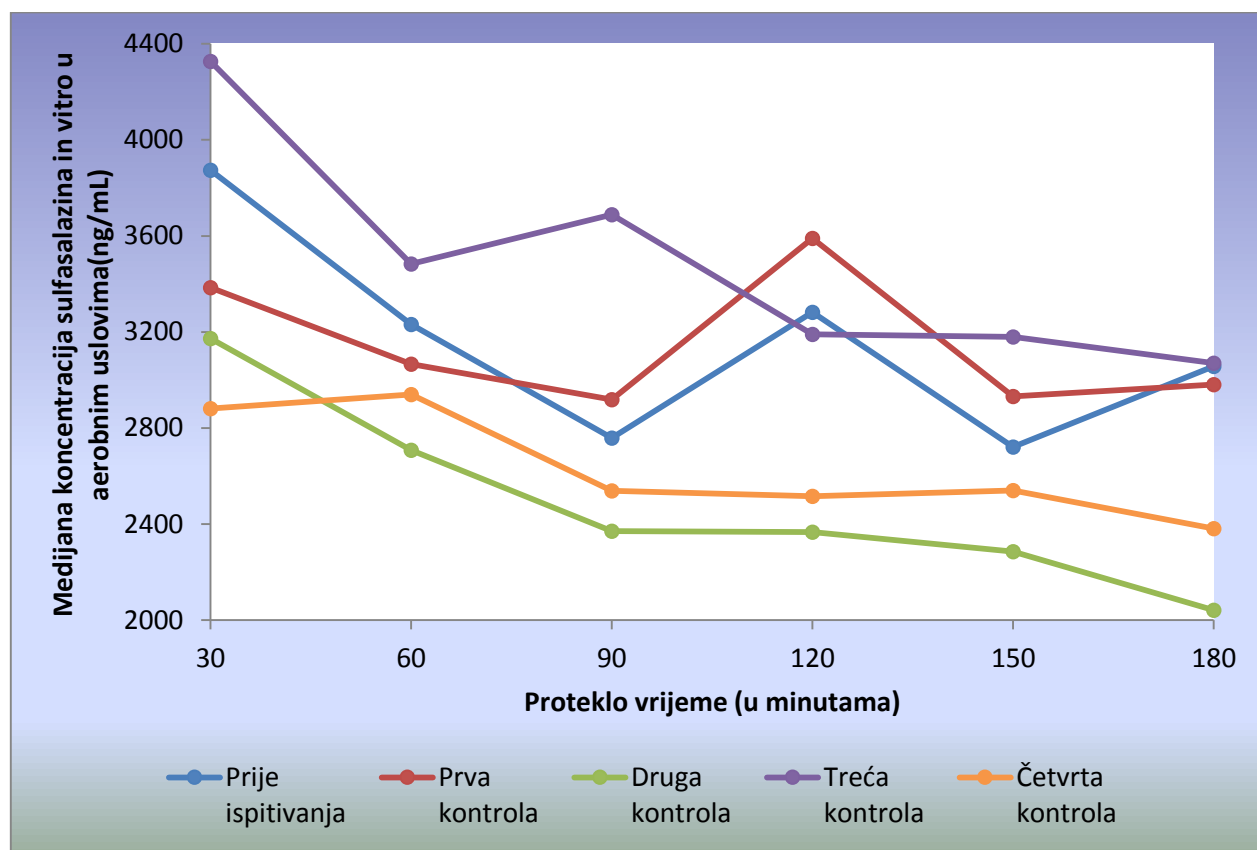
Srednje vrijednosti koncentracija sulfasalazina na trećoj kontroli su statistički značajno veće nego prije ispitivanja ($p= 0.026$), na prvoj ($p= 0.041$) i drugoj kontroli ($p= 0.036$).

Tabela 49. Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima nakon 90 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	15	15	15	15
Aritmetička sredina		2743.37	2963.71	2627.97	3725.48	3022.37
Standardna devijacija		1495.04	1290.32	1759.80	1604.58	1612.97
Standardna greška aritmetičke sredine		399.57	333.16	454.38	414.30	416.47
95% interval povjerenja	Donja granica	1960.21	2310.72	1737.39	2913.45	2206.10
	Gornja granica	3526.52	3616.70	3518.55	4537.51	3838.65
Medijana - Q2		2758.94	2919.05	2371.51	*3688.60	2538.23
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.017				

$p<0.05$

Vrijednosti koncentracija sulfasalazina nađene *in vitro* u fekalnim suspenzijama ispitanika pri aerobnim uslovima u svim tačakama mjerenja u grupi Sulfasalazin i probiotik su prikazane na grafikonu 12.



Grafikon 12. Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima kultivisanja u grupi Sulfasalazin i probiotik

Pri poređenju vrijednosti procentualne promjene koncentracija sulfasalazina *in vitro* po minutu u aerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik nisu uočene statistički ($p=0.398$) značajne razlike (vidi Prilozi-Prilog 44.).

Pri poređenju između grupa, vrijednost procentualnog smanjenja koncentracija sulfasalazina na mjerenjima pri prvoj kontroli kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin je bila statistički značajno veća nego kod onih iz grupe Sulfasalazin i probiotik, a na na mjerenjima pri drugoj kontroli je bila statistički značajno veća kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik (Tabela 50).

Tabela 50. Poređenje vrijednosti koncentracije sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesapri aerobnim uslovimana različitim kontrolama prema ispitivanoj grupi

	Nakon	Sulfasalazin		Sulfasalazin i probiotik		p
		n	Srednja vrijednost	n	Srednja vrijednost	
Prije ispitivanja	30 min	13	3,008.71 (2,626.56 , 4,268.21)	14	3,873.16 (2,865.45 , 5,384.59)	0.409
	60 min	14	2,999.11 (2,537.63 , 4,354.92)	14	3,231.50 (1,967.55 , 4,098.92)	0.854
	90 min	14	2,910.78 (2,320.56 , 3,500.99)	14	2,743.37 (1,960.21 , 3,526.52)	0.741
	120 min	14	3,041.48 (2,326.42 , 3,756.55)	14	3,174.28 (2,318.41 , 4,030.16)	0.817
	150 min	14	2,755.63 (2,170.36 , 3,340.90)	14	2,856.20 (2,004.77 , 3,707.64)	0.850
	180 min	14	2,767.47 (1,997.40 , 3,537.54)	14	2,907.26 (1,986.55 , 3,827.96)	0.821
	Promjena	14	-0.01987 (-0.38727 , 0.04087)	14	-0.15416 (-0.53807 , -0.04009)	0.232
Prva kontrola	30 min	14	3,750.94 (2,857.68 , 4,644.19)	15	3,811.46 (2,981.01 , 4,641.90)	0.923
	60 min	14	3,363.96 (2,882.47 , 3,845.45)	15	3,386.99 (2,600.17 , 4,173.82)	0.962
	90 min	14	2,966.93 (1,792.24 , 4,010.54)	15	2,919.05 (2,227.21 , 3,156.37)	0.827
	120 min	14	2,699.29 (2,125.55 , 3,273.03)	13	3,546.51 (2,804.71 , 4,288.31)	0.086
	150 min	12	2,106.35 (1,541.84 , 2,670.86)	15	2,878.09 (2,198.86 , 3,557.32)	0.110
	180 min	13	2,335.11 (1,606.14 , 3,064.08)	15	3,060.78 (2,271.78 , 3,849.78)	0.202
	Promjena	14	-0.32293 (-0.56728 , -0.15267)	15	-0.10669 (-0.45086 , 0.03337)	0.081
Druga kontrola	30 min	12	2,862.11 (2,143.33 , 3,052.08)	15	3,172.62 (2,392.39 , 4,197.84)	0.306
	60 min	13	2,466.98 (2,230.23 , 3,028.45)	15	2,708.28 (2,028.37 , 3,599.14)	0.872
	90 min	14	2,645.87 (2,302.80 , 3,056.75)	15	2,371.51 (1,119.37 , 3,714.08)	0.359
	120 min	14	2,431.42 (1,968.61 , 2,730.22)	15	2,367.38 (1,474.72 , 3,735.43)	0.570
	150 min	14	2,463.51 (1,648.21 , 3,278.82)	15	2,419.15 (1,626.63 , 3,211.67)	0.940
	180 min	14	2,493.57 (1,638.37 , 3,348.76)	14	2,369.25 (1,438.66 , 3,299.84)	0.849
	Promjena	14	-0.10082 (-0.17675 , 0.02792)	15	-0.28897 (-0.66882 , -0.19331)	0.013
Treća kontrola	30 min	14	2,740.08 (2,100.64 , 3,564.09)	15	4,326.89 (2,574.14 , 5,612.90)	0.089
	60 min	14	3,120.53 (2,058.03 , 4,183.03)	15	3,894.56 (2,965.28 , 4,823.85)	0.290
	90 min	14	2,843.25 (1,755.33 , 3,931.17)	15	3,725.48 (2,913.45 , 4,537.51)	0.210
	120 min	14	2,646.35 (1,723.37 , 3,569.33)	15	3,299.88 (2,575.48 , 4,024.28)	0.281
	150 min	13	2,348.64 (1,560.16 , 3,137.12)	15	3,321.87 (2,573.71 , 4,070.02)	0.091
	180 min	13	2,072.28 (1,524.92 , 2,494.99)	15	3,070.69 (1,934.35 , 4,848.85)	0.134
	Promjena	14	-0.35592 (-0.58843 , -0.12341)	15	-0.32006 (-0.64571 , 0.00560)	0.694
Četvrta kontrola	30 min	14	2,936.61 (2,724.53 , 3,774.13)	15	2,880.74 (2,252.85 , 4,938.35)	0.793
	60 min	14	2,701.94 (1,850.95 , 3,655.93)	15	2,939.89 (2,082.40 , 4,811.47)	0.541
	90 min	14	2,853.46 (2,376.89 , 3,195.43)	15	2,538.23 (1,981.98 , 3,857.20)	0.663
	120 min	14	2,456.74 (1,942.70 , 2,730.22)	14	2,515.62 (1,906.51 , 3,150.92)	0.646
	150 min	13	3,068.13 (1,849.83 , 4,286.43)	15	2,650.73 (1,942.18 , 3,359.27)	0.554
	180 min	13	2,415.40 (2,087.26 , 3,774.96)	14	2,380.93 (1,869.62 , 2,630.55)	0.923
	Promjena	14	-0.13994 (-0.32427 , -0.07366)	15	-0.17734 (-0.50046 , -0.03775)	0.864

p<0.05

5.3.1.2. Sulfapiridin

U grupi Sulfasalazin pri aerobnim uslovima kultivisanja se uočavaju statistički značajne razlike pri mjerenju vrijednosti koncentracija sulfapiridina u 90., 120., 150. i 180. minuti. Pri mjerenju u 30. i 60. minuti nema statistički značajnih razlika (vidi Prilozi-Prilog 45 i 46)

Pri mjerenju u 90. minuti (Tabela 51) vrijednosti koncentracija sulfapiridina nastalog *in vitro* prije ispitivanja su statistički značajno manje nego na prvoj ($p = 0.043$) i na drugoj kontroli ($p = 0.043$).

Tabela 51. Vrijednost koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa nastalog *in vitro* fekalnoj suspenziji pri aerobnim uslovima nakon 90 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		5	14	13	13	11
Aritmetička sredina		202.07	441.74	449.85	424.47	308.07
Standardna devijacija		132.00	646.75	428.59	480.89	231.02
Standardna greška aritmetičke sredine		59.03	172.85	118.87	133.37	69.65
95% interval povjerenja	Donja granica	86.37	102.95	216.86	163.06	171.55
	Gornja granica	317.78	780.53	682.84	685.88	444.59
Medijana - Q2		203.04	*224.71	*426.02	211.32	240.96
Friedman test za više uparenih uzoraka		p 0.022				

$p < 0.05$

Pri mjerenju u 120. minuti (Tabela 52.) vrijednosti koncentracija sulfapiridina nastalog *in vitro* prije ispitivanja su statistički značajno manje nego na prvoj ($p = 0.043$) i na drugoj kontroli ($p = 0.043$).

Tabela 52. Vrijednost koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima nakon 120 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		5	13	13	13	11
Aritmetička sredina		233.62	464.29	501.32	480.09	342.37
Standardna devijacija		177.54	475.89	463.89	517.97	287.77
Standardna greška aritmetičke sredine		79.40	131.99	128.66	143.66	86.76
95% interval povjerenja	Donja granica	78.00	205.59	249.15	198.51	172.31
	Gornja granica	389.25	722.98	753.50	761.66	512.43
Medijana - Q2		266.77	*304.80	*447.20	305.03	242.73
Friedman test za više uparenih uzoraka		p 0.022				

$p < 0.05$

Pri mjerenju u 150. minuti (Tabela 53.) vrijednosti koncentracija sulfapiridina nastalog *in vitro* prije ispitivanja su statistički značajno manje nego na drugoj ($p=0.025$) i trećoj kontroli ($p=0.018$).

Tabela 53. Vrijednosti koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima nakon 150 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		8	12	13	12	11
Aritmetička sredina		207.44	448.43	529.19	553.81	435.94
Standardna devijacija		198.49	448.34	491.41	514.68	379.36
Standardna greška aritmetičke sredine		70.18	129.42	136.29	148.58	114.38
95% interval povjerenja	Donja granica	69.89	194.76	262.05	262.60	211.75
	Gornja granica	344.99	702.10	796.32	845.02	660.12
Medijana - Q2		162.43	356.33	*452.59	*396.86	321.13
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.048				

$p<0.05$

Pri mjerenju u 180. minuti (Tabela 54.) vrijednosti koncentracija sulfapiridina nastalog *in vitro* prije ispitivanja su statistički značajno manje nego na drugoj ($p = 0.037$) i trećoj kontroli ($p = 0.007$). I vrijednosti koncentracija sulfapiridina na četvrtoj kontroli su statistički ($p=0.040$) značajno manje nego na trećoj kontroli.

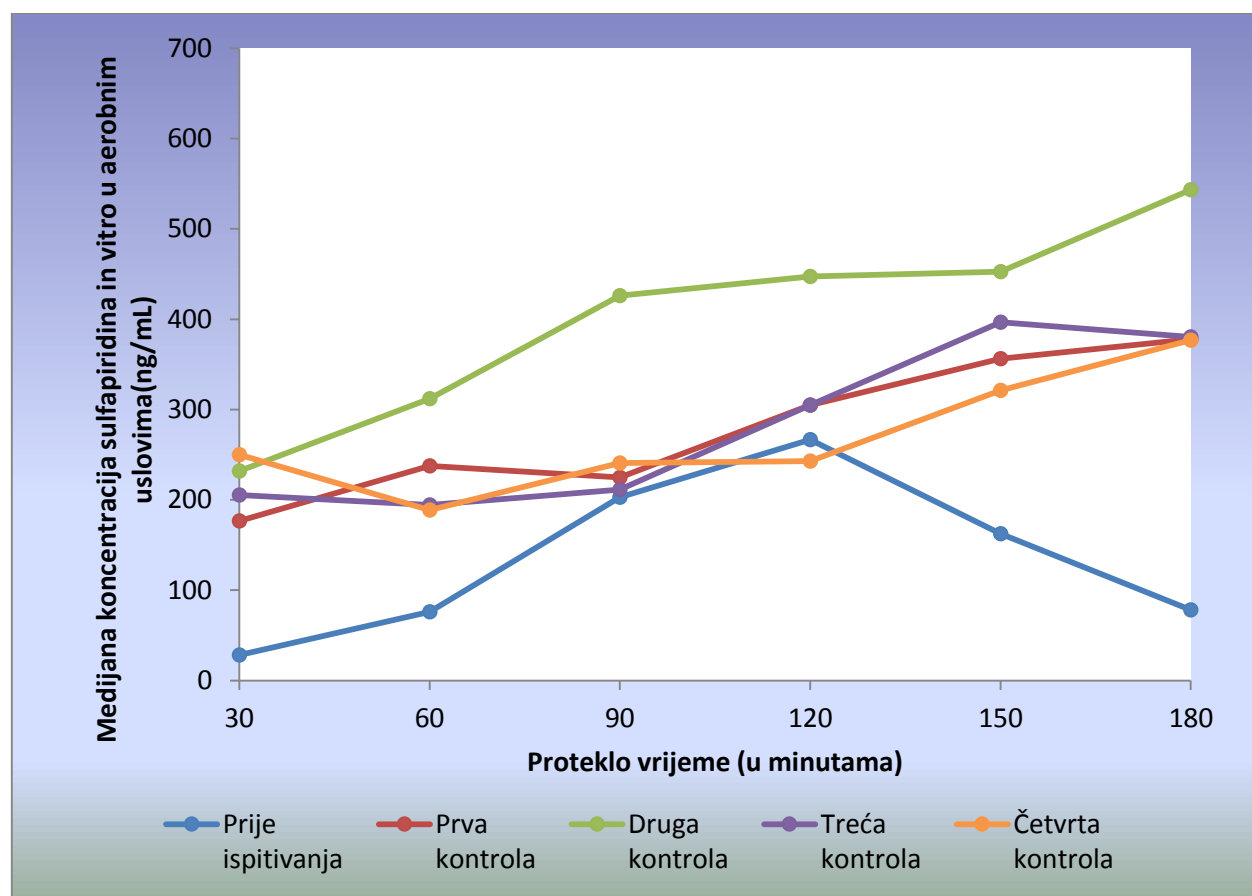
Tabela 54. Vrijednosti koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima nakon 180 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		9	13	13	13	11
Aritmetička sredina		216.71	527.33	*583.47	*538.58	*453.18
Standardna devijacija		257.45	507.12	523.25	508.16	356.42
Standardna greška aritmetičke sredine		85.82	140.65	145.12	140.94	107.47
95% interval povjerenja	Donja granica	48.52	251.66	299.03	262.34	242.54
	Gornja granica	384.91	803.00	867.92	814.82	663.81
Medijana - Q2		78.17	377.90	543.48	380.45	376.84
ANOVA test za ponovljajuća mjerenja		p				
		0.018				

$p<0.05$

Pri poređenju vrijednosti procentualne promjene koncentracija sulfapiridina *in vitro* po minutu u aerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin između različitih kontrola nisu uočene statistički ($p=0.663$) značajne razlike (vidi Prilozi-Prilog 47).

Vrijednosti koncentracija sulfapiridina nađene *in vitro* u fekalnim suspenzijama ispitanika pri aerobnim uslovima u svim tačkama mjerenja u grupi Sulfasalazin su prikazane na grafikonu 13.



Grafikon 13. Vrijednosti koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima kultivisanja u grupi Sulfasalazin

U grupi Sulfasalazin i probiotik, pri aerobnim uslovima kultivisanja se statistički značajna razlika ($p=0.038$) u vrijednostima koncentracijain *vitro* nastalog sulfapiridina uočava samo u 180. minuti (Tabela 55). Pri ostalim vremenima mjerenja nema statistički značajnih razlika (vidi Prilozi-Prilog 48, 49, 50, 51 i 52)

Pri mjerenju u 180. minuti (Tabela 55) vrijednosti koncentracija sulfapiridina na prvoj kontroli su statistički značajno veće nego prije ispitivanja ($p = 0.028$) i na drugoj kontroli ($p = 0.041$).

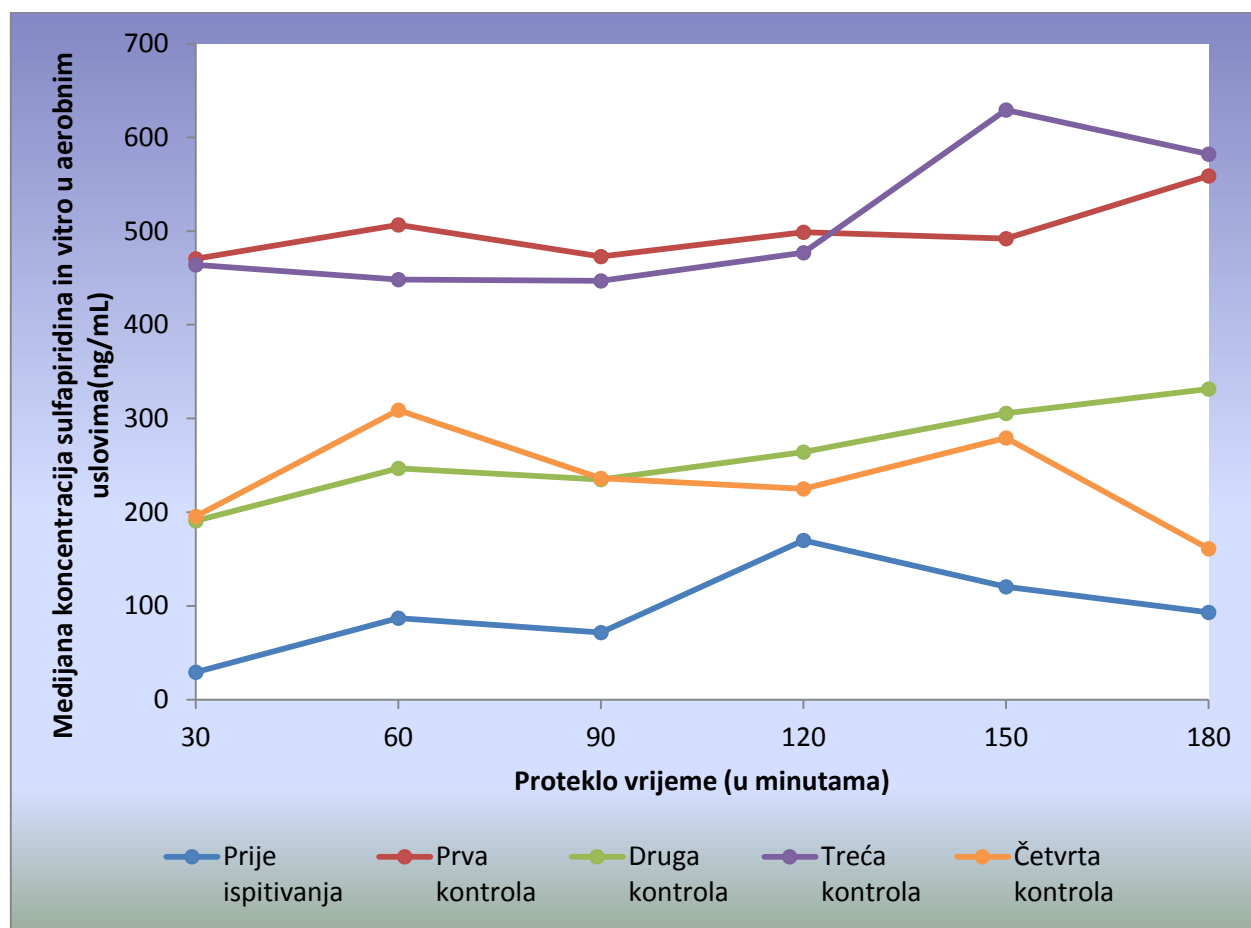
Tabela 55. Vrijednost koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima nakon 180 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		7	12	13	14	13
Aritmetička sredina		183.49	716.49	387.88	774.97	614.01
Standardna devijacija		211.22	686.54	243.43	849.35	943.68
Standardna greška aritmetičke sredine		79.84	198.19	67.52	227.00	261.73
95% interval povjerenja	Donja granica	27.01	328.05	255.55	330.05	101.02
	Gornja granica	339.96	1104.94	520.21	1219.89	1127.00
Medijana - Q2		93.14	*558.99	331.62	582.17	161.14
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.038				

$p<0.05$

Pri poređenju vrijednosti koncentracija procentualne promjene sulfapiridina *in vitro* po minutu u aerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik između različitih kontrola nisu uočene statistički ($p=0.076$) značajne razlike (vidi Prilozi-Prilog 53.).

Vrijednosti koncentracija sulfapiridina nađene *in vitro* u fekalnim suspenzijama ispitanika pri aerobnim uslovima u svim tačakama mjerenja u grupi Sulfasalazin i probiotik su prikazane na grafikonu 14.



Grafikon 14. Vrijednosti koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima kultivisanja u grupi Sulfasalazin i probiotik

Pri poređenju između grupa, razlike u srednjim vrijednostima koncentracija sulfapiridina *in vitro* u aerobnim uslovima nisu bile statistički značajne ni u jednom mjerenju prije ispitivanja, kao ni na jednom mjerenju na kontrolama (vidi Prilozi-Prilog 54.).

5.3.1.3. Mesalazin (5-ASA)

U grupi Sulfasalazin pri aerobnim uslovima kultivisanja se ne uočavaju statistički značajne razlike ($p=0.138$, $p=0.173$, $p=0.225$) pri mjerenju vrijednosti koncentracijain *in vitro* nastalog mesalazina ni u jednom mjerenju (vidi Prilozi-Prilog 55.,56., 57., 58., 59. i 60.)

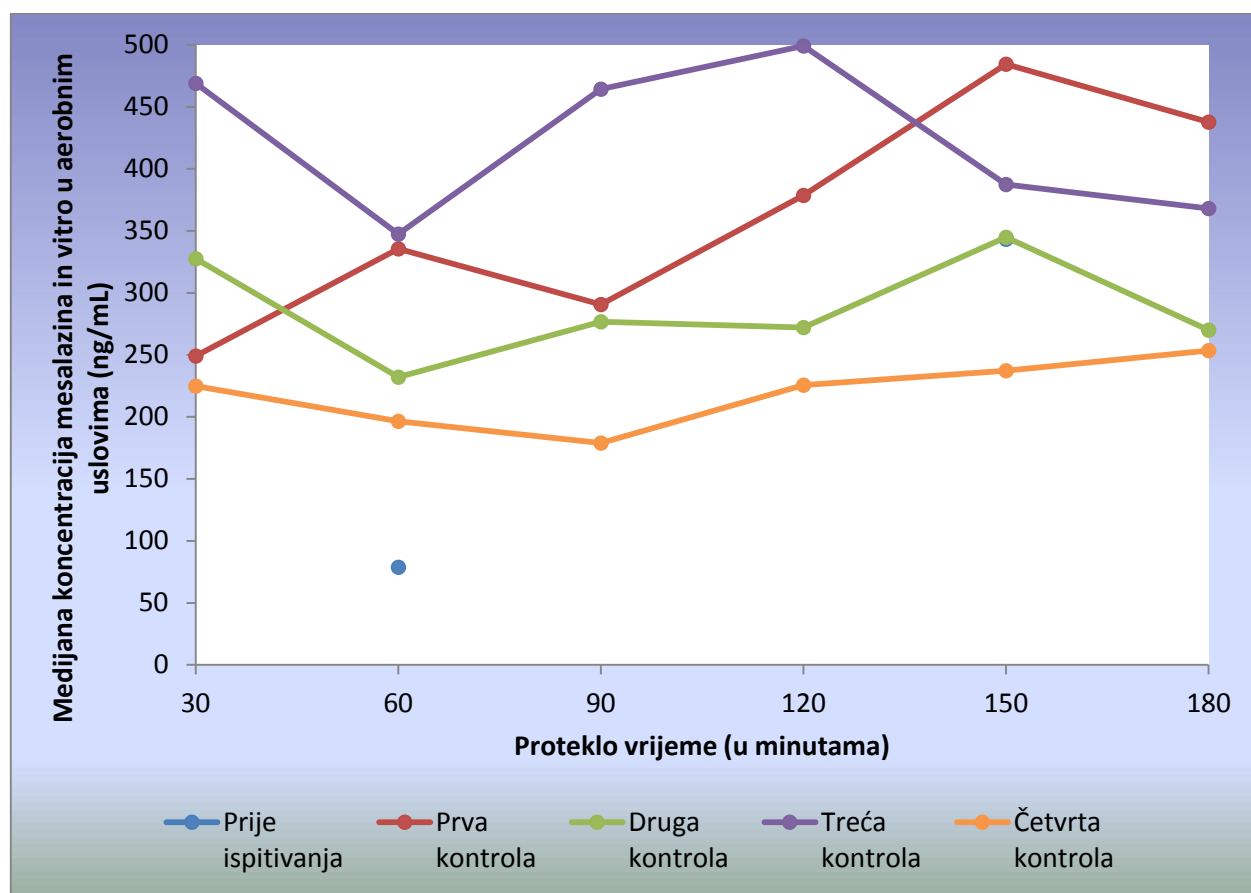
Pri poređenju vrijednosti procentualne promjene koncentracija mesalazina *in vitro* po minutu u aerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin su statistički značajne (Tabela 56) pri čemu su vrijednosti koncentracija na prvoj kontroli statistički značajno veće nego na drugoj ($p = 0.043$) i trećoj kontroli ($p = 0.046$).

Tabela 56. Procentualna promjenakoncentracija mesalazina *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovimakod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

	Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	1	8	7	8	7
Aritmetička sredina	1.64767	0.23264	-0.05682	-0.11671	0.04682
Standardna devijacija		0.21596	0.21373	0.19789	0.24238
Standardna greška aritmetičke sredine		0.07635	0.08078	0.06997	0.09161
95% interval povjerenja	Donja granica	0.08299	-0.21515	-0.25384	-0.13274
	Gornja granica	0.38228	0.10152	0.02042	0.22638
Medijana - Q2	1.64767	*0.17872	-0.03510	-0.10434	0.03316
Friedman test					
za više uparenih uzoraka		p			
		0.043			

$p<0.05$

Vrijednosti koncentracija mesalazina nađene *in vitro* u fekalnim suspenzijama ispitanika pri aerobnim uslovima u svim tačakama mjerenja u grupi Sulfasalazin su prikazane na grafikonu 15.



Grafikon 15. Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima kultivisanja u grupi Sulfasalazin

U grupi Sulfasalazin i probiotik pri aerobnim uslovima kultivisanja se uočava statistički značajna razlika ($p=0.028$) pri mjerenju vrijednosti koncentracija *in vitro* nastalog mesalazina samo u 150. minutu (Tabela 57) dok pri ostalim vremenima mjerenja nema statistički značajne razlike u srednjim vrijednostima (vidi Prilozi-Prilog 61, 62, 63, 64 i 65).

Srednje vrijednosti koncentracija mesalazina nastalog *in vitro* (Tabela 57) na prvoj kontroli su statistički značajno veće nego na četvrtoj kontroli ($p = 0.028$).

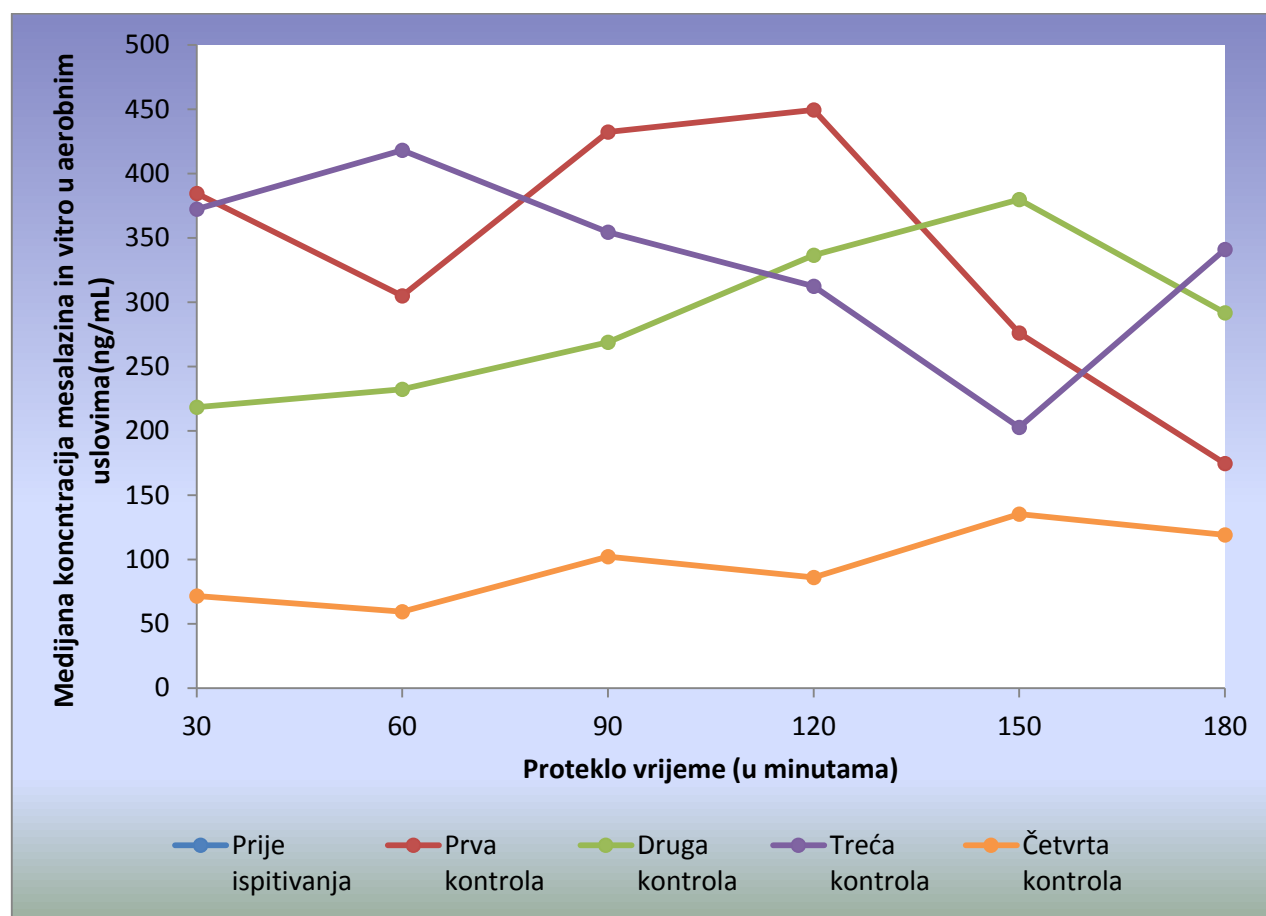
Tabela 57. Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima nakon 150 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

	Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	0	10	8	5	6
Aritmetička sredina		488.14	420.66	273.05	166.94
Standardna devijacija		533.76	210.13	230.77	149.14
Standardna greška aritmetičke sredine		168.79	74.29	103.20	60.89
95% interval povjerenja	Donja granica	157.31	275.05	70.77	47.60
	Gornja granica	818.97	566.27	475.33	286.28
Medijana - Q2		*275.96	379.71	202.68	135.13
Friedman test za više uparenih uzoraka		p			
		0.028			

$p<0.05$

Pri poređenju vrijednosti procentualne promjene koncentracija mesalazina *in vitro* po minutu u aerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik, nisu uočene statistički značajne razlike (vidi Prilozi-Prilog 66.)

Vrijednosti koncentracija mesalazina nađene *in vitro* u fekalnim suspenzijama ispitanika pri aerobnim uslovima u svim tačakama mjerenja u grupi Sulfasalazin i probiotik su prikazane na grafikonu 16.



Grafikon 16. Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima kultivisanja u grupi Sulfasalazin i probiotik

Pri poređenju između grupa, razlike u srednjim vrijednostima koncentracija mesalazina nastalog *in vitro* u aerobnim uslovima nisu bile statistički značajne ni u jednom mjerenju prije ispitivanja, kao ni na jednom mjerenju na kontrolama (vidi Prilozi- Prilog 67.).

5.3.2. Anaerobni uslovi kultivisanja

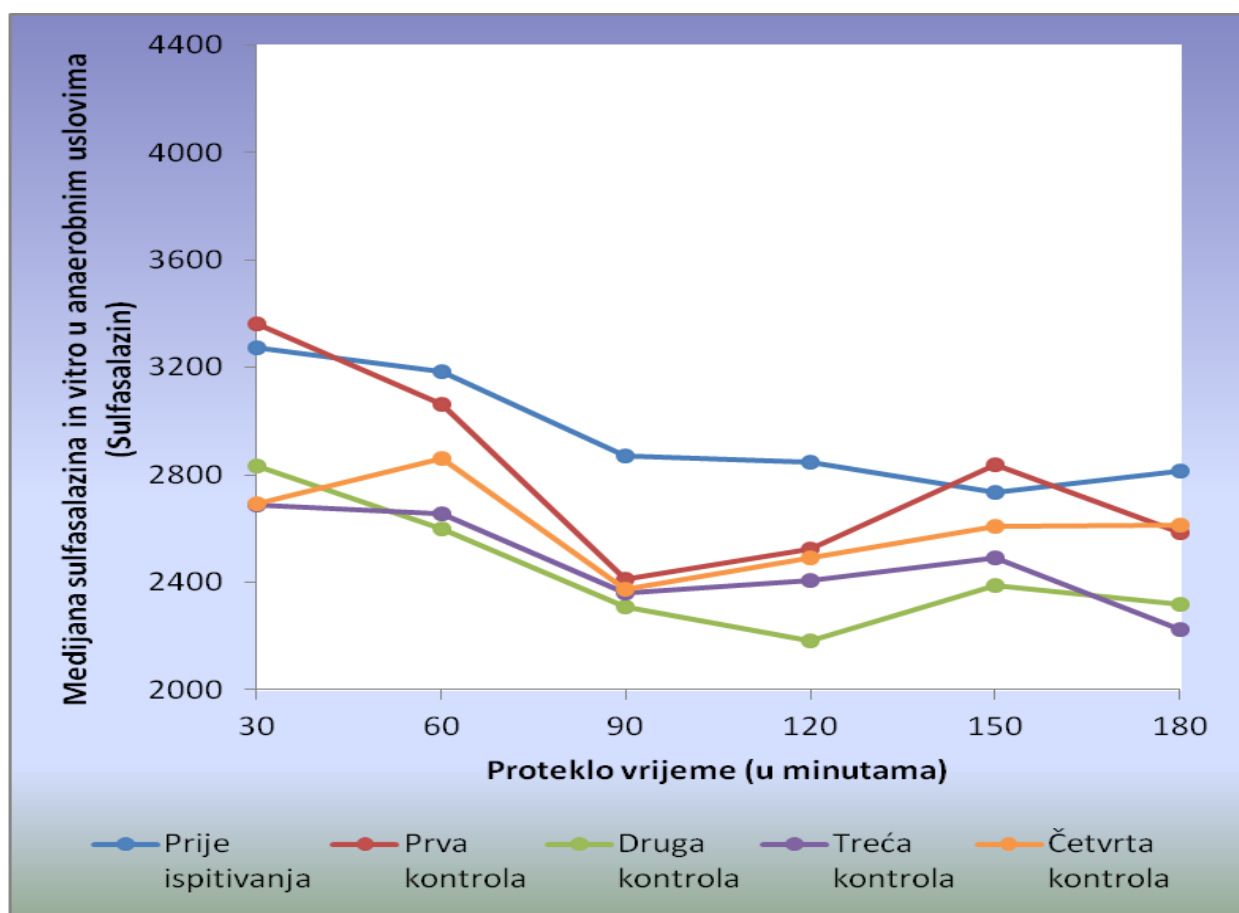
5.3.2.1 Sulfasalazin

U grupi Sulfasalazin pri *in vitro* anaerobnim uslovima kultivisanja nije uočena statistički

značajna razlika u srednjim vrijednostima koncentracija sulfasalazina ($p=0.264$, $p=0.343$, $p=0.279$, $p=0.302$, $p=0.114$, $p=0.842$) ni na jednoj kontroli niti u jednom vremenu mjerenja (vidi Prilozi-Prilog 68, 69, 70, 71, 72 i 73.)

Ni pri poređenju vrijednosti procentualne promjene koncentracije sulfasalazina, nema statistički značajnih razlike ($p=0.757$) između kontrola (vidi Prilozi-Prilog 74.). Procentualna promjena koncentracije sulfasalazina na mjerenju prije tretmana u svakoj minuti pokazuje smanjenje za 0.182 %, a na 1., 2., 3. i 4. kontroli 0.250 %, 0.292 %, 0.273 % i 0.238 %.

Vrijednosti koncentracija sulfasalazina nađene *in vitro* u fekalnim suspenzijama ispitanika pri anaerobnim uslovima u svim tačkama mjerenja u grupi Sulfasalazin su prikazane na grafikonu 17.



Grafikon 17. Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima kultivisanja u grupi Sulfasalazin

U grupi Sulfasalazin i probiotik pri *in vitro* anaerobnim uslovima kultivisanja postoji statistički značajna razlika u srednjim vrijednostima koncentracija sulfasalazina ($p=0.013$, $p=0.008$, $p=0.007$) u 30., 60. i 90 minuta (Tabela 58, 59 i 60) dok u ostalim vremenskim tačkama mjerenja nije ustanovljena statistički značajna razlika (vidi Prilozi-Prilog 75, 76 i 77)

Srednje vrijednosti koncentracija sulfasalazina *in vitro* na prvoj kontroli nakon 30 minuta su statistički značajno manje nego prije ispitivanja ($p = 0.028$), te statistički značajno veće nego na drugoj kontroli ($p= 0.031$) (Tabela 58).

Tabela 58. Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 30 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		13	15	15	15	15
Aritmetička sredina		4179.75	3898.23	3011.52	3973.57	3258.89
Standardna devijacija		1673.98	1484.23	1314.73	1356.75	1556.04
Standardna greška aritmetičke sredine		464.28	383.23	339.46	350.31	401.77
95% interval povjerenja	Donja granica	3269.77	3147.11	2346.17	3286.96	2471.43
	Gornja granica	5089.74	4649.35	3676.86	4660.18	4046.36
Medijana - Q2		4112.14	3009.80	2615.05	3834.44	2819.94
Friedman test za više uparenih uzoraka		p 0.013				

$p<0.05$

Srednje vrijednosti koncentracija sulfasalazina *in vitro* na drugoj kontroli nakon 60 minuta su statistički značajno manje nego na prvoj kontroli ($p= 0.017$), trećoj ($p= 0.031$) i četvrtoj kontroli ($p= 0.031$) (Tabela 59).

Tabela 59. Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 60 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	15	15	15	15
Aritmetička sredina		3498.71	3683.73	2677.71	3903.56	3265.43
Standardna devijacija		1461.58	1364.86	1192.41	1706.45	1333.02
Standardna greška aritmetičke sredine		390.62	352.40	307.88	440.60	344.18
95% interval povjerenja	Donja granica	2733.09	2993.01	2074.27	3039.98	2590.82
	Gornja granica	4264.33	4374.44	3281.16	4767.15	3940.03
Medijana - Q2		3437.24	3683.03	2507.38	3834.77	2924.64
Friedman test za više uparenih uzoraka		p 0.008				

$p<0.05$

Srednje vrijednosti koncentracija sulfasalazina *in vitro* na drugoj kontroli nakon 90 minuta su statistički značajno manje nego na prvoj ($p=0.027$) i trećoj kontroli ($p=0.023$) (Tabela 60).

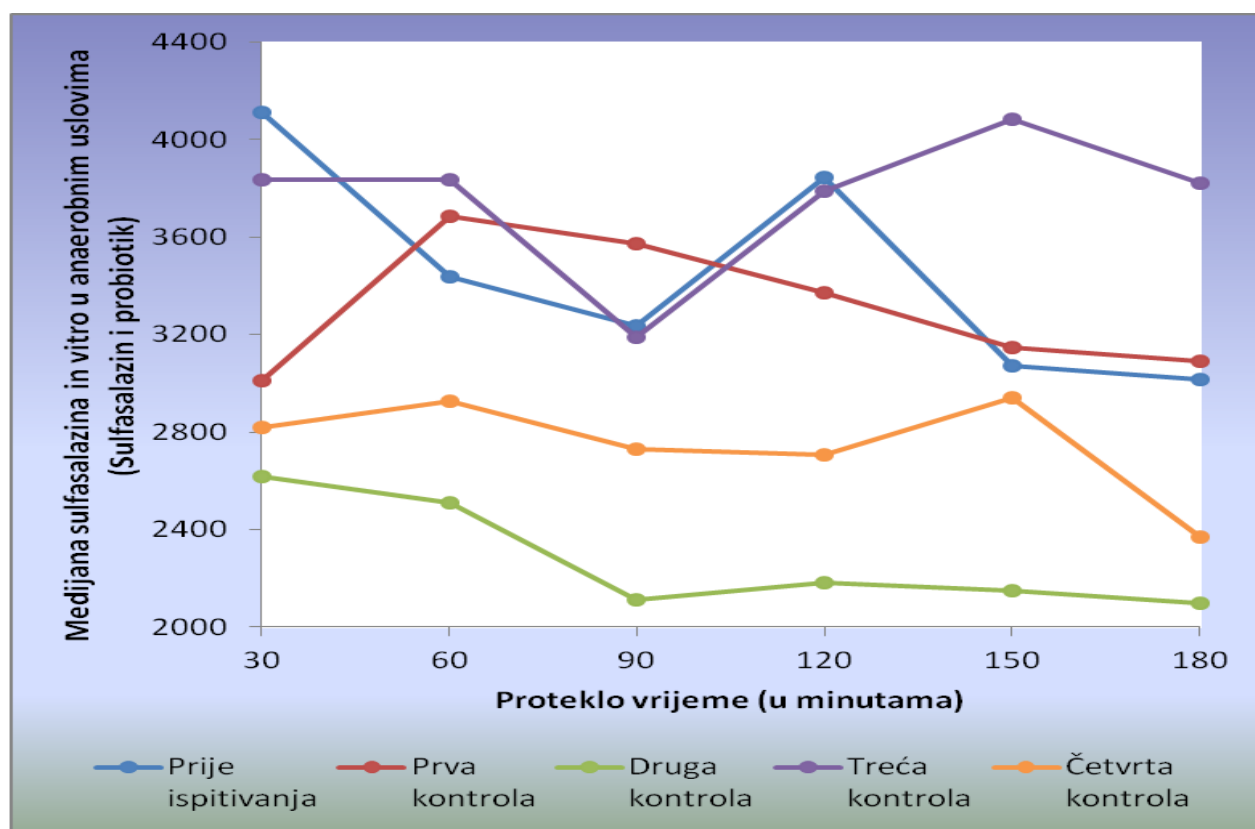
Tabela 60. Vrijednost koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 90 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		13	15	15	15	15
Aritmetička sredina		3551.15	3523.37	2513.04	3763.03	2933.48
Standardna devijacija		1776.40	1588.88	1421.72	1372.64	1078.94
Standardna greška aritmetičke sredine		492.69	410.25	367.09	354.41	278.58
95% interval povjerenja	Donja granica	2585.49	2719.28	1793.55	3068.38	2387.46
	Gornja granica	4516.82	4327.46	3232.53	4457.69	3479.50
Medijana - Q2		3237.75	3573.51	2111.39	3190.89	2732.06
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.007				

$p<0.05$

Pri poređenju vrijednosti procentualne promjene koncentracija sulfasalazina u grupi Sulfasalazin i probiotik, nema statistički značajnih razlike ($p=0.923$) između kontrola (vidi Prilozi-Prilog 78). Procentualna promjena koncentracija sulfasalazina na mjerenju prije tretmana u svakoj minuti pokazuje smanjenje za 0.156 %, a na 1., 2., 3. i 4. kontroli 0.259 %, 0.199 %, 0.203 % i 0.079 %.

Vrijednosti koncentracija sulfasalazina nađene *in vitro* u fekalnim suspenzijama ispitanika pri anaerobnim uslovima u svim tačakama mjerenja u grupi Sulfasalazin i probiotik su prikazane na grafikonu 18.



Grafikon 18. Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima kultivisanja u grupi Sulfasalazin i probiotik

Pri poređenju između grupa, razlike u srednjim vrijednostima koncentracija sulfasalazina *in vitro* u anaerobnim uslovima nakon 90 minuta prilikom treće kontrole kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin su statistički značajno manje nego kod ispitanika iz grupe sulfasalazin i probiotik (Tabela 61).

Tabela 61. Poređenje vrijednostikoncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovimana različitim kontrolama prema ispitivanoj grupi

	Mjerenje		Sulfasalazin		Sulfasalazin i probiotik		p
		n	Srednja vrijednost	n	Srednja vrijednost		
Prije ispitivanja	30 min	14	3,271.92 (2,371.13 , 4,737.42)	13	4,112.14 (3,107.03 , 5,040.14)	M: 0.225	
	60 min	14	3,695.11 (2,847.97 , 4,542.25)	14	3,498.71 (2,733.09 , 4,264.33)	S: 0.739	
	90 min	14	3,353.41 (2,617.36 , 4,089.46)	13	3,551.15 (2,585.49 , 4,516.82)	S: 0.750	
	120 min	14	3,253.68 (2,529.59 , 3,977.78)	14	3,929.20 (3,060.12 , 4,798.28)	S: 0.252	
	150 min	13	3,124.63 (2,397.97 , 3,851.29)	14	3,399.04 (2,371.47 , 4,426.62)	S: 0.677	
	180 min	14	2,811.78 (2,192.81 , 3,273.22)	14	3,014.13 (1,819.69 , 4,422.96)	M: 0.818	
	Promjena	14	-0.00134 (-0.15577 , 0.05792)	14	-0.12775 (-0.26456 , 0.01238)	M: 0.462	
Prva kontrola	30 min	14	3,362.15 (2,330.02 , 4,166.08)	15	3,009.80 (2,838.59 , 4,838.81)	M: 0.727	
	60 min	14	3,411.00 (2,627.71 , 4,194.29)	15	3,683.73 (2,993.01 , 4,374.44)	S: 0.612	
	90 min	14	2,411.89 (2,277.72 , 3,310.79)	15	3,573.51 (2,784.40 , 3,801.65)	M: 0.089	
	120 min	14	2,941.34 (2,227.86 , 3,654.82)	15	3,197.50 (2,515.43 , 3,879.57)	S: 0.615	
	150 min	14	3,115.85 (2,215.15 , 4,016.54)	15	2,933.83 (2,208.97 , 3,658.70)	S: 0.759	
	180 min	14	2,609.47 (1,946.06 , 3,272.88)	15	3,175.91 (2,309.11 , 4,042.70)	S: 0.323	
	Promjena	14	-0.15941 (-0.26105 , 0.01455)	15	-0.13455 (-0.43341 , 0.07683)	M: 0.600	
Druća kontrola	30 min	13	2,831.27 (2,349.48 , 3,571.51)	15	2,615.05 (2,027.61 , 4,000.00)	M: 0.596	
	60 min	13	2,598.87 (2,350.91 , 3,954.38)	15	2,507.38 (1,769.00 , 2,804.35)	M: 0.322	
	90 min	14	2,307.30 (1,926.24 , 3,271.99)	15	2,111.39 (1,474.07 , 2,751.24)	M: 0.694	
	120 min	13	2,181.89 (1,909.29 , 3,262.41)	14	2,182.98 (1,745.76 , 2,492.81)	M: 0.662	
	150 min	14	2,386.37 (1,773.27 , 3,104.72)	15	2,149.63 (1,538.88 , 3,850.88)	M: 0.930	
	180 min	14	2,318.28 (1,928.25 , 3,138.75)	15	2,096.94 (1,196.06 , 2,870.67)	M: 0.663	
	Promjena	14	-0.15941 (-0.26105 , 0.01455)	15	-0.13455 (-0.43341 , 0.07683)	M: 0.600	
Treća kontrola	30 min	14	2,688.21 (2,253.87 , 3,933.34)	15	3,834.44 (2,893.57 , 5,115.77)	M: 0.116	
	60 min	14	2,655.08 (2,176.88 , 3,206.22)	15	3,834.77 (2,389.10 , 5,451.96)	M: 0.097	
	90 min	14	2,358.65 (2,186.06 , 2,784.31)	15	3,190.89 (2,618.18 , 5,182.06)	M: 0.036	
	120 min	14	2,407.80 (2,158.36 , 2,959.14)	15	3,788.97 (2,049.93 , 5,065.01)	M: 0.513	
	150 min	14	2,775.83 (1,850.34 ,	15	3,684.27 (2,831.56 ,	S: 0.168	

Četvrta kontrola			3,701.31)		4,536.99)	
	180 min	14	2,529.01 (1,709.77 , 3,348.24)	13	3,576.40 (2,630.70 , 4,522.10)	S: 0.112
	Promjena	14	-0.19382 (-0.34597 , -0.11934)	15	-0.10272 (-0.20860 , 0.00307)	M: 0.176
	30 min	14	2,690.20 (2,230.08 , 3,802.45)	15	2,819.94 (2,443.03 , 3,348.78)	M: 0.513
	60 min	14	2,859.91 (2,367.56 , 3,537.74)	15	2,924.64 (2,420.41 , 3,897.66)	M: 0.663
	90 min	14	2,374.69 (2,246.84 , 3,446.88)	15	2,732.06 (2,205.70 , 3,592.18)	M: 0.570
	120 min	14	2,492.74 (2,026.26 , 3,247.28)	15	2,706.80 (2,211.11 , 3,359.43)	M: 0.513
	150 min	13	2,607.46 (1,967.97 , 2,873.42)	15	2,938.63 (2,365.11 , 3,190.22)	M: 0.369
	180 min	13	2,613.67 (1,623.08 , 3,068.04)	15	2,369.37 (2,066.86 , 3,352.46)	M: 0.982
	Promjena	14	-0.15149 (-0.35738 , 0.00715)	15	-0.08322 (-0.10514 , -0.00368)	M: 0.176

p<0.05

5.3.2.2 Sulfapiridin

U grupi Sulfasalazin pri *in vitro* anaerobnim uslovima kultivisanja uočava se statistički značajna razlika u vrijednostima koncentracija sulfapiridina (p=0.011, p=0.021, p=0.030, p=0.022) od 90 do 180 minuta kultivisanja (Tabela 62, 63, 64 i 65) dok u ostalim vremenskim tačkama mjerenja nije ustanovljena statistički značajna razlika (vidi Prilozi-Prilog 79 i 80).

Srednje vrijednosti koncentracija sulfapiridina nastalog *in vitro* mjerene u 90. minuti (Tabela 62) prije ispitivanja su statistički značajno manje nego na prvoj (p= 0.043), drugoj (p= 0.043) i trećoj kontroli (p= 0.043).

Tabela 62. Vrijednost koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 90 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		5	14	13	14	12
Aritmetička sredina		143.80	336.29	329.50	477.63	408.84
Standardna devijacija		114.19	402.94	339.37	495.25	380.36
Standardna greška aritmetičke sredine		51.07	107.69	94.12	132.36	109.80
95% interval povjerenja	Donja granica	43.70	125.22	145.02	218.21	193.63
	Gornja granica	243.89	547.36	513.98	737.06	624.05
Medijana - Q2		158.56	205.96	181.96	302.46	289.52
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.011				

p<0.05

Srednje vrijednosti koncentracija sulfapiridina nastalog *in vitro* mjerene u 120. minuti (Tabela 63) prije ispitivanja su statistički značajno manje nego na trećoj kontroli ($p = 0.043$).

Tabela 63. Vrijednosti koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 120 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		5	13	12	14	12
Aritmetička sredina		250.38	464.65	413.40	518.47	416.71
Standardna devijacija		286.18	536.38	425.50	552.10	371.05
Standardna greška aritmetičke sredine		127.98	148.77	122.83	147.55	107.11
95% interval povjerenja	Donja granica	-0.47	173.07	172.65	229.26	206.77
	Gornja granica	501.23	756.23	654.15	807.67	626.65
Medijana - Q2		150.66	271.97	286.08	330.86	285.30
Friedman test za više uparenih uzoraka		p 0.021				

$p < 0.05$

Srednje vrijednosti koncentracija sulfapiridina *in vitro* mjerene u 150. minuti (Tabela 64) prije ispitivanja su statistički značajno manje nego na trećoj kontroli ($p = 0.043$).

Tabela 64. Vrijednosti koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 150 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		5	14	13	14	12
Aritmetička sredina		263.09	443.89	397.36	544.89	433.19
Standardna devijacija		259.80	497.77	424.39	504.39	338.38
Standardna greška aritmetičke sredine		116.19	133.03	117.70	134.80	97.68
95% interval povjerenja	Donja granica	35.36	183.14	166.66	280.68	241.73
	Gornja granica	490.81	704.64	628.06	809.11	624.65
Medijana - Q2		219.01	296.00	213.83	379.81	318.90
Friedman test za više uparenih uzoraka		p 0.030				

$p < 0.05$

Srednje vrijednosti koncentracija sulfapiridina *in vitro* mjerene u 180. minuti (Tabela 65) prije ispitivanja su statistički značajno manje nego na trećoj kontroli ($p = 0.018$).

Tabela 65. Vrijednost koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 180 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		7	14	13	14	13
Aritmetička sredina		222.60	478.65	478.05	675.00	516.84
Standardna devijacija		252.46	534.66	490.14	762.67	394.84
Standardna greška aritmetičke sredine		95.42	142.89	135.94	203.83	109.51
95% interval povjerenja	Donja granica	35.57	198.57	211.61	275.49	302.20
	Gornja granica	409.63	758.72	744.50	1074.51	731.47
Medijana - Q2		147.13	350.63	432.23	411.02	421.37
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.022				

$p < 0.05$

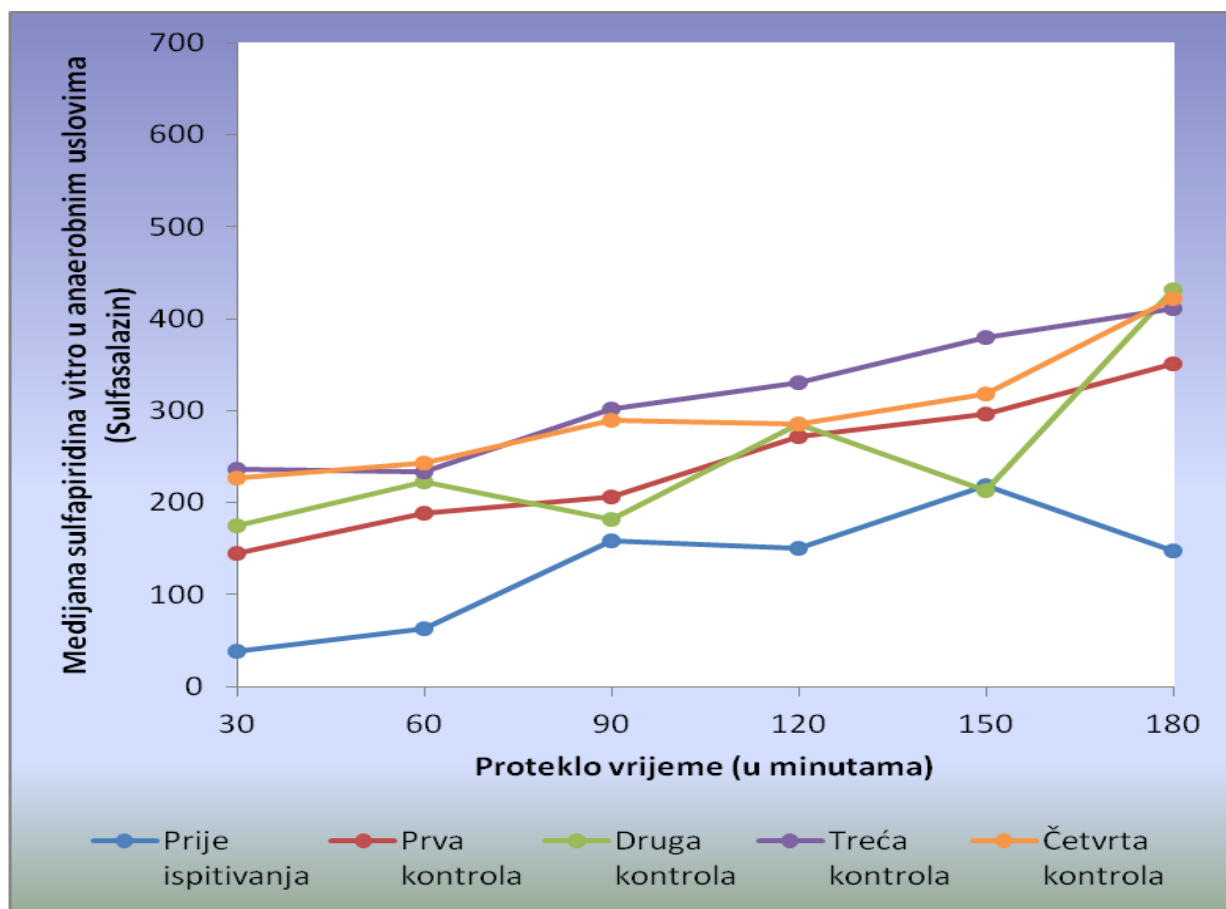
Pri poređenju vrijednosti procentualne promjene koncentracija sulfapiridina u grupi Sulfasalazinuočava se statistički značajna razlike ($p = 0.035$) između kontrola (Tabela 66). Procentualna promjena koncentracija sulfasalazina na mjerenju prije tretmana u svakoj minuti pokazuje smanjenje za 1.181 %, a na 1., 2., 3. i 4. kontroli 0.586 %, 0.260 %, 0.382 % i 0.264 %. Srednje vrijednosti procentalnog smanjenja koncentracija sulfapiridina *in vitro* prije ispitivanja su statistički značajno veće nego na drugoj kontroli ($p = 0.048$).

Tabela 66. Procentualna promjena koncentracija sulfapiridina *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		5	14	13	14	12
Aritmetička sredina		1.18128	0.58662	0.26024	0.38283	0.26464
Standardna devijacija		0.64455	0.70339	0.32287	0.31580	0.28517
Standardna greška aritmetičke sredine		0.28825	0.18799	0.08955	0.08440	0.08232
95% interval povjerenja	Donja granica	0.61631	0.21817	0.08472	0.21741	0.10329
	Gornja granica	1.74625	0.95508	0.43575	0.54826	0.42599
Medijana - Q2		1.27273	0.32255	0.24124	0.26118	0.20002
ANOVA test za ponovljajuća mjerenja		p				
		0.035				

$p < 0.05$

Vrijednosti koncentracija sulfapiridina nađene *in vitro* u fekalnim suspenzijama ispitanika pri anaerobnim uslovima u svim tačakama mjerenja u grupi Sulfasalazin su prikazane na grafikonu 19.



Grafikon 19. Vrijednosti koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima kultivisanja u grupi Sulfasalazin

U grupi Sulfasalazin i probiotik pri *in vitro* anaerobnim uslovima kultivisanja nema statistički značajne razlike ($p=0.525$, $p=0.281$, $p=0.107$, $p=0.434$, $p=0.066$, $p=0.075$) u vrijednostima koncentracija sulfapiridina ni na jednom mjerenju niti na jednoj kontroli (vidi Prilozi- Prilog 81, 82, 83, 84, 85 i 86).

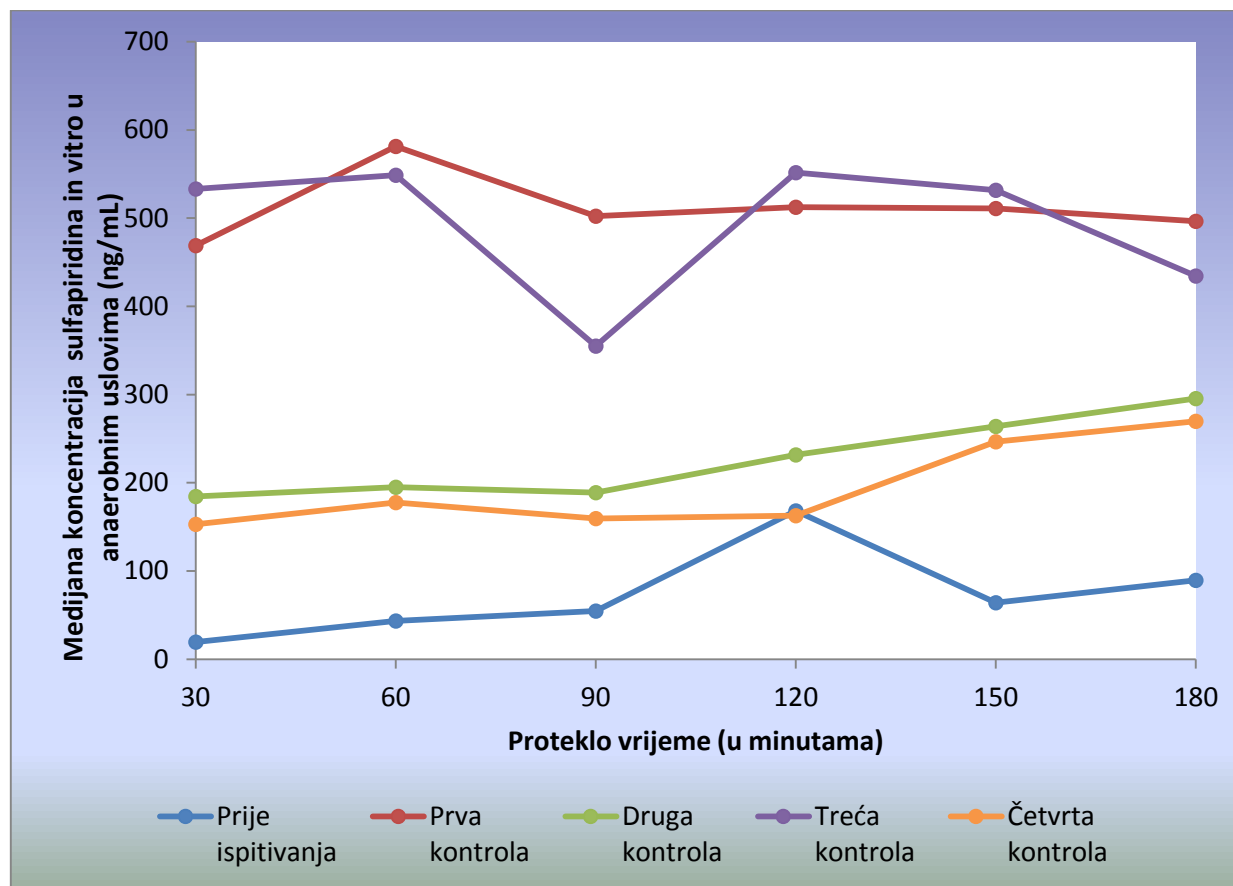
Pri poređenju vrijednosti procentualne promjene koncentracijasulfapiridina u grupi Sulfasalazin i probiotikuočava se statistički značajna razlike ($p=0.023$) između kontrola (Tabela 67). Procentualna promjena koncentracijasulfasalazina na mjerenju prije tretmana u svakoj minuti pokazuje smanjenje za 2.93 %, a na 1., 2., 3. i 4. kontroli 0.286 %, 0.390 %, 0.101 % i 0.224 %. Srednje vrijednosti procentualnog smanjenja koncentracija sulfapiridina *in vitro* prije ispitivanja su statistički značajno veće nego na prvoj kontroli ($p= 0.043$), drugoj ($p= 0.043$), trećoj ($p= 0.018$) i četvrtoj kontroli ($p= 0.028$). Srednje vrijednosti procentualnog smanjenja koncentracija sulfapiridina *in vitro* na prvoj kontroli su statistički značajno manje nego na drugoj kontroli ($p= 0.034$)

Tabela 67. Procentualna promjena koncentracija sulfapiridina *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		7	13	14	15	14
Aritmetička sredina		2.93001	0.28639	0.39027	0.10117	0.22402
Standardna devijacija		2.78430	0.75926	0.30661	0.20693	0.25788
Standardna greška aritmetičke sredine		1.05237	0.21058	0.08195	0.05343	0.06892
95% interval povjerenja	Donja granica	0.86737	-0.12635	0.22966	-0.00355	0.08893
	Gornja granica	4.99265	0.69913	0.55088	0.20589	0.35911
Medijana - Q2		1.53535	0.09099	0.42669	0.02917	0.13195
ANOVA test za ponovljajuća mjerenja		p				
		0.023				

$p<0.05$

Vrijednosti koncentracija sulfapiridina nađene *in vitro* u fekalnim suspenzijama ispitanika pri anaerobnim uslovima u svim tačakama mjerenja u grupi Sulfasalazin i probiotik su prikazane na grafikonu 20.



Grafikon 20. Vrijednosti koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima kultivisanja u grupi Sulfasalazin i probiotik

Pri poređenju između grupa, razlike u srednjim vrijednostima koncentracija sulfapiridina *in vitro* u anaerobnim uslovima nakon 60 minuta na prvoj kontroli kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin su statistički značajno manje ($p = 0.022$) nego kod ispitanika iz grupe sulfasalazin i probiotik dok su na trećoj kontroli kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin statistički značajno veće ($p = 0.010$) u odnosu na ispitanike iz grupe Sulfasalazin i probiotik (Tabela 68).

Tabela 68. Poređenje vrijednostikoncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovimana različitim kontrolama prema ispitivanoj grupi

	Nakon	Sulfasalazin		Sulfasalazin i probiotik		p
		n	Srednja vrijednost	n	Srednja vrijednost	
Prije ispitivanja	30 min	4	37.76 (30.07 , 58.74)	3	19.55 (2.67 , 174.78)	M: 0.480
	60 min	4	62.39 (46.11 , 81.03)	3	43.54 (26.83 , 239.03)	M: 0.480
	90 min	5	158.56 (48.04 , 163.19)	4	54.76 (18.31 , 288.80)	M: 0.462
	120 min	5	150.66 (111.28 , 177.74)	5	168.37 (67.91 , 246.94)	M: 0.917
	150 min	5	219.01 (81.61 , 233.31)	7	64.08 (3.06 , 180.57)	M: 0.062
	180 min	7	147.13 (9.89 , 316.66)	7	89.56 (14.88 , 283.84)	M: 0.565
Prva kontrola	Promjena	5	1.18128 (0.61631 , 1.74625)	7	2.93001 (0.86737 , 4.99265)	S: 0.154
	30 min	14	145.33 (23.01 , 275.37)	12	469.01 (259.63 , 619.75)	M: 0.045
	60 min	13	188.68 (59.95 , 309.62)	11	581.44 (358.69 , 775.95)	M: 0.022
	90 min	14	205.96 (37.55 , 479.79)	13	502.32 (147.18 , 650.18)	M: 0.174
	120 min	13	271.97 (81.43 , 490.01)	13	512.39 (120.15 , 640.85)	M: 0.489
	150 min	14	296.00 (56.48 , 606.44)	13	510.98 (201.79 , 666.87)	M: 0.332
Druga kontrola	180 min	14	350.63 (81.20 , 672.33)	13	496.64 (233.12 , 829.72)	M: 0.286
	Promjena	14	0.58662 (0.21817 , 0.95508)	13	0.28639 (-0.12635 , 0.69913)	S: 0.296
	30 min	12	174.31 (41.94 , 609.33)	14	184.38 (143.15 , 259.51)	M: 1.000
	60 min	12	222.44 (44.31 , 732.86)	14	195.16 (160.85 , 303.38)	M: 0.877
	90 min	13	181.96 (57.14 , 603.28)	14	188.85 (152.74 , 331.57)	M: 0.884
	120 min	12	286.08 (43.30 , 714.04)	13	231.75 (189.67 , 356.07)	M: 0.828
Treća kontrola	150 min	13	213.83 (56.88 , 648.68)	14	263.86 (189.24 , 416.05)	M: 0.923
	180 min	13	432.23 (61.78 , 644.39)	14	295.55 (228.57 , 404.57)	M: 0.923
	Promjena	13	0.26024 (0.08472 , 0.43575)	14	0.39027 (0.22966 , 0.55088)	S: 0.293
	30 min	14	236.71 (65.50 , 619.96)	15	533.06 (232.89 , 717.62)	M: 0.206
	60 min	14	233.56 (72.69 , 656.34)	15	548.77 (141.68 , 640.34)	M: 0.432
	90 min	14	302.46 (77.82 , 694.85)	15	355.02 (152.84 , 722.59)	M: 0.570
Četvrta kontrola	120 min	14	330.86 (139.70 , 737.72)	15	551.62 (241.31 , 789.90)	M: 0.513
	150 min	14	379.81 (217.71 , 771.75)	15	531.79 (251.79 , 804.25)	M: 0.600
	180 min	14	411.02 (185.21 , 720.14)	13	434.48 (302.28 , 649.18)	M: 0.923
	Promjena	14	0.38283 (0.21741 , 0.54826)	15	0.10117 (-0.00355 , 0.20589)	S: 0.010
	30 min	12	226.26 (94.36 , 577.72)	14	152.97 (100.06 , 474.90)	M: 0.837
	60 min	12	242.64 (95.96 , 579.84)	13	177.45 (132.01 , 435.69)	M: 0.957
	90 min	12	289.52 (118.89 , 647.43)	13	159.32 (115.18 , 372.86)	M: 0.624
	120 min	12	285.30 (142.18 , 735.35)	13	162.74 (145.24 , 516.68)	M: 0.786
	150 min	12	318.90 (195.53 , 700.65)	13	246.62 (150.37 , 384.52)	M: 0.624
	180 min	13	421.37 (223.98 , 809.09)	14	269.71 (161.15 , 630.73)	M: 0.382
	Promjena	12	0.20002 (0.05164 , 0.47229)	14	0.13195 (0.03495 , 0.46207)	M: 0.719

p<0.05

5.3.2.3 Mesalazin

U grupi Sulfasalazin pri anaerobnim uslovima kultivisanja uočava se statistički značajna razlika ($p=0.028$, $p=0.028$) u vrijednostima koncentracija mesalazina na mjerjenjima u 60. i 120. minuti (Tabele 69 i 70) dok u ostalim vremenskim tačkama mjerenja nisu ustanovljene statistički značajne razlike (vidi Prilozi-Prilog 87, 88, 89 i 90). Srednje vrijednosti koncentracija mesalazina nastalog *in vitro* mjerene u 60. minuti (Tabela 69) na trećoj kontroli su statistički značajno veće nego na četvrtoj kontroli ($p=0.028$).

Tabela 69. Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 60 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

	Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	1	5	6	8	7
Aritmetička sredina	86.52	462.71	345.87	420.22	216.30
Standardna devijacija		282.80	317.02	140.23	133.76
Standardna greška aritmetičke sredine		126.47	129.42	49.58	50.56
95% interval povjerenja	Donja granica	214.82	92.20	323.04	117.21
	Gornja granica	710.60	599.54	517.39	315.39
Medijana - Q2	86.52	467.73	213.35	465.93	203.16
Friedman test za više uparenih uzoraka	p				
	0.028				

$p<0.05$

Srednje vrijednosti koncentracija mesalazina nastalog *in vitro* mjerene u 120. minuti (Tabela 70) na trećoj kontroli su statistički značajno veće nego na četvrtoj kontroli ($p=0.028$).

Tabela 70. Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 120 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

	Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	0	6	4	8	6
Aritmetička sredina		346.91	264.28	393.67	229.66
Standardna devijacija		184.93	254.75	158.60	154.74
Standardna greška aritmetičke sredine		75.50	127.37	56.07	63.17
95% interval povjerenja	Donja granica	198.94	14.63	283.77	105.84
	Gornja granica	494.88	513.94	503.58	353.48
Medijana - Q2		337.74	163.27	393.55	208.66
Friedman test za više uparenih uzoraka	p				
	0.028				

$p<0.05$

Pri poređenju vrijednosti procentualne promjene koncentracijamesalazina u anaerobnim uslovima u grupi Sulfasalazinizmeđu različitih mjerenja uočavaju se statistički značajne razlike (Tabela 71).Srednje vrijednosti procentualnog povećanjakoncentracija mesalazina *in vitro* na prvoj kontroli su statistički značajno veće nego na drugoj ($p= 0.043$) i trećoj kontroli ($p= 0.046$).

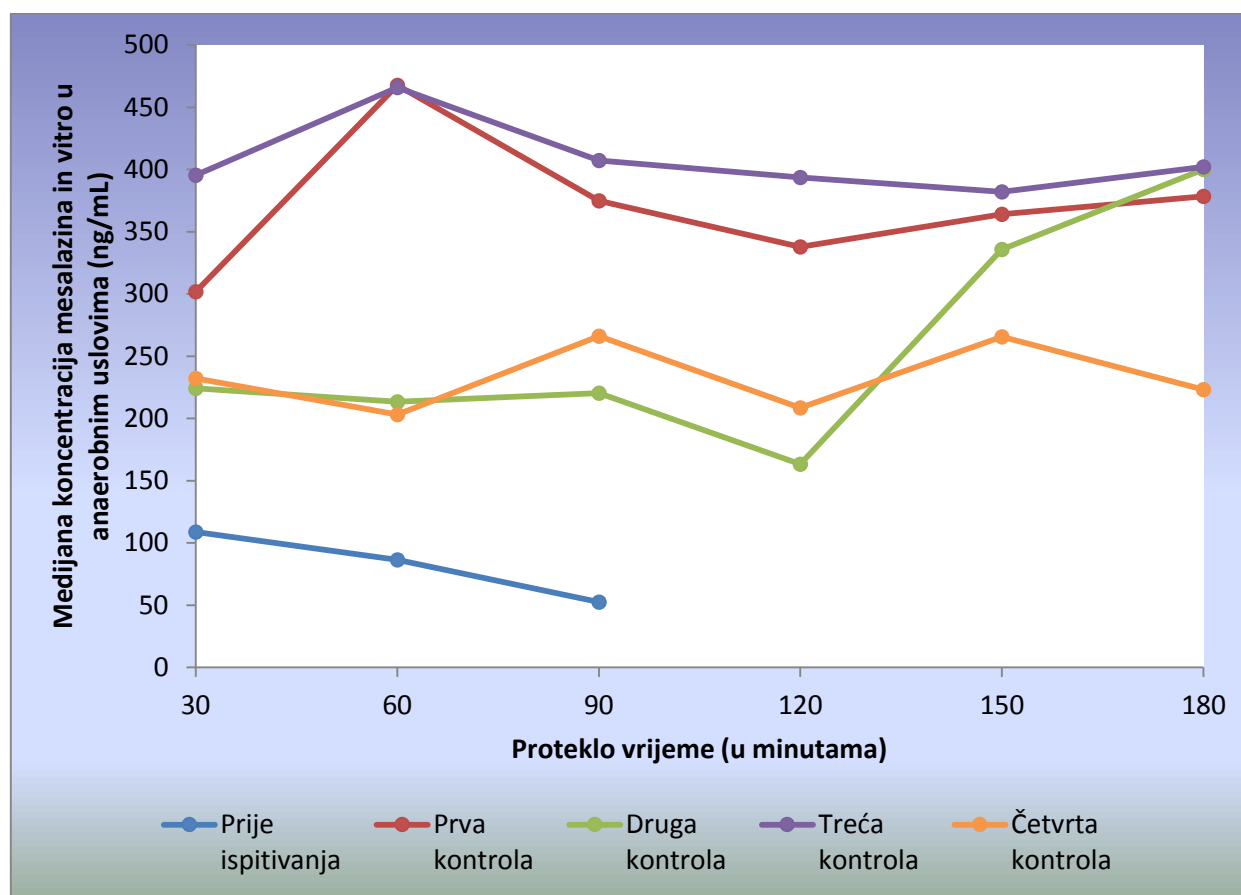
Procentualna promjena koncentracijamesalazina na mjerenju prije kontrole u svakoj minuti pokazuje smanjenje za1.647 %, a na1., 2., 3. i 4. kontroli0.17872%, 0.03510%, 0.10434% i 0.03316%.

Tabela 71.Procentualna promjena koncentracija mesalazina*in vitro* u suspenziji fecesa mesalazina nastalog *in vitro* pri anaerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

	Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	1	8	7	8	7
Aritmetička sredina	1.64767	0.23264	-0.05682	-0.11671	0.04682
Standardna devijacija		0.21596	0.21373	0.19789	0.24238
Standardna greška aritmetičke sredine		0.07635	0.08078	0.06997	0.09161
95% interval povjerenja	Donja granica	0.08299	-0.21515	-0.25384	-0.13274
	Gornja granica	0.38228	0.10152	0.02042	0.22638
Medijana - Q2	1.64767	0.17872	-0.03510	-0.10434	0.03316
Friedman test za više uparenih uzoraka	p 0.043				

$p<0.05$

Vrijednosti koncentracija mesalazina nađene *in vitro* u fekalnim suspenzijama ispitanika pri anaerobnim uslovima u svim tačakama mjerenja u grupi Sulfasalazin su prikazane na grafikonu 21.



Grafikon 21. Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima kultivisanja u grupi Sulfasalazin

U grupi Sulfasalazin i probiotik pri anaerobnim uslovima kultivisanja uočavaju se statistički značajne razlike ($p = 0.012$, $p = 0.043$, $p = 0.046$, $p = 0.043$) u vrijednostima koncentracija mesalazina na mjerenjima u 30., 90., 120. i 150. minuti (Tabela 72, 73, 74 i 75) dok u ostalim vremenskim tačkama mjerenja nisu ustanovljene statistički značajne razlike (vidi Prilozi-Prilog 91 i 92).

Srednje vrijednosti koncentracija mesalazina *in vitro* na prvoj kontroli (Tabela 72) mjerene u 30. minuti, su statistički značajno veće nego na drugoj kontroli ($p = 0.012$).

Tabela 72. Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 30 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

	Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	1	9	10	6	5
Aritmetička sredina	33.65	427.52	292.51	327.55	131.00
Standardna devijacija		348.50	226.85	247.23	109.99
Standardna greška aritmetičke sredine		116.17	71.74	100.93	49.19
95% interval povjerenja	Donja granica	199.83	151.91	129.73	34.59
	Gornja granica	655.21	433.11	525.37	227.41
Medijana - Q2	33.65	337.81	216.96	288.77	72.88
Friedman test za više uparenih uzoraka	p				
	0.012				

$p < 0.05$

Srednje vrijednosti koncentracija mesalazina *in vitro* na prvoj kontroli (Tabela 73) mjerene u 90. minuti su statistički značajno veće nego na trećoj kontroli ($p = 0.043$).

Tabela 73. Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 90 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

	Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	0	9	7	6	6
Aritmetička sredina		501.02	331.42	227.77	160.14
Standardna devijacija		445.30	240.75	188.67	111.89
Standardna greška aritmetičke sredine		148.43	90.99	77.02	45.68
95% interval povjerenja	Donja granica	210.09	153.07	76.80	70.61
	Gornja granica	791.95	509.76	378.73	249.67
Medijana - Q2		364.72	226.56	206.22	127.23
Friedman test za više uparenih uzoraka	p				
	0.043				

$p < 0.05$

Srednje vrijednosti koncentracija mesalazina *in vitro* na prvoj kontroli (Tabela 74) mjerene u 120. minuti su statistički značajno veće nego na drugoj kontroli ($p = 0.046$).

Tabela 74. Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 120 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		2	8	8	6	4
Aritmetička sredina		169.22	479.41	338.76	369.86	191.21
Standardna devijacija		104.24	351.72	245.80	279.61	88.93
Standardna greška aritmetičke sredine		73.71	124.35	86.90	114.15	44.46
95% interval povjerenja	Donja granica	24.76	235.68	168.43	146.12	104.07
	Gornja granica	313.68	723.14	509.09	593.60	278.36
Medijana - Q2		169.22	437.09	226.92	368.85	213.13
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.046				

$p < 0.05$

Srednje vrijednosti koncentracija mesalazina *in vitro* na prvoj kontroli (Tabela 75) mjerene u 150. minuti su statistički značajno veće nego na drugoj ($p = 0.043$) i trećoj kontroli ($p = 0.050$)

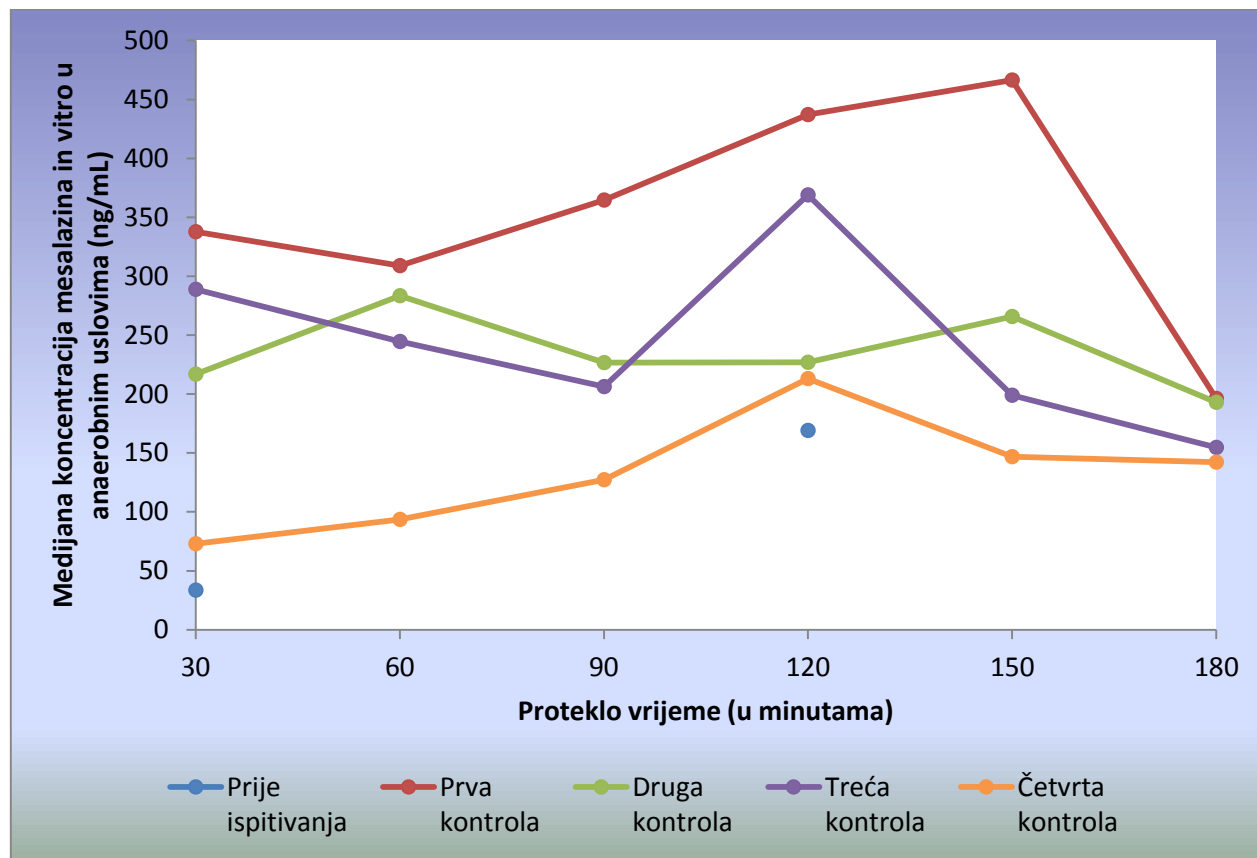
Tabela 75. Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 150 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		0	9	7	8	4
Aritmetička sredina			549.48	322.79	235.60	146.47
Standardna devijacija			392.37	200.98	194.92	78.07
Standardna greška aritmetičke sredine			130.79	75.96	68.92	39.03
95% interval povjerenja	Donja granica		293.14	173.91	100.53	69.96
	Gornja granica		805.83	471.68	370.68	222.98
Medijana - Q2			466.58	265.79	198.89	146.80
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.043				

$p < 0.05$

Pri poređenju vrijednosti procentualne promjene koncentracija mesalazina (vidi Prilozi-Prilog 93) u anaerobnim uslovima u grupi Sulfasalazin i probiotika između različitih mjerenja ne uočavaju se statistički značajne razlike ($p = 0.463$). Procentualna promjena koncentracija mesalazina na mjerenju pri prvoj kontroli u svakoj minuti pokazuje smanjenje za 0.017%, a na 2., 3. i 4. kontroli 0.045 %, 0.030 % i 0.050 %.

Vrijednosti koncentracija mesalazina nađene *in vitro* u fekalnim suspenzijama ispitanika pri anaerobnim uslovima u svim tačakama mjerenja u grupi Sulfasalazin i probiotik su prikazane na grafikonu 22.



Grafikon 22. Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima kultivisanja u grupi Sulfasalazin i probiotik

Pri poređenju između grupa, razlike u srednjim vrijednostima koncentracija mesalazina nastalog *in vitro* u anaerobnim uslovima između ispitivanih grupa nisu bile statistički značajne ni na jednom mjerenju na kontrolama (vidi Prilozi-Prilog 94).

5.4. In vivometabolizam sulfasalazina

5.4.1. Sulfasalazin

U grupi Sulfasalazin pri poređenju količina sulfasalazina (mg) izlučenog u 24 h urinu, nisu uočene statistički značajne ($p=0.792$) razlike između kontrola (Tabela 76).

Tabela 76. Količine sulfasalazina (mg) izlučenog u 24 h urinu na različitim kontrolama u grupi Sulfasalazin

	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	14	14	12	13
Aritmetička sredina	1.86	1.32	1.23	1.81
Standardna devijacija	3.77	1.77	1.81	3.13
Standardna greška aritmetičke sredine	1.01	0.47	0.52	0.87
95% interval povjerenja	-0.12	0.39	0.21	0.11
	3.84	2.24	2.26	3.52
Medijana - Q2	0.85	0.87	0.70	0.90
Friedman test za više uparenih uzoraka				
p				
0.792				

$p<0.05$

I u grupi Sulfasalazin i probiotik pri poređenju količina sulfasalazina (mg) izlučenog u 24 h urinu, nisu uočene statistički značajne ($p=0.729$) razlike između različitih kontrola (Tabela 77).

Tabela 77. Količine sulfasalazina (mg) izlučenog u 24 h urinu na različitim kontrolama u grupi Sulfasalazin i probiotik

	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	13	15	15	13
Aritmetička sredina	2.78	1.69	1.65	2.32
Standardna devijacija	4.54	1.84	1.42	1.90
Standardna greška aritmetičke sredine	1.26	0.48	0.37	0.53
95% interval povjerenja	Donja granica	0.31	0.76	0.93
	Gornja granica	5.24	2.62	2.37
Medijana - Q2	1.99	1.48	0.98	1.54
Friedman test za više uparenih uzoraka				
p				
0.729				

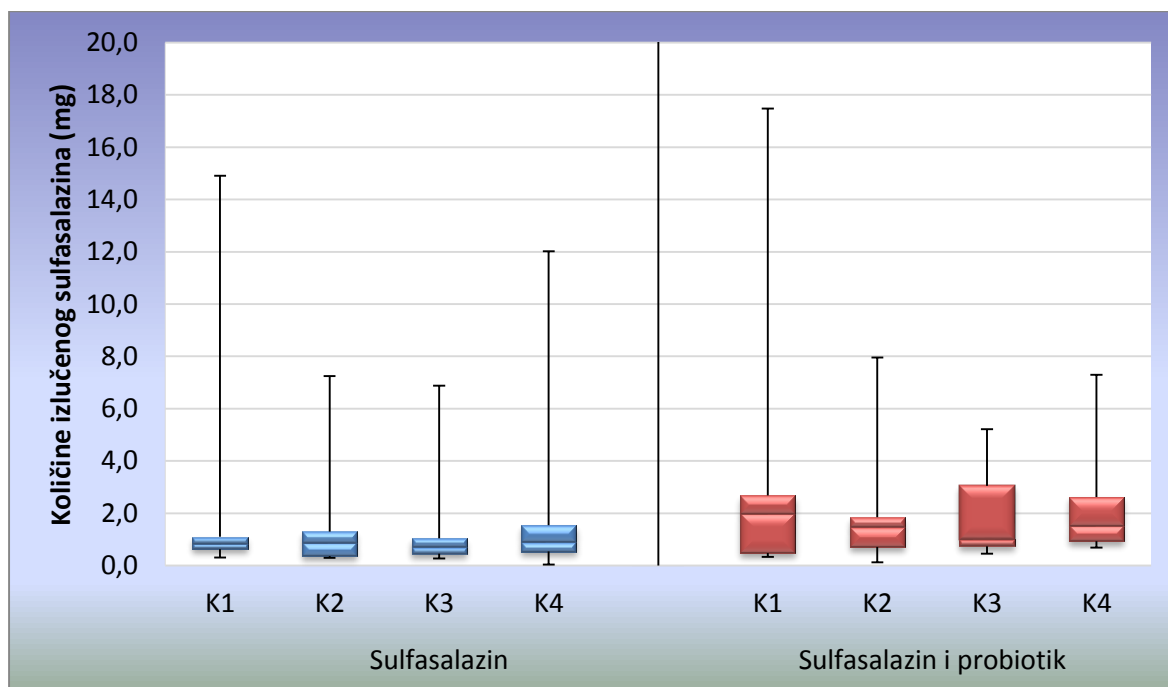
$p<0.05$

Pri poređenju količina izlučenog sulfasalazina između grupa, ne postoji statistički značajna razlika (Tabela 78).

Tabela 78. Poređenje količina sulfasalazina (mg) izlučenog u 24 h urinu na različitim kontrolama prema ispitivanoj grupi

	Sulfasalazin		Sulfasalazin i probiotik		<i>p</i>
	n	Srednja vrijednost	n	Srednja vrijednost	
Prva kontrola	14	0.85 (0.63 , 1.10)	13	1.99 (0.48 , 2.68)	<i>M: 0.244</i>
Druga kontrola	14	0.87 (0.36 , 1.29)	15	1.48 (0.71 , 1.85)	<i>M: 0.190</i>
Treća kontrola	12	0.70 (0.46 , 1.04)	15	0.98 (0.74 , 3.05)	<i>M: 0.118</i>
Četvrta kontrola	13	0.90 (0.54 , 1.55)	13	1.54 (0.93 , 2.62)	<i>M: 0.061</i>

Vrijednosti količina sulfasalazina (mg) izlučenog u 24 h urinu za svaku kontrolu i obje ispitivane grupe su prikazane na grafikonu 23.



Grafikon 23. Količine sulfasalazina (mg) izlučenog u 24 h urinu na različitim kontrolama u obje ispitivane grupe

5.4.2. Sulfapiridin

U grupi Sulfasalazin pri poređenju količina sulfapiridina (mg) izlučenog u 24 h urinu nisu uočene statistički značajne ($p=0.853$) razlike između kontrola (Tabela 79).

Tabela 79. Količine sulfapiridina (mg) izlučenog u 24 h urinu na različitim kontrolama u grupi Sulfasalazin

		Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	13
Aritmetička sredina		3.50	3.22	4.57	4.38
Standardna devijacija		3.07	2.97	6.09	4.69
Standardna greška aritmetičke sredine		0.82	0.79	1.63	1.30
95% interval povjerenja	Donja granica	1.89	1.66	1.38	1.83
	Gornja granica	5.10	4.77	7.75	6.93
Medijana - Q2		2.47	1.74	2.63	2.84
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p			
		0.853			

$p<0.05$

I u grupi Sulfasalazin i probiotik pri poređenju količina sulfapiridina (mg) izlučenog u 24 h urinu nisu uočene statistički značajne ($p=0.114$) razlike između kontrola (Tabela 80.)

Tabela 80. Količine sulfapiridina (mg) izlučenog u 24 h urinu na različitim kontrolama u grupi Sulfasalazin i probiotik

		Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	15	14	15
Aritmetička sredina		5.26	3.73	4.57	4.75
Standardna devijacija		4.99	2.92	4.53	5.23
Standardna greška aritmetičke sredine		1.33	0.76	1.21	1.35
95% interval povjerenja	Donja granica	2.65	2.25	2.19	2.11
	Gornja granica	7.88	5.21	6.94	7.39
Medijana - Q2		2.67	2.49	3.22	2.04
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p			
		0.114			

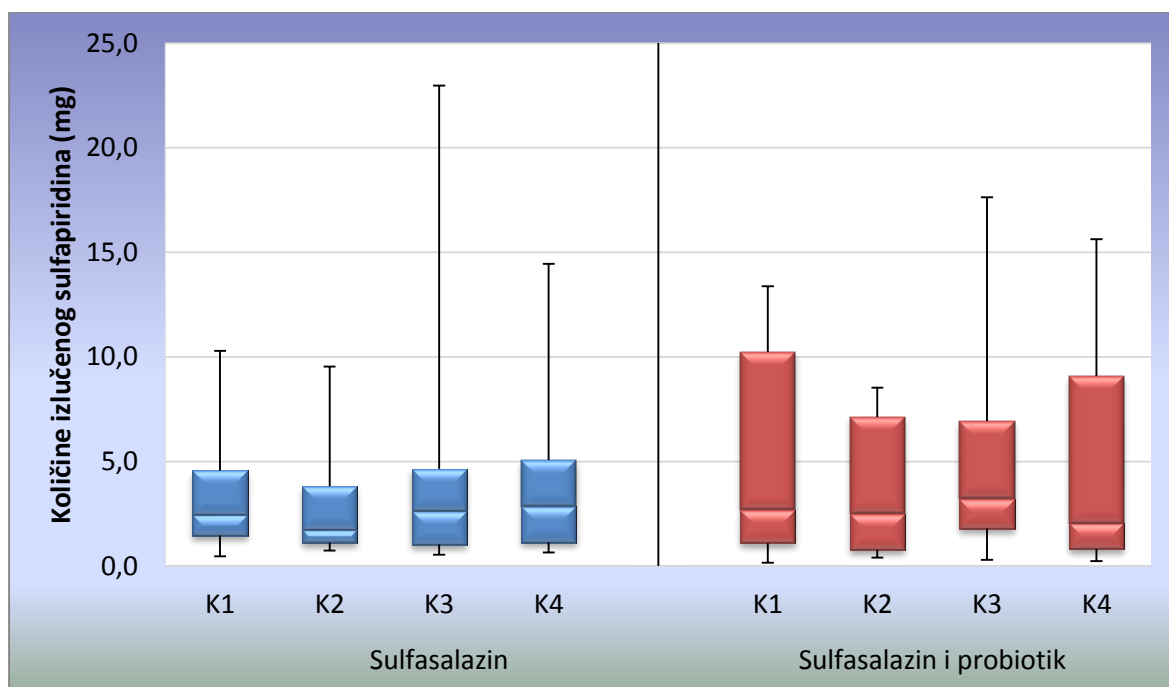
$p<0.05$

Pri poređenju vrijednosti sulfapiridina između grupa ne postoji statistički značajna razlika (Tabela 81)

Tabela 81. Poređenje količina sulfapiridina (mg) izlučenog u 24 h urinu na različitim kontrolama prema ispitivanoj grupi

	Sulfasalazin		Sulfasalazin i probiotik		<i>p</i>
	n	Srednja vrijednost	n	Srednja vrijednost	
Prva kontrola	14	2.47 (1.46 , 4.57)	14	2.67 (1.10 , 10.23)	<i>M:</i> 0.679
Druga kontrola	14	1.74 (1.13 , 3.81)	15	2.49 (0.77 , 7.12)	<i>M:</i> 0.760
Treća kontrola	14	2.63 (1.03 , 4.64)	14	3.22 (1.80 , 6.92)	<i>M:</i> 0.581
Četvrta kontrola	13	2.84 (1.13 , 5.07)	15	2.04 (0.81 , 9.08)	<i>M:</i> 0.908

Vrijednosti količina sulfapiridina (mg) izlučenog u 24 h urinu za svaku kontrolu i obje ispitivane grupe su prikazane na grafikonu 24.



Grafikon 24. Količine sulfapiridina (mg) izlučenog u 24 h urinu na različitim kontrolama u obje ispitivane grupe

5.4.3. Mesalazin

U grupi Sulfasalazin pri poređenju količina mesalazina (mg) izlučenog u 24 h urinu, nisu uočene statistički značajne ($p=0.059$) razlike između kontrola (Tabela 82)

Tabela 82. Količine mesalazina (mg) izlučenog u 24 h urinu na različitim kontrolama u grupi Sulfasalazin

		Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		13	14	14	14
Aritmetička sredina		0.59	1.05	0.98	0.96
Standardna devijacija		0.35	0.76	0.70	0.66
Standardna greška aritmetičke sredine		0.10	0.20	0.19	0.18
95% interval povjerenja	Donja granica	0.40	0.65	0.62	0.61
	Gornja granica	0.78	1.44	1.35	1.30
Medijana - Q2		0.48	0.89	0.73	1.01
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p			
		0.059			

$p<0.05$

Ni u grupi Sulfasalazin i probiotik pri poređenju količina mesalazina (mg) izlučenog u 24 h urinu, nisu uočene statistički značajne ($p=0.261$) razlike između kontrola (Tabela 83).

Tabela 83. Količine mesalazina (mg) izlučenog u 24 h urinu na različitim kontrolama u grupi Sulfasalazin i probiotik

		Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		13	14	15	14
Aritmetička sredina		0.87	0.63	0.69	0.93
Standardna devijacija		0.85	0.60	0.47	0.86
Standardna greška aritmetičke sredine		0.23	0.16	0.12	0.23
95% interval povjerenja	Donja granica	0.41	0.32	0.45	0.48
	Gornja granica	1.33	0.95	0.93	1.39
Medijana - Q2		0.70	0.48	0.51	0.63
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p			
		0.261			

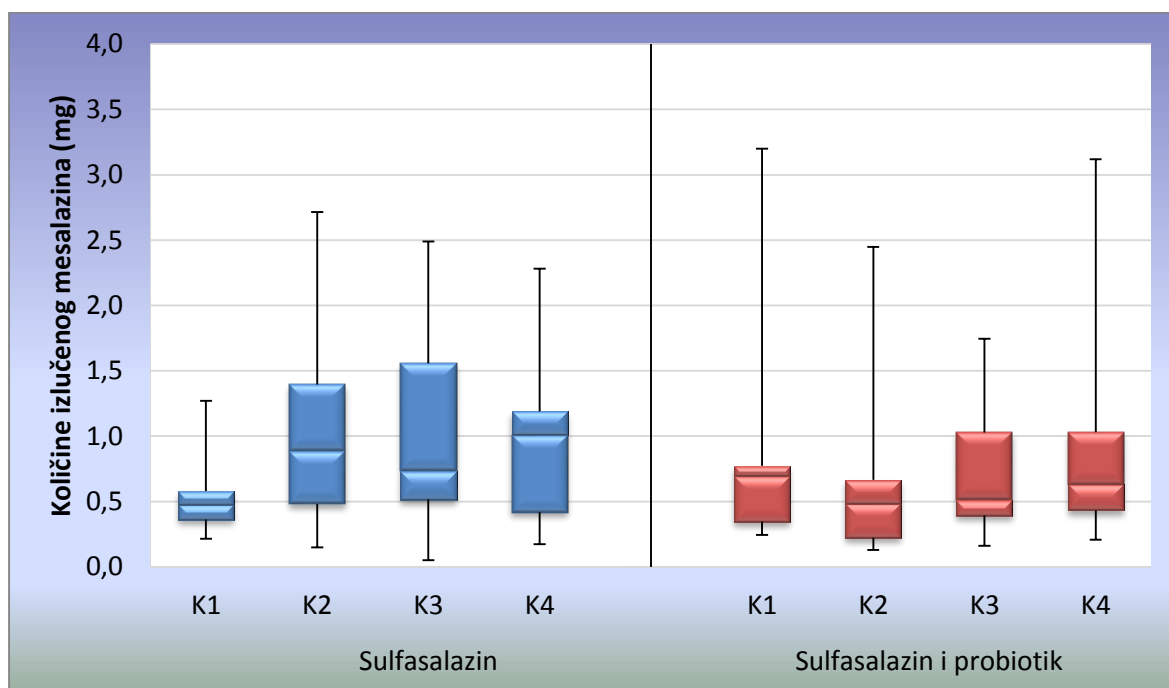
$p<0.05$

Pri poređenju količina mesalazina (mg) izlučenog u 24 h urinu između grupa ne postoje statistički značajne razlike (Tabela 84).

Tabela 84. Poređenje količina mesalazina (mg) izlučenog u 24 h urinu na različitim kontrolama prema ispitivanoj grupi

	Sulfasalazin		Sulfasalazin i probiotik		<i>p</i>
	n	Srednja vrijednost	n	Srednja vrijednost	
Prva kontrola	13	0.48 (0.36 , 0.58)	13	0.70 (0.35 , 0.77)	<i>M:</i> 0.427
Druga kontrola	14	0.89 (0.48 , 1.40)	14	0.48 (0.22 , 0.66)	<i>M:</i> 0.089
Treća kontrola	14	0.73 (0.52 , 1.56)	15	0.51 (0.39 , 1.03)	<i>M:</i> 0.239
Četvrta kontrola	14	1.01 (0.42 , 1.19)	14	0.63 (0.43 , 1.03)	<i>M:</i> 0.713

Vrijednosti količina mesalazina (mg) izlučenog u 24 h urinu za svaku kontrolu i obje ispitivane grupe su prikazane na grafikonu 25.

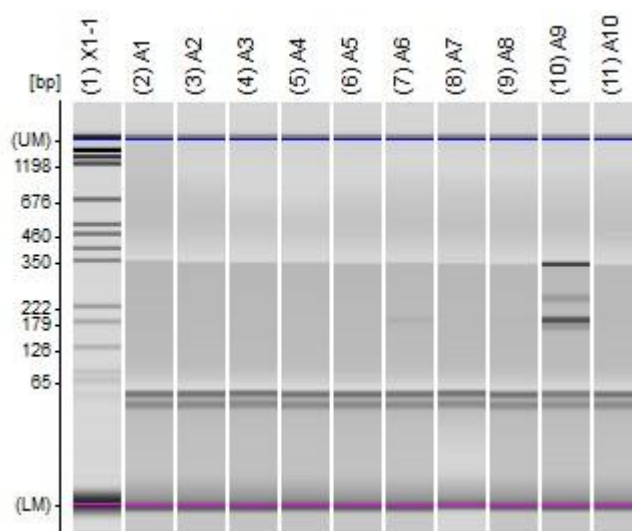


Grafikon 25. Količine mesalazina (mg) izlučenog u 24 h urinu na različitim kontrolama u obje ispitivane grupe

5.6. Detekcija probiotika u uzorku fecesa metodom PCR-elektroforeza na mikročipu

Uzorci stolice pacijenata iz grupe Sulfasalazin i probiotik (n=15) su analizirani metodom elektroforeze na mikročipu, radi utvrđivanja prisustva probiotiskih bakterija. Analiza PCR proizvoda urađena je nakon elektroforetskog razdvajanja dobijenih produkata upotrebom elektroforeze na čipovima MultiNA Shimadzu Biotech (Shimadzu, Japan). DNK bendovi koji korespondiraju sa onima od probiotika korištenih u istraživanju, su detektovani i identifikovani poređenjem migracijskog rastojanja dobijenog iz referentnih sojeva individualnih probiotika (*Lactobacillus rhamnosus* LGG i *Bifidobacterium lactis* BB-12).

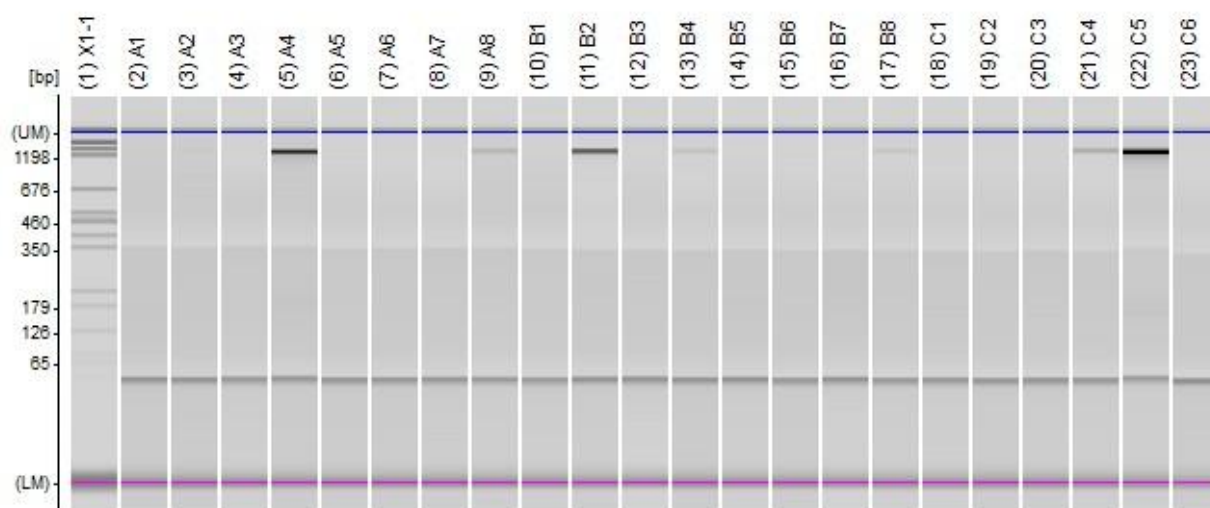
Niti u jednom od ispitivanih uzoraka nije potvrđeno prisustvo *Lactobacillus rhamnosus* LGG.



Slika 2. Profili umnožaka gena dobijeni elektroforezom na mikročipu specifični za *Lactobacillus rhamnosus* LGG koji su dobijeni u PCR reakcijama sa parom prajmera Prl-RhaII. Linija 1: Ljestvica visine baznih parova; linije 2-9: ispitivani uzorci; linija 10: pozitivna kontrola; linija 11: negativna kontrola.

Prisustvo *Bifidobacterium lactis* BB-12 je potvrđeno kod 17 od ukupno 75 analiziranih uzoraka. Uzorci koji su uzeti prije početka tretmana su pokazali prisustvo bakterije kod 2 ispitanika, a na prvoj kontroli je potvrđeno prisustvo bakterije kod samo jednog pacijenta. Na drugoj kontroli, koja se sprovodila poslije 2-sedmične terapije probiotikom, bakterija je detektovana kod 5 pacijenta. Na trećoj kontroli je dokazano prisustvo bakterije kod 3 ispitanika, a na četvrtoj kontroli, koja se sprovodila poslije 2-sedmične terapije probiotikom, je dokazano prisustvo

bakterije kod 6 ispitanika.



Slika 3. Profili umnožaka gena dobijeni elektroforezom na mikročipu specifični za *Bifidobacterium lactis* BB-12 koji su dobijeni u PCR reakcijama sa parom prajmera Lm3 i Lm26. Linija 1: Ljestvica visine baznih parova; linije 2-21: ispitivani uzorci; linija 22: pozitivna kontrola; linija 23: negativna kontrola.

6.DISKUSIJA

6.1.Broj bakterija u fekalnom sadržaju

Jednom naseljeni mikroorganizmi u probavnom traktu formiraju svoju zajednicu, koja u normalnim uslovima ostaje relativno stabilna tokom cijelog života individue tako da novouneseni mikroorganizmi teško mogu istisnuti već postojeće, naseljene bakterije[13].

U našem istraživanju smo željeli ustanoviti da li će primjena probiotika izazvati promjenu u broju fekalnih bakterija u pacijenata oboljelih od inflamatorne bolesti crijeva, odnosno da li će doći do promjene ukupnog broja aerobnih i anaerobnih fekalnih bakterija. Broj bakterija je izražavan kao logaritam CFU (*colony forming units*) po gramu fecesa. Jedna grupa pacijenata je dobijala samo sulfasalazin, a druga grupa je uz sulfasalazin dobijala i probiotik koji je bio kombinacija *Lactobacillus rhamnosus*GG i *Bifidobacterium* BB-12.

Pri kultivaciji u aerobnim uslovima u obje ispitivane grupe, nismo uočili statistički značajnu promjenu broja bakterija kad se porede vrijednosti prije i poslije tretmana mada je uočljiv trend rasta broja bakterija. I pri anaerobnim uslovima kultivisanja, u grupi Sulfasalazin, se uočava porast broja mikroorganizama, koji nije statistički značajan.

Interesantno je da je u grupi tretiranoj kombinacijom sulfasalazina i probiotika pri anaerobnim uslovima kultivisanja došlo do opadanja broja mikroorganizama u odnosu na početne vrijednosti, mada ni ono nije bilo statistički značajno.

I pored suprotnog smjera kretanja promjene broja bakterija, nema statistički značajne razlike pri poređenju između grupa pri anaerobnim uslovima kultivisanja.

Ovakva stabilnost broja bakterija u grupi tretiranoj sa sulfasalazinom, je u skladu sa nekim ranijim istraživanjima na zdravim dobrovoljcima [171]ali i na pacijentima oboljelim od Kronove bolesti [172]gdje takođe nisu uočene statistički značajne razlike u broju crijevnih bakterija u odnosu na pretretmanske vrijednosti.

Međutim, West i saradnici su u ispitivanju provedenom na oboljelim od IBD pokazali statistički značajno manji broj aerobnih i anaerobnih bakterija u grupi liječenoj sulfasalazinom u odnosu na grupu koja ga nije koristila[173]. Krook i saradnici[171]su pokazali da jednomjesečno liječenje sulfasalazinom dovodi do značajnog smanjenja broja anaerobnih bakterija. Nakon četiri mjeseca liječenja sulfasalazinom broj bakterija se vratio na početne vrijednosti, iako se smanjenje određenih sojeva bakterija i dalje održavalo. Neumann i saradnici [174]su poredili fekalnu floru kod zdrave populacije i kod oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA) na terapiji

sulfasalazinom. Uočeno je da je tokom terapije sulfasalazinom došlo do pada broja *Cl. perfringens* u odnosu na kontrolnu grupu gdje nije bilo promjena. *Tremaine* i saradnici [175] su uočili da pacijenti na terapiji sulfasalazinom imaju značajno nižu incidencu infekcija izazvanih *Cl. difficile* u odnosu na pacijente koji nisu na liječenju.

Hartley i saradnici su ispitivali uticaj sulfasalazina na crijevnu floru oboljelih od ulceroznog kolitisa [176]. Uočili su samo zanemarljivu promjenu u sastavu crijevne flore kolorektalne regije, što je u skladu sa ranijim zapažanjima vezanim za stabilnost sastava crijevne flore.

Stabilnost broja bakterija, u našem istraživanju se održava i u grupi tretiranoj kombinacijom sulfasalazina i probiotika. Slične rezultate su imali i drugi istraživači. *Bouhnik* i saradnici [177] su proveli studiju sa probioticima na pacijentima sa sindromom iritabilnih crijeva. U studiji je potvrđeno naseljavanje primjenjenih probiotskih bakterija i smanjenje aktivnosti beta glukuronidaze, pri čemu nije dolazilo do promjene ukupnog broja fekalnih anaerobnih bakterija

U istraživanju *Tanock*-a i saradnika je uočeno, da i pored promjene u sastavu *Lactobacillus*-ne flore, ne dolazi do statistički značajne promjene u populaciji obligatnih anaeroba, koji su brojčano dominantni članovi fekalne flore [178]. Interesantno je da je u našem istraživanju pri anaerobnim uslovima kultivisanja prisutan trend smanjenja broja bakterija.

Primjena probiotika može izazvati određene izmjene u mikrobnom profilu kao i u metaboličkoj aktivnosti u fecesu. Te promjene su generalno male, ali u slučaju kad se primjenjuju u patološkim stanjima mogu biti dovoljne za izmjenu toka bolesti. U najvećem broju slučajeva, primjena probiotika dovodi do povećanja broja bifidobakterija i laktobacila, smanjenja fekalnog pH kao i smanjenja aktivnosti bakterijskih enzima koji su povezani sa razvojem malignih tumora u debelom crijevu [179].

U istraživanju provednom na zdravim dobrovoljcima kojima se davao *Bifidobacterium longum* je ustanovljen porast broja bifidobakterija, a smanjenje broja klostridija, snižavanje nivoa fekalnog pH te smanjenje koncentracije amonijuma [180]. Moguće je da je smanjenje broja anaerobnih bakterija u našem ispitivanju, takođe, bilo rezultat smanjenja broja klostridija. Obzirom da se nije radila identifikacija bakterija unutar anaerobne grupe ne možemo to sa sigurnošću tvrditi.

6.2. Broj bakterija u crijevnom mukusu

Stabilnost zajednice MAMC je dobro poznata i dokumentovana [29]. U našem istraživanju smo pokušali da dobijemo reprezentativan uzorak mukusa pomoću četkica tokom rektoskopije. Za uzimanje uzoraka tokom rektoskopije, a ne kolonoskopije, smo se odlučili zbog manje invazivne pripreme pacijenata, koji se za kolonoskopiju pripremaju uzimanjem laktuloze za koju je poznato da utiče na sastav crijevne flore [181]. Za rektoskopiju smo pacijente pripremali primjenom lijeka bisakodil, koji na žalost nije doveo do najboljeg čišćenja tako da je prilikom uzimanja uzoraka čest dolazilo do kontaminacije sa fekalnim sadržajem. Dobijene količine mukusa su bile veoma male (masa u μg). S obzirom da smo imali mali broj četkica, višekratno su korištene i bile potapane u dezinfekcijsko sredstvo, a tečnost se nakon ispiranja u određenoj količini zadržavala na četkicama. Zbog uočenih tehničkih manjkavosti u radu, dobijene rezultate o broju CFU u mukusu, nismo smatrali validnim, te ih nismo niti uvrstili u rad.

6.3. Enzimska aktivnost fekalne flore

Metabolička aktivnost crijevne flore je ogromna, te uz jetru predstavlja najveći metabolički organ tijela. Enzimi, koje bakterije proizvode, učestvuju u brojnim procesima transformacije lijekova i drugih ksenobiotika. Sposobnost crijevne mikroflore da učestvuje u stvaranju i velikog broja različitih mutagena, karcinogena i promotora rasta tumora iz prehranbenih i endogeno nastalih prekursora, je veoma dobro dokumentovana [8,79].

Većina dosadašnjih saznanja o metaboličkoj aktivnosti crijevne flore su dobijena, uglavnom iz istraživanja koja se provode na životinjama te iz istraživanja koja se provode u *in vitro* modelima probavnog sistema [52,182], a mnogo rjeđe iz kliničkih istraživanja [183].

Iako je aktivnost azoreduktaze u jetri *in vitro* dokazana, ipak je crijevna azoreduktaza najvećim dijelom odgovorna za redukciju sulfasalazina (SSZ) *in vivo*. Ovakav značaj komenzalne flore u metabolizmu SSZ, znači da bilo kakva intervencija koja može dovesti do poremećaja sastava crijevne flore, može uticati na efikasnost SSZ i pojavu neželjenih dejstava. Dokazano je da smanjenje broja mikrororganizama npr. nakon primjene antibiotika širokog spektra [184] dovodi do smanjenja metabolizma SSZ.

Ranije provedena istraživanja su pokazala da su u crijevima glavni proizvođači azoreduktaze bakterije roda *Clostridium* i *Bacteroides* [185]. *In vitro* ispitivanja produkcije azoreduktaze su pokazala snažnu inaktivaciju enzima pri izlaganju kultura *Clostridium* i

Bacteroides vazduhu [65] dok azoreduktaza koju proizvodi *Pseudomonas* ne pokazuje inaktivaciju u prisustvu vazduha [187]. Cijepljenje azo veze sulfasalazina u bakterijskoj suspenziji i tkivnom homeogenatu je pokazalo da, za maksimum aktivnosti, azoreduktaza zahtijeva anaerobne uslove kao i prisustvo kofaktora NADPH i FAD [188].

Aktivnost azoreduktaze (AZ), u našem istraživanju, je bila snižena u obje eksperimentalne grupe, što nije u skladu sa nekim ranijim istraživanjima [189]. Statistički značajan pad aktivnosti azoreduktaze u odnosu na početne vrijednosti i prve dve kontrole, se vidi na 3. i 4. kontroli u obje grupe pri aerobnim uslovima kultivisanja.

I u anaerobnim uslovima je prisutan pad aktivnosti AZ, ali je samo kod pacijenata koji su uz sulfasalazin koristili i probiotike taj pad statistički značajan i u skladu sa padom broja anaerobnih mikroorganizama u istoj grupi. Ovi nalazi su u skladu sa kliničkim podacima koji govore o padu djelotvornosti SSZ pri dugotrajnoj primjeni kod IBD, jer dolazi do smanjenja aktivnosti azoreduktaze [173]. Carrette i saradnici [190] su pokazali da je aktivnost enzima crijevnih bakterija kod oboljelih od Kronove bolesti različita od onih kod zdravih osoba. Aktivnosti azoreduktaze, beta-glukozidaze i beta-glukuronidaze kod oboljelih su bile manje od onih kod zdravih osoba. Ovi rezultati dovode u pitanje terapijsku korist od azo-jedinjenja i glikozidnih prolijeкова kod takvih pacijenata, i objašnjavaju izostanak terapijskog efekta kod istih.

Aktivnosti nitroreduktaze (NZ) je kod pacijenata u obje ispitivane grupe statistički značajno rasla u odnosu na vrijednosti prije početka liječenja. Ovaj porast aktivnosti nitroreduktaze je, smatramo, posljedica povećanja broja mikroorganizama koji je proizvode. Interesantan je pad aktivnosti NZ na kontrolama poslije primjene probiotika u odnosu na vrijednosti mjerene na 1. i 3. kontroli kod pacijenata u grupi Sulfasalazina i probiotik. Smatramo da ovo smanjenje aktivnosti NZ u sedmicama nakon primjene probiotika ukazuje na to da sami probiotici doprinose smanjenju NZ.

Ovi rezultati su u skladu sa opisanim efektima nakon primjene *Bifidobacterium*-a i *Lactobacillus*-a koji se uobičajeno i koriste kao probiotici. Naime, kod ovih bakterija je dokazana niska produkcija metaboličkih enzima kao što su azoreduktaza, nitroreduktaza i beta-glukuronidaza u odnosu na druge anaerobe u probavnom traktu poput *Eubacteria*, *Bacteroides* i *Clostridia* [3]. U istraživanju grupe japanskih naučnika [191] je uočeno da su najveći proizvođači azoreduktaze, nitroreduktaze, beta-glukozidaze i beta-glukuronidaze bakterije roda *Clostridium*,

dok bakterije roda *Bifidobacterium* pokazuju nisku aktivnost AZ, NZ, beta- glukuronidaze, a nešto višu aktivnost beta-glukozidaze. *Saito* i saradnici[192]su takođe uočili da je aktivnost AZ i beta-glukuronidaze faktički nemjerljiva u bakterija roda *Bifidobacterium*.

Marteau i saradnici[193]su u ispitivanju provedenom na zdravim dobrovoljcima dokazali da unos mliječnih proizvoda koji sadrže *Bifidobacterium bifidum* i *Lactobacillus acidophilus* te mezofilne kulture bakterija (*Streptococcus lactis* i *Streptococcus cremoris*) tokom tri nedelje, smanjuje aktivnost nitroreduktaze, povećava aktivnost beta-glukozidaze, dok aktivnost azoreduktaze i beta-glukuronidaze ostaje nepromijenjena.

U studiji *Ling* i saradnika [86]je dokazano da već i suplementacija jogurtom sa *Lactobacillus GG* smanjuje aktivnost fekalne beta glukuronidaze, nitroreduktaze i glikoholne hidrolaze. Po prestanku tretmana, vrijednosti su se vratile na početne. Čisti i fakultativni anaerobi proizvode velike količine beta glukuronidaze i nitroreduktaze dok laktobacilusi proizvode male količine ovih enzima. Djelimična zamjena u standardnoj flori sa *Lactobacillus GG* može smanjiti nivo aktivnosti beta glukuronidaze, nitroreduktaze i aktivnosti glikoholne hidrolaze. I neke ranije studije su potvrdile rezultate ove studije, jer su ustanovile smanjenje fekalne aktivnosti beta glukuronidaze i nitroreduktaze nakon unosa *Lactobacillus GG*[186, 193,194,195]. Postoji trend pada aktivnosti beta glukozidaze kod svih pacijenata u odnosu na početne vrijednosti, bez obzira na eksperimentalnu grupu. U grupi koja je liječena samo sulfasalazinom, na trećoj i četvrtoj kontroli, je došlo do povećanja aktivnost enzima u odnosu na grupu koja je dobijala i probiotik. Ovakvi rezultati su u skladu sa ranijim istraživanjima[192]u kojima je uočeno smanjenje enzimske aktivnosti AZ, betaglukuronidaze i beta glukozidaze nakon povećanja broja bifidobakterija, zbog posljedičnog makar i privremenog, istiskivanja drugih bakterija koje imaju veću aktivnost tih enzima. *Goldin* i *Gorbach*[196]su uočili da davanje velikog broja bakterija roda laktobacilus dovodi do smanjenja aktivnosti istih enzima.

Aktivnost beta-glukuronidaze u obje ispitivane grupe je opadala, ali za razliku od beta-glukozidaze, njena aktivnost u pacijenata liječenih SSZ i probiotikom, je padala statistički značajno. I kod ovog enzima je uočena statistički značajno veća aktivnost pri trećoj kontroli u grupi liječenoj samo sulfasalazinom u odnosu na grupu koja je dobijala i probiotik. *Nakamura* i saradnici[191]su na *in vitro* modelu pokazali da *Bifidobacterium* ima nisku produkciju beta-glukuronidaze, i nešto veću produkciju beta-glukozidaze u odnosu na beta-glukuronidazu, čime možemo objasniti i razliku u statističkoj značajnosti promjene jednog i drugog enzima.

6.4. Sulfasalazin i njegovi metaboliti izlučeni u urinu

Po svojoj strukturi sulfasalazin (salicilazosulfapiridin, salazopirin, salazosulfapiridin) je konjugat 5-aminosalicilne kiseline (5-ASA, mesalazin, mesalamin) i sulfonamida sulfapiridina, koji su međusobno spojeni azo vezom. Pripremljen je tako da se oslobađa i apsorbuje u crijevima, jer je vrlo slabo rastvorljiv u vodi u kiselim uslovima, te se ne apsorbuje u želucu. Nakon peroralnog davanja u nepromijenjenom obliku apsorbuje se u promjenjivim količinama od 3-33%. Njegova koncentracija u sistemskej cirkulaciji iznosi oko 2-13%. Smatra se da je niska biološka raspoloživost sulfasalazina rezultat postojanja efluksnih pumpi. Dokazano je postojanje najmanje dva ćelijska efluksna mehanizma; protein vezan za multiplu rezistenciju na lijekove i anjonski transportni sistem. Specifičnost apsorpcije sulfasalazina je posljedica njegove intaktnosti, jer ni jedan od njegovih degradacionih produkata nema afinitet za efluksne pumpe. Humani serumski albumini imaju 3 klase vezujućih mjesta za sulfasalazin i oko 83% sulfasalazina je vezano za prvu klasu. U studijama *in vivo* procenat ukupno vezanog sulfasalazina za humane albumine je iznosio oko 99%. Ovakvo, izrazito plazmatsko, vezivanje ukazuje na to da su samo male količine ove supstance dostupne za prodor u druga tkiva. Manje od 5% apsorbovanog sulfasalazina se metaboliše u tankom crijevu ili jetri, a dvije trećine od toga dopijeva u sistemskej cirkulaciju, veže se za plazmatske proteine i izlučuje urinom.

Ipak, najveća količina unesenog sulfasalazina se ne apsorbuje u tankom crijevu, nego dopijeva u kolon i metaboliše se u SP i 5-ASA pod uticajem bakterijske azoreduktaze. Intenzitet razgradnje zavisi od aktivnosti crijevne flore i brzine crijevne peristaltike[197]. Iz tog razloga u svim slučajevima poremećaja crijevne flore ili ubrzanja peristaltike dolazi i do poremećaja u metabolisanju ovog lijeka što utiče na njegovu bioraspoloživost [198].

Sulfasalazin je jedan od lijekova koji je zasigurno među prvim maskrenu opaznjuna farmakološki značaj intestinalnih mikroorganizama. Kasnija istraživanja su dokazala da je intestinalna mikroflora mjesto intenzivnih metaboličkih transformacija kako endogenih tako i egzogenih supstanci[52,199].

Za razliku od sulfasalazina, sulfapiridin se dobro i gotovo potpuno apsorbuje (60-80%) iz kolona zdravih osoba, a metaboliše se acetilacijom, hidroksilacijom i glukurinacijom. Apsorpcija ne zavisi od acetilatorskog fenotipa. Postoje individualne razlike u brzini acetilacije sulfapiridina. Kod "sporih acetilatora" maksimalna koncentracija sulfapiridina u plazmi daleko je veća te je i

rizik od pojave neželjenih dejstava povećan za 2-3 puta u odnosu na istu dozu kod "brzih acetilatora". Sulfapiridin i njegovi metaboliti se izlučuju urinom i nije dokazana enterohepatička recirkulacija.

Mesalazin (5-ASA) se slabo apsorbira iz kolona; 25% nastale 5-ASA-e se apsorbira i brzo izlučuje preko bubrega nakon acetilacije; oko 50% se zadržava u crijevima i izbacuje putem fecesa, a sudbina preostalih 25% nije poznata [197]. Svoj koristan efekt kod pacijenata sa inflamatornom bolesti crijeva ispoljava lokalnim djelovanjem u mukozu kolona [200].

Jedan od ciljeva našeg istraživanja je bio i taj da ustanovimo da li će primjena probiotika uticati na metabolizam sulfasalazina. Slično ispitivanje su radili *Lee* i saradnici na pacijentima oboljelim od reumatoidnog artritisa [183] ali je u njihovom istraživanju primjena probiotika trajala svega 7 dana.

Smatra se da nakon peroralne primjene probiotika imaju sposobnost dostavljanja enzima i metaboličkih produkata u crijeva, što za posljedicu može imati indukciju ili inhibiciju metaboličkih aktivnosti crijevnih mikroorganizama [195,201].

U našem istraživanju nismo uočili statistički značajne razlike između izmjerenih vrijednosti sulfasalazina (SSZ) izlučenog u urinu unutar grupa, ali je primjetno da su pri poređenju između eksperimentalnih grupavrijednostibile veće kod ispitanika iz grupe sa sulfasalazinom i probiotikom. I drugi istraživači [183] su uočili da vrijednosti SSZ izmjerenog u plazmi rastu nakon primjene probiotika, mada i kod njih vrijednosti u urinu nađenog SSZ nisu pokazale značajnu promjenu nakon primjene probiotika.

Vrijednosti sulfapiridina (SP) u urinu u grupi tretiranoj sulfasalazinom i probiotikom subile veće, ali bez statističke značajnosti, u odnosu na grupu tretiranu samo sulfasalazinom. Takođe je primjetan i pad količine SP u Sulfasalazin i probiotik grupi na kontrolama provedenim poslije davanja probiotika. I u drugim istraživanjima [183] je primjećen pad vrijednosti SP u plazmi, ali ne i u urinu, nakon primjene probiotika, ali bez statističke značajnosti. U ispitivanjima provedenim na životinjama takođe je došlo porasta vrijednosti SP nakon davanja probiotika, ali nije ustanovljena statistički značajna razlika između kontrolne grupe i grupe koja je dobijala probiotik [189].

Interesantno je da su vrijednosti mesalazina (5-ASA) u urinu u grupi tretiranoj sulfasalazinom i probiotikom su (osim na 1. kontroli) bile niže, ali bez statističke značajnosti, u odnosu na grupu tretiranu samo sulfasalazinom. Ovakve vrijednosti su u suprotnosti sa

izmjerenim vrijednostima sulfapiridina kod istih ispitanika. Kod drugih istraživača[183] nije došlo do statistički značajne promjene u vrijednostima izmjerene 5-ASA niti u plazmi niti u urinu prije i poslije primjene probiotika.

Ovakvi rezultati ukazuju da je moguće da je primjena probiotika odgovorna za ove promjene. Lee i saradnici[183] u svom radu nisu dokazali statistički značajne promjene u urinarnoj ekskreciji ni sulfasalazina ni njegovih metabolita, iako se plazmatska koncentracija SSZ nakon primjene probiotika povećala za 23%, a koncentracija SP i 5-ASA smanjila za 9% i 6%.

6.5. Sulfasalazin i njegovi metaboliti u fekalnom sadržaju-in vitro metabolizam

Količine izmjerenog SSZ i SP, u grupi tretiranoj sulfasalazinom i probiotikom pri oba kultivacijska uslova, pokazuju trend pada vrijednosti za obe supstance na kontrolama provedenim poslije 2-sedmične primjene probiotika, u odnosu na kontrole provedene nakon primjene isključivo sulfasalazina. Količina izmjerenog mesalazina u istoj grupi ne pokazuje jednak trend promjene kao SSZ i SP. Samo pri aerobnim uslovima kultivisanja u 30., 60. i 90. minuti mjerenja je došlo do pada vrijednosti mesalazina na kontrolama provedenim poslije 2-sedmične primjene probiotika, u odnosu na kontrole provedene nakon primjene isključivo sulfasalazina.

Vrijednosti izmjerenog SSZ se u našem istraživanju nisu značajno mijenjale, iako je aktivnost azoreduktaze (AZ) opadala, pa smo očekivali da će količina SSZ da raste. Statistički značajan porast SSZ je primjetan jedino unutar grupe tretirane sulfasalazinom i probiotikom, na trećoj kontroli u 90. minuti pri aerobnim uslovima kultivisanja.

Pri oba uslova kultivisanja kod pacijenata u grupi tretiranoj samo sulfasalazinom, je prisutan porast sulfapiridina (SP) u odnosu na početne vrijednosti, iako to ne bismo očekivali obzirom na pad aktivnosti AZ. Kod pacijenata iz grupe tretirane sulfasalazinom i probiotikom nije došlo do statistički značajnih promjena vrijednosti SP u odnosu na pretretmanske vrijednosti iako i ovdje postoji značajan pad aktivnosti AZ.

Interesantno je da se vrijednost mesalazina (5-ASA) u grupi liječenoj sulfasalazinom nije značajno mijenjala, iako je vrijednost SP kod ove grupe pacijenata u odnosu na vrijednosti prije tretmana rasla. Ovakvi rezultati se donekle razlikuju od onih dobijenih *in vivo* gdje su vrijednosti i jednog i drugog metabolita (5-ASA i SP) rasle u odnosu na početne vrijednosti.

Za razliku od SP koja nije pokazivala promjenu vrijednosti, vrijednost 5-ASA kod pacijenata iz grupe liječene sulfasalazinom i probiotikom, je opadala u odnosu na vrijednosti prije

tretmana. Ovi rezultati pokazuju sličnost sa *in vivo* rezultatima gdje su vrijednosti 5-ASA takođe opadale u odnosu na početnu vrijednost dok su vrijednosti SP opadale na kontrolama nakon tretmana probioticima. Kad poredimo rezultate izmjerene *in vitro* i *in vivo* vidljiv je trend stagniranja ili pada vrijednosti metabolita. Ovakvi nalazi podupiru hipotezu da probiotici utiču na metaboličke izmjene supstanci.

Efekti uočeni u grupi liječenoj sulfasalazinom i probiotikom, ne ukazuju na moguće pozitivno dejstvo kod oboljelih od IBD, jer se vrijednosti SP ne mijenjaju značajnije u odnosu na pretremanske vrijednosti, dok vrijednosti mesalazina koji se upravo i smatra aktivnom komponentom u liječenju IBD, pokazuju trend opadanja [202].

6.6. Detekcija probiotika u uzorcima fecesa PCR-elektroforezom na mikročipu

Sposobnost oralno unesenih probiotika da prežive unutar probavnog sistema i da se adheriraju za crijevnu mukozu su osobine koje su od posebne važnosti za preživljavanje probiotika. *In vivo* kolonizacija se uglavnom izučava proučavanjem fekalnih uzoraka, što daje nedovoljno informacija o eventualnoj kolonizaciji različitih segmenata probavnog sistema. Lee i saradnici [203] su izučavali preživljavanje mješavine više sojeva probiotika i njihovu sposobnost priljublivanja za mukozu pri prolasku kroz probavni sistem pacova. Životinje su dobijale komercijalanu mješavinu probiotika porijeklom iz crijeva *Lactobacillus acidophilus* LA742, *Lactobacillus rhamnosus* L2H, *Bifidobacterium lactis* HN019 i bakteriju porijekla iz usta *Streptococcus salivarius* K12 tokom 3 dana. Ispitivanje je pokazalo da bakterije porijeklom iz crijeva, ali ne i iz usta, pokazuju privremenu kolonizaciju probavnog trakta, kao i da pojedne bakterije pokazuju relativni afinitet za kolon ili ileum. Potvrđeno je prisustvo *B. lactis* i *L. rhamnosus* u uzorku mukusa crijeva i 7 dana nakon prestanka primjene. Ovi rezultati dobijeni ispitivanjem na životinjskom modelu su u skladu sa ispitivanjima provedenim na ljudima [113] gdje je potvrđeno prisustvo bakterije u crijevnom mukusu, mada nije dokazano prisustvo bakterije u uzorku stolice.

Brojna *in vitro* istraživanja su potvrdila da je trajno naseljavanje neke bakterije u domaćinovim crijevima moguće samo ako bakterija uspije da se adherira za enterocite [204-207].

Ipak *in vivo* istraživanja do sad pokazuju uglavnom suprotne rezultate onima iz *in vitro* istraživanja. Bouhnik i saradnici su proveli istraživanje u kome se pratio stepen zadržavanja jedne vrste bifidobakterije u probavnom sistemu nakon prestanka njegove primjene [208]. Ustanovljeno

je da nakon prestanka primjene probiotika, on ne može više da se pronađe u fecesu, te su autori zaključili da primjenjeni probiotik nije kolonizovao ljudski kolon.

Prisustvo *Bifidobacterium*BB12 tokom našeg istraživanja smo utvrdili kod 22% ispitivanih uzoraka. Uočljivo je povećanje broja pozitivnih uzoraka (potvrđeno prisustvo DNK) na kontrolama koje su slijedile poslije 2-sedmične primjene probiotika.

Kullen i saradnici [209]su određeni soj bifidobakterije tokom kontinuiranog unosa redovno identifikovali u fecesu, ali nakon prestanka unosa se taj soj više nije mogao izolovati. Zaključak istraživača je bio, da iako su bakterije preživjele prolazak kroz probavni trakt nisu mogle da ga kolonizuju. S druge strane su zaključili da je kolonizacija bakterija možda i nepotrebna za postizanje pozitivnih efekata probiotika.

Takvo stanovište je potvrđeno istraživanjem *Fujiware* i saradnika [210]koji su otkrili da bifidobakterije proizvode jedan protein koji sprečava adheziju patogenih sojeva *E.coli*.

I za jedan od najistraživanijih probiotika, *L.rhamnosus GG*, se tvrdi da kolonizuje humani probavni trakt, mada su podaci kojima se te tvrdnje potkrepljuju u stvari rezultati *in vitro* studija. Studije koje su provedene na zdravim dobrovoljcima nisu potvrdile kolonizaciju ove bakterije, nego samo prolazno prisustvo[85,211]

S druge strane *Alander* i saradnici [113]su u svom istraživanju ustnovili da je *L. rhamnosusGG* kod zdravih osoba sposobna da se adherira i zadrži na sluznici crijeva još izvjesno vrijeme nakon prestanka primjene probiotika.

Rezultati dobijeni tokom našeg istraživanja su u suprotnosti sa nalazom *Alandera*i saradnika[113], jer prisustvo *Lactobacillus rhamnosusGG* nismo utvrdili ni u jednom ispitivanom uzorku. Ispitivanje koje smo mi provodili je izvedeno na pacijentima oboljelim od IBD, za razliku od istraživanja *Alandera*i saradnika koje je provedeno na zdravim dobrovoljcima.

7.ZAKLJUČCI

I Aktivnost azoreduktaze pri aerobnim uslovima kultivisanja statistički značajan opada i kod ispitanika u grupi sulfasalazin i kod ispitanika u grupi sulfasalazin i probiotik.

II Pri anaerobnim uslovima kultivisanja statistički značajan pad aktivnosti azoreduktaze postoji samo u grupi koja je uz sulfasalazin koristila i probiotike. Ovi nalazi su u skladu sa smanjenjem broja anaerobnih bakterija u grupi sulfasalazin i probiotik.

III Aktivnost nitroreduktaze statistički značajno raste, u odnosu na vrijednosti prije početka liječenja, kod ispitanika u grupi sulfasalazin i kod ispitanika u grupi sulfasalazin i probiotik pri aerobnim i pri anaerobnim uslovima kultivisanja. Ovaj porast aktivnosti nitroreduktaze je vjerovatno posljedica povećanja broja mikrororganizama koji je produkuju.

IV U grupi liječenoj kombinacijom sulfasalazina i probiotika je uočljiv pad aktivnosti nitroreduktaze nakon 2-nedeljne primjene probiotika. Moguće je da je smanjenje aktivnosti nitroreduktaze u sedmicama nakon primjene probiotika rezultat dejstva samih probiotika.

V Aktivnost beta glukozidaze opada u odnosu na početne vrijednosti kod ispitanika i u grupi sulfasalazin i u grupi sulfasalazin i probiotik, pri aerobnim i pri anaerobnim uslovima kultivisanja. Kod ispitanika u sulfasalazin grupi postoji veću aktivnost enzima u odnosu na grupu sulfasalazin i probiotik. Ova razlika je vjerovatno posljedica povećanja broja bifidobakterija i laktobacila zbog nastalog istiskivanja drugih bakterija koje pokazuju veću aktivnost ovog enzima.

VI Aktivnost beta-glukuronidaze opada i kod ispitanika u grupi sulfasalazin i u grupi sulfasalazin i probiotik, pri čemu je kod pacijenata liječenih kombinacijom sulfasalazina i probiotika taj pad i statistički značajan. I kod ovog enzima je uočena statistički značajno veća aktivnost u grupi liječenoj samo sulfasalazinom u odnosu na grupu koja je dobijala sulfasalazin i probiotik. Ovakvi rezultati su, smatramo, posljedica povećanja broja bifidobakterija i laktobacila zbog nastalog istiskivanja drugih bakterija koje imaju veću aktivnost ovog enzima.

VII Primjena sulfasalazina ne dovodi do statistički značajne promjene broja fekalnih bakterija ni pri aerobnim niti anaerobnim uslovima kultivisanja, mada je prisutan trend rasta broja bakterija u odnosu na početne vrijednosti.

VIII Primjena kombinacije sulfasalazina i probiotika takođe ne dovodi do statistički značajne promjene broja fekalnih bakterija ni pri aerobnim niti anaerobnim uslovima kultivisanja. I u ovoj eksperimentalnoj grupi pri aerobnim uslovima kultivisanja broj bakterija raste, ali pri anaerobnim uslovima kultivisanja broj bakterija opada u odnosu na početne vrijednosti. Moguće je da je probiotik izazvao trend smanjenja broja anaerobnih bakterija smanjenjem prije svega broja bakterija iz roda klostridija.

IX Količina sulfasalazina izlučenog u urinu se nije statistički značajno mijenjala, iako su u grupi liječenoj kombinacijom sulfasalazina i probiotika vrijednosti veće u odnosu na grupu koja je dobijala samo sulfasalazin.

X Količina sulfapiridina izlučenog u urinu se nije statistički značajno mijenjala, iako je u grupi liječenoj kombinacijom sulfasalazina i probiotika prisutan blag pad na kontrolama provedenim poslije 2-nedjeljnog davanja probiotika. Ovakvi rezultati ukazuju da je moguće da je primjena probiotika odgovorna za ove promjene i u skladu su sa padom aktivnosti azoreduktaze i porastom vrijednosti sulfasalazina u urinu.

XI Količinamesalazina (5-ASA)izlučenog u urinunije pokazala statistički značajne promjene vrijednosti. Kod ispitanika liječenih sulfasalazinom 5-ASA je rasla u odnosu na početne vrijednosti, dok je kod ispitanika tretiranih sulfasalazinom i probioticima došlo do pada količine nastalog mesalazina.

XII Količina sulfasalazina izmjerenog u uzorku fecesa kod ispitanika u grupi Sulfasalazin i u grupi Sulfasalazin i probiotik,pokazuje trend opadanja, iako je aktivnost azoreduktaze u obje ispitivane grupe opadala.

XIII Količina sulfapiridina nastalog u uzorku fecesa, kod pacijenata liječenih samo sulfasalazinom je rasla, dok u grupi liječenoj sulfasalazinom i probiotikom nije došlo do statistički značajnih promjena.

XIV Količina mesalazina (5-ASA)nastalog u uzorku fecesa, kod pacijenata liječenih samo sulfasalazinom se nije značajno mijenjala, a u grupi liječenoj sulfasalazinom i probiotikom je opala u odnosu na početne vrijednosti.

XV Prolazna kolonizacija *Bifidobacterium*BB12 je potvrđena kod 22% ispitivanih uzoraka. Uočljivo je povećanje broja pozitivnih uzoraka na kontrolama koje su slijedile poslije 2-sedmične primjene probiotika, što je potvrđeno korištenjem metodePCR amplifikacije različitih regiona unutar 16S rDNK.

XVI *Lactobacillus rhamnosus* GG nije pokazala prolaznu kolonizaciju probavnog trakta, što je potvrđeno korištenjem metode PCR amplifikacije različitih regiona unutar 16S rDNK.

8.LITERATURA

1. Tlaskalova-Hogenova H, Stipankova R, Kozakova H, et al. The role of gut microbiota (comensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune disease and cancer. Contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cellular & Molecular Immunology* 2011; 8:110-120.
2. Ilett K, Tee LB, Reeves PT, Mincin RF. Metabolism of drugs and other xenobiotics in the gut lumen and wall. *Pharmacol Ther* 1990; 46:67-93.
3. Burns AJ, Rowland IR. Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Current Issues Intestinal Microbiology* 2000; 1(1):13-24.
4. Mikov M, Lee HJ, Fawcett JP. The influence of probiotic treatment on sulfasalazine metabolism in rat gut contents. *Asian J. Pharmacokinet Pharmacodyn* 2006; 6:337-342.
5. Heselmans M, Reid G, Akkermans L, Savelkoul H, Timmerman H, Rombouts F. Gut flora in health and disease: potential role of probiotics. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2004; 6:1-8.
6. Verna EC, Lucak S. Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 2010; 3(5):307-319.
7. Ghouri A Y, Richards DM, Rahimi EF, Krill JT, Jelinek KA, DuPontet AW. Systematic review of randomized controlled trials of probiotics, prebiotics and synbiotics in inflammatory bowel disease. *Clinical and experimental gastroenterology* 2014; 7:473-487.
8. Stojančević M, Bojić G, Salami HA i Mikov M. The influence of intestinal tract and probiotics on the fate of orally administered drugs. *Curr Issues Mol Biol* 2014; 16(2):55-68.
9. Yu LC, Wyng JT, Wei SC, Ni YH. Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: from physiology to pathology. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* 2012; 3 (1):27-43.
10. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 2010; 90: 859–904.
11. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science (New York, NY)* 2005; 308(5728):1635-1638.
12. Schraiber O. Microcirculation, mucus and microbiota in inflammatory bowel disease. PhD thesis, Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala. 2010.

13. Walter J. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(16):4985-96.
14. Behnsen J, Deriu E, Sassone-Corsi M, Raffatellu M. Probiotics: properties, examples, and specific applications. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2013; 3(3):a010074.
15. Hooper L. V. Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nature Reviews Microbiology* 2009; 7:367-374.
16. Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut* 2001; 48:198–205.
17. Zoetendal EG, Akkermans ADL, Akkermans-van Vilet WM, DeVisser JAGM, DeVos WM. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microb Ecol Health Dis* 2001;13:129–134.
18. Ouwehand AC, Isolauri E, He F, Hashimoto H, Benno Y, Salminen S. Differences in *Bifidobacterium* flora composition in allergic and healthy infants. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001; 108:144-145.
19. Grönlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero PJ. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28(1):19-25.
20. Xu J, Gordon JI. Honor thy symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(18):10452-10459.
21. Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* 1996; 4: 430-5
22. Bäckhed S, Bäckhed F, Bäckhed F. The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology* 2013; 11(4): 227-238.
23. Shanahan F. The host-microbe interface within the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16(6): 915-31
24. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. *Cell* 2005; 122: 107–118.
25. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004; 118(2):229-241.

26. Weinstein PD, Cebra JJ. The preference for switching to IgA expression by Peyer's patch germinal center B cells is likely due to the intrinsic influence of their microenvironment. *J Immunol* 1991; 147(12):4126-4135.
27. Isolauri E, Kirjavainen PV, Salminen S. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut* 2002; 50:54-59.
28. Hansson GC, Johansson ME. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Gut Microbes* 2010;1(1):51-54.
29. Van den AP, Van de Wiele T, Verstraete W, Possemiers S. The host selects mucosal and luminal associations of coevolved gut microorganisms: a novel concept. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35: 681–704.
30. Metchnikoff E. The prolongation of life. New York: Putnam and Sons, 1908.
31. Grönlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen OP, Isolauri E. Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow-up study of healthy infants aged 0-6 months. *Archives of Disease in Childhood Fetal Neonatal Edition* 2000; 83: F186-F192
32. Ahmed S, Macfarlane GT, Fite A, McBain AJ, Gilbert P, Macfarlane S. Mucosa-associated bacterial diversity in relation to human terminal ileum and colonic biopsy samples. *Applied and Environmental Microbiology* 2007;73(22):7435-7442.
33. Zoetendal EG, Akkermans ADL, Akkermans-van Vilet WM, DeVisser JAGM, DeVos WM. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microb Ecol Health Dis* 2001;13: 129–134
34. Macfarlan S, Dillon JF. Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Journal of applied microbiology* 2007; 102:1187-1196.
35. Antoni L, Nuding S, Wehkamp J, Stange EF. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 2014;20(5):1165-1179.
36. Van Tassell ML, Miller MJ. *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients* 2011; 3(5): 613-636
37. Rogier EW, Frantz AL, Bruno MEC, Kaetzel CS. Secretory IgA is concentrated in the outer layer of colonic mucus along with gut bacteria. *Pathogens* 2014;3(2):390-403.

38. Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 2006; 131:117-129
39. Gallo RL, Hooper LV. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nature reviews Immunology* 2012; 12(7):503-516.
40. Borchers AT, Selmi C, Meyers FJ, Keen C., Gershwin M.E. Probiotics and immunity. *J Gastroenterol* 2009; 44:26–46.
41. Abreu M. T. Toll-like receptor signaling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature Reviews Immunology* 2010; 10(2): 131-144.
42. Fukata M, Michelsen KS, Eri R, et al. Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288(5):G1055-65.
43. Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotic Mechanisms of Action. *Ann Nutr Metab* 2012; 61:160–174
44. Barnes P. Th2 cytokines and asthma: an introduction. *Respir Res* 2001; 2(2): 64–65.
45. Rajilić-Stojanović M, De Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev* 2014; 38(5):996-1047.
46. Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* 1997; 1(2):12-26.
47. Harrison OJ, Maloy KJ. Innate immune activation in intestinal homeostasis. *Journal of innate immunity* 2011; 3(6):585-593.
48. Rescigno M. Dendritic cells in oral tolerance in the gut. *Cellular Microbiology* 2001; 13: 1312–1318.
49. Gilbert RS, Kobayashi R, Sekine S, Fujihashi K. Functional transforming growth factor-beta receptor type II. *PLoS One* 2011; 6(11): e27501.
50. Abreu M T. Toll-like receptor signaling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature Reviews Immunology* 2010; 10(2):131-144.
51. Yeoh N, Burton JP, Suppiah P, Reid G, Stebbings S. The role of microbiome in Rheumatic disease. *Curr Rheumatol Rep* 2013; 15: 314.
52. Mikov M. The metabolism of drugs by the gut flora. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1994; 19(3):201-7.

53. Saulnier DM, Kolida , Gibson GR Microbiology of the human intestinal tract and approaches for its dietary modulation. *Curr Pharm Des* 2009; 15:1403-1414.
54. Fagerholm U. Prediction of human pharmacokinetics—gut-wall metabolism. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2007; 59:1335–1343.
55. Shen DD, Kunze KL, Thummel KE. Enzyme-catalyzed processes of firstpass hepatic and intestinal drug extraction. *Adv Drug Deliv Rev* 1997; 27:99-127.
56. Haslam IS, Jones K, Coleman T, Simmons NL. Induction of P-glycoprotein expression and function in human intestinal epithelial cells (T84). *Biochem Pharmacol* 2008; 76:850-861.
57. Mealey KL, Waiting D, Raunig DL, Schmidt KR, Nelson FR. Oral bioavailability of P-glycoprotein substrate drugs do not differ between ABCB1- 1Delta and ABCB1 wild type dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 2010; 33:453-460.
58. Colabufo NA, Berardi F, Perrone MG, et al. Substrates, Inhibitors and Activators of P-Glycoprotein: Candidates for Radiolabeling and Imaging Perspectives. *Curr Top Med Chem* 2010; 10:1703-1714.
59. Sousa T, Paterson R, Moore V, et al. The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs *Int J Pharm.* 2008; 363:1-25.
60. Cummings JH, Antoine JM, Azpiroz F, et al. PASSCLAIM-gut health and immunity. *Eur J Nutr* 2004; 2:II118-II173.
61. Simon GL, Gorbach SL. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology* 1984; 86:174-193.
62. Rowland I. Modification of gut flora metabolism by probiotics and oligosaccharides. In: Fuller R, Heidt PJ, Rusch V, van der Waai D, eds. Old Herborn University Seminar Monograph 8: Probiotics: prospects of use in opportunistic infections. Herborn-Dill, Germany: Institute for Microbiology and Biochemistry; 1995:35-46.
63. Gingell R, Bridges JW, Williams RT. The role of the gut flora in the metabolism of prontosil and neoprontosil in the rat. *Xenobiotica* 1971; 1:143-156.
64. Peppercorn MA, Goldman P. The role of intestinal bacteria in the metabolism of salicylazosulfapyridine. *J Pharmacol Exp Ther* 1972; 181:555-562
65. Rafii F, Franklin W, Cerniglia CE. Azoreductase activity of anaerobic bacteria isolated from human intestinal microflora. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56:2146-2151.

66. Takeno S, Nakagawa M, Sakai T. Teratogenic effects of nitrazepam in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1990; 69:59-70.
67. Elmer GW, Remmel RP. Role of the intestinal microflora in clonazepam metabolism in the rat. *Xenobiotica* 1984; 14:829-840.
68. Koch RL, Beaulieu BB, Jr., Goldman P. Role of the intestinal flora in the metabolism of misonidazole. *Biochem Pharmacol* 1980; 29:3281-3284.
69. Tissier H. Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. *C. R. Soc. Biol* 1906; 60:359-361.
70. Okuda H, Ogura K, Kato A, Takubo H, Watabe T. A possible mechanism of eighteen patient deaths caused by interactions of sorivudine, a new antiviral drug, with oral 5-fluorouracil prodrugs. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 287:791-799.
71. Elkington SG, Floch MH, Conn HO. Lactulose in the treatment of chronic portal-systemic encephalopathy. A double-blind clinical trial. *N Engl J Med* 1969; 281:408-412.
72. Goldin BR, Peppercorn MA, Goldman P. Contributions of host and intestinal microflora in the metabolism of L-dopa by the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1973; 186:160-166.
73. Tozaki H, Emi Y, Horisaka E, et al. Metabolism of peptide drugs by the microorganisms in rat cecal contents. *Biol Pharm Bull* 1995; 18:929-931.
74. Narushima S, Itoha K, Miyamoto Y, et al. Deoxycholic acid formation in gnotobiotic mice associated with human intestinal bacteria. *Lipids* 2006; 41:835-843.
75. Adlercreutz H, Martin F. Biliary excretion and intestinal metabolism of progesterone and estrogens in man. *J Steroid Biochem* 1980; 13:231-244.
76. Winter J, Bokkenheuser VD. Bacterial metabolism of natural and synthetic sex hormones undergoing enterohepatic circulation. *J Steroid Biochem* 1987; 27:1145-1149.
77. Caldwell J, Hawksworth GM. The demethylation of methamphetamine by intestinal microflora. *J Pharm Pharmacol* 1973; 25:422-424.
78. Favier C, Neut C, Mizon C, Cortot A, Colombel JF, Mizon J. Fecal β -d-galactosidase production and bifidobacteria are decreased in Crohn's disease. *Digestive diseases and sciences* 1997; 42(4):817-822.
79. Hughes R, Rowland IR. Metabolic activities of the gut microflora in relation to cancer.. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2000; Suppl 2:179–185.

80. Van de Wiele T, Vanhaecke L, Boeckaert C, et al. Human colon microbiota transform polycyclic aromatic hydrocarbons to estrogenic metabolites. *Environmental health perspectives* 2005;6-10.
81. Kim KA, Jung IH, Park SH, et al. Comparative analysis of the gut microbiota in people with different levels of ginsenoside Rb1 degradation to compound K. *PLoS ONE* 2013; 8(4):e62409.
82. Hayakawa K, Mizutani J, Wada K, et al. Effects of soybean oligosaccharides on human faecal microflora. *Microb Ecol Health Dis* 1990; 3:293-303.
83. Morotomi M, Mutai M. *In vitro* binding of potent mutagenic pyrolyzates to intestinal bacteria. *J Natl Cancer Inst* 1986; 77:195–201.
84. Orrhage K, Sillerstrom E, Gustafsson JA, et al. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mut Res* 1994; 311:239–48
85. Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gualtieri L, Salminen S. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 1992;37:121–8.
86. Ling WH, Korpela R, Mykkänen H, Salminen S, Hänninen O. *Lactobacillus* strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activities in healthy female adults. *The Journal of nutrition* 1994; 124(1):18-23.
87. Brigidia P, Vitalia B, Swennena E, Bazzocchib G, Matteuzzi D. Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea. *Res. Microbiol* 2001; 152:735–741
88. Bjorksten B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001; 108(4):516-520.
89. Molodecky NA, Kaplan GG. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology & Hepatology* 2010; 6(5):339-346.
90. World Gastroenterology Organisation (WGO) Global Guidelines. Probiotics and prebiotics. October 2011. *Journal of Clinical Gastroenterology* 2012; 46(6):468–481.
91. Borchers AT, Selmi C, Meyers FJ, Kee CL and Gershwin ME. Probiotics and immunity. *J Gastroenterol* 2009; 44:26–46.

92. Gourbeyre P., Denery S., Bodinier M. Probiotics, prebiotics and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *Journal of Leucocyte Biology* 2011; 89(5):685-695.
93. Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotic Mechanisms of Action. *Ann Nutr Metab* 2012; 61:160–174
94. Oelschlaeger T.A. Mechanisms of probiotic actions-A review. *Int J Med Microbiol* 2010; 300:57-62.
95. MacFarlane GT, Cummings JH. Probiotics and Prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *British Medical Journal* 1999;318:999-1003.
96. Axelsson L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, von Wright A, eds. *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects* 2nd Edition. New York: Marcel Dekker Inc; 1998:1-72.
97. Russell DA, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International journal of food microbiology* 2011 Sep 1;149(1):88-105.
98. Roger LC, Costabile A, Holland DT, Hoyles L, McCartney AL. Examination of faecal *Bifidobacterium* populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life. *Microbiology* 2010; 156:3329–3341.
99. Jayamanne VS, Adams MR. Determination of survival, identity, and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts. *Letters in Applied Microbiology* 2006; 42(3):189 - 194.
100. Marteau P, Seksik P. Tolerance of probiotics and prebiotics. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38: S67–69.
101. Cannon JP, Lee TA, Bolanos JT, Danziger LH. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infective Diseases* 2005; 24 (1):31-40.
102. Salminen MK, Tynkkynen S, Rautelin H, et al. *Lactobacillus* bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clin Infect Dis* 2002; 35:1155-1160.
103. Harzallah D and Belhadj H. Lactic Acid Bacteria as Probiotics: Characteristics, Selection Criteria and Role in Immunomodulation of Human GI Mucosal Barrier. In: Kongo M, ed. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. InTech. 2013. DOI:

- 10.5772/50732. Available from: <http://www.intechopen.com/books/lactic-acid-bacteria-r-d-for-food-health-and-livestock-purposes/lactic-acid-bacteria-as-probiotics-characteristics-selection-criteria-and-role-in-immunomodulation>
104. Saarela M, Maukonen J, von Wright A, et al. Tetracycline susceptibility of the ingested *Lactobacillus acidophilus* lach-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 strains during antibiotic/probiotic intervention. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29:271–280.
 105. Bin-Nun A, Bromiker R, Wilschanski M, et al. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. *J Pediatr* 2005; 147(2):192-6.
 106. Dekker JW, Wickens K, Black PN, et al. Safety aspects of probiotic bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 in human infants aged 0–2 years. *International Dairy Journal* 2009; 19(3):149–154.
 107. Allen SJ, Martinez EG, Gregorio GV, Dans LF. Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2010, Issue 11. Art. No.: CD003048. DOI: 10.1002/14651858.CD003048.pub3.
 108. Plaza-Diaz J, Gomez-Llorente C, Fontana L, Gil A. Modulation of immunity and inflammatory gene expression in the gut, in inflammatory diseases of the gut and in the liver by probiotics. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 2014; 20(42):15632–15649. doi:10.3748/wjg.v20.i42.15632.
 109. Savard P, Lamarche B, Paradis ME, Thiboutot H, Laurin E, Roy D. Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt on fecal bacterial counts of healthy adults. *International Journal of Food Microbiology* 2011; 149:50–57.
 110. Madsen KL. Interactions between microbes and the gut epithelium. *J Clin Gastroenterol* 2011;45:111-114.
 111. Kekkonen RA, Lummela N, Karjalainen H, et al. Probiotic intervention has strain-specific anti-inflammatory effects in healthy adults. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 2008; 14(13): 2029-2036. doi:10.3748/wjg.14.2029.
 112. Kuisma J, Mentula S, Jarvinen H, Kahri A, Saxelin M, Farkkila M. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on ileal pouch inflammation and microbial flora. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 509-515.

113. Alander M, Satokari R, Korpela R, et al. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65(1):351–354.
114. Caallero-Franco C, Keller K, De Simone C, Chadee K. The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292:G315–G322.
115. Schlee M, Harder J, Köten B, Stange EF, Wehkamp J, Fellermann K. Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte β -defensin 2. *Clinical & Experimental Immunology* 2008; 151:528–535. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03587.
116. Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW et al. VSL#3 Probiotic-Mixture Induces Remission in Patients with Active Ulcerative Colitis. *VSL#3 for Treatment of Ulcerative Colitis. Am J Gastroenterol* 2005; 100(7):1539-46.
117. Larsen C, Nielsen S, Kaestel P, et al. Dose-response study of probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CRL-341 in healthy young adults. *Eur J Clin Nutr* 2006; 60:1284– 1293.
118. Saxelin M, Chuang NH, Chassy B, et al. Lactobacilli and bacteremia in southern Finland, 1989–1992. *Clin Infect Dis* 1996; 22:564–566.
119. Fukushima Y, Kawata Y, Hara H, Terada A , Mitsuoka T. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *Int J Food Microbiol* 1998; 42:39-44.
120. Meierregger A, Mayrhuber E, Lettner HP. Probiotics and health claims: the perspective of the feed industry. In: Kneifel W, Salminen S, eds. *Probiotics and health claims*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2011: 223–248.
121. Floch MH, Walker WA, Guandalini S, et al. Recommendations for Probiotic Use- 2008. *Journal of Clinical Gastroenterology* 2008; 42:S104-S108 doi: 10.1097/MCG.0b013e31816b903.
122. Isolauri E, Salminen S. Probiotics: use in allergic disorders: a Nutrition, Allergy, Mucosal Immunology, and Intestinal Microbiota (NAMI) Research Group Report. *J Clin Gastroenterol* 2008 Jul; 42 (2):S91-6. doi: 10.1097/MCG.0b013e3181639a98.

123. Miele E, Pascarella F, Giannetti E, Quaglietta L, Baldassano RN, Staiano A. Effect of a probiotic preparation (vsl#3) on induction and maintenance of remission in children with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2009; 104:437–443. doi:10.1038/ajg.2008.118.
124. Shanahan F. Probiotics in Inflammatory Bowel Disease: is there a scientific rationale? *Inflammatory Bowel Disease* 2000; 6:107-115.
125. Bjarnason I, MacPherson A, Hollander D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology* 1995;108:1566-81
126. Garcia-Lafuente A, Antolin M, Guarner F, Crespo E, Malagelada JR. Modulation of colonic barrier function by the composition of the commensal flora in the rat. *Gut* 2001; 48: 503-7.
127. Mao Y, Nobaek S, Kasravi B, Adawi D, Stenram U, Molin G & Jeppsson B. The effects of *Lactobacillus* strains and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Gastroenterology* 1996; 111:334-44.
128. Spitz J, Hecht G, Taveras M, Aoye E & Alverdy J. The effect of dexamethasone administration on rat intestinal permeability: the role of bacterial adherence. *Gastroenterology* 1994; 106:35-41.
129. Konstantinov SR, Smidt H, de Vos WM et al. S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *P Natl Acad Sci USA* 2008; 105:19474–19479.
130. Montalto M, Maggiano N, Ricci R, et al. *Lactobacillus acidophilus* protects tight junctions from aspirin damage in HT-29 cells. *Digestion* 2004; 69:225–229.
131. Seth A, Yan F, Polk DB & Rao RK. Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism. *Am J Physiol Gastr L* 2008; 294:G1060–G1069.
132. Zhou JS, Gopal PK, Gill HS. Potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) do not degrade gastric mucin in vitro. *Int J Food Microbiol* 2001; 63:81-90.
133. Kirjavainen PV, Ouwehand AC, Isolauri E, Salminen SJ. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol Lett* 1998;167:185-9.

134. Colina AR, Aumont F, Deslauriers N, Belhumeur P, de Repentigny L. Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infect Immun* 1996; 64:4514-19.
135. Caplan MS, Miller-Catchpole R, Kaup S, et al. Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology* 1999; 117:577-83.
136. Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis. *New England Journal of Medicine* 2011; 365:1713-25.
137. Blumberg R.S. Inflammation in the intestinal tract: Pathogenesis and treatment. *Digestiv diseases* 2009; 27:455-464.
138. Rodes L, Paul A, Coussa-Charley M, et al. Transit time affects the community stability of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in an in vitro model of human colonic microbiota. *Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology* 2011; 39(6):351-6.
139. Iwatani Y, Hidaka V, Matsuzuka F, Kuma K, Amino N. Intrathyroidal lymphocyte subsets, including unusual CD4⁺ CD8⁺ cells and CD3^{lo}TCR $\alpha\beta$ ^{lo}/-CD4⁻ CD8⁻ cells, in autoimmune thyroid disease. *Clinical & Experimental Immunology* 1993; 93(3):430-6.
140. Al-Salami H, Kansara H, King J, Morar B, Jayathilaka B, Fawcett P. Bile acids: a bitter sweet remedy for diabetes. *New Zealand Pharmacy* 2007; 27(10):17.
141. Goebel KM, Krause A, Neurath F. Acquired transient autoimmune reactions in Lyme arthritis: correlation between rheumatoid factor and disease activity. *Scandinavian journal of rheumatology* 1988; Supplement, 75:314-7.
142. MacDonald TT. Breakdown of tolerance to the intestinal bacterial flora in inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunology* 1995; 102:445-7.
143. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The Human Microbiome Project. *Nature* 2007; 449:804-10.
144. Sartor, R.B. Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 2008; 134: 577-594. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2007.11.059>
145. Scribano ML, Prantera C. Use of antibiotics in the treatment of Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 2013; 19(5):648–653.

146. McGuckin MA, Eri R, Simms LA, Florin TH, Radford-Amith G. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases* 2009; 15 (1):100-113.
147. Bruewer M., Luegering A., Kucharzik T., Parkos C. A., Madara J. L., Hopkins A. M., Nusrat A. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis independent mechanisms. *The Journal of Immunology* 2003; 171(11):6164-6172.
148. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Bürgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 2005 Aug;129(2):550-64.
149. Al-Salami, H., et al., Probiotic treatment reduces blood glucose levels and increases systemic absorption of gliclazide in diabetic rats. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 2008. 33(2):101-6.
150. Ghadimi D, Helwig U, Schrezenmeir J, Heller KJ, de Vrese M. Epigenetic imprinting by commensal probiotics inhibits the IL-23/IL-17 axis in an in vitro model of the intestinal mucosal immune system. *J Leukoc Biol.* 2012;92:895-911
151. Sahar KH, El-Bedewy MM. Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokine and NF- κ B activation in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2010; 16(33): 4145-4151.
152. Schultz M, Timmer A, Herfarth HH, et al. *Lactobacillus GG* in inducing and maintaining remission of Chron's disease. *BMC Gastroenterology* 2004; 4:5.
153. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999; 354:635–639.
154. Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti GM, Forti G, Modeo ME, Gigliobianco A. Low-dose balsalazide plus a high-potency probiotic preparation is more effective than balsalazide alone or mesalazine in the treatment of acute mild-to-moderate ulcerative colitis. *Med Sci Monit* 2004; 10:PI126–PI131.
155. Kato K, Mizuno S, Umesaki Y, et al. Randomized placebo-controlled trial assessing the effect of bifidobacteria-fermented milk on active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20:1133–1141.

156. Furrie E, Macfarlane S, Kennedy A, et al. Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut* 2005; 54:242–249.
157. Kruis W, Schutz E, Frick P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 1997; 11:853–858.
158. Ishikawa H, Akedo I, Umesaki Y, Tanaka R, Imaoka A, Otani T. Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria-fermented milk on ulcerative colitis. *J Am Coll Nutr* 2003; 22:56-63.
159. Kruis W, Frick P, Pokrotnieks J, et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004; 53:1617–1623.
160. Zocco MA, dal Verme LZ, Cremonini F, et al. Efficacy of Lactobacillus GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23:1567–1574.
161. Schultz M, Timmer A, Herfarth HH, Sartor RB, Vanderhoof JA, Rath HC. Lactobacillus GG in inducing and maintaining remission of Crohn's disease. *BMC Gastroenterology* 2004;4:5. <http://doi.org/10.1186/1471-230X-4-5>.
162. Malchow H.A. Crohn's disease and *Escherichia coli*. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? *J Clin Gastroenterol* 1997;25:653–658.
163. Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, Testoni PA. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000; 45:1462–1464.
164. Prantera C, Scribano ML, Falasco G, Andreoli A, Luzi C. Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with Lactobacillus GG. *Gut* 2002; 51:405–409.
165. Chermesh I, Tamir A, Reshef R, et al. Failure of Synbiotic 2000 to prevent postoperative recurrence of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2007; 52:385–389.
166. Van Gossum A, Dewit O, Louis E, et al. Multicenter randomized-controlled clinical trial of probiotics (*Lactobacillus johnsonii*, LA1) on early endoscopic recurrence of Crohn's disease after ileo-caecal resection. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13:135–142

167. Marteau P, Lemann M, Seksik P, et al. Ineffectiveness of *Lactobacillus johnsonii* LA1 for prophylaxis of postoperative recurrence in Crohn's disease: a randomised, double blind, placebo controlled GETAID trial. Gut 2006; 55:842–847
168. Goldin BR. Intestinal microflora: metabolism of drugs and carcinogens. Ann Med 1990;22:43-8.
169. Guang-Zhi Gu, Hui-Min Xia, Zhi-Qing Pang, Zhong-Yang Liu, Xin-Guo Jiang, Jun Chen. Determination of sulphasalazine and its main metabolite sulphapyridine and 5-aminosalicylic acid in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study. Journal of Chromatography B 2011; 879(5-6):449–456.
170. Walter J, Tannock GW, Tilsala-Timsjarvi A et al. Detection and identification of gastrointestinal Lactobacillus species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. Appl Environ Microbiol 2000;66:297-303.
171. Krook A. Effect of metronidazole and sulfasalazine on the normal human faecal flora. Scand J Gastroenterol 1981;16(5):587-92
172. Danielsson D, Kjellander J & Jarnerot G. The effect of metronidazole and sulfasalazine on the fecal flora in patients with Chrons disease. Scand J Gastroenterol 1981; 16(2):183-92.
173. West B et al. Effects of sulphasalazine (Salazopyrin) on faecal flora in patients with inflammatory bowel disease. Gut 1974; 15:960-965.
174. Neumann VC, Grindulis KA. Sulphasalazine in rheumatoid arthritis: an old drug revived. J R Soc Med 1984 Mar;77(3):169-72.
175. Tremaine WJ, Billie J, Huizenga KA, Washington JA & Ilstrup DM. Factors which influence the occurrence of Clostridium difficile infections in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 1983; 84:1337.
176. Hartley, M. G., Hudson, M. J., Swarbrick, E. T., Grace, R. H., Gent, A. E. and Hellier, M. D. Sulphasalazine treatment and the colorectal mucosa-associated flora in ulcerative colitis. Alimentary Pharmacology & Therapeutics 1996; 10:157–163.
177. Bouhnik Y, Flourie B, Andrieux C, Bisetti N, Briet F, Rambaud JC. Effects of Bifidobacterium sp fermented milk ingested with or without inulin on colonic bifidobacteria and enzymatic activities in healthy humans. Eur J Clin Nutr 1996; 50:269–73.

178. Tannock W et al. Analysis of the fecal microflora on human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Applied and environmental microbiology* 2000; 66 (6):2578-2588.
179. Bezkorovainy A. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 399S-405S.
180. Benno Y, Mitsuoka T. Impact of *Bifidobacterium longum* on Human Fecal Microflora. *Microbiology and Immunology* 1992; 36:683-694.
181. Salminen S, Salminen E. Lactulose lactic acid bacteria intestinal microecology and mucosal protection. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1997;222:45-48.
182. Mikov MM, Caldwell J. Metabolism of paracetamol 3-cysteine in conventional and germ-free-mice – the crucial role of intestinal microflora. *Eur J Pharmacol* 1990; 183:1206-7.
183. Lee HJ, Waller RD, Stebbings S, Highton J, Orlovich DA, Schmierer D and Fawcett JP. The effects of an orally administered probiotic on sulfasalazine metabolism in individuals with rheumatoid arthritis: a preliminary study. *International Journal of Rheumatic Diseases*. 2010; 13:48-54. doi: 10.1111/j.1756-185X.2009.01449.
184. Stojaković Nataša. Uticaj aerobne crijevne flore pacova na metabolizam sulfasalazina. Magistarski rad 2006.
185. Mc Bain AJ and Macfarlan GT. Ecological and physiological studies on large intestinal bacteria in relation to production of hydrolitic and reductive enzymes involved in formation of genotoxic metabolites. *J Med Microbiol* 1998 May;47(5):407-16.
186. Dabek M, McCrae SI, Stevens VJ, Duncan SH, Louis P. Distribution of β -glucosidase and β -glucuronidase activity and of β -glucuronidase gene *gus* in human colonic bacteria. *FEMS microbiology ecology* 2008 Dec 1; 66(3):487-95.
187. Idaka E, Ogawa T, Horitsu H. Reductive metabolism of aminoazobenzenes by *Pseudomonas cepacia*. *Bull Environ Toxicol* 1987;39:100-107.
188. Azad Khan AK, Guthrie G, Johnston HH, Truelove SC, Williamson DH. Tissue and bacterial splitting of sulphasalazine. *Clin Sci (Lon)* 1983;64(3):349-354.
189. Lee HJ, Zhang H, Orlovich DA, Fawcett JP. The influence of probiotic treatment on sulfasalazine metabolism in rat. *Animal pharmacokinetics and metabolism* 2012; 791-97.
190. Carrette O, Favier C, Mizon C et al. Bacterial enzymes used for colon-specific drug delivery are decreased in active Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1995; 40, 2641-6.

191. Nakamura J, Kubota Y, Miyaoka M, Saitoh T, Mizuno F and Benno Y. Comparison of Four Microbial Enzymes in Clostridia and Bacteroides Isolated from Human Feces. *Microbiology and Immunology* 2002;46:487–490.
192. Saito Y, Takano T and Rowland IR: Effect of soybean oligosaccharides on the human gut microflora in in vitro culture. *Microb Ecol Health Dis* 1992; 5:105-110.
193. Marteau P, Pochart P, Flourie B et al. Effect of chronic ingestion of a fermented dairy product containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic flora in humans. *Am J Clin Nutr* 1990; 52(4):685-688.
194. Goldin BR & Gorbach SL. The Effect of Oral Administration on *Lactobacillus* and Antibiotics on Intestinal Bacterial Activity and Chemical Induction of Large Bowel Tumors. *Developments in Industrial Microbiology* 1984; 25 (1):139-150.
195. Goldin BR, Swenson L, Dwyer J, Sexton M and Gorbach S. Effect of diet and *Lactobacillus acidophilus* supplements on human fecal bacterial enzymes. *J Natl Cancer Inst* 1980; 64:255–261.
196. Goldin B, Gorbach SL. Alterations in fecal microflora enzymes related to diet, age, *Lactobacillus* supplements and dimethylhydrazine. *Cancer* 1977; 40:2421-2426.
197. Mikov M, Škrbić R, Fawcett JP editors. Sulphasalazine- past, present and future challenges. Medical Faculty, University of Banja Luka; 2009.
198. Azad Khan AK, Truelove SC & Aronson JK. The disposition and metabolism of sulphasalazine (salicylazosulphapyridine) in man. *Br. J. clin. Pharmacol* 1982; 13:523-528.
199. Lee HJ, Fung B., Lim P., Tang F., Tominari A., Mikov M., Fawcett P. Role of gut microflora in drug metabolism- pets or pests. *New Zealand Pharmacy* 2007; 27:21-24.
200. Klotz U, Karlernst M, Fischer C and Heinkel K. Therapeutic Efficacy of Sulfasalazine and Its Metabolites in Patients with Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *N Engl J Med* 1980; 303:1499-1502.
201. Goossens D, Jonkers D, Russel M, Stobberingh E, Van Den Bogaard A, Stockbrugger R The effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on the bacterial composition and metabolic activity in faeces of healthy volunteers: a placebo-controlled study on the onset and duration of effects. *Aliment Pharmacol Ther* 2003 Sep 1;18(5):495-505.

202. Das KM, Eastwood MA, McManus JP and Sircus W. The metabolism of salicylazosulphapyridine in ulcerative colitis I. The relationship between metabolites and the response to treatment in inpatients. *Gut* 1973; 14:631-636.
203. LeeHJ, Orlovich DA, Tagg JR, Fawcett JP. Detection and Specific Enumeration of Multi-Strain Probiotics in the Lumen Contents and Mucus Layers of the Rat Intestine After Oral Administration. *Probiotics & Antimicro Prot* 2009; 1:113–120.
204. Hoepelman AIM, Tuomanen EI. Consequences of microbial attachment: directing host cell functions with adhesins. *Infect Immun* 1992; 60:1729–33.
205. Bernet M-F, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:4121–8.
206. Perez PF, Minnaard Y, Disalvo EA, De Antoni GL. Surface properties of bifidobacterial strains of human origins. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:21–6.
207. Bouhnik Y, Pochart P, Marteau P, Arlet G, Goderel I, Rambaud JC. Fecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium* sp. ingested in fermented milk. *Gastroenterology* 1992;102:875–8.
208. Kullen MJ, Amann MM, O'Shaughnessy W, O'Sullivan DJ, Busta FF, Brady U. Differentiation of ingested bifidobacteria by DNA fingerprinting demonstrates the survival of an unmodified strain in the gastrointestinal tract of humans. *J Nutr* 1997;127:89–94.
209. Fujiwara S, Hashiba H, Hirota T, Forstner JF. Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to ganglioside GM1. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:506–12.
210. Millar MR, Bacon C, Smith SL, Walker V, Hall MA. Enteral feeding of premature infants with *Lactobacillus GG*. *Arch Dis Child* 1993;69:483–7.

PRILOZI

Prilog 1

Procentualna promjena azoreduktaze po minuti
u aerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		-8.52237	-8.37756	-8.44331	-8.37123	-8.17339
Standardna devijacija		0.66762	0.79523	0.99370	0.78129	0.55167
Standardna greška aritmetičke sredine		0.17843	0.21254	0.26558	0.20881	0.15300
95% interval povjerenja	Donja granica	-8.87209	-8.79413	-8.96384	-8.78049	-8.47328
	Gornja granica	-8.17266	-7.96099	-7.92278	-7.96196	-7.87350
Medijana - Q2		-8.45485	-8.16475	-8.51233	-8.51229	-8.33640
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.641				

Prilog 2

Procentualna promjena azoreduktaze po minuti
u aerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	15	14
Aritmetička sredina		-8.36818	-8.50691	-8.27879	-8.32674	-8.50774
Standardna devijacija		0.84237	0.45693	0.74977	0.66576	0.45859
Standardna greška aritmetičke sredine		0.21750	0.11798	0.19359	0.17190	0.12256
95% interval povjerenja	Donja granica	-8.79448	-8.73815	-8.65822	-8.66365	-8.74796
	Gornja granica	-7.94188	-8.27567	-7.89936	-7.98982	-8.26752
Medijana - Q2		-8.53153	-8.39652	-8.58008	-8.60310	-8.54652
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.978				

Prilog 3

Poređenje aktivnosti azoreduktaze u aerobnim uslovima
između grupa

	Mjerenje	Sulfasalazin		Sulfasalazin i probiotik		<i>p</i>
		n	Srednja vrijednost	n	Srednja vrijednost	
Prije ispitivanja	5 min	14	4.13224 (3.45393 , 4.81056)	15	3.90519 (3.34780 , 4.46257)	<i>S: 0.614</i>
	10 min	14	2.05599 (1.71662 , 2.39537)	15	2.16536 (1.87010 , 2.46063)	<i>S: 0.636</i>
	20 min	14	0.83224 (0.77686 , 1.41349)	15	1.02705 (0.78523 , 1.27206)	<i>M: 0.861</i>
	Promjena	14	-8.45485 (-8.72816 , - 8.32235)	15	-8.53153 (-8.91309 , - 8.10373)	<i>M: 0.930</i>
Prva kontrola	5 min	14	3.43530 (2.76704 , 5.59940)	15	4.40305 (3.55717 , 5.48151)	<i>M: 0.150</i>
	10 min	14	2.02982 (1.67876 , 2.38089)	15	2.07733 (1.78149 , 2.37316)	<i>S: 0.840</i>
	20 min	14	0.89339 (0.75296 , 1.44456)	15	1.08880 (0.84100 , 1.39237)	<i>M: 0.337</i>
	Promjena	14	-8.16475 (-8.50177 , - 7.89334)	15	-8.39652 (-8.60291 , - 8.28100)	<i>M: 0.206</i>
Druga kontrola	5 min	14	3.38194 (3.01874 , 4.27083)	15	3.38672 (3.19556 , 4.49704)	<i>M: 0.793</i>
	10 min	14	1.83582 (1.56767 , 2.10397)	15	2.04929 (1.75347 , 2.34511)	<i>S: 0.306</i>
	20 min	14	0.83264 (0.72507 , 1.10115)	15	0.88721 (0.78961 , 1.17684)	<i>M: 0.359</i>
	Promjena	14	-8.51233 (-8.71427 , - 7.88123)	15	-8.58008 (-8.74009 , - 7.90996)	<i>M: 0.861</i>
Treća kontrola	5 min	14	2.95228 (2.76547 , 3.13909)	15	3.29337 (2.85815 , 3.72859)	<i>S: 0.174</i>
	10 min	14	1.50658 (1.30945 , 1.70053)	15	1.60813 (1.56353 , 1.74274)	<i>M: 0.138</i>
	20 min	14	0.76092 (0.65774 , 0.82307)	15	0.76889 (0.72706 , 0.85694)	<i>M: 0.419</i>
	Promjena	14	-8.37123 (-8.78049 , - 7.96196)	15	-8.32674 (-8.66365 , - 7.98982)	<i>S: 0.870</i>
Četvrta kontrola	5 min	13	2.93602 (2.74665 , 3.12539)	14	3.10191 (2.94173 , 3.26210)	<i>S: 0.200</i>
	10 min	13	1.52162 (1.43656 , 1.60669)	14	1.51358 (1.42157 , 1.60558)	<i>S: 0.901</i>
	20 min	13	0.78290 (0.71705 , 0.84874)	14	0.77342 (0.73283 , 0.81400)	<i>S: 0.809</i>
	Promjena	13	-8.17339 (-8.47328 , - 7.87350)	14	-8.50774 (-8.74796 , - 8.26752)	<i>S: 0.098</i>

Prilog 4

Aktivnosti azoreduktaze mjerena u 5. minuti pri anaerobnim uslovima
kod grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		4.04099	3.93926	3.56206	3.11284	3.01506
Standardna devijacija		1.39350	1.44663	1.08649	0.63980	0.33748
Standardna greška aritmetičke sredine		0.37243	0.38663	0.29038	0.17099	0.09360
95% interval povjerenja	Donja granica	3.31102	3.18147	2.99292	2.77769	2.83160
	Gornja granica	4.77095	4.69705	4.13120	3.44798	3.19852
Medijana - Q2		3.45203	3.17485	3.31025	3.00519	2.96776
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.264				

Prilog 5

Aktivnosti azoreduktaze mjerena u 10. minuti pri anaerobnim uslovima
kod grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		2.02180	2.01020	1.85556	1.61769	1.57296
Standardna devijacija		0.70535	0.68264	0.56097	0.31710	0.18683
Standardna greška aritmetičke sredine		0.18851	0.18244	0.14992	0.08475	0.05182
95% interval povjerenja	Donja granica	1.65232	1.65261	1.56171	1.45159	1.47140
	Gornja granica	2.39128	2.36778	2.14941	1.78380	1.67453
Medijana - Q2		1.75748	1.59977	1.57388	1.59220	1.52609
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.250				

Prilog 6

Aktivnosti azoreduktaze mjerena u 20. minuti pri anaerobnim uslovima
kod grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		1.01459	1.02230	0.89740	0.77069	0.76316
Standardna devijacija		0.37797	0.36588	0.28170	0.16585	0.07152
Standardna greška aritmetičke sredine		0.10102	0.09779	0.07529	0.04433	0.01984
95% interval povjerenja	Donja granica	0.81659	0.83064	0.74984	0.68381	0.72428
	Gornja granica	1.21258	1.21396	1.04497	0.85756	0.80204
Medijana - Q2		0.83761	0.83343	0.79499	0.76770	0.78124
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.089				

Prilog 7

Procentualna promjena azoreduktaze po minuti
u anaerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		-8.52604	-8.31038	-8.53501	-8.64796	-8.48625
Standardna devijacija		0.73881	0.31769	0.88113	0.91487	0.82810
Standardna greška aritmetičke sredine		0.19746	0.08491	0.23549	0.24451	0.22967
95% interval povjerenja	Donja granica	-8.91306	-8.47680	-8.99658	-9.12720	-8.93641
	Gornja granica	-8.13903	-8.14397	-8.07345	-8.16872	-8.03609
Medijana - Q2		-8.60093	-8.32667	-8.48557	-8.48624	-8.59381
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.820				

Prilog 8

Aktivnosti azoreduktaze mjerena u 20. minuti pri anaerobnim uslovima
kod grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	15	14
Aritmetička sredina		1.03417	0.89630	0.95653	0.82549	0.78836
Standardna devijacija		0.32418	0.46404	0.29737	0.19334	0.07073
Standardna greška aritmetičke sredine		0.08370	0.11981	0.07678	0.04992	0.01890
95% interval povjerenja	Donja granica	0.87011	0.66146	0.80604	0.72765	0.75131
	Gornja granica	1.19822	1.13113	1.10702	0.92333	0.82541
Medijana - Q2		0.92227	0.91869	0.87925	0.77049	0.78503
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.485				

Prilog 9

Procentualna promjena azoreduktaze po minuti
u anaerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	15	14
Aritmetička sredina		-8.35309	-14.66358	-8.55855	-8.69972	-8.49192
Standardna devijacija		1.01693	15.89332	0.41038	0.57046	0.69421
Standardna greška aritmetičke sredine		0.26257	4.10364	0.10596	0.14729	0.18554
95% interval povjerenja	Donja granica	-8.86772	-22.70671	-8.76623	-8.98842	-8.85557
	Gornja granica	-7.83845	-6.62045	-8.35087	-8.41103	-8.12827
Medijana - Q2		-8.41736	-8.61981	-8.51979	-8.57046	-8.64729
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.931				

Prilog 10

Poređenje aktivnosti azoreduktaze u anaerobnim uslovima između grupa

	Mjerenje	Sulfasalazin		Sulfasalazin i probiotik		p
		n	Srednja vrijednost	n	Srednja vrijednost	
Prije ispitivanja	5 min	14	4.04099 (3.31102 , 4.77095)	15	4.04888 (3.36343 , 4.73432)	S: 0.988
	10 min	14	2.02180 (1.65232 , 2.39128)	15	2.04621 (1.70758 , 2.38483)	S: 0.925
	20 min	14	0.83761 (0.69161 , 1.40751)	15	0.92227 (0.74499 , 1.26130)	M: 0.527
	Promjena	14	-8.52604 (-8.91306 , -8.13903)	15	-8.35309 (-8.86772 , -7.83845)	S: 0.861
Prva kontrola	5 min	14	3.17485 (2.95024 , 5.03866)	15	3.96179 (3.29114 , 5.39231)	M: 0.138
	10 min	14	1.59977 (1.50698 , 2.58464)	15	1.95381 (1.71964 , 2.68659)	M: 0.162
	20 min	14	0.83343 (0.74698 , 1.43420)	15	0.91869 (0.72109 , 1.19915)	M: 0.827
	Promjena	14	-8.32667 (-8.52403 , -8.04838)	15	-8.61981 (-9.90814 , -8.23312)	M: 0.089
Druga kontrola	5 min	14	3.56206 (2.99292 , 4.13120)	15	3.83467 (3.20986 , 4.45948)	S: 0.534
	10 min	14	1.57388 (1.46317 , 2.31702)	15	1.83753 (1.54123 , 2.54561)	M: 0.295
	20 min	14	0.79499 (0.71113 , 1.16569)	15	0.87925 (0.76730 , 1.27724)	M: 0.326
	Promjena	14	-8.53501 (-8.99658 , -8.07345)	15	-8.55855 (-8.76623 , -8.35087)	S: 0.295
Treća kontrola	5 min	14	3.00519 (2.85306 , 3.37397)	15	3.16370 (2.96776 , 3.60177)	M: 0.266
	10 min	14	1.59220 (1.44326 , 1.66787)	15	1.55716 (1.42892 , 1.71009)	M: 0.965
	20 min	14	0.76770 (0.69639 , 0.82507)	15	0.77049 (0.70236 , 0.84538)	M: 0.513
	Promjena	14	-8.48624 (-8.68220 , -8.38008)	15	-8.57046 (-8.94696 , -8.29807)	M: 0.631
Četvrta kontrola	5 min	13	3.01506 (2.83160 , 3.19852)	14	3.14435 (2.90932 , 3.37939)	S: 0.408
	10 min	13	1.57296 (1.47140 , 1.67453)	14	1.61018 (1.49639 , 1.72398)	S: 0.639
	20 min	13	0.76316 (0.72428 , 0.80204)	14	0.78836 (0.75131 , 0.82541)	S: 0.366
	Promjena	13	-8.48625 (-8.93641 , -8.03609)	14	-8.49192 (-8.85557 , -8.12827)	S: 0.884

Prilog 11

Poređenje aktivnosti nitroreduktaze u anaerobnim uslovima između grupa

	Nakon	Sulfasalazin		Sulfasalazin i probiotik		<i>p</i>
		n	Srednja vrijednost	n	Srednja vrijednost	
Prije ispitivanja	5 min	14	0.06722 (0.06175 , 0.09301)	15	0.06175 (0.05080 , 0.08519)	<i>M: 0.541</i>
	10 min	14	0.04557 (0.04010 , 0.04843)	15	0.04323 (0.03333 , 0.04687)	<i>M: 0.197</i>
	20 min	14	0.03613 (0.03242 , 0.04648)	15	0.02969 (0.02461 , 0.03594)	<i>M: 0.176</i>
	Promjena	14	-4.11377 (-4.73088 , -3.70697)	15	-4.38810 (-4.95003 , -3.80345)	<i>M: 0.295</i>
Prva kontrola	5 min	14	0.18267 (0.13589 , 0.22945)	15	0.21822 (0.15038 , 0.28606)	<i>S: 0.412</i>
	10 min	14	0.14229 (0.10622 , 0.17836)	15	0.16909 (0.11964 , 0.21853)	<i>S: 0.404</i>
	20 min	14	0.11771 (0.08901 , 0.14641)	15	0.13731 (0.09373 , 0.18089)	<i>S: 0.475</i>
	Promjena	14	-2.63112 (-3.48440 , -1.77784)	15	-2.97280 (-3.87929 , -2.06631)	<i>S: 0.596</i>
Druga kontrola	5 min	14	0.18072 (0.13441 , 0.22702)	15	0.15434 (0.11989 , 0.18879)	<i>S: 0.374</i>
	10 min	14	0.13146 (0.09916 , 0.16377)	15	0.11607 (0.09067 , 0.14147)	<i>S: 0.466</i>
	20 min	14	0.10490 (0.07767 , 0.13213)	15	0.09315 (0.07273 , 0.11356)	<i>S: 0.500</i>
	Promjena	14	-3.50405 (-3.94903 , -3.25326)	15	-3.50819 (-3.90496 , -2.44430)	<i>M: 0.694</i>
Treća kontrola	5 min	14	0.22705 (0.15163 , 0.28919)	15	0.16101 (0.11724 , 0.27903)	<i>M: 0.383</i>
	10 min	14	0.16658 (0.12800 , 0.20516)	15	0.15464 (0.10659 , 0.20270)	<i>S: 0.710</i>
	20 min	14	0.13713 (0.10207 , 0.17219)	15	0.12635 (0.09025 , 0.16244)	<i>S: 0.679</i>
	Promjena	14	-3.48171 (-3.93719 , -3.02624)	15	-3.21530 (-3.86106 , -2.56954)	<i>S: 0.520</i>
Četvrta kontrola	5 min	13	0.15945 (0.13444 , 0.25402)	14	0.12467 (0.08676 , 0.30951)	<i>M: 0.356</i>
	10 min	13	0.11249 (0.09322 , 0.17343)	14	0.09010 (0.05989 , 0.23801)	<i>M: 0.497</i>
	20 min	13	0.09413 (0.07734 , 0.13046)	14	0.07070 (0.04883 , 0.16991)	<i>M: 0.357</i>
	Promjena	13	-3.51952 (-4.00657 , -3.03247)	14	-3.77243 (-4.33080 , -3.21407)	<i>S: 0.512</i>

Prilog 12

Procentualna promjena betaglukoizidaze po minuti
u aerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		-8.62109	-7.90594	-7.04723	-6.79204	-6.79952
Standardna devijacija		5.29745	2.62925	1.50428	0.43987	1.24332
Standardna greška aritmetičke sredine		1.41580	0.70270	0.40203	0.11756	0.34483
95% interval povjerenja	Donja granica	-11.39606	-9.28322	-7.83521	-7.02245	-7.47540
	Gornja granica	-5.84612	-6.52865	-6.25924	-6.56162	-6.12364
Medijana - Q2		-6.88113	-6.65770	-6.73468	-6.79138	-6.76853
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.842				

Prilog 13

Aktivnosti betaglukoizidaz mjerena u 5. minuti pri aerobnim uslovima
kod grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	14	14
Aritmetička sredina		2.50098	1.55153	1.87289	1.19443	1.26415
Standardna devijacija		1.84987	1.37497	1.08283	0.52782	0.79893
Standardna greška aritmetičke sredine		0.47763	0.35502	0.27958	0.14107	0.21352
95% interval povjerenja	Donja granica	1.56482	0.85570	1.32490	0.91794	0.84565
	Gornja granica	3.43715	2.24736	2.42087	1.47092	1.68265
Medijana - Q2		1.78596	1.01228	1.85103	1.13279	1.16051
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.106				

Prilog 14

Aktivnosti betaglukozidazemjerena u 10. minuti pri aerobnim uslovima
kod grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	14	14
Aritmetička sredina		1.14099	0.75937	0.95235	0.59893	0.61331
Standardna devijacija		0.96878	0.70979	0.52282	0.25147	0.35325
Standardna greška aritmetičke sredine		0.25014	0.18327	0.13499	0.06721	0.09441
95% interval povjerenja	Donja granica	0.65072	0.40017	0.68777	0.46721	0.42827
	Gornja granica	1.63126	1.11857	1.21693	0.73066	0.79835
Medijana - Q2		0.87129	0.46276	0.90985	0.61340	0.55796
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.216				

Prilog 15

Aktivnosti betaglukozidazemjerena u 20. minuti pri aerobnim uslovima
kod grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	14	14	14
Aritmetička sredina		0.59187	0.43361	0.54064	0.40326	0.39162
Standardna devijacija		0.36746	0.22215	0.25220	0.17108	0.24193
Standardna greška aritmetičke sredine		0.09488	0.05736	0.06740	0.04572	0.06466
95% interval povjerenja	Donja granica	0.40591	0.32118	0.40854	0.31364	0.26489
	Gornja granica	0.77783	0.54604	0.67275	0.49288	0.51834
Medijana - Q2		0.56135	0.32605	0.55372	0.39512	0.36259
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.110				

Prilog 16

Procentualna promjena betaglukozidaze po minutu
u aerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	14	14
Aritmetička sredina		-8.22701	-7.13986	-7.38881	-6.58891	-6.95112
Standardna devijacija		3.24530	1.85990	2.82115	0.68104	1.20895
Standardna greška aritmetičke sredine		0.83793	0.48022	0.72842	0.18202	0.32311
95% interval povjerenja	Donja granica	-9.86935	-8.08110	-8.81651	-6.94566	-7.58440
	Gornja granica	-6.58466	-6.19862	-5.96111	-6.23216	-6.31783
Medijana - Q2		-6.77325	-6.58910	-6.78315	-6.52369	-6.82906
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.842				

Prilog 17

Aktivnosti betaglukozidazemjerena u 5. minuti pri anaerobnim uslovima
kod grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		2.67894	2.46959	1.97327	1.80627	1.54549
Standardna devijacija		1.44129	2.25799	1.42227	0.88026	0.55011
Standardna greška aritmetičke sredine		0.38520	0.60347	0.38012	0.23526	0.15257
95% interval povjerenja	Donja granica	1.92394	1.28679	1.22824	1.34516	1.24645
	Gornja granica	3.43393	3.65240	2.71830	2.26738	1.84454
Medijana - Q2		2.41261	1.49673	1.55578	1.60278	1.50396
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.063				

Prilog 18

Aktivnosti betaglukozidazemjerena u 20. minuti pri anaerobnim uslovima
kod grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		0.81645	0.61665	0.60730	0.53973	0.49723
Standardna devijacija		0.29529	0.41271	0.31331	0.23894	0.14482
Standardna greška aritmetičke sredine		0.07892	0.11030	0.08374	0.06386	0.04016
95% interval povjerenja	Donja granica	0.66176	0.40046	0.44318	0.41456	0.41851
	Gornja granica	0.97113	0.83284	0.77142	0.66489	0.57595
Medijana - Q2		0.87455	0.51959	0.48225	0.51397	0.52602
ANOVA test za ponovljajuća mjerenja		p				
		0.136				

Prilog 19

Procentualna promjena betaglukozidaze po minutu
u anaerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		-6.90597	-7.57256	-6.63711	-7.20990	-6.57566
Standardna devijacija		1.79871	2.01702	1.01866	1.10159	0.57214
Standardna greška aritmetičke sredine		0.48072	0.53907	0.27225	0.29441	0.15868
95% interval povjerenja	Donja granica	-7.84819	-8.62914	-7.17072	-7.78694	-6.88668
	Gornja granica	-5.96375	-6.51598	-6.10350	-6.63285	-6.26465
Medijana - Q2		-6.85206	-6.54659	-6.64638	-6.94250	-6.46476
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.587				

Prilog 20.

Aktivnosti betaglukozidazemjerena u 5. minuti pri anaerobnim uslovima
kod grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	14	14
Aritmetička sredina		2.33082	1.68473	1.75559	1.21061	1.47212
Standardna devijacija		1.76575	1.36636	1.15881	0.51627	1.35238
Standardna greška aritmetičke sredine		0.45591	0.35279	0.29920	0.13798	0.36144
95% interval povjerenja	Donja granica	1.43723	0.99326	1.16915	0.94017	0.76370
	Gornja granica	3.22442	2.37620	2.34203	1.48105	2.18054
Medijana - Q2		1.80042	1.32320	1.53771	1.14485	1.08580
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.374				

Prilog 21.

Aktivnosti betaglukozidazemjerena u 10. minuti pri anaerobnim uslovima
kod grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	14	14
Aritmetička sredina		1.15400	0.82935	0.90222	0.58129	0.81534
Standardna devijacija		0.92715	0.69528	0.55823	0.27095	0.88874
Standardna greška aritmetičke sredine		0.23939	0.17952	0.14413	0.07241	0.23753
95% interval povjerenja	Donja granica	0.68480	0.47749	0.61971	0.43936	0.34978
	Gornja granica	1.62321	1.18121	1.18472	0.72322	1.28089
Medijana - Q2		0.85080	0.60255	0.80983	0.54169	0.56700
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.122				

Prilog 22.

Aktivnosti betaglukoizidazemjerena u 20. minuti pri anaerobnim uslovima
kod grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	14	14	14
Aritmetička sredina		0.71019	0.51402	0.50135	0.41479	0.52705
Standardna devijacija		0.45556	0.29243	0.24494	0.21818	0.64833
Standardna greška aritmetičke sredine		0.11762	0.07550	0.06546	0.05831	0.17327
95% interval povjerenja	Donja granica	0.47965	0.36604	0.37304	0.30050	0.18743
	Gornja granica	0.94073	0.66201	0.62966	0.52908	0.86667
Medijana - Q2		0.62399	0.38146	0.53887	0.38146	0.35014
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.082				

Prilog 23

Procentualna promjena betaglukoizidaze po minutu
u anaerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	14	14
Aritmetička sredina		-6.90102	-6.80269	-7.11339	-6.50220	-6.79927
Standardna devijacija		0.97461	1.69568	2.39699	0.72131	1.54502
Standardna greška aritmetičke sredine		0.25164	0.43782	0.61890	0.19278	0.41292
95% interval povjerenja	Donja granica	-7.39424	-7.66082	-8.32643	-6.88004	-7.60860
	Gornja granica	-6.40780	-5.94455	-5.90034	-6.12435	-5.98994
Medijana - Q2		-6.62551	-6.49217	-6.31396	-6.45968	-6.66642
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.903				

Prilog 24.

Aktivnosti betaglukuronidaze mjerena u 5. minuti pri aerobnim uslovima
kod grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		3.28149	3.06887	2.29589	1.96380	1.71514
Standardna devijacija		1.52663	2.83481	1.79775	0.91657	0.66873
Standardna greška aritmetičke sredine		0.40801	0.75764	0.48047	0.24496	0.18547
95% interval povjerenja	Donja granica	2.48179	1.58391	1.35417	1.48367	1.35161
	Gornja granica	4.08119	4.55384	3.23761	2.44392	2.07866
Medijana - Q2		3.33210	1.89321	1.77752	1.78475	1.85585
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.197				

Prilog 25

Aktivnosti betaglukuronidaze mjerena u 10. minuti pri aerobnim uslovima
kod grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		1.59495	1.47513	1.18599	0.96408	0.85154
Standardna devijacija		0.67573	1.28070	0.94375	0.44721	0.34567
Standardna greška aritmetičke sredine		0.18060	0.34228	0.25223	0.11952	0.09587
95% interval povjerenja	Donja granica	1.24098	0.80426	0.69162	0.72982	0.66363
	Gornja granica	1.94892	2.14600	1.68036	1.19834	1.03945
Medijana - Q2		1.69076	0.99481	0.90744	0.87068	0.95082
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.104				

Prilog 26.

Procentualna promjena betaglukuronidaze po minutu
u aerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		-9.88471	-8.15244	-7.15593	-6.58508	-6.86523
Standardna devijacija		12.86196	3.02377	1.93438	0.37688	0.39243
Standardna greška aritmetičke sredine		3.43750	0.80814	0.51698	0.10073	0.10884
95% interval povjerenja	Donja granica	-16.62221	-9.73639	-8.16922	-6.78250	-7.07856
	Gornja granica	-3.14720	-6.56850	-6.14264	-6.38766	-6.65190
Medijana - Q2		-6.63416	-6.61550	-6.59499	-6.63138	-6.87555
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.382				

Prilog 27.

Aktivnosti betaglukuronidaze mjerena u 5. minuti pri aerobnim uslovima
kod grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	15	14
Aritmetička sredina		3.03701	2.21465	2.23458	1.35807	1.39017
Standardna devijacija		2.45599	2.06915	1.52518	0.57163	0.89830
Standardna greška aritmetičke sredine		0.63413	0.53425	0.39380	0.14759	0.24008
95% interval povjerenja	Donja granica	1.79411	1.16752	1.46273	1.06878	0.91961
	Gornja granica	4.27992	3.26179	3.00643	1.64735	1.86073
Medijana - Q2		2.20533	1.63894	1.81247	1.27500	1.31115
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.118				

Prilog 28.

Procentualna promjena betaglukuronidaze po minutu
u aerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		15	15	15	15	14
Aritmetička sredina		-7.11390	-6.87307	-9.93140	-9.30629	-6.48272
Standardna devijacija		2.02365	1.91716	11.98845	10.86277	0.52019
Standardna greška aritmetičke sredine		0.52250	0.49501	3.09540	2.80475	0.13903
95% interval povjerenja	Donja granica	-8.13800	-7.84329	-15.99839	-14.80361	-6.75522
	Gornja granica	-6.08979	-5.90286	-3.86441	-3.80898	-6.21023
Medijana - Q2		-6.66282	-6.50778	-6.50729	-6.54120	-6.34807
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.725				

Prilog 29.

Aktivnosti betaglukuronidaze mjerena u 5. minuti pri anaerobnim uslovima
kod grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		3.36120	3.05837	2.37542	2.06554	1.74109
Standardna devijacija		1.48221	2.75355	1.68793	0.89048	0.68168
Standardna greška aritmetičke sredine		0.39614	0.73592	0.45112	0.23799	0.18906
95% interval povjerenja	Donja granica	2.58477	1.61598	1.49123	1.59908	1.37053
	Gornja granica	4.13763	4.50077	3.25962	2.53201	2.11166
Medijana - Q2		3.28631	1.87273	1.80886	2.15351	2.01011
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.063				

Prilog 30

Aktivnosti betaglukuronidaze mjerena u 10. minuti pri anaerobnim uslovima
kod grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		1.61604	1.50594	1.19666	1.03406	0.88269
Standardna devijacija		0.70712	1.29683	0.87653	0.46328	0.35625
Standardna greška aritmetičke sredine		0.18899	0.34659	0.23426	0.12382	0.09881
95% interval povjerenja	Donja granica	1.24563	0.82662	0.73751	0.79138	0.68903
	Gornja granica	1.98645	2.18527	1.65582	1.27674	1.07635
Medijana - Q2		1.56121	0.96529	0.97372	1.04301	0.96770
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.120				

Prilog 31.

Aktivnosti betaglukuronidaze mjerena u 20. minuti pri anaerobnim uslovima
kod grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		0.92698	0.80015	0.71686	0.67149	0.55938
Standardna devijacija		0.40543	0.49234	0.34019	0.28875	0.20578
Standardna greška aritmetičke sredine		0.10835	0.13158	0.09092	0.07717	0.05707
95% interval povjerenja	Donja granica	0.71461	0.54225	0.53866	0.52024	0.44752
	Gornja granica	1.13936	1.05806	0.89507	0.82274	0.67124
Medijana - Q2		1.03557	0.66013	0.64206	0.69266	0.63604
<i>ANOVA test za ponovljajuća mjerenja</i>		p 0.127				

Prilog 32

Procentualna promjena betaglukuronidaze po minutu
u anaerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		-10.12149	-7.24417	-6.81108	-6.75932	-6.82697
Standardna devijacija		12.79368	2.17102	1.52951	0.42135	0.51915
Standardna greška aritmetičke sredine		3.41926	0.58023	0.40878	0.11261	0.14399
95% interval povjerenja	Donja granica	-16.82323	-8.38142	-7.61229	-6.98004	-7.10918
	Gornja granica	-3.41975	-6.10692	-6.00987	-6.53861	-6.54476
Medijana - Q2		-6.65005	-6.40673	-6.45842	-6.63129	-6.78491
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.390				

Prilog 33.

Vrijednosti koncentracijasulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima
nakon 30 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		13	14	12	14	14
Aritmetička sredina		3519.11	3750.94	3058.31	3279.41	3266.64
Standardna devijacija		1352.79	1705.24	1985.30	2154.69	1255.10
Standardna greška aritmetičke sredine		375.20	455.74	573.11	575.87	335.44
95% interval povjerenja	Donja granica	2783.72	2857.68	1935.02	2150.71	2609.19
	Gornja granica	4254.50	4644.19	4181.60	4408.11	3924.10
Medijana - Q2		3008.71	3354.00	2862.11	2740.08	2936.61
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.444				

Prilog 34.

Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesapri aerobnim uslovima nakon 60 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	13	14	14
Aritmetička sredina		3442.84	3363.96	3003.73	3120.53	3395.74
Standardna devijacija		1127.51	919.17	1752.91	2028.32	2555.55
Standardna greška aritmetičke sredine		301.34	245.66	486.17	542.09	683.00
95% interval povjerenja	Donja granica	2852.22	2882.47	2050.84	2058.03	2057.06
	Gornja granica	4033.47	3845.45	3956.62	4183.03	4734.42
Medijana - Q2		2999.11	3474.53	2466.98	2486.87	2701.94
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.268				

Prilog 35.

Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesapri aerobnim uslovima nakon 90 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	14
Aritmetička sredina		2910.78	2953.07	3003.69	2843.25	3157.60
Standardna devijacija		1126.73	1313.14	1787.92	2076.84	1527.48
Standardna greška aritmetičke sredine		301.13	350.95	477.84	555.06	408.24
95% interval povjerenja	Donja granica	2320.56	2265.20	2067.12	1755.33	2357.46
	Gornja granica	3500.99	3640.93	3940.25	3931.17	3957.74
Medijana - Q2		2724.69	2966.93	2645.87	2334.10	2853.46
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.849				

Prilog 36.

Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesapri aerobnim uslovima nakon 120 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	14
Aritmetička sredina		3041.48	2699.29	2649.36	2646.35	2879.38
Standardna devijacija		1365.06	1095.28	1497.96	1761.98	2039.92
Standardna greška aritmetičke sredine		364.83	292.73	400.35	470.91	545.19
95% interval povjerenja	Donja granica	2326.42	2125.55	1864.68	1723.37	1810.81
	Gornja granica	3756.55	3273.03	3434.05	3569.33	3947.95
Medijana - Q2		2706.09	2483.44	2431.42	2343.25	2456.74
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.874				

Prilog 37

Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesapri aerobnim uslovima nakon 150 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	12	14	13	13
Aritmetička sredina		2755.63	2106.35	2463.51	2348.64	3068.13
Standardna devijacija		1117.29	997.72	1556.43	1450.46	2241.14
Standardna greška aritmetičke sredine		298.61	288.02	415.97	402.28	621.58
95% interval povjerenja	Donja granica	2170.36	1541.84	1648.21	1560.16	1849.83
	Gornja granica	3340.90	2670.86	3278.82	3137.12	4286.43
Medijana - Q2		2710.23	2038.12	2216.78	2320.56	2451.67
<i>ANOVA test za ponovljajuća mjerenja</i>		p 0.673				

Prilog 38.

Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesapri aerobnim uslovima nakon 180 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	13	14	13	13
Aritmetička sredina		2767.47	2335.11	2493.57	2362.67	3292.55
Standardna devijacija		1470.07	1340.98	1632.57	1424.20	2731.71
Standardna greška aritmetičke sredine		392.89	371.92	436.32	395.00	757.64
95% interval povjerenja	Donja granica	1997.40	1606.14	1638.37	1588.47	1807.57
	Gornja granica	3537.54	3064.08	3348.76	3136.87	4777.52
Medijana - Q2		3263.32	2262.61	2463.36	2072.28	2415.40
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.381				

Prilog 39.

Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesapri aerobnim uslovima nakon 30 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	15	15	15	15
Aritmetička sredina		4223.33	3811.46	3568.50	4119.26	3458.91
Standardna devijacija		2368.83	1640.97	1915.47	1708.64	1707.16
Standardna greška aritmetičke sredine		633.10	423.70	494.57	441.17	440.79
95% interval povjerenja	Donja granica	2982.47	2981.01	2599.14	3254.57	2594.97
	Gornja granica	5464.20	4641.90	4537.86	4983.96	4322.85
Medijana - Q2		3873.16	3385.11	3172.62	4326.89	2880.74
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.612				

Prilog 40.

Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesapri aerobnim uslovima nakon 60 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	15	15	15	15
Aritmetička sredina		3304.39	3386.99	3006.33	3894.56	3564.71
Standardna devijacija		1346.51	1554.78	1474.33	1836.28	2001.84
Standardna greška aritmetičke sredine		359.87	401.44	380.67	474.13	516.87
95% interval povjerenja	Donja granica	2599.04	2600.17	2260.22	2965.28	2551.64
	Gornja granica	4009.73	4173.82	3752.44	4823.85	4577.78
Medijana - Q2		3231.50	3066.89	2708.28	3483.97	2939.89
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.480				

Prilog 41.

Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesapri aerobnim uslovima nakon 120 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	13	15	15	14
Aritmetička sredina		3174.28	3546.51	2467.40	3299.88	2649.80
Standardna devijacija		1633.87	1364.59	1646.24	1431.42	864.26
Standardna greška aritmetičke sredine		436.67	378.47	425.06	369.59	230.98
95% interval povjerenja	Donja granica	2318.41	2804.71	1634.29	2575.48	2197.07
	Gornja granica	4030.16	4288.31	3300.51	4024.28	3102.52
Medijana - Q2		3282.48	3590.35	2367.38	3190.13	2515.62
<i>ANOVA test za ponovljajuća mjerenja</i>		p				
		0.232				

Prilog 42.

Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesapri aerobnim uslovima nakon 150 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	15	15	15	15
Aritmetička sredina		2856.20	2878.09	2419.15	3321.87	2650.73
Standardna devijacija		1625.40	1342.16	1566.02	1478.36	1400.09
Standardna greška aritmetičke sredine		434.41	346.54	404.35	381.71	361.50
95% interval povjerenja	Donja granica	2004.77	2198.86	1626.63	2573.71	1942.18
	Gornja granica	3707.64	3557.32	3211.67	4070.02	3359.27
Medijana - Q2		2721.41	2931.65	2285.99	3180.12	2539.89
ANOVA test za ponovljajuća mjerenja		p				
		0.194				

Prilog 43.

Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesapri aerobnim uslovima nakon 180 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	15	14	15	14
Aritmetička sredina		2907.26	3060.78	2369.25	3276.99	2621.07
Standardna devijacija		1757.63	1559.08	1776.50	1845.18	1326.70
Standardna greška aritmetičke sredine		469.75	402.55	474.79	476.42	354.57
95% interval povjerenja	Donja granica	1986.55	2271.78	1438.66	2343.20	1926.11
	Gornja granica	3827.96	3849.78	3299.84	4210.78	3316.04
Medijana - Q2		3057.29	2980.88	2041.97	3070.69	2380.93
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.580				

Prilog 44.

Procentualna promjena koncentracija sulfasalazina *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	15	15	15	15
Aritmetička sredina		-0.36875	-0.25010	-0.59279	-0.32006	-0.22910
Standardna devijacija		0.55539	0.47977	0.74715	0.64350	0.28857
Standardna greška aritmetičke sredine		0.14844	0.12388	0.19291	0.16615	0.07451
95% interval povjerenja	Donja granica	-0.65969	-0.49289	-0.97089	-0.64571	-0.37514
	Gornja granica	-0.07782	-0.00730	-0.21468	0.00560	-0.08307
Medijana - Q2		-0.15416	-0.10669	-0.28897	-0.22495	-0.17734
<i>ANOVA test za ponovljajuća mjerenja</i>		p 0.398				

Prilog 45.

Vrijednosti koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima nakon 30 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		3	13	12	13	11
Aritmetička sredina		28.46	327.20	333.95	405.49	323.38
Standardna devijacija		26.43	428.49	341.73	484.13	326.13
Standardna greška aritmetičke sredine		15.26	118.84	98.65	134.27	98.33
95% interval povjerenja	Donja granica	-1.45	94.27	140.60	142.32	130.65
	Gornja granica	58.37	560.13	527.30	668.67	516.11
Medijana - Q2		28.18	176.53	231.76	205.41	249.88
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.109				

Prilog 46

Vrijednosti koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima nakon 60 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		4	13	13	13	11
Aritmetička sredina		76.19	325.24	422.60	431.39	332.40
Standardna devijacija		21.64	364.52	405.15	513.46	352.31
Standardna greška aritmetičke sredine		10.82	101.10	112.37	142.41	106.22
95% interval povjerenja	Donja granica	54.98	127.08	202.36	152.26	124.20
	Gornja granica	97.39	523.39	642.84	710.51	540.60
Medijana - Q2		75.97	237.59	311.95	194.51	188.65
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.068				

Prilog 47

Procentualna promjenakoncentracija sulfapiridina *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		8	14	13	13	11
Aritmetička sredina		-0.03089	0.57518	0.23611	0.38977	0.30215
Standardna devijacija		3.65390	0.76901	0.38120	0.43718	0.29549
Standardna greška aritmetičke sredine		1.29185	0.20553	0.10573	0.12125	0.08909
95% interval povjerenja	Donja granica	-2.56291	0.17235	0.02889	0.15211	0.12752
	Gornja granica	2.50114	0.97801	0.44333	0.62742	0.47677
Medijana - Q2		0.81699	0.28298	0.28437	0.19507	0.22589
<i>ANOVA test za ponovljajuća mjerenja</i>		p				
		0.663				

Prilog 48.

Vrijednosti koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima nakon 30 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		3	11	13	14	12
Aritmetička sredina		95.73	515.62	203.56	674.99	622.02
Standardna devijacija		129.15	426.03	83.32	844.75	928.21
Standardna greška aritmetičke sredine		74.57	128.45	23.11	225.77	267.95
95% interval povjerenja	Donja granica	-50.42	263.86	158.27	232.48	96.83
	Gornja granica	241.88	767.39	248.86	1117.49	1147.21
Medijana - Q2		29.33	470.59	190.76	464.16	195.56
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
			0.592			

Prilog 49.

Vrijednosti koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima nakon 60 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		3	11	12	14	12
Aritmetička sredina		107.17	609.94	271.07	661.67	730.38
Standardna devijacija		76.08	618.73	114.19	831.73	1047.09
Standardna greška aritmetičke sredine		43.92	186.56	32.96	222.29	302.27
95% interval povjerenja	Donja granica	21.08	244.29	206.46	225.98	137.93
	Gornja granica	193.25	975.59	335.68	1097.35	1322.83
Medijana - Q2		86.82	506.65	246.86	448.26	308.91
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
			0.189			

Prilog 50.

Vrijednosti koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima nakon 90 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		5	12	13	14	13
Aritmetička sredina		97.22	652.27	284.15	668.13	569.49
Standardna devijacija		121.57	851.23	184.17	834.19	819.56
Standardna greška aritmetičke sredine		54.37	245.73	51.08	222.95	227.31
95% interval povjerenja	Donja granica	-9.34	170.64	184.04	231.15	123.97
	Gornja granica	203.78	1133.89	384.26	1105.11	1015.01
Medijana - Q2		71.48	472.94	234.92	446.95	236.13
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.107				

Prilog 51.

Vrijednosti koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima nakon 120 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		5	11	13	14	12
Aritmetička sredina		157.87	638.46	319.32	715.22	636.26
Standardna devijacija		164.59	624.00	219.34	823.88	893.61
Standardna greška aritmetičke sredine		73.61	188.14	60.84	220.19	257.96
95% interval povjerenja	Donja granica	13.60	269.71	200.09	283.64	130.66
	Gornja granica	302.14	1007.22	438.56	1146.79	1141.87
Medijana - Q2		169.80	498.85	264.26	476.87	225.02
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.339				

Prilog 52.

Vrijednosti koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima nakon 150 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		6	12	13	14	13
Aritmetička sredina		193.73	569.03	376.51	706.81	599.59
Standardna devijacija		236.48	499.25	229.79	721.32	821.68
Standardna greška aritmetičke sredine		96.54	144.12	63.73	192.78	227.89
95% interval povjerenja	Donja granica	4.51	286.55	251.59	328.96	152.92
	Gornja granica	382.95	851.51	501.42	1084.66	1046.26
Medijana - Q2		120.36	492.13	305.72	629.31	279.10
ANOVA test za ponovljajuća mjerenja		p 0.179				

Prilog 53

Procentualna promjena koncentracija sulfapiridina *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		6	12	13	14	14
Aritmetička sredina		1.27317	0.37492	0.33176	0.16860	0.08668
Standardna devijacija		0.93673	0.72008	0.32754	0.20356	0.71322
Standardna greška aritmetičke sredine		0.38242	0.20787	0.09084	0.05440	0.19062
95% interval povjerenja	Donja granica	0.52363	-0.03250	0.15371	0.06197	-0.28693
	Gornja granica	2.02271	0.78234	0.50982	0.27523	0.46029
Medijana - Q2		1.02609	0.16568	0.24749	0.16760	0.06866
ANOVA test za ponovljajuća mjerenja		p 0.076				

Prilog 54

Poređenje vrijednosti koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima na različitim kontrolama prema ispitivanoj grupi

	Mjerenje	Sulfasalazin		Sulfasalazin i probiotik		p
		n	Srednja vrijednost	n	Srednja vrijednost	
Prije ispitivanja	30 min	3	28.18 (2.16 , 55.03)	3	29.33 (13.28 , 244.57)	M: 0.513
	60 min	4	75.97 (57.67 , 94.70)	3	86.82 (43.33 , 191.35)	M: 1.000
	90 min	5	203.04 (96.53 , 281.62)	5	71.48 (11.82 , 90.33)	M: 0.175
	120 min	5	266.77 (56.63 , 332.05)	5	169.80 (17.35 , 175.52)	M: 0.347
	150 min	8	207.44 (69.89 , 344.99)	6	193.73 (4.51 , 382.95)	S: 0.908
	180 min	9	216.71 (48.52 , 384.91)	7	183.49 (27.01 , 339.96)	S: 0.786
	Promjena	8	0.81699 (0.22349 , 1.46802)	6	1.02609 (0.80227 , 1.63121)	M: 0.606
Prva kontrola	30 min	13	176.53 (66.32 , 295.85)	11	470.59 (178.02 , 562.51)	M: 0.099
	60 min	13	237.59 (74.74 , 373.23)	11	506.65 (174.43 , 646.57)	M: 0.125
	90 min	14	224.71 (74.11 , 491.14)	12	472.94 (116.74 , 697.36)	M: 0.258
	120 min	13	304.80 (87.27 , 641.90)	11	498.85 (187.88 , 920.31)	M: 0.543
	150 min	12	448.43 (194.76 , 702.10)	12	569.03 (286.55 , 851.51)	S: 0.540
	180 min	13	527.33 (251.66 , 803.00)	12	716.49 (328.05 , 1,104.94)	S: 0.439
	Promjena	14	0.28298 (0.15871 , 1.19574)	12	0.16568 (0.09359 , 0.28851)	M: 0.355
Druga kontrola	30 min	12	231.76 (42.24 , 665.15)	13	190.76 (176.64 , 267.16)	M: 0.786
	60 min	13	311.95 (65.53 , 814.59)	12	246.86 (200.97 , 334.36)	M: 0.957
	90 min	13	426.02 (51.29 , 710.52)	13	234.92 (184.84 , 380.28)	M: 0.590
	120 min	13	447.20 (58.30 , 909.28)	13	264.26 (176.81 , 359.15)	M: 0.590
	150 min	13	529.19 (262.05 , 796.32)	13	376.51 (251.59 , 501.42)	S: 0.324
	180 min	13	583.47 (299.03 , 867.92)	13	387.88 (255.55 , 520.21)	S: 0.238
	Promjena	13	0.23611 (0.02889 , 0.44333)	13	0.33176 (0.15371 , 0.50982)	S: 0.499
Treća kontrola	30 min	13	205.41 (92.89 , 622.12)	14	464.16 (259.14 , 791.83)	M: 0.225
	60 min	13	194.51 (138.01 , 617.33)	14	448.26 (217.46 , 732.60)	M: 0.332
	90 min	13	211.32 (180.67 , 503.77)	14	446.95 (294.38 , 758.05)	M: 0.264
	120 min	13	305.03 (199.70 , 572.23)	14	476.87 (287.99 , 890.32)	M: 0.332
	150 min	12	396.86 (230.40 , 778.20)	14	629.31 (306.67 , 811.91)	M: 0.537
	180 min	13	538.58 (262.34 , 814.82)	14	774.97 (330.05 , 1,219.89)	S: 0.393
	Promjena	13	0.19507 (0.07376 , 0.43342)	14	0.16760 (0.01119 , 0.25556)	M: 0.357
Četvrta kontrola	30 min	11	249.88 (96.55 , 355.39)	12	195.56 (119.57 , 520.73)	M: 0.758
	60 min	11	188.65 (110.00 , 369.41)	12	308.91 (156.05 , 589.66)	M: 0.498
	90 min	11	240.96 (184.09 , 422.34)	13	236.13 (121.60 , 524.39)	M: 0.931
	120 min	11	242.73 (201.69 , 551.10)	12	225.02 (139.32 , 632.96)	M: 1.000
	150 min	11	435.94 (211.75 , 660.12)	13	599.59 (152.92 , 1,046.26)	S: 0.550
	180 min	11	376.84 (232.00 , 710.61)	13	161.14 (128.31 , 476.41)	M: 0.505
	Promjena	11	0.30215 (0.12752 , 0.47677)	14	0.08668 (-0.28693 , 0.46029)	S: 0.358

Prilog 55

Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesapri aerobnim uslovima nakon 30 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

	Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	0	6	6	8	7
Aritmetička sredina		334.98	338.18	428.34	236.32
Standardna devijacija		262.27	201.55	146.02	186.99
Standardna greška aritmetičke sredine		107.07	82.28	51.63	70.68
95% interval povjerenja	Donja granica	125.12	176.90	327.15	97.79
	Gornja granica	544.83	499.46	529.53	374.85
Medijana - Q2		249.18	327.51	469.13	224.92
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p			
		0.173			

Prilog 56

Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesapri aerobnim uslovima nakon 60 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

	Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	1	9	6	6	5
Aritmetička sredina	78.87	361.79	285.41	369.22	172.10
Standardna devijacija		214.47	174.89	173.30	83.65
Standardna greška aritmetičke sredine		71.49	71.40	70.75	37.41
95% interval povjerenja	Donja granica	221.67	145.47	230.55	98.77
	Gornja granica	501.91	425.36	507.88	245.42
Medijana - Q2	78.87	335.52	232.04	347.47	196.63
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p			
		0.225			

Prilog 57

Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesapri aerobnim uslovima nakon 90 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

	Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	0	6	7	7	8
Aritmetička sredina		352.90	371.79	455.99	210.54
Standardna devijacija		271.63	316.71	170.06	174.17
Standardna greška aritmetičke sredine		110.89	119.71	64.28	61.58
95% interval povjerenja	Donja granica	135.55	137.16	330.01	89.85
	Gornja granica	570.24	606.41	581.98	331.24
Medijana - Q2		290.76	276.70	464.38	179.05
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.116			

Prilog 58

Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesapri aerobnim uslovima nakon 120 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

	Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	0	7	5	7	6
Aritmetička sredina		394.82	354.70	475.60	247.28
Standardna devijacija		233.58	320.19	120.26	196.60
Standardna greška aritmetičke sredine		88.28	143.19	45.45	80.26
95% interval povjerenja	Donja granica	221.79	74.04	386.52	89.96
	Gornja granica	567.86	635.36	564.69	404.59
Medijana - Q2		378.75	272.21	499.15	225.80
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.138			

Prilog 59

Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesapri aerobnim uslovima nakon 150 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

	Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	1	5	6	7	7
Aritmetička sredina	343.32	404.30	359.95	381.97	241.58
Standardna devijacija		257.99	244.77	148.09	175.19
Standardna greška aritmetičke sredine		115.37	99.93	55.97	66.22
95% interval povjerenja	Donja granica	178.16	164.09	272.26	111.79
	Gornja granica	630.43	555.81	491.68	371.36
Medijana - Q2	343.32	484.54	345.01	387.58	237.27
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p			
		0.080			

Prilog 60

Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesapri aerobnim uslovima nakon 180 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

	Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	0	6	7	8	6
Aritmetička sredina		466.59	312.43	346.87	266.90
Standardna devijacija		227.51	221.56	149.72	143.54
Standardna greška aritmetičke sredine		92.88	83.74	52.93	58.60
95% interval povjerenja	Donja granica	284.55	148.30	243.12	152.04
	Gornja granica	648.64	476.57	450.62	381.75
Medijana - Q2		437.71	269.99	368.03	253.59
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p			
		0.109			

Prilog 61

Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesapri aerobnim uslovima nakon 30 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin iprobiotik

	Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	0	10	5	6	5
Aritmetička sredina		449.40	336.83	323.42	143.27
Standardna devijacija		357.90	261.58	219.22	125.62
Standardna greška aritmetičke sredine		113.18	116.98	89.49	56.18
95% interval povjerenja	Donja granica	227.57	107.54	148.01	33.16
	Gornja granica	671.23	566.11	498.83	253.38
Medijana - Q2		384.47	218.22	372.28	71.59
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.068			

Prilog 62

Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesapri aerobnim uslovima nakon 60 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin iprobiotik

	Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	0	8	8	5	5
Aritmetička sredina		499.45	313.53	366.10	151.59
Standardna devijacija		502.30	216.22	219.78	136.53
Standardna greška aritmetičke sredine		177.59	76.45	98.29	61.06
95% interval povjerenja	Donja granica	151.38	163.69	173.46	31.92
	Gornja granica	847.52	463.36	558.75	271.27
Medijana - Q2		304.94	232.25	418.24	59.31
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.068			

Prilog 63

Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesapri aerobnim uslovima nakon 90 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin iprobiotik

	Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	0	8	9	6	5
Aritmetička sredina		560.87	329.42	307.34	153.83
Standardna devijacija		490.68	208.22	218.91	151.71
Standardna greška aritmetičke sredine		173.48	69.41	89.37	67.85
95% interval povjerenja	Donja granica	220.85	193.38	132.17	20.84
	Gornja granica	900.90	465.45	482.51	286.81
Medijana - Q2		432.31	268.89	354.52	102.06
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p			
		0.068			

Prilog 64.

Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesapri aerobnim uslovima nakon 120 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin iprobiotik

	Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	0	10	8	6	4
Aritmetička sredina		499.97	354.94	355.35	154.04
Standardna devijacija		370.61	203.31	183.31	155.15
Standardna greška aritmetičke sredine		117.20	71.88	74.83	77.58
95% interval povjerenja	Donja granica	270.26	214.05	208.68	1.99
	Gornja granica	729.68	495.82	502.03	306.09
Medijana - Q2		449.50	336.50	312.31	86.02
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p			
		0.068			

Prilog 65.

Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesapri aerobnim uslovima nakon 180 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

	Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	0	9	9	6	6
Aritmetička sredina		589.83	384.76	323.66	125.80
Standardna devijacija		719.44	205.82	204.63	100.23
Standardna greška aritmetičke sredine		239.81	68.61	83.54	40.92
95% interval povjerenja	Donja granica	119.80	250.29	159.92	45.60
	Gornja granica	1059.86	519.23	487.39	206.00
Medijana - Q2		174.67	291.79	340.93	119.09
Friedman test za više uparenih uzoraka		p			
		0.068			

Prilog 66.

Procentualna promjena koncentracija mesalazina *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

	Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	0	11	10	6	5
Aritmetička sredina		-0.06271	0.06488	-0.02734	-0.14256
Standardna devijacija		0.57543	0.15067	0.26434	0.38071
Standardna greška aritmetičke sredine		0.17350	0.04765	0.10792	0.17026
95% interval povjerenja	Donja granica	-0.40277	-0.02851	-0.23885	-0.47627
	Gornja granica	0.27735	0.15827	0.18418	0.19115
Medijana - Q2		0.05333	0.08468	-0.06947	-0.12218
Friedman test za više uparenih uzoraka		p			
		0.285			

Prilog 67.

Poređenje vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri aerobnim uslovima na različitim kontrolama prema ispitivanoj grupi

	Mjerenje	Sulfasalazin		Sulfasalazin i probiotik		p
		n	Srednja vrijednost	n	Srednja vrijednost	
Prva kontrola	30 min	6	249.18 (146.91 , 447.13)	10	384.47 (167.30 , 609.39)	M: 0.588
	60 min	9	335.52 (208.22 , 478.21)	8	304.94 (131.79 , 743.40)	M: 0.923
	90 min	6	290.76 (147.09 , 406.61)	8	432.31 (174.87 , 849.73)	M: 0.606
	120 min	7	378.75 (167.84 , 532.04)	10	449.50 (165.61 , 720.94)	M: 0.770
	150 min	5	484.54 (173.39 , 514.83)	10	275.96 (132.50 , 715.15)	M: 1.000
	180 min	6	437.71 (355.82 , 500.31)	9	174.67 (160.58 , 654.41)	M: 0.409
	Promjena	8	0.17872 (0.05213 , 0.42923)	11	0.05333 (-0.04389 , 0.24726)	M: 0.160
Druga kontrola	30 min	6	327.51 (133.31 , 492.23)	5	218.22 (146.90 , 581.43)	M: 1.000
	60 min	6	232.04 (140.07 , 394.48)	8	232.25 (166.72 , 483.74)	M: 0.669
	90 min	7	276.70 (128.02 , 487.84)	9	268.89 (192.21 , 366.46)	M: 0.958
	120 min	5	272.21 (116.24 , 445.71)	8	336.50 (180.32 , 539.84)	M: 0.661
	150 min	6	345.01 (136.00 , 484.81)	8	379.71 (238.87 , 567.02)	M: 0.439
	180 min	7	269.99 (130.93 , 565.74)	9	291.79 (233.17 , 574.86)	M: 0.315
	Promjena	7	-0.03510 (-0.08016 , 0.04117)	10	0.08468 (-0.03432 , 0.21387)	M: 0.172
Treća kontrola	30 min	8	469.13 (337.68 , 504.04)	6	372.28 (110.07 , 457.13)	M: 0.197
	60 min	6	347.47 (218.99 , 456.56)	5	418.24 (202.29 , 420.22)	M: 1.000
	90 min	7	464.38 (343.50 , 556.67)	6	354.52 (96.10 , 496.70)	M: 0.317
	120 min	7	499.15 (393.34 , 561.81)	6	312.31 (291.21 , 471.73)	M: 0.199
	150 min	7	387.58 (234.92 , 443.72)	5	202.68 (198.51 , 335.17)	M: 0.223
	180 min	8	368.03 (213.75 , 433.17)	6	340.93 (177.87 , 432.13)	M: 1.000
	Promjena	8	-0.10434 (-0.20226 , -0.00704)	6	-0.06947 (-0.21199 , 0.12580)	M: 0.606
Četvrta kontrola	30 min	7	224.92 (116.44 , 297.14)	5	71.59 (62.55 , 242.36)	M: 0.465
	60 min	5	196.63 (122.19 , 224.04)	5	59.31 (58.38 , 281.24)	M: 0.917
	90 min	8	179.05 (94.54 , 259.23)	5	102.06 (48.44 , 165.53)	M: 0.464
	120 min	6	225.80 (145.20 , 239.65)	4	86.02 (65.40 , 242.69)	M: 0.394
	150 min	7	237.27 (133.83 , 269.19)	6	135.13 (96.19 , 170.76)	M: 0.199
	180 min	6	253.59 (249.64 , 299.32)	6	119.09 (26.16 , 218.81)	M: 0.078
	Promjena	7	0.03316 (-0.10709 , 0.14786)	5	-0.12218 (-0.17075 , 0.00313)	M: 0.291

Prilog 68.

Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 30 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	13	14	14
Aritmetička sredina		3840.09	3826.35	3848.01	3577.46	3569.03
Standardna devijacija		2232.52	2274.44	3463.81	2485.07	2762.25
Standardna greška aritmetičke sredine		596.66	607.87	960.69	664.16	738.24
95% interval povjerenja	Donja granica	2670.62	2634.93	1965.06	2275.70	2122.08
	Gornja granica	5009.55	5017.78	5730.95	4879.22	5015.99
Medijana - Q2		3271.92	3362.15	2831.27	2688.21	2690.20
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.264				

Prilog 69.

Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 60 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	13	14	14
Aritmetička sredina		3695.11	3411.00	3736.00	3177.14	3313.34
Standardna devijacija		1617.20	1495.31	3192.01	1994.50	2166.71
Standardna greška aritmetičke sredine		432.21	399.64	885.31	533.05	579.08
95% interval povjerenja	Donja granica	2847.97	2627.71	2000.80	2132.36	2178.35
	Gornja granica	4542.25	4194.29	5471.20	4221.93	4448.33
Medijana - Q2		3186.06	3060.48	2598.87	2655.08	2859.91
Friedman test za više uparenih uzoraka		p				
		0.343				

Prilog 70.

Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 90 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	14
Aritmetička sredina		3353.41	2966.43	2528.65	2990.61	3236.76
Standardna devijacija		1405.13	1198.52	1244.39	1983.41	2416.34
Standardna greška aritmetičke sredine		375.54	320.32	332.58	530.09	645.79
95% interval povjerenja	Donja granica	2617.36	2338.61	1876.80	1951.63	1971.00
	Gornja granica	4089.46	3594.25	3180.50	4029.58	4502.51
Medijana - Q2		2872.17	2411.89	2307.30	2358.65	2374.69
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.279				

Prilog 71.

Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 120 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	13	14	14
Aritmetička sredina		3253.68	2941.34	2994.64	2812.00	2864.44
Standardna devijacija		1382.30	1362.04	2371.35	1741.42	1816.03
Standardna greška aritmetičke sredine		369.44	364.02	657.69	465.41	485.35
95% interval povjerenja	Donja granica	2529.59	2227.86	1705.56	1899.79	1913.15
	Gornja granica	3977.78	3654.82	4283.72	3724.21	3815.74
Medijana - Q2		2845.96	2522.84	2181.89	2407.80	2492.74
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.302				

Prilog 72

Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 150 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		13	14	14	14	13
Aritmetička sredina		3124.63	3115.85	2802.80	2775.83	2943.43
Standardna devijacija		1336.74	1719.43	2207.10	1766.76	1780.58
Standardna greška aritmetičke sredine		370.74	459.54	589.87	472.19	493.84
95% interval povjerenja	Donja granica	2397.97	2215.15	1646.65	1850.34	1975.49
	Gornja granica	3851.29	4016.54	3958.95	3701.31	3911.36
Medijana - Q2		2733.14	2836.55	2386.37	2492.22	2607.46
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.114				

Prilog 73

Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 180 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	13
Aritmetička sredina		3014.37	2609.47	2685.83	2529.01	3067.01
Standardna devijacija		1622.83	1266.46	2044.42	1563.93	2147.11
Standardna greška aritmetičke sredine		433.72	338.47	546.39	417.98	595.50
95% interval povjerenja	Donja granica	2164.28	1946.06	1614.90	1709.77	1899.83
	Gornja granica	3864.46	3272.88	3756.76	3348.24	4234.19
Medijana - Q2		2811.78	2586.73	2318.28	2223.92	2613.67
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.842				

Prilog 74

Procentualna promjena koncentracija sulfasalazina *in vitro* u suspenziji fecesa pri anerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	14	14	14	14
Aritmetička sredina		-0.18182	-0.25007	-0.29181	-0.27337	-0.23813
Standardna devijacija		0.46112	0.39536	0.53102	0.38566	0.39813
Standardna greška aritmetičke sredine		0.12324	0.10566	0.14192	0.10307	0.10641
95% interval povjerenja	Donja granica	-0.42337	-0.45717	-0.56997	-0.47539	-0.44669
	Gornja granica	0.05973	-0.04296	-0.01364	-0.07135	-0.02958
Medijana - Q2		-0.00134	-0.17324	-0.15941	-0.19382	-0.15149
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.757				

Prilog 75

Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 120 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	15	14	15	15
Aritmetička sredina		3929.20	3197.50	2498.45	3548.26	3156.50
Standardna devijacija		1659.08	1347.78	1471.85	1838.55	1417.44
Standardna greška aritmetičke sredine		443.41	348.00	393.37	474.71	365.98
95% interval povjerenja	Donja granica	3060.12	2515.43	1727.45	2617.83	2439.17
	Gornja granica	4798.28	3879.57	3269.45	4478.70	3873.82
Medijana - Q2		3842.43	3372.82	2182.98	3788.97	2706.80
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.070				

Prilog 76

Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesapri anaerobnim uslovima nakon 150 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	15	15	15	15
Aritmetička sredina		3399.04	2933.83	2556.81	3684.27	2898.32
Standardna devijacija		1961.65	1432.35	1452.51	1684.98	756.75
Standardna greška aritmetičke sredine		524.27	369.83	375.04	435.06	195.39
95% interval povjerenja	Donja granica	2371.47	2208.97	1821.74	2831.56	2515.35
	Gornja granica	4426.62	3658.70	3291.88	4536.99	3281.29
Medijana - Q2		3070.12	3147.94	2149.63	4082.82	2938.63
ANOVA test za ponovljajuća mjerenja		p				
		0.060				

Prilog 77

Vrijednosti koncentracija sulfasalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesapri anaerobnim uslovima nakon 180 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	15	15	13	15
Aritmetička sredina		3303.01	3175.91	2352.38	3576.40	2895.31
Standardna devijacija		1961.84	1712.80	1384.83	1739.67	1282.26
Standardna greška aritmetičke sredine		524.32	442.24	357.56	482.50	331.08
95% interval povjerenja	Donja granica	2275.34	2309.11	1651.57	2630.70	2246.40
	Gornja granica	4330.69	4042.70	3053.20	4522.10	3544.23
Medijana - Q2		3014.13	3092.54	2096.94	3821.98	2369.37
ANOVA test za ponovljajuća mjerenja		p				
		0.098				

Prilog 78

Procentualna promjena koncentracija sulfasalazinain *in vitro* u suspenziji fecesa pri anerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		14	15	15	15	15
Aritmetička sredina		-0.15571	-0.25925	-0.19988	-0.20250	-0.07864
Standardna devijacija		0.46999	0.40273	0.42986	0.37831	0.13175
Standardna greška aritmetičke sredine		0.12561	0.10398	0.11099	0.09768	0.03402
95% interval povjerenja	Donja granica	-0.40191	-0.46306	-0.41742	-0.39395	-0.14532
	Gornja granica	0.09048	-0.05545	0.01766	-0.01104	-0.01197
Medijana - Q2		-0.12775	-0.20465	-0.13455	-0.10272	-0.08322
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.923				

Prilog 79.

Vrijednosti koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 30 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		4	14	12	14	12
Aritmetička sredina		44.40	269.98	287.19	405.68	373.98
Standardna devijacija		21.72	369.76	285.32	472.68	394.56
Standardna greška aritmetičke sredine		10.86	98.82	82.36	126.33	113.90
95% interval povjerenja	Donja granica	23.12	76.28	125.75	158.08	150.73
	Gornja granica	65.69	463.67	448.62	653.29	597.22
Medijana - Q2		37.76	145.33	174.31	236.71	226.26
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.068				

Prilog 80.

Vrijednosti koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 60 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
		4	13	12	14	12
Aritmetička sredina		63.57	338.16	339.87	460.01	401.98
Standardna devijacija		20.27	447.84	346.78	543.96	434.31
Standardna greška aritmetičke sredine		10.14	124.21	100.11	145.38	125.37
95% interval povjerenja	Donja granica	43.70	94.71	143.66	175.06	156.25
	Gornja granica	83.43	581.61	536.08	744.95	647.71
Medijana - Q2		62.39	188.68	222.44	233.56	242.64
Friedman test za više uparenih uzoraka		p 0.068				

Prilog 81.

Vrijednosti koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 30 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
		3	12	14	15	14
Broj ispitanika		3	12	14	15	14
Aritmetička sredina		65.67	546.26	189.73	662.71	500.24
Standardna devijacija		94.87	436.01	96.45	784.37	789.82
Standardna greška aritmetičke sredine		54.77	125.87	25.78	202.52	211.09
95% interval povjerenja	Donja granica	-41.69	299.56	139.20	265.76	86.50
	Gornja granica	173.03	792.95	240.25	1059.65	913.97
Medijana - Q2		19.55	469.01	184.38	533.06	152.97
Friedman test za više uparenih uzoraka		p 0.525				

Prilog 82.

Vrijednosti koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 60 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		3	11	14	15	13
Aritmetička sredina		103.13	673.71	210.73	599.78	528.16
Standardna devijacija		117.99	493.53	104.71	698.55	780.48
Standardna greška aritmetičke sredine		68.12	148.81	27.98	180.37	216.47
95% interval povjerenja	Donja granica	-30.38	382.06	155.88	246.27	103.88
	Gornja granica	236.65	965.37	265.58	953.30	952.44
Medijana - Q2		43.54	581.44	195.16	548.77	177.45
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.281				

Prilog 83.

Vrijednosti koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 90 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		4	13	14	15	13
Aritmetička sredina		153.56	551.58	222.74	615.19	560.09
Standardna devijacija		231.77	507.15	122.43	735.50	900.98
Standardna greška aritmetičke sredine		115.89	140.66	32.72	189.91	249.89
95% interval povjerenja	Donja granica	-73.58	275.89	158.61	242.97	70.31
	Gornja granica	380.69	827.27	286.87	987.40	1049.86
Medijana - Q2		54.76	502.32	188.85	355.02	159.32
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.107				

Prilog 84.

Vrijednosti koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 120 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		5	13	13	15	13
Aritmetička sredina		213.67	545.71	257.07	649.08	610.23
Standardna devijacija		198.13	557.77	127.64	720.20	921.72
Standardna greška aritmetičke sredine		88.61	154.70	35.40	185.96	255.64
95% interval povjerenja	Donja granica	40.00	242.50	187.68	284.60	109.18
	Gornja granica	387.33	848.92	326.45	1013.55	1111.28
Medijana - Q2		168.37	512.39	231.75	551.62	162.74
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.434				

Prilog 85.

Vrijednosti koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 150 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		7	13	14	15	13
Aritmetička sredina		137.00	553.51	315.46	679.76	572.75
Standardna devijacija		225.39	479.52	191.97	767.04	781.40
Standardna greška aritmetičke sredine		85.19	132.99	51.31	198.05	216.72
95% interval povjerenja	Donja granica	-29.97	292.84	214.90	291.58	147.97
	Gornja granica	303.98	814.18	416.02	1067.93	997.52
Medijana - Q2		64.08	510.98	263.86	531.79	246.62
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.066				

Prilog 86.

Vrijednosti koncentracija sulfapiridina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 180 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		7	13	14	13	14
Aritmetička sredina		168.95	614.30	376.73	671.59	633.71
Standardna devijacija		231.97	518.06	277.82	826.12	916.41
Standardna greška aritmetičke sredine		87.68	143.69	74.25	229.12	244.92
95% interval povjerenja	Donja granica	-2.90	332.68	231.20	222.51	153.67
	Gornja granica	340.80	895.93	522.26	1120.67	1113.76
Medijana - Q2		89.56	496.64	295.55	434.48	269.71
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.075				

Prilog 87.

Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 30 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		1	6	5	7	7
Aritmetička sredina		108.89	338.34	278.03	378.85	228.98
Standardna devijacija			227.08	226.21	161.16	194.67
Standardna greška aritmetičke sredine			92.70	101.16	60.91	73.58
95% interval povjerenja	Donja granica		156.64	79.74	259.47	84.76
	Gornja granica		520.04	476.31	498.24	373.19
Medijana - Q2		108.89	301.92	224.21	395.50	232.29
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.075				

Prilog 88.

Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 90 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		2	8	5	7	7
Aritmetička sredina		52.55	377.77	309.67	388.22	279.47
Standardna devijacija		60.49	256.19	221.20	164.83	153.54
Standardna greška aritmetičke sredine		42.77	90.58	98.92	62.30	58.03
95% interval povjerenja	Donja granica	-31.29	200.24	115.77	266.11	165.73
	Gornja granica	136.38	555.30	503.56	510.33	393.21
Medijana - Q2		52.55	374.86	220.35	407.15	266.02
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.225				

Prilog 89

Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 150 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

		Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika		0	8	5	8	6
Aritmetička sredina			379.59	325.97	384.88	262.96
Standardna devijacija			262.88	238.29	107.24	165.77
Standardna greška aritmetičke sredine			92.94	106.57	37.92	67.68
95% interval povjerenja	Donja granica		197.42	117.10	310.56	130.31
	Gornja granica		561.76	534.85	459.19	395.60
Medijana - Q2			363.92	335.84	382.11	265.62
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p				
		0.273				

Prilog 90.

Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 180 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin

	Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	0	8	5	7	7
Aritmetička sredina		398.58	407.51	367.95	234.62
Standardna devijacija		256.30	377.26	142.42	174.73
Standardna greška aritmetičke sredine		90.62	168.72	53.83	66.04
95% interval povjerenja	Donja granica	220.97	76.83	262.44	105.17
	Gornja granica	576.19	738.19	473.46	364.06
Medijana - Q2		378.52	400.04	402.12	223.19
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.273			

Prilog 91.

Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 60 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

	Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	0	8	7	7	4
Aritmetička sredina		480.87	367.61	292.03	116.00
Standardna devijacija		509.18	225.95	222.35	83.42
Standardna greška aritmetičke sredine		180.02	85.40	84.04	41.71
95% interval povjerenja	Donja granica	128.03	200.22	127.30	34.25
	Gornja granica	833.72	535.00	456.75	197.75
Medijana - Q2		309.08	283.33	244.53	93.49
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p 0.068			

Prilog 92.

Vrijednosti koncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima nakon 180 minuta kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

	Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	0	9	8	7	4
Aritmetička sredina		467.91	295.17	225.15	136.59
Standardna devijacija		493.22	202.55	189.27	88.79
Standardna greška aritmetičke sredine		164.41	71.61	71.54	44.39
95% interval povjerenja	Donja granica	145.67	154.81	84.94	49.58
	Gornja granica	790.15	435.52	365.37	223.60
Medijana - Q2		196.23	193.01	154.68	142.17
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p			
		0.068			

Prilog 93.

Procentualna promjena koncentracija mesalazina *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovima kod ispitanika iz grupe Sulfasalazin i probiotik

	Prije ispitivanja	Prva kontrola	Druga kontrola	Treća kontrola	Četvrta kontrola
Broj ispitanika	0	11	11	8	7
Aritmetička sredina		0.017	0.045	0.030	0.050
Standardna devijacija		0.332	0.322	0.303	0.194
Standardna greška aritmetičke sredine		0.100	0.097	0.107	0.073
95% interval povjerenja	Donja granica	-0.179	-0.146	-0.180	-0.094
	Gornja granica	0.213	0.235	0.240	0.194
Medijana - Q2		0.033	0.015	-0.041	-0.011
<i>Friedman test za više uparenih uzoraka</i>		p			
		0.463			

Prilog 94

Poređenje vrijednostikoncentracija mesalazina (ng/mL fekalne suspenzije) *in vitro* u suspenziji fecesa pri anaerobnim uslovimana različitim kontrolama prema ispitivanoj grupi

	Mjerenje	Sulfasalazin		Sulfasalazin i probiotik		p
		n	Srednja vrijednost	n	Srednja vrijednost	
Prva kontrola	30 min	6	301.92 (160.50 , 454.16)	9	337.81 (211.72 , 523.17)	M: 0.724
	60 min	5	467.73 (324.71 , 549.59)	8	309.08 (185.03 , 552.15)	M: 0.661
	90 min	8	374.86 (144.76 , 520.10)	9	364.72 (169.54 , 644.77)	M: 0.630
	120 min	6	337.74 (195.48 , 544.49)	8	437.09 (219.56 , 589.36)	M: 0.606
	150 min	8	363.92 (161.30 , 495.00)	9	466.58 (265.10 , 688.14)	M: 0.386
	180 min	8	378.52 (193.30 , 520.18)	9	196.23 (120.82 , 612.00)	M: 0.700
	Promjena	9	0.07155 (-0.03403 , 0.13172)	11	0.03300 (-0.07030 , 0.22248)	M: 0.909
Druga kontrola	30 min	5	224.21 (118.29 , 292.70)	10	216.96 (108.76 , 518.58)	M: 1.000
	60 min	6	213.35 (140.39 , 452.54)	7	283.33 (175.33 , 648.85)	M: 0.475
	90 min	5	220.35 (135.86 , 431.78)	7	226.56 (144.80 , 564.42)	M: 0.685
	120 min	4	163.27 (99.50 , 429.07)	8	226.92 (162.21 , 571.77)	M: 0.610
	150 min	5	335.84 (128.22 , 457.31)	7	265.79 (150.55 , 499.59)	M: 0.935
	180 min	5	400.04 (132.89 , 461.00)	8	193.01 (170.28 , 461.68)	M: 0.844
	Promjena	6	0.06245 (0.00486 , 0.22630)	11	0.01532 (-0.21084 , 0.16406)	M: 0.688
Treća kontrola	30 min	7	395.50 (215.17 , 494.11)	6	288.77 (151.99 , 607.45)	M: 0.775
	60 min	8	465.93 (294.46 , 510.00)	7	244.53 (82.91 , 499.43)	M: 0.247
	90 min	7	407.15 (215.87 , 486.97)	6	206.22 (94.08 , 295.40)	M: 0.153
	120 min	8	393.55 (265.92 , 537.80)	6	368.85 (109.58 , 608.17)	M: 0.897
	150 min	8	382.11 (352.88 , 470.66)	8	198.89 (81.63 , 375.34)	M: 0.093
	180 min	7	402.12 (216.57 , 506.59)	7	154.68 (91.73 , 352.52)	M: 0.142
	Promjena	8	-0.02923 (-0.10312 , -0.00606)	8	-0.04057 (-0.08187 , 0.02477)	M: 0.834
Četvrta kontrola	30 min	7	232.29 (52.54 , 364.99)	5	72.88 (68.00 , 224.39)	M: 0.372
	60 min	7	203.16 (158.26 , 261.60)	4	93.49 (58.99 , 173.01)	M: 0.257
	90 min	7	266.02 (122.51 , 392.51)	6	127.23 (68.40 , 212.75)	M: 0.086
	120 min	6	208.66 (150.71 , 270.51)	4	213.13 (123.21 , 259.22)	M: 0.831
	150 min	6	265.62 (130.13 , 343.53)	4	146.80 (83.25 , 209.70)	M: 0.286
	180 min	7	223.19 (72.00 , 380.69)	4	142.17 (60.26 , 212.92)	M: 0.345
	Promjena	7	-0.01949 (-0.53131 , 0.27058)	7	-0.01058 (-0.10549 , 0.24053)	M: 0.749

BIOGRAFIJA AUTORA

Nataša Stojaković je rođena 19.8.1971. u Baču, Republika Srbija. Osnovnu školu i srednju Medicinsku školu–opšti smjer završila je u Banjoj Luci sa odličnim uspjehom. Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci je upisala 1990. godine, a diplomirala 1997. godine. Od oktobra 1998. je zaposlena na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci, na Katedri za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju. Magistarski rad pod imenom “Uticaj aerobne crijevne flore pacova na metabolizam sulfasalazina,, je odbranila 29.6.2006. na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci, a u decembru iste godine je izabrana u zvanje višeg asistenta. 2010. je položila specijalistički ispit iz kliničke farmakologije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci i stekla zvanje–specijalista kliničke farmakologije. Do sada je publikovala 7 originalnih naučnih radova u časopisima međunarodnog značaja, kao i 5 naučnih radova u časopisima nacionalnog značaja. Pored toga, imala je 15 naučnih radova na skupovima međunarodnog značaja štampanih u cjelini. Autor je poglavlja u knjizi. Udata je i majka je dvoje djece.

Izjava 1

IZJAVA O AUTORSTVU

**Izjavljujem
da je doktorska disertacija**

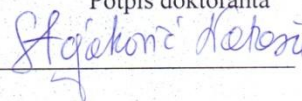
„Uticaj probiotika na metabolizam sulfasalazina u oboljelih od inflamatorne bolesti crijeva“

“The influence of probiotics on sulfasalazine metabolism
in patients with inflammatory bowel disease”

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da doktorska disertacija, u cjelini ili u dijelovima, nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Banjoj Luci, maj 2017.

Potpis doktoranta



Izjava 2

Izjava kojom se ovlašćuje Univerzitet u Banjoj Luci da doktorsku disertaciju učini javno dostupnom

Ovlašćujem Univerzitet u Banjoj Luci da moju doktorsku disertaciju pod naslovom

„Uticaj probiotika na metabolizam sulfasalazina u oboljelih od inflamatorne bolesti crijeva“

koja je moje autorsko djelo, učini javno dostupnom.

Doktorsku disertaciju sa svim prilogima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo-nekomercijalno
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
4. Autorstvo - nekomercijalno - dijeliti pod istim uslovima
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - dijeliti pod istim uslovima

U Banjoj Luci, maj 2017.

Potpis doktoranta

Stojaković Nataša

Izjava 3

Izjava o identičnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

Ime i prezime autora Nataša Stojaković

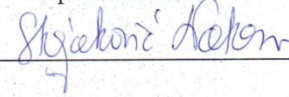
Naslov rada Uticaj probiotika na metabolizam sulfasalazina u oboljelih od inflamatorne bolesti crijeva

Mentor Prof dr Momir Mikov

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije identična elektronskoj verziji koju sam predala za digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci.

U Banjoj Luci, maj 2017.

Potpis doktoranta

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Stojaković', is written over a horizontal line.

UNIVERZITETU U BANJOJ LUCI
PODACI O AUTORU ODBRANJENE DOKTORSKE DISERTACIJE

Ime i prezime autora disertacije : Nataša Stojaković

Datum, mjesto i država rođenja autora: 19.08.1971. Bač, Republika Srbija

Naziv završenog fakulteta i godina diplomiranja: Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, 1997.

Datum odbrane magistarskog rada autora: 29.6.2006.

Naslov magistarskog rada autora: „Uticaj aerobne crijevne flore pacova na metabolizam sulfasalazina,,

Akademski titula koju je autor stekao odbranom magistarskog rada: Magistar medicinskih nauka

Akademski titula koju je autor stekao odbranom doktorske disertacije: Doktor medicinskih nauka

Naziv fakulteta na kome je doktorska disertacija odbranjena: Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci

Naziv doktorske disertacije i datum odbrane: „Uticaj probiotika na metabolizam sulfasalazina u oboljelih od inflamatorne bolesti crijeva“

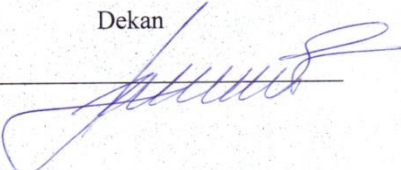
Naučna oblast disertacije prema CERIF šifraniku: B740

Imena mentora i članova komisije za odbranu doktorske disertacije:

1. Prof dr Momir Mikov, mentor
2. Prof dr Svjetlana Stoisavljević Šatara, predsjednik komisije
3. Prof dr Stevan Trbojević, član

U Banjoj Luci, jul 2017.

Dekan



УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
ФАКУЛТЕТ: МЕДИЦИНСКИ



ИЗВЈЕШТАЈ
о оцјени урађене докторске дисертације

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ

На основу члана 149. Закона о високом образовању Републике Српске („Службени гласник Републике Српске“ број: 73/10, 104/11, 84/12, 108/13, 44/15 и 90/16)) члана 54. Статута Универзитета у Бањој Луци и члана 18. Статута Медицинског факултета, Наставно-научно вијеће Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци на IV редовној сједници одржаној дана, 14.3.2017. год, донијело је одлуку под бројем 18/3 227/2017 о именовању комисије за оцјену и одбрану урађене докторске тезе мр сц Наташе Стојаковић, доктора медицине, по називом: „Утицај пробиотика на метаболизам сулфасалазина у оболелих од инфламаторне болести цријева“ у саставу:

1. Др Свјетлана Стоисављевић Шатара, редовни професор, ужа научна област Фармакологија, Медицински факултет Бања Лука, Универзитета у Бањој Луци, предсједник
2. Др Момир Миков, редовни професор, ужа научна област Фармакологија, Медицински факултет Нови Сад, Универзитета у Новом Саду, ментор и члан
3. Др Стеван Трбојевић, редовни професор, ужа научна област Интерна медицина, Медицински факултет Фоча, Универзитет у Источном Сарајеву, члан

Након детаљног прегледа урађене докторске тезе кандидата мр сци Наташе Стојаковић, именована комисија Наставно-научном вијећу Медицинског факултета у Бањој Луци подноси сљедећи извјештај:

II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

1. Наташа (Петра) Стојаковић
2. 19.08.1971. Бач, Република Србија
3. Универзитет у Бањој Луци, Медицински факултет Постдипломски студиј, стечено звање магистра медицинских наука.
4. Медицински факултет Бања Лука, магистарска теза под именом „Утицај аеробне цријевне флоре пацова на метаболизам сулфасалазина“ ужа научна област Фармакологије, 29.6. 2006. године.
5. Научна област Фармакологија

III УВОДНИ ДИО ОЦЈЕНЕ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Наслов докторске дисертације мр сц. Наташе Стојаковић је :

“Утицај пробиотика на метаболизам сулфасалазина у обољелих од инфламаторне болести цријева”.

Тема докторске дисертације је прихваћена од стране Наставно-научног вијеће Медицинског факултета Универзитета у Бањалуци Одлуком , број 18-3-233/2012 од 19.3.2012. Сенат Универзитета у Бањалуци Одлуком број: 02/04-3.927-20/12 од 12.4.2012, дао је сагласност на Извештај о оцјени услова и подобности теме и кандидата за израду докторске дисертације на Медицинском факултету у Бањалуци, кандидаткиње мр сц. Наташе Стојаковић под називом “Утицај пробиотика на метаболизам сулфасалазина у обољелих од инфламаторне болести цријева”.

Садржај докторске дисертације је изложен у сљедећим поглављима:

1. Увод докторске дисертације је написан на 29 страна.
2. Хипотезе су написане на 1 страни
3. Циљеви истраживања су написани на 1 страни
4. Поглавље Испитаници и методе је написано на 9 страна.
5. Резултати рада су приказани на 81 страници.
6. Дискусија је написана на 10 страна.
7. Закључци су написани на 3 стране.
8. Списак коришћене литературе је написан на 18 страна.

Докторска дисертација кандидатар мр сци Наташе Стојаковић је написана латиничним писмом фонтом *Times New Roman* на 203 стране, формата А4. На почетку дисертације налази се 17 страна које нису нумерисане, а односе се на наслов дисертације, кључне дисертацијске информације (на српском и енглеском језику), захвалницу, садржај, сажетак (на српском и енглеском језику) и листу скраћеница. Садржи 3 слике, 25 графикона, 84 табеле и 94 прилога (прилози садрже табеле које нису приказане у поглављу Резултати рада и приказани су на 50 страна).

У дисертацији су цитирана 202 литературна извора.

У **првој цјелини** (стр. 1-29) истакнут је разлог због којег је ово истраживање предузето као и то да у данашњој, релевантној, научној литератури не постоје свеобухватна испитивања значаја цријевне микрофлоре за метаболизам лијекова и других ксенобиотика код људи. Уводни дио са прегледом литературе јасно даје увид у тренутна научна сазнања везана за бактеријску флору цријева и њену

ензимску активност, механизме настанка инфламаторне болести цријева, примјену пробиотика и њихов утицај на метаболизам лијекова.

У **другој цјелини** (стр. 30) представљене су хипотезе спроведног истраживања које истичу могућност да краткотрајна или дуготрајна перорална примјена пробиотика утиче на састав и ензимску активност цријевне микрофлоре повећавајући обим разградње сулфасалазина у цријевима и настанак његових метаболита.

Циљеви истраживања су дати у **трећој цјелини** (стр. 30). Циљеви истраживања су прецизно постављени како би се испитао утицај краткотрајне и дуготрајне пероралне примјене пробиотика на састав и ензимску активност цријевне микрофлоре, као и утицај на обим разградње сулфасалазина у цријевима и настанак његових метаболита.

У **четвртој цјелини** (стр. 31-39) представљена је основна методологија истраживања. У оквиру овог дијела је описан критеријум одабира одговарајућих испитаника (фактори укључивања, искључивања и не укључивања), кориштени лијекови и детаљна методологија рада током истраживања.

Резултати истраживања и тестирање хипотезе чине садржај **пете цјелине** (стр 40-121). У оквиру овог дијела дисертације, систематично су приказани резултати по фазама истраживања. Детаљно су приказани резултати који указују на: 1. промјену броја бактерија у фецесу и мукусу цријева 2. промјену ензимске активност азоредуктазе, нитроредуктазе, бета-глюкозидазе и бета-глукуронидазе 3. обим метаболичке измјене сулфасалзина при *in vitro* условима, 4. обим метаболичке измјене сулфасалазина *in vivo* , 5. детекцију пробиотика у узорку фецеса.

Шеста цјелина (стр. 122-131) је представљена дискусијом о добијеним резултатима истраживања и њиховим поређењем са већ постојећим сличним истраживањима у овој научној области. Представљени су и образложени научни и прагматични доприноси овог рада у фармакологији.

У **седмој цјелини** (стр .132-134) кандидаткиња је на јасан и систематичан начин представила синтезу сазнања и научних чињеница изнесених у оквиру дисертације, добијених на основу резултата истраживања и тестирања хипотезе.

Осма цјелина (стр.135-152) ове дисертације представља списак кориштене литературе у оквиру спроведеног истраживања, а у оквиру израде ове дисертације.

IV УВОД И ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

IV 1. Разлог због којег је истраживање предузето, проблем, предмет, циљеви и

хипотеза истраживања

Људска цријева садрже комплексан екосистем разних микроорганизама. У истраживањима на животињама је доказан значај цријевне микрофлоре за метаболизам лијекова и других ксенобиотика, али резултати ових истраживања се не могу директно пренијети на људе. Иако је могуће постићи ензимску активност цријевне флоре у животиња сличну оној код људи, једина права информација о улози цријевне микрофлоре код људи се може постићи провођењем добро организованих клиничких испитивања. Модификацијом цријевне флоре помоћу пробиотика се покушава постићи повољно дејство за људе. Иако постоје тврдње о користи пробиотика, не само у превенцији него и у терапији различитих болести, не постоје још увијек јасни докази њиховог дјеловања, било самостално или у интеракцији са лијековима који се користе у терапији. Један од лијекова који се користи у терапији инфламаторне болести цријева, сулфасалазин, представља веома добар модел за испитивање интеракција на нивоу цријевне микрофлоре. Кандидаткиња је кроз рад успјешно дала одговор на постављени *проблем истраживања* који се односи на могућност измјене састава цријевне флоре и посљедичног утицаја на метаболизам сулфасалазина.

Кандидаткиња је у дисертацији аргументовано и објективно анализира *предмет истраживања*-утицај перорално примјењених пробиотика на састав и ензимску активност цријевне микрофлоре код пацијената обољелих од инфламаторне болести цријева, као и утицај пробиотика на метаболизам сулфасалазина.

Научни циљ истраживања је стицање сазнања о наведеном проблему истраживања на бази релевантне грађе, што је кандидаткиња урадила детаљним описима до сада изведених истраживања у области испитивања значаја ензимске активности цријевне флоре у метаболизму лијекова.

Уважавајући горе наведене чињенице, произашли су *циљеви докторске дисертације*:

Основни циљеви истраживања су били:

Испитати утицај краткотрајне и дуготрајне пероралне примјене пробиотика на састав и ензимску активност цријевне микрофлоре, као и утицај на обим разградње сулфасалазина у цријевима и настанак његових метаболита.

Ближи циљеви истраживања су били:

1. Испитати утицај пробиотика на број фекалних бактерија при аеробним и анаеробним условима култивисања
2. Испитати утицај пробиотика на број бактерија у мукусу зида цријева при

аеробним и анаеробним условима култивисања

3. Испитати утицај пробиотика на активност ензима азоредуктазе, нитроредуктазе, бета-глюкозидазе и бета-глукуронидазе
4. Испитати метаболизам сулфасалазина *in vitro* при аеробним и анаеробним условима култивисања
5. Испитати метаболизам сулфасалазина *in vivo* при аеробним и анаеробним условима култивисања
6. Потврдити присуство пробиотских бактерија у фекалном садржају

На основу проблема, предмета и циљева истраживања, као и претходних сличних истраживања, постављена су *хипотезе истраживања* које гласе: 1. Краткотрајна перорална примјена пробиотика утиче на састав и ензимску активност цријевне микрофлоре, те повећава обим разградње сулфасалазина у цријевима и повећава настанак његових метаболита 2. Дуготрајна перорална примјена пробиотика утиче на састав и ензимску активност цријевне микрофлоре, те повећава обим разградње сулфасалазина у цријевима и повећава настанак његових метаболита.

IV 2.Преглед претходних истраживања

Преглед релевантне литературе даје ширу слику теме докторске дисертације. Уводни дио са прегледом литературе јасно даје увид у тренутна научна сазнања везана за бактеријску флору цријева и њену ензимску активност, механизме настанка инфламаторне болести цријева, примјену пробиотика и њихов утицај на метаболизам лијекова. Пробавни тракт човјека је колонизован великим бројем различитих микрорганизама, који чине комплексну, балансирану заједницу микроорганизама који су нормални становници пробавног тракта, а значајни су за физиологију исхране домаћина и контролу имуног система [1,2,3]. До појаве модерних молекуларних метода, култивацијским техникама се процјењивало да нормалну цријевну микрофлору чини око 500 бактеријских врста, при чему је 30-40 доминантно. Данас можемо успјешно идентификовати и класификовати много већи број микрорганизама него раније када су кориштене искључиво култивацијске методе, јер је установљено да је јако велики број бактерија некултивибилан [4,5]. Сматра се да једном насељени микрорганизми, формирају своју заједницу, која у нормалним условима остаје релативно стабилна током цијелог живота индивидуе. Сваки новоунесени микроорганизам тешко може истиснути већ постојеће, насељене бактерије при чему се цријевна флора сматра еквивалентом отиска прста [6] а чине је резидентне (симбионти) и пролазне бактерије. Симбионти успјешно

колонишују цријева и умножавају се континуирано, за разлику од пролазних бактерија којима то успијева само током кратког времена. Симбионтске бактерије су се, ради осигурања опстанка у пробавном тракту, прилагодили антимикуробним механизмима домаћина. Све већи број података говори у прилог чињеници да симбионтски микроорганизми подстичу антимикуробне системе домаћина чиме регулишу сопствени раст и бројност. На тај начин ове бактерије штите домаћина, јер би њихово неконтролисано умножавање, без обзира што не посједују факторе вируленције, могло довести до продирања бактерија у интестинално ткиво и до неконтролисане имунолошке реакције интестиналног ткива, системске бактеријемје и сепсе [7]. На основу досадашњих истраживања, може се рећи да састав колонишујуће флоре утиче на индивидуалне варијације у имунитету домаћина. Сојеви бактерија за које је доказано да имају корисне особине по домаћина углавном припадају роду лактобацилуса и бифидобактерија, а управо та два рода се најчешће и користе као пробиотици. Неки сојеви имају додатне корисне аспекте као што је стимулација имуног одговора и конкуритивно искључивање патогена [8]. Ензимска активност цријевних бактерија је велика, а обзиром на разноликост и број микроорганизама, разумљив је снажан утицај на врсту и обим метаболитких процеса, посебно оних везаних за биотрансформацију ксенобиотика [9,10,11,12,13]. Упркос великој разноликости бактерија у пробавном тракту, метаболитки процеси су највећим дијелом везани за редукцију и хидролизу, са малом фракцијом одговорном за цијепање, разградњу и реакције повезивања. С обзиром да је колон дио цријева са најбројнијом флором, данас се управо он сматра мјестом гдје се одвија највише метаболитких реакција [11]. Бројна истраживања указују да је цријевна флора укључена у патогенезу аутоимуних болести, а међу њима и у инфламаторну болест цријева [3,14,15,16,17].

За установљавање значаја цријевне флоре код болести попут инфламаторне болести цријева се користе испитивања метаболитке функције цријевне флоре [18].

Van de Wiel са сарадницима је на моделу гастроинтестиналног симулатора доказао да цријевна флора учествује у биоактивацији полицикличних ароматичних угљоводоника и њиховој трансформацији до супстанци које показују естрогенску активност [12]. У другом истраживању је уочено постојање разлике у фармаколошким ефектима орално унесених традиционалних кинеских лијекова. Установљено је да интестинални бактеријски метаболизам гинсенга, посебно гинсенозида Р61 зависи од састава цријевне флоре [13]. Откривено је да је ендогена изложеност метилмеркуру у директој зависности од његове елиминације, која се

одвија највећим дијелом преко фецеса [19]. У другим студијама је доказана способност смрзнутих цријевних бактерија, посебно лактобацила, да вежу карциногене из хране посебно афлатоксин Б1 и контаминанте хране АФ 2 [20]. Досадашња истраживања су показала да бифидобактерије и лактобацили, који се најчешће и користе као пробиотици, имају ниску производњу ензима значајних за метаболизам ксенобиотика као што су азоредуктаза, нитроредуктаза и бета глукуронидаза, у односу на друге главне анаеробе у цријевима [19]. Супротно томе показују високу активност бета глюкозидазе која повећава производњу флавоноидских агликона који имају генотоксичне и антикарциногене особине. *Lactobacillus* GG, који је изолован из пробавног тракта здраве особе, дјелује тако што смањује активност бета-глукуронидазе у људи [21]. У истраживању на здравим добровољкама које су конзумирале јогурт са *Lactobacillus* GG, је уочено смањење активност фекалне бета глукуронидазе, нитроредуктазе и хидролазе гликохоличне киселине, док се активност бета глюкозидазе и уреазе није значајније мијењала [22]. Истраживање проведено на пацијентима обољелим од иритабилног колона или функционалне дијајереје, а који су третирани са мјешавином пробитика, је показала повећање активности фекалне бета галактозидазе и смањење активности уреазе током примјене пробитика [23]. Савремени начин живота подразумијева све мању изложеност микроорганизмима од раног дјетињства што, сматра се, повећава предиспозицију за појаву алергија, већу подложност инфекцијама и настанак инфламаторних обољења [24]. Пробиотици су дефинисани као живи микроорганизми, који примјењени у адекватним количинама испољавају повољно дејство на људско здравље. Испитивање дјелотворности пробитика у лијечењу инфекција, инфламаторних и алергијских болести је предмет многих истраживања [25,26,27,28,29]. Један од праваца истраживања везаних за дјеловање пробитика је и појачање дјеловања стандардних лијекова који се користе у инфламаторној болести цријева. То је хронична, релапсна инфламаторна болест пробавног система, аутоимуне природе, која се манифестује у виду улцерозног колитиса и Кроне болести. Нова истраживања имунолошке, микробиолошке и генетичке основе обе форме болести подупиру тренутно важећи модел болести који каже да инфламаторна болест цријева представља обољење које настаје због поремећеног одговора цријевно-мукозног имуног система на антигене цријевних комензала код генетски осјетљивих особа. Због повезаности цријевне микрофлоре и ове болести, проводе се бројне студије са пробиотцима. У сличном истраживању проведеном на пацијентима обољелим од реуматоидног артритиса, а лијечених сулфасалазином,

истовремена краткотрајна примјена пробиотика није довела нити до побољшања клиничког одговора, нити је значајно промијенила метаболизам сулфасалазина [30] иако је студија проведена на анималном моделу показала значајно повећање метаболизма сулфасалазина [31]. Овакви резултати нам показују да, резултате истраживања проведених на животињама не можемо директно пренијети на људе, те да постоји неоспорна потреба за спровођењем добро контролисаних клиничких испитивања на људима.

Литература цитирана у IV 2.

1. Yeoh N, Burton JP, Suppiah P, Reid G, Stebbings S. The role of microbiome in Rheumatic disease. *Curr Rheumatol Rep*. 2013; 15:314.
2. Plaza-Diaz J, Gomez-Llorente C, Fontana L, Gil A. Modulation of immunity and inflammatory gene expression in the gut, in inflammatory diseases of the gut and in the liver by probiotics. *World Journal of Gastroenterology* □: WJG. 2014; 20(42): 15632–15649. doi:10.3748/wjg.v20.i42.1563
3. Yu LC, Wyng JT, Wei SC, Ni YH. Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: from physiology to pathology. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* 2012; 3 (1):27-43.
4. Rajilić-Stojanović M, De Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev* 2014; 38(5):996-1047.
5. Bäckhed S, Bäckhed F, Bäckhed F. The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*. 2013; 11(4): 227-238.
6. Behnsen J, Deriu E, Sassone-Corsi M, Raffatellu M. Probiotics: properties, examples, and specific applications. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2013; 3(3):a010074
7. Van den AP, Van de Wiele T, Verstraete W, Possemiers S. The host selects mucosal and luminal associations of coevolved gut microorganisms: a novel concept. *FEMS Microbiol Rev*. 2011;35: 681–704.
8. Isolauri E, Kirjavainen PV, Salminen S. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut*. 2002; 50:54-59.
9. Mikov M, Lee HJ, Fawcett JP. The influence of probiotic treatment on sulfasalazine metabolism in rat gut contents. *Asian J. Pharmacokinet. Pharmacodyn*. 2006; 6: 337-342.
10. Stojančević M, Bojić G, Salami HA i Mikov M. The influence of intestinal

- tract and probiotics on the fate of orally administered drugs. *Curr Issues Mol Biol* 2014;16(2):55-68.
11. Sousa T, Paterson R, Moore V, et al. The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. *Int J Pharm*(2008). 363: 1-25.
 12. Van de Wiele T, Vanhaecke L, Boeckaert C, et al. Human colon microbiota transform polycyclic aromatic hydrocarbons to estrogenic metabolites. *Environmental health perspectives*. 2005; 6-10.
 13. Kim KA, Jung IH, Park SH, et al. Comparative analysis of the gut microbiota in people with different levels of ginsenoside Rb1 degradation to compound K. *PLoS ONE*. 2013; 8(4): e62409.
 14. Tlaskalova-Hogenova H, Stipankova R, Kozakova H, et al. The role of gut microbiota (comensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune disease and cancer. Contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cellular & Molecular Immunology*. 2011; 8:110-120.
 15. Ghouri A Y, Richards DM, Rahimi EF, Krill JT, Jelinek KA, DuPontet AW. Systematic review of randomized controlled trials of probiotics, prebiotics and synbiotics in inflammatory bowel disease. *Clinical and experimental gastroenterology*. 2014; 7: 473-487.
 16. Antoni L, Nuding S, Wehkamp J, Stange EF. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* □: WJG. 2014;20(5):1165-1179.
 17. Harzallah D, Belhadj H. Lactic acid bacteria as probiotics: characteristics, selection criteria and role in immunomodulation of human GI mucosal barrier. *Kongo M*. 2013:197-216.
 18. Favier C, Neut C, Mizon C, Cortot A, Colombel JF, Mizon J. Fecal β -d-galactosidase production and bifidobacteria are decreased in Crohn's disease. *Digestive diseases and sciences*. 1997; 42(4): 817-822.
 19. Rowland I. Modification of gut flora metabolism by probiotics and oligosaccharides. In: Fuller R, Heidt PJ, Rusch V, van der Waai D, eds. *Old Herborn University Seminar Monograph 8: Probiotics: prospects of use in opportunistic infections*. Herborn-Dill, Germany: Institute for Microbiology and Biochemistry; 1995: 35-46.
 20. Orrhage K, Sillerstrom E, Gustafsson JA, et al. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mut Res*. 1994; 311:

239–48.

21. Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gualtieri L, Salminen S. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci*. 1992;37:121–8.
22. Ling WH, Korpela R, Mykkänen H, Salminen S, Hänninen O. *Lactobacillus* strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activities in healthy female adults. *The Journal of nutrition*. 1994; 124(1): 18–23.
23. Brigidia P, Vitalia B, Swennena E, Bazzocchib G, Matteuzzi D. Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea. *Res. Microbiol*. 2001; 152: 735–741
24. Molodecky NA, Kaplan GG. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology & Hepatology*. 2010; 6(5): 339–346.
25. Verna EC, Lucak S. Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 2010;3(5):307–319.
26. Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llrente C, Gil A. Probiotic Mechanisms of Action. *Ann Nutr Metab* 2012;61:160–174.
27. Gourbeyre P., Denery S., Bodinier M. Probiotics, prebiotics and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *Journal of Leucocyte Biology*. 2011; 89(5): 685–695.
28. Russell DA, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International journal of food microbiology*. 2011 Sep 1;149(1):88–105.
29. Savard P, Lamarche B, Paradis ME, Thiboutot H, Laurin E, Roy D. Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and, *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. *International Journal of Food Microbiology*. 2011; 149: 50–57.
30. Lee HJ, Waller RD, Stebbings S, Highton J, Orlovich DA, Schmierer D and Fawcett JP. The effects of an orally administered probiotic on sulfasalazine metabolism in individuals with rheumatoid arthritis: a preliminary study. *International Journal of Rheumatic Diseases*. 2010; 13:48–54. doi: 10.1111/j.1756-185X.2009.01449.
31. Mikov M, Lee HJ, Fawcett JP. The influence of probiotic treatment on sulfasalazine metabolism in rat gut contents. *Asian J. Pharmacokinetics*

IV 3. Допринос тезе у рјешавању изучаваног предмета истраживања

Бројна истраживања имунолошке, микробиолошке и генетичке основе обје форме инфламаторне болести цријева подупиру тренутно важећи модел болести који каже да је то обољење које настаје због поремећеног одговора цријевно-мукозног имуног система на антигене цријевних комензала код генетски осјетљивих особа. Сулфасалазин је лијек који се користи у лијечењу инфламаторне болести цријева и реуматоидног артритиса. Његова молекула садржи 5-аминосалицилну киселину и сулфапиридин који су везани азо везом, а која се примарно цијепа дјеловањем бактеријске азоредуктазе у колону. Сматра се да је сулфапиридин активни принцип дјелотворан у реуматоидном артритису због свог антибактеријског и имуномодулаторног дејства, док је 5-аминосалицилна киселина активни принцип у инфламаторној болести цријева. Због повезаности цријевне микрофлоре и инфламаторне болести цријева, проводе се бројне студије са пробиотицима. Један од праваца истраживања везаних за дјеловање пробиотика је и појачање дјеловања стандардних лијекова, попут сулфасалазина, који се користе у инфламаторној болести цријева.

У данашњој, релевантној, научној литератури не постоје свеобухватна испитивања значаја цријевне микрофлоре за метаболизам лијекова и других ксенобиотика код људи.. С обзиром да се ови резултати не могу директно пренијети на људе, постоји потреба за спровођењем добро контролисаних клиничких испитивања на људима.

Током овог истраживања кандидаткиња је истражила да ли перорална примјена пробиотика утиче на састав и ензимску активност цријевне микрофлоре код пацијената обољелих од инфламаторне болести цријева, као и да ли пробиотици утичу на метаболизам сулфасалазина

IV 4. Научни и прагматични допринос дисертације

До сада није публикован рад који овако свеобухватно истражује утицај комбинације пробиотика на метаболичку активност цријевне флоре и метаболизам сулфасалазина. С овим је дат значајан *научни допринос дисертације* у истраживању као и у ширењу знања везаних за метаболичке капацитете цријевне флоре и значај пробиотика. *Прагматичан допринос дисертације* подразумијева подизање свијести љекара о важности препознавања цријевне флоре као важног метаболичког органа одговорног за метаболизам лијекова и других ксенобиотика.

V МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

V 1. Материјал и критеријуми

Материјал-испитаници и методе рада који су коришћене у овој дисертацији су усклађене са постављеним циљевима и приказане су на девет страница. Коришћени испитаници и метод истраживања, који су примјењени у овој дисертацији омогућили су увид у испитивану проблематику и пружиле одговор на научни проблем, односно предмет испитивања. Испитивање је проведено као моноцентрична, рандомизована, отворена, контролисана студија фазе IV са паралелним групама у трајању од 8 недјеља у коју је укључено 29 новообољелих особа.

Испитаници обољели од инфламаторне болести цријева су морали да испуне следеће *критеријуме за укључивање* у испитивање:

- Потписан информисани пристанак,
- Доб од 18-70 година
- Клинички индикована доња ендоскопија
- Ендоскопски потврђена инфламаторна болест цријева -новоткривена
- Патохистолошки потврђена инфламаторна болест цријева
- Амбулантни болесници

Критеријуми за не укључивање испитаника у студију

- Старост испод 18 година
- Псеудомембранозни колитис
- Позитиван налаз столице на патолошке бактерије, гљивице, протозое или паразите
- Постојање малигног обољења
- Постојање срчане инсуфицијенције
- Постојање бубрежне инсуфицијенције
- Постојање инсуфицијенције јетре
- Ранија алергија или неподношење сулфасалазина
- Ранија алергија или неподношење пробиотика
- Испитаници са метаболичком болешћу
- Труднице, дојиље и жене у генеративном периоду које не примењују адекватну заштиту од трудноће
- Изражена анемија ($E < 2.5$ милиона Hgb < 70)
- Примјена системских кортикостероида дужа од 10 дана у претходна 2 мјесеца
- Систолни притисак већи од 160 mm Hg

-Дијастолни притисак већи од 95 mm Hg

-Учешће у другом клиничком испитивању у претходна 3 мјесеца.

Критеријуми за искључивање из студије

У случају акутне компликације или потребе за било којом клиничком интервенцијом која захтјева додатну терапију

Ако се развила нежељена реакција/догађај, која сама по себи условљава искључивање из студије

Ако је дошло до непоштовања усвојеног плана клиничког испитивања

На лични захтјев испитаника

Одлуком главног испитивача

V 2. Кратак увид у метод истраживања

Испитивана популација је подијељена у двије групе; групу Сулфасалазин (сулфасалазин таблете од 500 mg, Sulfasalazin, Krka) са 14 испитаника и групу Сулфасалазин и пробиотик (сулфасалазин таблете од 500 mg, Sulfasalazin, Krka и пробиотик Normia, Jadran Galenski Laboratorij) са 15 испитаника. Група Сулфасалазин је лијечена само сулфасалазином током 8 недјеља, а група Сулфасалазин и пробиотик је уз сулфасалазин током 8 недјеља добијала и пробиотик током 4 недјеље. У овој групи терапија са пробиотиком је почела 2 недјеље послје почетка терапије сулфасалазином, и трајала је 2 недеље. Након тога је терапија пробиотиком прекинута током слиједеће 2 недеље, да би се потом поново укључила и трајала до истека испитивања. Контролни прегледи испитаника су вршени сваке двије недјеље, при чему су сакупљани узорци столице и 24-часовног урина. Узорци мукуса зида цријева су узети при првом ендоскопском прегледу те при контролној ендоскопији, након завршетка испитивања. Рађена је стандардна микробиолошка култивација цријевних бактерија из фекалног садржаја и цријевног мукуса на плочама са крвним агаром, у аеробним и анаеробним условима. Број бактеријских колонија је изражен као log 10. Ензимска активност цријевних бактерија у фекалном садржају (азоредуктаза, нитроредуктаза, бета-глукозидаза, бета-глукуронидаза) је одређивана спектрофотометријски. Мјерење вриједности сулфасалазина и његових метаболита, сулфапиридина и 5-аминосалицилне киселина, насталих *in vitro* у фекалној суспензији и из узорка 24-часовног урина, је вршено помоћу уређаја за течну хроматографију са масеним детектором (LC-MS). Идентификација пробиотских бактерија у фекалном садржају пацијената се вршила *PCR* методом и електрофорезом на чиповима. Све методе истраживања кориштене у

испитивања су *адекватне, тачне и савремене* имајући у виду достигнућа у овој области истраживања.

Промјена у односу на план истраживања који је дат приликом пријаве докторске тезе није било.

Сви *испитивани параметри*, осим оних који се односе на одређивање броја бактерија из узорка мукуса зида колона што је кандидаткиња детаљно објаснила у дијелу дискусија, *дају довољно елемената* који чине ово истраживање квалитетним.

Статистичка обрада података је била адекватна. Сви резултати су представљени табеларним приказом и/или графички. Квалитативни подаци су приказани кроз број појава и процентуалну заступљеност. За приказ квантитативних података кориштени су показатељи дескриптивне статистике (број испитаника, аритметичка средина, стандардна девијација, стандардна грешка аритметичке средине, 95%-тни интервал повјерења за аритметичку средину, екстремне вриједности, квантили и медијана).

Нормалност расподеле код посматраних обилежја је тестирана Колмогоров-Смирнов-им тестом нормалности. За упоређивање средњих вредности обилежја према испитиваној групи кориштен је *ANOVA* тест за понављајућа мјерења (ако посматрана обилежја имају нормалну расподелу), те непараметарски *Friedman* -ов тест за више независних узорака (ако посматрана обилежја немају нормалну расподелу). У случајевима када је помоћу *ANOVA* теста за понављајућа мјерења показана статистички значајна разлика у средњим вриједностима обилежја, рађен је и *Student*-ов *t* тест за независне узорке ради упоређивања средњих вриједности обилежја за свака два мјерења. У случајевима када је помоћу *Friedman* -овог теста за више независних узорака показана статистички значајна разлика у средњим вриједностима обилежја, рађен је и *Mann-Whitney U* тест за два независна узорка ради упоређивања средњих вриједности обилежја за свака два мјерења. Код кориштења *Student* -овог *t* теста за независне узорке, значајност разлике у варијансама посматраних обилежја тестирана је *F* тестом. За упоређивање средњих вриједности посматраних обилежја на различитим контролама кориштен је *Student* -ов *t* тест за упарене узорке (ако посматрана обилежја имају нормалну расподелу), односно непараметарски *Wilcoxon*-ов *W* тест (ако посматрана обилежја немају нормалну расподелу). За утврђивање степена повезаности (корелације) различитих обилежја кориштена је *Spearman*-ова непараметарска корелација (у овим табелама *r* означава коефицијент повезаности или корелације, а *p* означава значајност корелације). Као статистички значајне узимане су вриједности у којима је $p < 0.05$.

За статистичку анализу, те табеларне и графичке приказе резултата кориштен је

слједећи софтвер: *IBM SPSS Statistics 21.0*; *MS Office Word 2010* и *MS Office Excell 2010*.

Анализирајући обрађени материјал, описане методе и материјал истраживања, а имајући у виду досадашња искуства и достигнућа у овој области комисија констатује да су примјењене методе адекватне, а испитивани параметри довољно обрађени и објективно тумачени.

VI РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ИСТРАЖИВАЊА

VI 1. Резултати истраживања

Добијени резултати ове докторске дисертације су приказани на 82 странице у дијелу резултати и још 50 страница у дијелу Прилози. Анализирани су кроз дискусију на десет страница. У дијелу истраживања у којем се испитивала *ензимска активност фекалне флоре*, кандидаткиња је дошла до слједећих резултата: Активност азоредуктазе при аеробним условима култивисања је статистички значајно опадала у обе експерименталне групе. При анаеробним условима култивисања статистички значајан пад активности азоредуктазе је постојао само у групи Сулфасалазин и пробиотик. Активност нитроредуктазе је статистички значајно расла, у односу на вриједности прије почетка лијечења, у обе испитиване групе и при оба култивацијска услова. У групи лијеченој комбинацијом сулфасалазина и пробиотика је дошло до уочљивог пад активности нитроредуктазе након 2-седмичне примјене пробиотика. Активност бета-глукозидазе и бета-глукуронидазе је падала у односу на вриједности прије почетка лијечења, у обе испитиване групе и при оба култивацијска услова, при чему је код пацијената који су добијали и пробиотике пад бета-глукуронидазе био и статистички значајан. Активност оба ова ензима је била већа у групи сулфасалазин vs. сулфасалазин и пробиотик. У дијелу истраживања у којем се испитивао *број бактерија у фекалном садржају*, кандидаткиња је дошла до слједећих резултата: Примјена сулфасалазина није довела до статистички значајне промјене броја фекалних бактерија ни при аеробним нити анаеробним условима култивисања, мада је био присутан тренд раста броја бактерија у односу на почетне вриједности. Ни примјена комбинације сулфасалазина и пробиотика није довела до статистички значајне промјене броја фекалних бактерија. И у овој експерименталној групи при аеробним условима култивисања број бактерија је растао, али је при анаеробним условима култивисања број бактерија опадао у односу на почетне вриједности. У дијелу истраживања у којем се испитивао *број бактерија у цријевном мукусу* кандидаткиња је закључила да ове резултате не може сматрати валидним

због техничких мањкавости у раду који се нису успјели превазићи, тако да нису ни уврштени у дисертацију. У дијелу истраживања у којем су се одређивали *сулфасалазин и његови метаболити излучени у урину*, кандидаткиња је дошла до сљедећих резултата: Количина сулфасалазина излученог у урину није показала статистички значајну промјену нити у једној испитиваној групи, нити између група. Ни количина метаболита сулфапиридина се није статистички значајно мијењала нити у једној од група, иако је у групи сулфасалазин и пробиотик присутан благ пад на контролама проведеним после 2-седмичног давања пробиотика. Количине метаболита месалазина такође нису показале статистички значајне промјене нити у једној групи испитаника, али су му вриједности у сулфасалазин групи расле у односу на почетне вриједности, док су му код испитаника третираних сулфасалазином и пробиотицима вриједности опадале. У дијелу истраживања у којем су се одређивали *сулфасалазин и његови метаболити у фекалном садржају-in vitro метаболизам*, кандидаткиња је дошла до сљедећих резултата: Количина сулфасалазина измјереног у узорку фецеса у обе експерименталне групе је показала тренд опадања. Количина метаболита сулфапиридина код испитаника у групи сулфасалазин је расла, док у групи лијеченој сулфасалазином и пробиотиком није дошло до статистички значајних промјена. Количина метаболита месалазина, код пацијената лијечених само сулфасалазином се није значајно мијењала, а у групи лијеченој сулфасалазином и пробиотиком је опала у односу на почетне вриједности. У дијелу истраживања у којем се вршила *идентификација пробиотских бактерија у фекалном садржају*, кандидаткиња је дошла до сљедећих резултата: Пролазна колонизација са *Bifidobacterium BB12* је потврђена код 22% испитиваних узорака, при чему је уочљиво повећање броја позитивних узорака на контролама које су слиједиле после 2-седмичне примјене пробиотика. За разлику од *Bifidobacterium BB12*, *Lactobacillus rhamnosus LGG* није показала пролазну колонизацију пробавног тракта.

VI 2. Критичност и коректност тумечења резултата

Резултати истраживања су приказани на прегледан начин. Они су јасно и објективно тумачени, а кандидаткиња је показала објективан и критичан став у процјени резултата, посебно у дијелу који се односи на компарацију са резултатима сличних истраживања. Дискусија резултата показује да је кандидатакиња способна да прикупи, обради, презентује резултате на врло прегледан начин, као и да на јасан и свеобухватан начин разматра приказане резултате и упоређи их са литературним подацима.

VI 3. Теоријски и практични допринос дисертације и нови истраживачки задаци

Основни теоријски допринос дисертације је следећи:

Ова докторска дисертација проширује постојећа знања о утицају пробиотика на број и метаболичку активности цријевних бактерија код обољелих од инафламаторне болести цријева. Анализирана је ензимска активност цријевне флоре и утицај пробиотика на њу. Уочено је пробиотици мијењају активност испитиваних ензима, али да та промјена не утиче на метаболизам сулфасалазина нити на број фекалних бактерија. Такође је уочено да је од мјешавине бактерија датих у облику пробиотика, само *Bifidobacterium BB12* показала пролазну колонизацију цријева испитаника док *Lactobacillus rhamnosus LGG* није показала пролазну колонизацију пробавног тракта.

Основни практични допринос дисертације је следећи:

Ова докторска дисертација својим предметом и проблематиком истраживања, указује на могућу примјену пробиотика прије свега као модулятора ензимске активности цријевне флоре. С обзиром да је већина досадашњих сазнања о метаболичкој активности цријевне флоре добијена, углавном истраживањима која се проводе на животињама и на *in vitro* моделима пробавног система, а много рјеђе клиничким истраживањима чини ово истраживање још драгоцјенијим.

Основни правци даљих истраживања:

Резултати ове дисертације дају одговоре на постављени проблем истраживања, али и указује на наредне правце истраживања. Свакако је један од праваца истраживања установљивање оптималне методе узорковања цријевних бактерија које насељавају луминални слој мукуса цријева, а потом и одређивање њихове ензимска активност.

VII ЗАКЉУЧАК И ПРИЈЕДЛОГ

Докторска дисертација мр сц. Наташе Стојаковић под називом “Утицај пробиотика на метаболизам сулфасалазина у обољелих од инфламаторне болести цријева” израђена је у складу са образложењем које је кандидат приложио приликом пријаве теме. Докторска дисертација урађена је према правилима и принципима научно-истраживачког рада и резултат је оригиналног научног рада кандидата. Резултати истраживања јасно намећу закључак да пробиотици утичу на ензимску активност цријевне флоре.

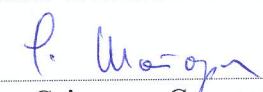
Поред тога кандидаткиња је прецизно и логички анализирала предложену тему истраживања и довела податке у везу са постављеном хипотезом. Такође, кандидаткиња је тему ове дисертације, кроз јасно и концизно писање учинила интересантном и корисном и за истраживаче и за практичаре. Дисертација представља оригинални допринос фармакологији и медицинској науци, јер проширује постојећа знања о пробиотцима и метаболичкој активности цријевне флоре.

Чланови Комисије, на основу укупне оцјене докторске дисертације једногласно дају позитивну оцјену о завршеној докторској дисертацији под називом: “Утицај пробиотика на метаболизам сулфасалазина у обољелих од инфламаторне болести цријева” мр сц. Наташе Стојаковић и предлаже члановима Наставно-научног вијећа Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци и Сенату Универзитета у Бањој Луци да прихвате овај Извјештај и омогуће кандидату да своју докторску дисертацију јавно брани.

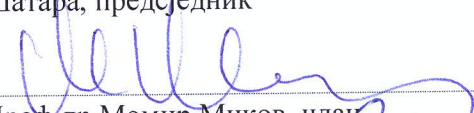
Датум: 24.4.2017.

ПОТПИС ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

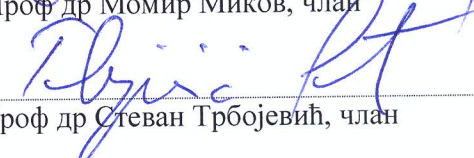
1.


Проф др Свјетлана Стоисављевић
Шатара, председник

2.


Проф др Момир Миков, члан

3.


Проф др Стеван Трбојевић, члан