

# Uloga probiotika u bolestima probavnog sustava u djece

---

**Prtajin, Marta**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2015**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:229856>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-04**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marta Prtajin**

**Uloga probiotika u bolestima  
probavnog sustava u djece**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2015.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marta Prtajin**

**Uloga probiotika u bolestima  
probavnog sustava u djece**

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za gastroenterologiju, hepatologiju i prehranu, Klinike za pedijatriju KBC-a Zagreb, Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof.dr.sc. Jurice Vukovića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2014./2015.

## POPIS KRATICA

BSH	Hidrolaza žučnih soli (prema engl. <i>Bile salt hydrolase</i> )
CFU	Jedinice koje tvore kolonije (prema engl. <i>Colony- forming units</i> )
HDL	Lipoprotein visoke gustoće (prema engl. <i>High density lipoprotein</i> )
IDL	Lipoprotein srednje gustoće (prema engl. <i>Intermediate density lipoprotein</i> )
LDL	Lipoprotein niske gustoće (prema engl. <i>Low density lipoprotein</i> )
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
SHIME	Simulator ljudskog probavnog mikrobnog ekosustava (prema engl. <i>Simulator of the human intestinal microbial ecosystem</i> )

# SADRŽAJ

1. SAŽETAK.....	
2. SUMMARY .....	
3. UVOD .....	1
4. OPĆENITO O PROBIOTICIMA I CRIJEVNOJ MIKROFLORI.....	2
4.1. Probiotici .....	2
4.2. Crijevna mikroflora .....	3
5. PROBIOTICI U PREVENCIJI I LIJEČENJU KLINIČKIH BOLESTI I STANJA U DJECE .....	5
5.1. Akutni infektivni proljev.....	5
5.1.1. Prevencija .....	5
5.1.2. Liječenje.....	6
5.2. Postantimikrobni proljev .....	7
5.2.1. Prevencija .....	7
5.2.2. Liječenje.....	8
5.3. Nekrotizirajući enterokolitis .....	8
5.3.1. Prevencija .....	8
5.4. Hiperbilirubinemija.....	9
5.4.1. Liječenje.....	9
5.5. <i>Helicobacter pylori</i> infekcija.....	10
5.5.1. Liječenje.....	10
5.6. Kronične upalne bolesti crijeva.....	10
5.6.1. Liječenje ulceroznog kolitisa .....	11
5.6.2. Liječenje Crohnove bolesti.....	12
5.7. Sindrom iritabilnog crijeva i opstipacija .....	13

5.8. Dojenačke kolike .....	13
5.8.1. Liječenje.....	15
5.9. Minimalna hepatička encefalopatija .....	16
5.9.1. Liječenje.....	16
5.10. Hiperkolesterolemija.....	17
5.10.1. Liječenje.....	17
5.11. Atopijske bolesti .....	19
5.11.1. Prevencija .....	19
5.11.2. Liječenje.....	20
5.12. Ekstraintestinalne infekcije.....	21
5.12.1. Prevencija .....	21
5.12.2. Liječenje.....	21
5.13. Rak.....	21
6. SIGURNOST PROBIOTIKA U DJECE .....	22
7. RASPRAVA.....	24
8. ZAKLJUČAK.....	26
9. ZAHVALE .....	28
10. LITERATURA .....	29
11. ŽIVOTOPIS .....	45

# 1. SAŽETAK

## Uloga probiotika u bolestima probavnog sustava u djece

Marta Prtajin

Probiotici su dodatci prehrani ili prehrambeni proizvodi koji sadrže žive mikroorganizme koji mijenjaju crijevnu mikrofloru te potencijalno korisno djeluju na zdravlje domaćina. Randomizirana klinička istraživanja su pokazala učinkovitost primjene probiotika u liječenju proljeva u akutnim virusnim gastroenteritisima i prevenciji postantimikrobnog proljeva u inače zdrave djece te skraćanju trajanja fototerapije u djece s vrlo malom porođajnom masom s indirektnom hiperbilirubinemijom. Neki rezultati podupiru profilaktičku primjenu probiotika u prevenciji nekrotizirajućeg enterokolitisa u djece s vrlo malom porođajnom masom i atopijskih bolesti, ali potrebno je više dokaza prije njihove rutinske primjene. Primjena probiotika u liječenju *Helicobacter pylori* infekcija, ulceroznog kolitisa, dojenačkih kolika, minimalne hepatičke encefalopatije i sindroma iritabilnog crijeva u djetinjstvu pokazala je pozitivne preliminarnе ishode, ali također zahtjeva više potvrdnih rezultata. Nije dokazana korist primjene probiotika u liječenju ili prevenciji raka i ekstraintestinalnih infekcija te liječenju Crohnove bolesti i opstipacije u pedijatrijskih pacijenata. Različita izvješća upućuju na hipokolesterolemički učinak probiotika, ali budući da se točan mehanizam slabo razumije, potrebna su daljnja istraživanja. Primjena probiotika se ne preporučuje u teško ili kronično bolesne djece dok se ne razriješe sva sigurnosna pitanja. S obzirom na nepoznate dugoročne učinke probiotika na mikrofloru i cjelokupno zdravlje te nedostatak razumijevanja njihove uloge u bolestima probavnog sustava u djece, kliničke smjernice za njihovu primjenu se još moraju utvrditi.

**Ključne riječi:** probiotici, mikroflora, liječenje, dugoročni učinak, kliničke smjernice



## 2. SUMMARY

### Role of probiotics in pediatric gastrointestinal diseases

Marta Prtajin

Probiotics are supplements or foods that contain viable microorganisms that change the microflora of the host and have positive health potential. Randomized clinical trials have shown efficiency of the probiotic use in treating diarrhea in acute viral gastroenteritis and preventing antibiotic-associated diarrhea in otherwise healthy children and reducing the duration of phototherapy in very low birth weight infants with indirect hyperbilirubinemia. Some results support the prophylactic use of probiotics in preventing necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants and atopic disorders, but more evidence is needed before routine use. Probiotic treatment for *Helicobacter pylori* infections, ulcerative colitis, infantile colic, minimal hepatic encephalopathy and irritable bowel syndrome in childhood has shown positive preliminary outcomes, but also requires more confirmatory results. No benefits are proven in treating or preventing cancer and extraintestinal infections and treating Crohn disease or constipation with probiotics in pediatric patients. Various reports suggest the hypocholesterolemic effect of probiotics, but the exact mechanism is poorly understood and requires further investigation. The use of probiotics is not recommended in seriously or chronically ill children until all safety concerns have been resolved. Due to unknown long-term effects of probiotics on the children microflora and overall health and lack of understanding of their role in pediatric gastrointestinal diseases, clinical guidelines for probiotics have yet to be determined.

**Key words:** probiotics, microflora, treatment, long-term effect, clinical guidelines

### 3. UVOD

Mikroorganizmi su sveprisutni i važni su faktori u prirodi i zdravlju čovjeka. U crijevima čovjeka milijarde mikroorganizama čine crijevnu mikrofloru koja sa svojim razvojnim, sintetskim, probavnim i zaštitnim učincima pozitivno utječe na zdravlje čovjeka. Narušavanje ravnoteže zdrave crijevne mikroflore, s prevladavanjem patogenih mikroorganizama, negativno utječe na zdravlje i povezuje se s brojnim stanjima i bolestima.

Pokušaji optimizacije i unaprjeđenja crijevne mikroflore potaknuli su i povećali zanimanje za dodatkom različitih tvari u prehranu čovjeka. Probiotici su se, kao tvari koje sadrže mikroorganizme u količini dovoljnoj za promjenu crijevne mikroflore i s potencijalnim pozitivnim učinkom na zdravlje, posebno istaknuli u toj namjeni. Kao i primjena antibiotika i drugih farmakoloških tvari, upotreba i učinkovitost probiotika moraju svoje temelje imati u medicini zasnovanoj na dokazima. Na tržištu danas postoji velik broj preparata probiotika, s različitim sastavom, brojem bakterija, dodacima i namjenom, dostupnih bez liječničkog recepta. Oni se koriste, prema preporuci liječnika ili često samoinicijativno, u svrhu prevencije i liječenja različitih bolesti i stanja kao adjuvantne tvari ili zamjena za uobičajenu terapiju. Dostupnost i široka upotreba probiotika nameću pitanja opravdanih indikacija i sigurnosti njihove primjene kako u odraslih tako i u djece. Njihova primjena u djece i pedijatrijskih pacijenata predstavlja poseban i složen izazov. Budući da modulacija zdravlja djeteta može imati dalekosežne posljedice u odrasloj dobi, primjena, učinci i potencijalne posljedice bilo koje tvari, a tako i probiotika, moraju biti detaljno istraženi prije utvrđivanja kliničkih smjernica i preporuka za njihovu primjenu.

Cilj ovog diplomskog rada je pružiti pregled razvoja, sastava i uloge crijevne mikroflore, značajki, djelovanja i upotrebe probiotika u pedijatrijskih pacijenata s naglaskom na one s bolestima probavnog sustava te sažetak znanja o njihovoj koristi za zdravlje djece, s posebnim osvrtom na opravdanost, preporuke i sigurnost njihove primjene.

## 4. OPĆENITO O PROBIOTICIMA I CRIJEVNOJ MIKROFLORI

### 4.1. Probiotici

Probiotici su, prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije, prehrambeni proizvodi ili dodatci prehrani koji sadrže žive mikroorganizme u količini dovoljnoj za promjenu crijevne mikroflore te s potencijalnim korisnim djelovanjem na zdravlje domaćina. Mikroorganizmi probiotika su u pravilu različite vrste rodova *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Streptococcus* (Food and Agriculture Organization of the United Nations & World Health Organization 2001, 2002; Council for Agricultural Science and Technology 2007). Oni su fermentacijski, obligatni ili fakultativno anaerobni organizmi, uglavnom nepokretni, različitih oblika te tipično proizvode mliječnu kiselinu. Najistraživaniji među njima su *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), *Bifidobacterium lactis* i *Streptococcus thermophilus*. Probiotičke se bakterije svojim značajkama razlikuju od Gram- negativnih, pokretnih bakterija koje ne proizvode mliječnu kiselinu poput vrsta rodova *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia* i *Proteus*. Te se potencijalno štetne bakterije mogu isticati u flori probavnog sustava te prelaženjem epitelne granice uzrokovati bolesti u čovjeka (Thomas et al. 2010, prema Heller & Duchmann 2003; Berg 1999).

Biološka svojstva omogućavaju probiotičkim bakterijama prevladavanje i savladavanje potencijalno patogenih mikroorganizama u probavnom sustavu čovjeka. Pretpostavlja se da povoljan regulatorni učinak na biološke funkcije domaćina ostvaruju stvaranjem malih molekularnih metaboličkih nusprodukata, uključujući kratko- lančane masne kiseline poput butirata. Ti nusprodukti, često spominjani kao postbiotici, mogu djelovati kao modulatori imunološkog sustava (Thomas et al. 2010, prema Commane et al. 2005; Falony et al. 2006; Björkstén et al. 1999).

U istraživanju Nolleta i suradnika proučavan je učinak *Lactobacillus reuteri* s aktivnosti hidrolaze žučnih soli (BSH, prema engl. *Bile salt hydrolase*) na probavni sustav čovjeka koristeći simulator ljudskog probavnog mikrobnog ekosustava (SHIME, prema engl. *Simulator of the human intestinal microbial ecosystem*). Primjena *L. reuteri* rezultirala je značajnim smanjenjem populacija

koliformnih bakterija i *Enterobacteriaceae*. Proizvodnja CO<sub>2</sub> smanjena je za 25 do 40% dok je koncentracija masnih kiselina porasla za 20 do 30%. Zabilježen je porast koncentracije NH<sub>4</sub><sup>+</sup> s 400 na 500 mg/L te izvanstaničnog proteina za 25 do 30%. *L. reuteri* je pokazao zadovoljavajuću sposobnost preživljavanja tijekom prolaska kroz želudac te rasta u okolini s visokim razinama žučnih soli. Rezultati ovog istraživanja su pružili uvid u učinke probiotika na probavni sustav čovjeka te podupiru oralnu primjenu *L. reuteri* s ciljem njihovih ostvarivanja (Nollet et al. 1999).

Neki kvasci, poput *Saccharomyces boulardii* te njihovi nusprodukti su također proučavani i primjenjivani kao probiotičke tvari (Thomas et al. 2010).

Probiotičke bakterije se mogu primjenjivati samostalno ili kao dodatci u hrani.

## 4.2. Crijevna mikroflora

Fetus i novorođenče pri rođenju imaju sterilan probavni sustav, ali njegova kolonizacija počinje i zbiva se brzo nakon rođenja (Thomas et al. 2010, prema Yoshioka et al. 1983; Weng & Walker 2006; Pietzak 2004). Na taj proces znatno utječu gestacijska dob novorođenčeta, način poroda i prehrana. Kod novorođenčadi rođenih carskim rezom, perinatalno ili postnatalno izloženih antibioticima te nedonoščadi kolonizacija komenzalnim probiotičkim bakterijama je usporena. Vaginalno rođena novorođenčad, dojena i ona hranjena dojenačkim mliječnim pripravcima s 48 sati starosti imaju sličan uzorak bakterijske kolonizacije probavnog sustava. S vremenom dolazi do značajnijih razlika u kolonizaciji između ove dvije skupine djece. Do sedmog dana starosti *Bacteroides fragilis* prevladava u otprilike dvije trećine djece hranjene dojenačkim mliječnim pripravcima, u usporedbi s 22% dojene djece (Thomas et al. 2010, prema Yoshioka et al. 1983). Prema kraju prvog mjeseca starosti, u zemljama u razvoju u kolonizaciji dojene djece prevladava *Bifidobacterium*, dok djeca hranjena dojenačkim mliječnim pripravcima imaju podjednaku kolonizaciju vrstama rodova *Bacteroides* i *Bifidobacteria*. Ta je razlika manje izražena u razvijenim zemljama (Thomas et al. 2010, prema Björkstén et al. 1999).

Nakon ranog djetinjstva sastav crijevne mikroflore značajnije se ne mijenja. Stoga je fekalna flora u starije djece i odraslih manje promjenjiva i ne ovisi toliko o prehrani. Koncentracije bakterija u debelom crijevu nakon djetinjstva su oko  $10^{12}$  jedinica koje tvore kolonije (CFU, prema engl. *Colony-forming units*) po mililitru crijevnog sadržaja. Anaerobne bakterije su znatno brojnije od aerobnih koliformnih (Thomas et al. 2010, prema Tannock 2003). Obligatni anaerobi poput *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* i *Bacteroides* čine otprilike 95% crijevne bakterijske populacije kod ljudi, dok 1-10% čine fakultativni anaerobi poput *Lactobacillus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* i *Bacillus*. Aerobni mikroorganizmi, s iznimkom *Pseudomonasa* prisutnog u vrlo maloj količini, nisu prisutni kod zdravih osoba (Jukić 2007).

Crijevna mikroflora je važna za razvoj i sazrijevanje imunološkog sustava i normalne crijevne morfologije, održavanje kroničnog i imunološki posredovanog upalnog odgovora i funkcije crijevne sluznice, sintezu vitamina, obranu od alergena te prevenciju pričvršćivanja patogenih mikroorganizama.

Prehrana u ranom djetinjstvu, kolonizacija probavnog sustava, rana izloženost potencijalnim infektivnim patogenima i antibioticima kao i genotip djeteta značajno utječu na imunološki odgovor probavnog sustava. Smatra se da su mnoge bolesti povezane s deregulacijom ranog razvoja crijevnog mukoznog obrambenog sustava. Primjeri su atopijske bolesti poput astme, ekcema i alergijskog rinitisa ili autoimune poput multiple skleroze, dijabetes mellitusa tip 1 i kronične upalne crijevne bolesti (Thomas et al. 2010, prema Matsuzaki et al. 2007; Yuan & Walker 2004). Vjeruje se da probiotičke bakterije i postbiotički bakterijski nusprodukti pozitivno utječu na razvoj crijevnog mukoznog imunološkog sustava (Thomas et al. 2010).

## 5. PROBIOTICI U PREVENCIJI I LIJEČENJU KLINIČKIH BOLESTI I STANJA U DJECE

### 5.1. Akutni infektivni proljev

Akutni infektivni proljev je glavni segment gastrointestinalnih infekcija. U pravilu traje do 14 dana, iznimno do 21 dan. Najčešće je uzrokovan bakterijama i virusima (Breitenfeld et al. 2006).

#### 5.1.1. Prevencija

Rezultati objavljenih randomiziranih kliničkih istraživanja su ukazali na skromnu korist primjene probiotika u prevenciji akutnih infekcija gastrointestinalnog sustava u zdrave djece (Thomas et al. 2010, prema Oberhelman et al. 1999; Hatakka et al. 2001; Thibault et al. 2004; Saavedra et al. 2004). U istraživanjima su primjenjivani probiotici (LGG, *S thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *B lactis* ili *Lactobacillus reuteri*) u kombinaciji s mlijekom ili dojenačkim mliječnim pripravcima ili kao oralni dodatci prehrani. Najčešći uzrok akutnog proljeva u ovim randomiziranim kliničkim istraživanjima bila je infekcija rotavirusom.

U dvostruko slijepom istraživanju kontroliranom placebom Weizmana i suradnika (Thomas et al. 2010, prema Weizman et al. 2005), 201 djeteta, od 4 do 10 mjeseci starosti, hranjeno je tijekom 12 tjedana dojenačkim mliječnim pripravkom s dodatkom *B lactis* ili *L reuteri* ili kontrolnim dojenačkim mliječnim pripravkom bez dodanog probiotika. Djeca hranjena dojenačkim mliječnim pripravkom s dodatkom probiotika imala su manji broj i kraće trajanje epizoda proljeva u usporedbi s djecom u kontrolnoj skupini. Značajan učinak na akutne respiratorne bolesti nije pronađen.

U drugom istraživanju, provedenom u centrima za njegu u Francuskoj (Thomas et al. 2010, prema Pedone et al. 2000), 928 zdrave djece je nasumično raspoređeno u skupinu hranjenu standardnim jogurtom ili skupinu hranjenu jogurtom s dodatkom *L casei* tijekom 4 mjeseca. Djeca hranjena jogurtom s dodatkom probiotika imala su manje epizoda proljeva tijekom razdoblja istraživanja nego djeca hranjena standardnim jogurtom.

Rezultati meta- analize prevencije akutnog rotavirusnog gastroenteritisa probioticima pokazali su da je za sprječavanje razvoja nozokomijalnog rotavirusnog gastroenteritisa kod jednog djeteta potrebno davati LGG otprilike sedmero djece u centrima za dječju njegu (Thomas et al. 2010, prema Szajewska et al. 2001).

Do danas dostupni podatci ne podržavaju rutinsku primjenu probiotika u prevenciji nozokomijalnih rotavirusnih proljeva u centrima za njegu djece (Thomas et al. 2010).

### **5.1.2. Liječenje**

Dobro provedena randomizirana klinička istraživanja su rezultirala dobrim podacima o terapijskoj koristi probiotika u djece s akutnim infektivnim proljevom.

Szymanski i suradnici (Thomas et al. 2010, prema Szymanski et al. 2006) su u randomiziranom, dvostruko slijepom istraživanju kontroliranom placebom pokazali da primjena LGG-a značajno skraćuje trajanje akutnog rotavirusnog proljeva, za prosječno 40 sati. Nije zabilježen utjecaj na trajanje proljeva duge etiologije. Primjena probiotika je također skratila vrijeme potrebno za intravensku rehidraciju za prosječno 18 sati.

Objavljeni rezultati nekoliko drugih meta- analiza (Thomas et al. 2010, prema Szajewska & Mrukowicz 2001; Van Niel et al. 2002; Hunag et al. 2002) i Cochrane pregleda (Thomas et al. 2010, prema Allen et al. 2004) također su ukazali na korist probiotika u liječenju akutnog infektivnog proljeva u djece. Ta izvješća pokazuju da probiotici smanjuju broj proljevastih stolica i trajanje samog proljeva za otprilike 1 dan. Učinak ovisi o vrsti, a najučinkovitijim se probiotikom do danas pokazao LGG. Njegov je učinak ovisan o dozi za doze veće od  $10^{10}$  CFU. Čini se da su probiotici učinkovitiji ako se primjene u početku proljeva. Od najveće su pomoći u inače zdrave djece s vodenastim proljevom uzrokovanim virusnim gastroenteritisom, dok to nije slučaj kod invazivnih bakterijskih infekcija.

Postoje dokazi koji podržavaju primjenu probiotika, naročito LGG-a, rano u tijeku akutnog infektivnog proljeva s ciljem skraćenja njegovog trajanja za 1 dan (Thomas et al. 2010).

## **5.2. Postantimikrobni proljev**

Postantimikrobni proljev je najčešća komplikacija upotrebe antimikrobika. Mogu ga uzrokovati gotovo svi antimikrobici. Njihovom primjenom oštećuje se zaštitni mehanizam kojeg čini normalna bakterijska flora te time omogućuje prodor enteropatogena (Breitenfeld et al. 2006).

### **5.2.1. Prevencija**

Meta- analiza objavljenih rezultata randomiziranih kliničkih istraživanja primjene probiotika u prevenciji postantimikrobnog proljeva u djece ukazuje na korist njihove primjene (Thomas et al. 2010, prema Szajewska et al. 2006; Corrêa et al. 2005; Hawrelak et al. 2005; D'Souza et al. 2002). U većini se ovih istraživanja započelo s primjenom probiotika kada je indicirana antibiotska terapija za liječenje akutne respiratorne infekcije, upale srednjeg uha. Najkorišteniji su bili LGG, *B lactis*, *S thermophilus* i *S boulardii*, a primjenjivani su zasebno ili kao dodatak dojenačkom mliječnom pripravku.

U usporedbi s placebo, primjena probiotika je smanjila rizik od razvoja postantimikrobnog proljeva s 28,5% na 11,9%. Otprilike 1 od 7 slučajeva postantimikrobnog proljeva spriječen je primjenom probiotika (Thomas et al. 2010, prema Szajewska et al. 2006).

Primjena LGG-a i nusprodukata *S boulardii* značajno je smanjila izgleda za postantimikrobni proljev u usporedbi s placebo. Značajnije razlike između ova dva sredstva nije bilo (Thomas et al. 2010, prema D'Soulza et al. 2002).

S obzirom na dostupne podatke, probiotici se mogu koristiti za smanjivanje incidencije postantimikrobnog proljeva (Thomas et al. 2010).



### **5.2.2. Liječenje**

Randomizirana klinička istraživanja učinka probiotika u liječenju postantimikrobnog proljeva u djece nisu objavljena. Stoga se njihova primjena u tu svrhu ne može preporučiti (Thomas et al. 2010).

### **5.3. Nekrotizirajući enterokolitis**

Formiranje probavne mikroflore u nedonoščadi je često zakašnjelo i nenormalno, moguće zbog ograničenog enteralnog hranjenja i česte upotrebe antibiotika (Thomas et al. 2010, prema Gewolb et al. 1999; Penders et al. 2006). Vjeruje se da su odgođeno enteralno hranjenje, česta upotreba antibiotika i promijenjeno formiranje probavne mikroflore primarni faktori koji pridonose povećanom riziku nekrotizirajućeg enterokolitisa u nedonoščadi (Thomas et al. 2010, prema Kliegman 2003; Cotten et al. 2009).

#### **5.3.1. Prevencija**

Cochrane pregled iz 2008. godine je na temelju 9 randomiziranih kliničkih istraživanja (Thomas et al. 2010, prema Bin-Nun et al. 2005; Costalos et al. 2003; Dani et al. 2002; Kitajima et al. 1997; Li et al. 2004; Lin et al. 2005; Manzoni et al. 2006; Millar et al. 1993; Reuman et al. 1986) ukazao na značajno smanjenje incidencije nekrotizirajućeg enterokolitisa i smrtnosti enteralnom primjenom probiotika (Thomas et al. 2010, prema Alfaleh & Bassler 2008). Nije zabilježeno značajnije smanjenje nozokomijalne sepse. U ovu je meta- analizu bilo uključeno 1425 djece s porođajnom masom manjom od 2500 grama i/ili rođene prije 37. tjedna gestacije. Sustavne infekcije ili ozbiljni štetni učinci izravno pripisani primijenjenim probioticima nisu zabilježeni. U navedenim je istraživanjima zaključeno da njihovi rezultati podupiru promjene u kliničkoj praksi u smjeru primjene probiotika u nedonoščadi s porođajnom masom većom od 1000 grama. Moguću korist i sigurnost primjene probiotika u nedonoščadi s porođajnom masom nižom od 1000 grama potrebno je još detaljno istražiti. S obzirom na velike razlike u istraživanjima uključenima u ovu meta- analizu koje uključuju različiti način primjene različitih probiotika (LGG, *Bifidobacterium breve*,

*Saccharomyces species* i mješavine *Bacteroides bifidus*, *S thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium infantis*) u različitim dozama, potrebno je oprezno interpretirati rezultate (Thomas et al. 2010).

U većem istraživanju Lina i suradnika 2008. godine (Thomas et al. 2010, prema Lin et al. 2008), čiji su rezultati objavljeni nakon Cochrane pregleda, ponovljeno je istraživanje iz 2005. godine (Thomas et al. 2010, prema Lin et al. 2005), ali koristeći drugačiju mješavinu probiotika, *L acidophilus* i *B bifidus*. Ukupna incidencija nekrotizirajućeg enterokolitisa i smrti bila je manja u istraživanju 2008. godine u usporedbi s prvim 2005. Istraživanje iz 2008. godine je otkrilo da probiotici nisu smanjili incidenciju sepse u usporedbi s rezultatima prvog istraživanja te da je u skupini koja je dobivala probiotik zabilježena njezina viša incidencija. U prvom je istraživanju bilo potrebno primijeniti probiotik u 27 djece da bi se spriječio nastanak 1 slučaja nekrotizirajućeg enterokolitisa, dok je taj broj u istraživanju 2008. godine bio 21.

Budući da svi probiotici još uvijek nisu istraženi, ne mogu se svi općenito preporučiti (Thomas et al. 2010).

## **5.4. Hiperbilirubinemija**

U prvom tjednu života 20 do 50% donošene novorođenčadi i više od 50% nedonoščadi ima vidljivu žuticu. Novorođenačka žutica je važna budući da u vrlo malog broja djece bilirubin u visokoj koncentraciji može prodrijeti iz plazme u bazalne ganglije i dovesti do kernikterusa i trajnih oštećenja. S druge strane, u gotovo svakog drugog novorođenčeta dolazi do benignog blagog i prolaznog porasta koncentracije bilirubina u plazmi (Mardešić 2003).

### **5.4.1. Liječenje**

Demirel i suradnici su na 179 djece gestacijske dobi manje ili jednake 32 tjedna i porođajne mase manje ili jednake 1500 grama istraživali utjecaj oralno primijenjenog *Saccharomyces boulardii* na tijek indirektna hiperbilirubinemije i trajanje liječenja. 81 je dijete jednom dnevno dobivalo 250 miligrama *S boulardii*, dok je 98 djece hranjeno bez dodatka probiotika. U skupini koja je

dobivala probiotik trajanje fototerapije je bilo kraće, a nepodnošenje hrane značajno manje nego u kontrolnoj skupini. Zaključeno je da je primjena *S. boulardii* u istraživanoj dozi kratkoročno sigurna i učinkovita u skraćenju trajanja fototerapije u djece vrlo male porođajne mase. Taj se učinak ostvaruje poboljšanjem tolerancije hrane i supresijom reapsorpcije bilirubina u enterohepatičku cirkulaciju (Demirel et al. 2013).

### **5.5. *Helicobacter pylori* infekcija**

Infekcija bakterijom *Helicobacter pylori* stječe se u djetinjstvu, vjerojatno je doživotna, uz pretpostavku izostanka liječenja i većinom asimptomatska uz čestu histološku sliku gastritisa (Kačić & Mardešić 2003).

#### **5.5.1. Liječenje**

Objavljeno je jedno randomizirano kliničko istraživanje primjene probiotika kao adjuvantne terapije za *H. pylori* gastritis u djece (Thomas et al. 2010, prema Sýkora et al. 2005). Rezultati su pokazali da je u skupini koja je primala probiotik eradikacija *H. pylori* bila veća (84,6%) nego u placebo skupini (57,7%). Nije bilo značajne razlike u štetnim učincima kao što su povraćanje, proljev i mučnina između obje skupine. Iako dostupni rezultati ukazuju na moguću korist probiotika u eradikaciji *H. pylori* u djece, potrebna su daljnja istraživanja (Thomas et al. 2010).

### **5.6. Kronične upalne bolesti crijeva**

U kronične upalne bolesti crijeva ubrajamo dvije različite, ali po brojnim značajkama slične bolesti, Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis. Uz utjecaj okolišnih čimbenika postoji i jasna obiteljska sklonost javljanja ovih bolesti. Važnu ulogu u održavanju patološkog procesa imaju autoimuni procesi (Kačić & Mardešić 2003).

U osoba s upalnim bolestima crijeva mikroorganizmi mikroflore crijeva pokreću imunološki odgovor koji vodi do kronične upale i bolesti (Boirivant &

Strober 2007). Pretpostavlja se da do toga dolazi u osoba s genetskom predispozicijom za upalne bolesti crijeva zbog raznih naslijeđenih defekata obrazaca imunološkog reagiranja. Jedan takav naslijeđeni defekt pronađen u pacijenata s Crohnovom bolesti je mutacija CARD15 gena na 16. kromosomu. Rezultat te mutacije je abnormalna kronična upala potaknuta bakterijama, kao što je *Escherichia coli* u probavnom traktu (Thomas et al. 2010, prema Weng & Walker 2006).

Smatra se da bi se upalni odgovor u pacijenata s upalnim bolestima crijeva mogao smanjiti modulacijom crijevne mikroflore probioticima (Thomas et al. 2010, prema Sartor 2004). Dosadašnja su istraživanja probiotika ukazala na njihovu sposobnost suprotstavljanja upali probavnog sustava djelovanjem na funkciju epitelnih stanica kao što su epitelna sekrecija citokina i funkcija epitela kao stanične prepreke te antibakterijskim učincima koje ostvaruju kolonizacijom epitelne površine. Također postoje dokazi da probiotici pobuđuju regulatorne T limfocite koji koče efektorske T stanice koje bi inače izazvale upalu (Boirivant & Strober 2007).

Procjenjuje se da otprilike 40% do 70% pedijatrijskih i odraslih pacijenata koji boluju od upalnih bolesti crijeva rutinski uzimaju alternativne lijekove, uključujući probiotike, kao adjuvantnu ili zamjensku terapiju prepisanu (Thomas et al. 2010, prema Day et al. 2004; Heuschkel et al. 2002; Sartor 2004).

### **5.6.1. Liječenje ulceroznog kolitisa**

Randomizirano kliničko istraživanje u kojem je 29 djece s novodijagnosticiranim ulceroznim kolitisom nasumičnim odabirom primalo VSL#3 ili placebo tijekom jedne godine pokazalo je obećavajuće rezultate (Thomas et al. 2010, prema Miele et al. 2009). VSL#3 korišten u ovom istraživanju je probiotička mješavina koja sadrži 8 različitih vrsta živih bakterija koje proizvode mliječnu kiselinu: *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*. Svi pacijenti u istraživanju su također dobivali standardnu indukcijsku terapiju kortikosteroidima u kombinaciji s mesalazinom kao

terapijom održavanja. Do remisije je došlo u 92,8% pacijenata u skupini koja je primala VSL#3 te u 36,4% onih u placebo skupini. Tijekom istraživanja je zabilježen relaps u 23% pacijenata u VSL#3 skupini i 73,3% pacijenata u placebo skupini.

Rezultati randomiziranih kliničkih istraživanja liječenja ulceroznog kolitisa probioticima u odraslih su također ohrabrujući (Thomas et al. 2010, prema Kruis et al. 1997; Rembacken et al. 1999; Kruis et al. 2004; Ishikawa et al. 2003). Cochrane pregled iz 2007. godine je ukazao na gotovo jednak učinak primjene probiotika u odraslih s blagim do umjerenim ulceroznim kolitisom i terapije protuupalnim lijekovima kao što je mesalazin (Thomas et al. 2010, prema Mallon et al. 2007). Jednaki su rezultati dobiveni kod pacijenata s upalom ileoanalnih džepova nakon terapijske kolektomije ulceroznog kolitisa. U većini je ovih istraživanja korištena probiotička mješavina VSL#3. Probiotik *E coli* Nissle 1917 je također pokazao uspjeh u liječenju ulceroznog kolitisa i njegovih postoperativnih komplikacija u odraslih (Thomas et al. 2010, prema Mimura et al. 2004).

Iako su rezultati obećavajući, potrebno je provesti više istraživanja na većem broju djece kako bi se potvrdila korist probiotika u liječenju djece s blagim do umjerenim ulceroznim kolitisom. Bez daljnjih potvrdnih rezultata ne može se općenito preporučiti liječenje ulceroznog kolitisa u djece probioticima (Thomas et al. 2010).

### **5.6.2. Liječenje Crohnove bolesti**

Randomizirano kliničko istraživanje u kojem je LGG korišten u pedijatrijskih pacijenata s Crohnovom bolesti nije pokazalo značajnu korist te terapije (Thomas et al. 2010, prema Bousvaros et al. 2005).

Također, liječenje odraslih pacijenata s Crohnovom bolesti probioticima *S boulardii*, LGG i *E coli* Nissle 1917 nije dosad dalo obećavajuće rezultate (Thomas et al. 2010, prema Schultz et al. 2004; Plein & Hotz 1993; Malchow 1997; Prantera et al. 2002). Cochrane pregled iz 2006. godine je pokazao da za sad nema dokazane učinkovitosti primjene probiotika u održavanju remisije Crohnove bolesti u odraslih (Thomas et al. 2010, prema Rolfe et al. 2006).

S obzirom na nedovoljnu učinkovitost, ne preporučuje se liječenje Crohnove bolesti probioticima u djece (Thomas et al. 2010).

### **5.7. Sindrom iritabilnog crijeva i opstipacija**

Sindrom iritabilnog crijeva je funkcionalni poremećaj probavnog sustava karakteriziran bolovima u abdomenu povezanim s defekacijom uz poremećaje defekacije i distenziju trbuha (Bilić & Jurčić 2008). Najčešće se javlja u mladih osoba i najčešće je dijagnosticirano stanje u probavnom traktu u ordinaciji obiteljske medicine.

U jedinom objavljenom randomiziranom kliničkom istraživanju liječenja sindroma iritabilnog crijeva u djece LGG je smanjio nelagodu i distenziju trbuha u skupini od 50 pedijatrijskih pacijenata tijekom 6 tjedana istraživanja (Thomas et al. 2010, prema Bausserman & Michail 2005). Temeljem ovog istraživanja postoji mogućnost koristi probiotika u liječenju djece sa sindromom iritabilnog crijeva, ali potrebna su daljnja potvrdna istraživanja prije njihove preporučene primjene (Thomas et al. 2010).

Otežano defeciranje suhe i tvrde stolice koja se izbacuje uz naprezanje, a često i bol te smanjen broj stolica značajke su opstipacije (Kačić & Mardešić 2003).

U randomiziranom kliničkom istraživanju LGG ili placebo su korišteni kao pomoćna terapija laktulozi u liječenju funkcionalne opstipacije kod 84 djece. LGG se nije pokazao kao učinkovita pomoć laktulozi (Thomas et al. 2010, prema Banaszkiwicz & Szajewska 2005). Trenutno se liječenje opstipacije u djece probioticima ne preporučuje (Thomas et al. 2010).

### **5.8. Dojenačke kolike**

Dojenačke kolike su široko rasprostranjeno kliničko stanje i frustrirajući problem roditelja i pedijataru. Karakterizira ih neutješan plač, nemir i razdražljivost inače zdravog djeteta tijekom prva 3 mjeseca života. Djeca s dojenačkim kolikama se prezentiraju pretjeranim i upornim plačem s najvećom

tendencijom javljanja u večernjim satima te progresijom simptoma od 6. tjedna starosti uz povlačenje nogu tijelu, napetost cijelog tijela, crvenilo lica i meteorizam. Dijagnoza se postavlja na temelju kliničke slike koja klasično zadovoljava 3 kriterija: neobjašnjive epizode paroksizmalnog plakanja više od 3 sata na dan, 3 dana u tjednu, tijekom najmanje 3 tjedna (Savino & Tarasco 2010, prema Wessel et al. 1954). Klinička prezentacija ovog stanja može biti raznolika, od blage do umjerene i teške. Prevalencija varira od 3% do 40% (Savino & Tarasco 2010, prema Lucassen et al. 2001), a u manje od 5% djece je moguće identificirati medicinski razlog u podlozi plakanja (Savino & Tarasco 2010, prema Heine 2008).

Iako sam naziv upućuje na gastrointestinalnu bolest, etiopatogeneza nije potpuno jasna te je pitanje liječenja još uvijek otvoreno (Savino & Tarasco 2010, prema Savino 2007). Postoji mogućnost neovisnih multifaktorskih utjecaja na pojavu kolika. Gupta je predložio teoriju utjecaja socijalnih, psiholoških i bioloških faktora kao što su alergija na hranu i poremećen motilitet crijeva pretpostavljajući da neka djeca imaju predispoziciju razvoja visceralne preosjetljivosti i hiperalgezije u prvim tjednima života (Savino & Tarasco 2010, prema Gupta 2007). U dijela je djece s teškim simptomima dojenačkih kolika opažena alergija na kravlje mlijeko. U takvih je pacijenata prvi terapijski pristup promjena prehrane (Savino & Tarasco 2010, prema Iacono et al. 2005). Rezultati istraživanja podupiru i koncept nenormalne crijevne mikroflore sa sniženom količinom laktobacila i povišenom koncentracijom koliformnih bakterija u djece s dojenačkim kolikama koja utječe na motoriku crijeva i proizvodnju plinova te moguću upalnu podlogu stanja (Savino & Tarasco 2010, prema Savino et al. 2009; Rhoads et al. 2009). Istraživanje provedeno na 89 djece u Finskoj ukazalo je na povezanost razvoja i sastava crijevne mikroflore s plakanjem i nemirom u ranom djetinjstvu. Zaključeno je da su *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* protektivni čimbenici protiv plakanja i nemira (Pärty et al. 2012).

Budući da dojenčad plačem iskazuje nelagodu iz različitih razloga, od benignih do životno ugrožavajućih (Savino & Tarasco 2010, prema Freedman et al. 2009), svu je dojenčad s kolikama potrebno temeljito pregledati kako bi se isključila stanja koja zahtijevaju daljnju obradu i liječenje.

Smatra se da je prirodan tijek dojenačkih kolika povoljan te da se simptomi uglavnom poboljšavaju do 3. mjeseca starosti. Hospitalizacija takvih pacijenata je nepotrebna i štetna te se ne bi trebala poticati (Savino & Tarasco 2010, prema Savino et al. 2007).

### 5.8.1. Liječenje

U randomiziranom kliničkom istraživanju 90 je dojene djece s problemom dojenačkih kolika nasumično primalo probiotik *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 ili simetikon tijekom 28 dana. Primjena *L reuteri* je smanjila dnevno trajanje plakanja povezanog s kolikama unutar 7 dana u usporedbi sa simetikonom. Majke su tijekom istraživanja iz svoje prehrane izbacile mliječne proizvode kako bi se smanjio mogući štetan utjecaj preosjetljivosti na proteine iz hrane. U skupini koja je primala *L reuteri* prosječno trajanje plakanja u danu smanjeno je za 50% u 95% djece, za razliku od 7% djece u skupini koja je primala simetikon. Autori istraživanja su predložili nekoliko teorija pozitivnog terapijskog učinka među kojima je i modulacija upalnog odgovora (Savino & Tarasco 2010, prema Savino et al 2007).

Dvostruko slijepo randomizirano kliničko istraživanje kontrolirano placebom (Savino & Tarasco 2010, prema Savino et al 2010) je potvrdilo učinkovitost probiotika *L reuteri* DSM 17938 u poboljšanju simptoma kolika u dojene djece. Pretpostavlja se da je taj učinak povezan s induciranim promjenama u crijevnoj mikrofliori, posebno onima vezanima uz bakteriju *Escherichia coli*.

Eksperimentalna istraživanja ukazuju na moguće mehanizme djelovanja *L reuteri* putem poboljšanja crijevene funkcije i motiliteta te izravnog učinka na visceralnu bol (Savino & Tarasco 2010, prema Kunze et al 2009). Zabilježeni su i učinci *L reuteri* na imunološki sustav u pogledu supresije pro- upalnih citokina i poticanja regulatornih T limfocita koji proizvode interleukin 10 i transformirajući faktor rasta beta (Savino & Tarasco 2010, prema Walter et al. 2010).

Rezultati ovih istraživanja pružaju važan uvid u ulogu promijenjene crijevene mikroflore u patogenezi dojenačkih kolika te potencijalnu učinkovitost probiotika u terapijskom pristupu (Savino & Tarasco 2010, prema Moore 2009).



Temeljem dostupnih informacija postoje pokazatelji učinkovitosti probiotika u liječenju dojenačkih kolika kod isključivo dojene djece. Međutim, potrebna su daljnja potvrdna istraživanja za preporuku njihove rutinske primjene u liječenju dojenačkih kolika u dojene i djece hranjene dojenačkim mliječnim pripravcima (Thomas et al. 2010).

## **5.9. Minimalna hepatička encefalopatija**

Hepatička encefalopatija je reverzibilni sindrom karakteriziran poremećenom funkcijom mozga kod pacijenata s uznapredovalom bolesti jetre. Klinički se može prezentirati metaboličkom encefalopatijom, atrofijom mozga, edemom mozga ili kombinacijom navedenih stanja. Ovi patofiziološki procesi dovode do poremećaja prokrvljenosti mozga i neurotransmeterske funkcije koji mogu rezultirati stanjem duboke kome (Rustemović 2011). Prvi simptomi su minimalno poremećeno stanje svijesti i motoričkih funkcija. U dojenčadi jedini simptom može biti pojačana podražljivost, a u veće djece lepršavi tremor ruku. Pojava tahipneje uglavnom označava progresiju, a u zadnjem stadiju često nastupa i respiratorna insuficijencija (Kačić & Mardešić 2003).

### **5.9.1. Liječenje**

U dvostruko slijepom randomiziranom kliničkom istraživanju 55 pacijenata s minimalnom hepatičkom encefalopatijom i cirozom jetre je nasumično dobivalo Cocktail 2000, bioaktivna vlakna ili placebo tijekom 30 dana. Cocktail 2000 je mješavina probiotika s bakterijama *Pediococcus pentococcus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus paracasei* i *Lactobacillus plantarum* i 10 grama bioaktivnih vlakana beta glukana, inulina, pektina i škroba u jednakim količinama. Ispitanici su imali značajno promijenjenu crijevnu mikrofloru s prerastom potencijalno patogenih *E coli* i vrsta roda *Staphylococcus* u stolici. Terapija Cocktail-om 2000 je smanjila sadržaj ovih bakterijskih vrsta, a povećala sadržaj bakterija roda *Lactobacillus* u stolici. U skupini koja je primala Cocktail 2000 također je zabilježeno značajno sniženje koncentracije amonijaka u krvi, smanjenje endotoksemije, poboljšanje

Child- Turcotte- Pugh rezultata u otprilike 50% slučajeva te reverzija minimalne hepatičke encefalopatije u 50% pacijenata u usporedbi s 13% u skupini koja je primala placebo. Primjena samih bioaktivnih vlakana rezultirala je poboljšanjem u otprilike polovice pacijenata. Rezultati ovog istraživanja doveli su do zaključka da je liječenje minimalne hepatičke encefalopatije u pacijenata s cirozom jetre probioticima s bioaktivnim vlaknima ili samo bioaktivnim vlaknima alternativa inače primjenjivanoj laktulozi (Liu et al. 2004). Potrebno je još istražiti učinak ove terapije u pedijatrijskih pacijenata prije eventualne preporučene primjene.

## **5.10. Hiperkolesterolemija**

Povišene koncentracije određenih lipida u krvi glavni su uzrok kardiovaskularnih bolesti te drugih invaliditeta u razvijenim zemljama. Povišena koncentracija lipoproteina niske gustoće (LDL, prema engl. *Low density lipoprotein*) i lipoproteina srednje gustoće (IDL, prema engl. *Intermediate density lipoprotein*), kao i snižena koncentracija lipoproteina visoke gustoće (HDL, prema engl. *High density lipoprotein*) rizični su faktori za ubrzan razvoj ateroskleroze i zbog toga rane bolesti krvnih žila, posebno koronarne bolesti (Barić 2003).

### **5.10.1. Liječenje**

Iako su za liječenje hiperkolesterolemije dostupne razne farmakološke tvari, njihovo djelovanje često nije zadovoljavajuće, skupe su i mogu imati neželjene učinke. Prehrambene strategije za prevenciju kardiovaskularnih bolesti podržavaju prehranu s malim udjelom masti. Iako je takva prehrana u eksperimentalnim uvjetima bez sumnje učinkovito sredstvo u smanjivanju koncentracije kolesterola u krvi, čini se da nije dovoljno učinkovita. Razlog tome je loša suradljivost koja je posljedica slabijeg prihvaćanja hrane drugačijih okusa (Kumar et al. 2012).

S obzirom na navedene probleme istaknula se potreba za pronalaskom drugih prehrambenih proizvoda koji snižavaju koncentraciju kolesterola u krvi. Dodatak fermentiranih mliječnih proizvoda s bakterijama koje proizvode

mliječnu kiselinu prehrani je pokazao potencijal snižavanja razine kolesterola u krvi. Brojna izvješća ukazuju na hipokolesterolemički učinak probiotika i njihovu sposobnost uklanjanja kolesterola. Pokazano je da oralna primjena probiotika rezultira sniženjem razina kolesterola za čak 22 do 33% (Kumar et al. 2012, prema De Smet et al. 1998; Pereira & Gibson 2002). U miševa s hiperkolesterolemijom zbog prehrane bogate mastima primjena *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 smanjila je ukupni kolesterol za 38%. Zabilježeno je i smanjenje razine triglicerida za 40% te povećanje omjera HDL- a prema LDL- u za 20% (Taranto et al. 2000). Ovi učinci probiotika mogu biti djelomično pripisani aktivnosti enzima hidrolaze žučnih soli. Dekonjugirane žučne soli se teže reapsorbiraju od konjugiranih što rezultira izlučivanjem većih količina slobodnih žučnih soli stolicom. Također, apsorpcija lipida u crijevu pomoću slobodnih žučnih soli nije učinkovita kao pomoću njihovih konjugiranih oblika. Stoga bi dekonjugacija žučnih soli mogla dovesti do smanjenja koncentracije kolesterola u serumu povećavajući potrebe za kolesterolom za de novo sintezu žučnih soli radi nadomještanja njihova gubitka stolicom ili smanjujući topljivost i posljedično apsorpciju kolesterola u crijevu. Međutim, točan mehanizam hipokolesterolemičke aktivnosti probiotika nije potpuno jasan. Ostali predloženi mehanizmi su asimilacija kolesterola tijekom bakterijskog rasta, vezanje kolesterola za bakterijsku staničnu površinu, uključivanje kolesterola u sastav bakterijske stanične membrane, koprecipitacija kolesterola dekonjugiranom žuči te proizvodnja kratko- lančanih masnih kiselina (Kumar et al. 2012, prema Liong & Shah 2005). Neki od navedenih mehanizama ovise o vrsti probiotika te iz toga proizlazi njihova raznolikost (Kumar et al. 2012).

Budući da brojne komercijalne vrste probiotika imaju visoku BSH aktivnost, potrebna su daljnja istraživanja koja će odgovoriti na pitanje koristi ili štete te aktivnosti u čovjeka. Prije preporučene primjene probiotika u svrhu snižavanja koncentracije kolesterola u krvi u djece i odraslih potrebno je daljnje razjašnjavanje njihovih mehanizama djelovanja (Kumar et al. 2012).

## 5.11. Atopijske bolesti

U nekim okolnostima bezopasne tvari i molekule mogu potaknuti imunološki odgovor koji može dovesti do oštećenja tkiva i smrti. Takav pretjerani i neprikladni odgovor dovodi do atopijskih bolesti. Sklonost razvitku atopijskog odgovora jako je nasljedna (Peakman 2012). Neki od primjera atopijskih bolesti su astma, ekcem i alergijski rinitis.

Slijed crijevne kolonizacije u novorođenčadi i male djece važan je u razvoju imunološkog odgovora (Thomas et al. 2010, prema Weng & Walker 2006). Prehrana djeteta i stjecanje komenzalne bakterijske crijevne populacije zajedno s genetskom predispozicijom utječu na sposobnost imunološkog sustava da prepozna i razlikuje vlastito od stranog te na tip upalnih odgovora koji će se ostvarivati kasnije u životu. Humoralni imunološki odgovor je opći obrazac reagiranja u ranom djetinjstvu. Smatra se da bi rizik za razvoj atopijskih bolesti mogao biti rezultat izostale ili zakašnjele konačne promjene dominantno humoralnog obrasca imunološkog odgovora u balansirani stanično- humoralni tip (Thomas et al. 2010, prema Neaville et al. 2003).

### 5.11.1. Prevencija

Primjena probiotika tijekom razvoja prirodne endogene populacije crijevnih bakterija koje proizvode mliječnu kiselinu bi teoretski mogla utjecati na imunološki razvoj u smjeru balansiranog stanično- humoralnog odgovora (Thomas et al. 2010, prema Majamaa & Isolauri 1997). Pokazano je da se crijevna mikroflora djece s atopijama razlikuje od mikroflore djece bez atopija. Djeca s atopijama imaju veći broj bakterija roda *Clostridium*, a manji broj bakterija roda *Bifidobacterium* nego djeca bez atopija (Thomas et al. 2010, prema Björkstén et al. 1999; Kalliomäki et al. 2001). Ova saznanja podupiru primjenu probiotika u djece s rizikom od atopijskih bolesti, posebno one hranjene dojenačkim mliječnim pripravcima (Thomas et al. 2010).

U dvostruko slijepom, randomiziranom kliničkom istraživanju 159 je žena primalo LGG ili placebo tijekom zadnjih 4 tjedna trudnoće. Postupak je nastavljen kod djeteta i majke dojilje tijekom 6 mjeseci nakon poroda ako je kod djeteta postojao visoki rizik razvoja atopijskih bolesti (Thomas et al. 2010,

prema Kalliomäki et al. 2003). Praćen je razvoj kroničnog rekurirajućeg atopijskog ekcema u djece. Do 2. godine života atopijski ekcem je dijagnosticiran u 23% djece u skupini koja je dobivala LGG, a u placebo skupini u njih 46%. Da bi se spriječio jedan slučaj kroničnog rekurirajućeg atopijskog ekcema bilo je potrebno primijeniti LGG kod 4,5 parova majki i djece. Do 4. godine života ekcem se razvio kod 26% djece u LGG skupini te kod 46% u placebo skupini. Ovi rezultati podržavaju primjenu probiotika u majki u kasnoj trudnoći te majki dojilja i djece 6 mjeseci nakon poroda u svrhu prevencije atopijskog ekcema u djece s rizikom razvoja atopijskih bolesti.

Međutim, prema pregledu Koppa i Salfelda ovi rezultati nisu potvrđeni u daljnjim kliničkim istraživanjima (Thomas et al. 2010, prema Kopp & Salfeld 2009). Mogući uzroci različitih rezultata su genetski faktori domaćina, okolišni čimbenici kao što su geografski utjecaji i prehrana te različite vrste i doze probiotika korišteni u istraživanjima (Thomas et al. 2010, prema Prescott & Björksténa 2007; Penders & Stobberingh 2007).

Prema zaključku pregleda Prescottta i Björksténa (Thomas et al. 2010, prema Prescott & Björksténa 2007) i Cochrane pregledu iz 2007. godine (Thomas et al. 2010, prema Osborn & Sinn 2007), unatoč ohrabrujućim rezultatima nekih istraživanja ne postoji dovoljno dokaza koji opravdavaju rutinsku primjenu probiotika u trudnica ili djece u svrhu prevencije atopijskih bolesti u djetinjstvu.

### **5.11.2. Liječenje**

U randomiziranom kliničkom istraživanju je 53 australske djece s umjerenim do jakim atopijskim dermatitisom primalo *Lactobacillus fermentum* ili placebo tijekom 8 tjedana. Nakon 16 tjedana zabilježeno je poboljšanje opsega i težine bolesti u značajno više djece koja su primala probiotik u usporedbi s onom koja su primala placebo (Thomas et al. 2010, prema Weston et al. 2005; Viljanen et al. 2005).

Iako su ovi rezultati ohrabrujući, prema Cochrane pregledu iz 2008. godine (Thomas et al. 2010, prema Boyle et al. 2008) još uvijek nije dokazana učinkovitost probiotika u liječenju ekcema.

## **5.12. Ekstraintestinalne infekcije**

### **5.12.1. Prevencija**

2001. godine u randomiziranom kliničkom istraživanju u 17 finskih centara za njegu djece 571 je zdravo dijete između 1 i 6 godina starosti nasumično tijekom 7 mjeseci 3 puta dnevno dobivalo mlijeko s ili bez LGG- a (Thomas et al. 2010, prema Hatakka et al. 2001). Nakon usklađivanja podataka prema dobi, djeca hranjena mlijekom s LGG-om nisu imala značajno manje dana sa simptomima respiratornog sustava ili odsustva iz vrtića zbog bolesti u usporedbi s djecom u kontrolnoj skupini. Također nije bilo značajnih razlika u broju djece s dijagnosticiranom infekcijom ili broju prepisanih antibiotika. S obzirom na objavljene rezultate, trenutno se ne preporučuje primjena probiotika u prevenciji ekstraintestinalnih infekcija u djece (Thomas et al. 2010).

### **5.12.2. Liječenje**

Randomizirana klinička istraživanja u djece nisu ukazala na koristan učinak primjene probiotika u liječenju ekstraintestinalnih infekcija te se njihova primjena u tu svrhu ne preporučuje (Thomas et al. 2010).

## **5.13. Rak**

Rezultati objavljenih istraživanja su pokazali pozitivne učinke primjene probiotika u prevenciji kancerogenih procesa na životinjskim modelima (Thomas et al. 2010, prema Burns & Rowland 2000). Do sada objavljena randomizirana klinička istraživanja ne opravdavaju preporuku rutinske primjene probiotika u svrhu prevencije ili liječenja raka u djece ili odraslih (Thomas et al. 2010).

## 6. SIGURNOST PROBIOTIKA U DJECE

Postoji zabrinutost u vezi cjelokupne sigurnosti primjene probiotičkih proizvoda u visokorizičnih pacijenata. Rizični su teško i kronično bolesni pacijenti, uključujući one imunokompromitirane, bolesnu nedonoščad i djecu s intravenskim kateterima ili ostalim medicinskim aparatima.

Zabilježeni su i prijavljeni slučajevi ozbiljnih infekcija i sepse u odraslih i djece koja su dobivala probiotike (Thomas et al. 2010, prema Boyle et al. 2006; Kunz et al. 2004; Thompson et al. 2001; Broughton et al. 1983; Perapoch et al. 2000; Salminen et al. 2004; Kalima et al. 1996; Soleman et al. 2003; Salminen et al. 2002; Land et al. 2005). Izgledno je da je u većini slučajeva uzročnik sepse proizašao iz bakterija pacijentove endogene flore. Land i suradnici su izvijestili o sepsi uzrokovanoj LGG-om koji je primjenjivan kao dodatak prehrani u imunokompromitiranog djeteta starog 6 tjedana (Thomas et al. 2010, prema Land et al. 2005). Molekularni DNA- fingerprinting je potvrdio da je bakterijski izolat tog djeteta LGG. Prijavljeni su i slučajevi novorođenačke sepse i meningitisa očigledno povezani s primjenom probiotika (Thomas et al. 2010, prema Kunz et al. 2004; Broughton et al. 1983).

Saavedra i suradnici su proučavali toleranciju i sigurnost probiotika u zdrave djece rođene u terminu koja su nasumično dobivala dojenačke mliječne pripravke s visokom dozom probiotika, niskom dozom probiotika ili bez probiotika tijekom 18 mjeseci (Thomas et al. 2010, prema Saavedra et al. 2004). Nisu prijavljene vidljive nuspojave. U sve je djece zabilježen normalan rast. U skupinama koje su dobivale probiotik prijavljeno je značajno manje slučajeva kolika te je učestalost posjeta liječniku i upotrebe antibiotika također bila manja u usporedbi sa skupinom koja je dobivala kontrolni pripravak bez probiotika.

Istraživanje Petschowa i suradnika (Thomas et al. 2010, prema Petschow et al. 2005) je pokazalo da je primjena dojenačkih mliječnih pripravaka s različitim količinama LGG- a u zdrave terminski rođene djece tijekom 2 tjedna rezultirala zadovoljavajućom ukupnom tolerancijom hranjenja i uspješnom kolonizacijom probavnog sustava, bez štetnih učinaka.

Odbor za prehranu Europskog društva za dječju gastroenterologiju, hepatologiju i prehranu zaključio je da su za utvrđivanje sigurnosti i učinkovitosti probiotika u djece potrebna daljnja istraživanja. S obzirom na dostupne podatke probiotici se čine sigurni za zdravu djecu. Odbor je također istaknuo potrebu za centraliziranim mehanizmom nadzora kojim bi se osigurala sigurnost, istovjetnost i genetička stabilnost probiotičkih mikroorganizama (Thomas et al. 2010, prema Agostoni et al. 2004). Isti je princip nadzora preporučen u izvješću Svjetske zdravstvene organizacije (Thomas et al. 2010, prema Food and Agriculture Organization of the United Nations & World Health Organization 2001, 2002; European Food Safety Authority 2004). Dok se ne razjasne sva sigurnosna pitanja primjene probiotika, ne preporučuje se njihova primjena u teško i kronično bolesne djece (Thomas et al. 2010).

Trenutno postoje dva dojenačka mliječna pripravka koja sadrže probiotik. Jedan sadrži *B lactis*, a drugi LGG. Ovi su probiotici dodani samo dojenačkim mliječnim pripravcima u prahu. Cjelokupan koristan učinak dodatka probiotika dojenačkim mliječnim pripravcima na zdravlje mora se istražiti u velikim randomiziranim kliničkim istraživanjima (Thomas et al. 2010).



## 7. RASPRAVA

Upotreba probiotika je danas vrlo proširena, od velikog broja potrošača do širokog spektra indikacija. Značajan dio potrošača čine djeca i pedijatrijski pacijenti sa svim svojim osobitostima. Najčešće indikacije za njihovu primjenu su različita stanja i bolesti probavnog sustava. Primjena probiotika u pedijatrijskoj populaciji predstavlja izazov kako pedijatrima, tako i roditeljima izloženima brojnim informacijama o njihovom potencijalno korisnom djelovanju na zdravlje djece. U slobodnoj je prodaji, bez liječničkog recepta, u Hrvatskoj moguće kupiti preko 20 različitih probiotičkih pripravaka namijenjenih djeci za različite indikacije. Budući da još uvijek ne postoje kliničke smjernice za njihovu primjenu, prirodno je zapitati se kolika je uistinu njihova učinkovitost i koje su opravdane indikacije za njihovu primjenu. Navedene činjenice potaknule su me na pisanje diplomskog rada o ulozi probiotika u bolestima probavnog sustava u djece.

Temeljem dostupne literature moguće je zaključiti da postoji nesrazmjer između uobičajene široke primjene probiotika u prevenciji i liječenju različitih bolesti i stanja u djece i dokaza koji potvrđuju njihovu učinkovitost u toj primjeni te je opravdavaju. Probiotici, iako definirani kao tvari koje sadrže žive mikroorganizme s potencijalnim pozitivnim djelovanjem na zdravlje, ne bi trebali biti nerazborito korišteni, bez čvrstih dokaza njihove učinkovitosti i na njima temeljenih preporuka. Iako postoje brojni preliminarni rezultati istraživanja koji podupiru primjenu probiotika u svrhu liječenja ili prevencije različitih kliničkih entiteta u pedijatrijskih pacijenata, potrebna su brojna daljnja istraživanja prije njihove opravdane i preporučene rutinske primjene.

Brojna istraživanja primjene probiotika u djece često se međusobno razlikuju u korištenim vrstama i dozama probiotika, trajanju same primjene te rezultatima. Tehničke razlike tih istraživanja uvelike otežavaju identifikaciju prave podloge ponekad potpuno oprečnih rezultata i njihovo razumijevanje te time utvrđivanje kliničkih smjernica za primjenu probiotika u djece.

Osim uloge probiotika u prevenciji i liječenju različitih bolesti u djece i pedijatrijskih pacijenata, nedovoljno je odgovoreno pitanje njihove sigurnosti. Imunokompromitirana, teško i kronično bolesna djeca čine posebnu skupinu u koje je primjena probiotika vrlo diskutabilna i zahtjeva vrlo stroge i detaljne sigurnosne smjernice.

Veliko pitanje također predstavljaju posljedice i dugoročni učinci primjene probiotika na zdravlje djeteta, a potom i odraslog čovjeka. Za sada ne postoji niti jedno istraživanje koje prati djecu kroz dovoljno dugi period i koje bi moglo odgovoriti na ovo pitanje. Dodatan problem u utvrđivanju dugoročnih učinaka probiotika predstavlja gubitak kontakta s pacijentima radi bilo kojeg razloga tijekom njihovog formalnog pedijatrijskog razdoblja ili radi prelaska iz pedijatrijske u domenu ostalih liječničkih specijalnosti zbog dobne granice. Zbog navedenih je poteškoća, kao i zbog nepotpunog nadzora nad primjenom probiotika radi njihove slobodne dostupnosti, vrlo otežano kvalitetno praćenje pacijenata i provedba bilo kakvog dugoročnog istraživanja. Također je teško odrediti do kada je potrebno pratiti pacijente i u kojem je trenutku moguće zaključiti da posljedica uzimanja probiotika nema. Budući da su brojna stanja i bolesti danas multifaktorski uvjetovani, teško je utvrditi njihovu neposrednu povezanost s primjenom probiotika.

S obzirom na potrebu za daljnjim istraživanjima koja će utvrditi i definirati ulogu i sigurnost probiotika u pedijatrijskih pacijenata te na temelju čijih će rezultata biti moguće uspostaviti kliničke smjernice za njihovu primjenu, potencijalno rješenje trenutno vrlo raširene i upitno opravdane primjene probiotika svoje temelje može imati u ograničenju njihove distribucije i slobodne dostupnosti.

## 8. ZAKLJUČAK

Uravnotežena crijevna mikroflora svojim brojnim učincima pozitivno utječe na zdravlje čovjeka. U slučaju narušavanja njene ravnoteže dolazi do razvoja raznih bolesti i stanja. Probiotici sadrže žive mikroorganizme u količini dovoljnoj za promjenu crijevne mikroflore i pozitivne učinke na zdravlje domaćina. Zbog tih su karakteristika potaknuli interes za svojom primjenom u prevenciji i liječenju različitih kliničkih stanja i bolesti, naročito onih probavnog sustava, u odraslih i u djece.

Provedena su brojna istraživanja uloge probiotika u prevenciji i liječenju različitih stanja i bolesti u djece i pedijatrijskih pacijenata.

Postoje dokazi koji podupiru primjenu probiotika rano u tijeku proljeva u akutnom virusnom gastroenteritisu kod inače zdrave djece u svrhu skraćenja njegova trajanja za jedan dan. Međutim, dostupni dokazi ne podupiru rutinsku primjenu probiotika u prevenciji infektivnog proljeva.

Rezultati nekih istraživanja podupiru primjenu probiotika u prevenciji postantimikrobnog proljeva u djece, ali ne i u njegovom liječenju.

Primjena probiotika u prevenciji nekrotizirajućeg enterokolitisa u nedonoščadi s porođajnom masom većom od 1000 grama također ima potporu u rezultatima istraživanja. Međutim, pitanja vrste i doze probiotika koje je potrebno primijeniti u toj indikaciji još uvijek nisu razjašnjena.

Rezultati istraživanja pokazuju da je učinkovito i kratkoročno sigurno primijeniti probiotike u djece vrlo male porođajne mase s indirektnom hiperbilirubinemijom s ciljem skraćenja trajanja fototerapije.

Postoji mogućnost koristi liječenja *H pylori* infekcije, ulceroznog kolitisa, dojenačkih kolika i sindroma iritabilnog crijeva u djetinjstvu probioticima, ali potrebna su daljnja istraživanja prije njihove rutinske primjene u tu svrhu.

Potrebno je provesti još istraživanja koristi primjene probiotika u liječenju Crohnove bolesti i opstipacije te liječenju i prevenciji ekstraintestinalnih infekcija. Stoga se njihova primjena u tu svrhu u djece ne može preporučiti.

Istraživanje primjene probiotika u liječenju minimalne hepatičke encefalopatije u pacijenata s cirozom jetre dovelo je do zaključka da su probiotici s bioaktivnim vlaknima ili sama bioaktivna vlakna alternativa inače primjenjivanoj laktulozi. Potrebno je još istražiti učinak ove terapije u pedijatrijskih pacijenata prije preporučene primjene.

Brojna istraživanja ukazuju na hipokolesterolemički učinak probiotika. Prije preporuke primjene probiotika u svrhu snižavanja koncentracije kolesterola u krvi u djece i odraslih potrebno je razjasniti njihove mehanizme djelovanja.

Iako rezultati nekih istraživanja podupiru profilaktičku primjenu probiotika tijekom trudnoće i dojenja u majki te tijekom prvih 6 mjeseci života u djece s povećanim rizikom od atopijskih bolesti, potrebni su daljnji potvrdni rezultati prije preporuke njihove rutinske primjene. Još uvijek nije dokazana učinkovitost probiotika u liječenju ekcema u djece, unatoč ohrabrujućim rezultatima.

Dugoročna korist probiotika u prevenciji i liječenju raka te pozitivan učinak na razvoj imunološkog sustava nakon ranog djetinjstva još se moraju dokazati.

Ne preporučuje se primjena probiotika u teško ili kronično bolesne djece dok se ne utvrde sve sigurnosne smjernice.

Iako nije zabilježena štetnost dodavanja probiotika u dojenačke mliječne pripravke u prahu u zdrave djece, ne može se rutinski preporučiti zbog nedostatka dokaza kliničke učinkovitosti. Niti jedno istraživanje nije izravno usporedilo učinke dojenja i prehrane dojenačkim mliječnim pripravcima s dodatkom probiotika na zdravlje djeteta.

Potrebno je još detaljno istražiti ulogu probiotika u različitim kliničkim stanjima i bolestima te odgovoriti na pitanja optimalnih vrsta i doza probiotika, trajanja primjene, sigurnosti i dugoročnih učinaka na crijevnu mikrofloru i cjelokupno zdravlje djece prije utvrđivanja kliničkih smjernica za njihovu primjenu. Budući da pristup svakom pacijentu treba biti individualiziran, uz dogovorene smjernice u obzir se moraju uzeti osobitosti svakog pojedinca s ciljem optimalnog preventivnog ili terapijskog djelovanja.

## 9. ZAHVALE

Zahvaljujem se svojem mentoru, prof.dr.sc. Jurici Vukoviću, koji je svojom stručnošću, savjetima, pozitivnim stajalištem i vedrim duhom uvelike pomogao u stvaranju ovog diplomskog rada.

Također se zahvaljujem svojim prijateljima i kolegama koji su sa strpljenjem slušali sve moje nedoumice i pomagali u sagledavanju ove teme iz drugog kuta.

Posebno se zahvaljujem svojoj mami i cijeloj obitelji koji su moj oslonac i kormilo u životu, vjeruju u mene i nepogrešivo znaju kada mi je potreban vjetar u leđa.

## 10. LITERATURA

Agostoni C, Axelsson I, Braegger C, Goulet O, Koletzko B, Michaelsen KF, Rigo J, Shamir R, Szajewska H, Turck D, Weaver LT; ESPGHAN Committee on Nutrition (2004) Probiotic bacteria in dietetic products for infants: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 38:365–374.

Alfaleh K, Bassler D (2008) Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* (1):CD005496.

Allen SJ, Okoko B, Martinez E, Gregorio G, Dans LF (2004) Probiotics for treating infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev* (2):CD003048.

Banaszkiewicz A, Szajewska H (2005) Ineffectiveness of *Lactobacillus GG* as an adjunct to lactulose for the treatment of constipation in children: a double-blind, placebo-controlled randomized trial. *J Pediatr* 146:364–369.

Barić I (2003) Nasljedne metaboličke bolesti. U: Mardešić D. *Pedijatrija*. 7. izd. Zagreb: Školska knjiga; str. 129-192.

Bausserman M, Michail S (2005) The use of *Lactobacillus GG* in irritable bowel syndrome in children: a double-blind randomized control trial. *J Pediatr* 147:197–201.

Berg RD (1999) Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol* 473:11–30.

Bilić A, Jurčić D (2008) Sindrom iritabilnog crijeva. U: Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B. *Interna medicina*. 4. izd. Zagreb: Naklada Ljevak; str. 759-761.

Bin-Nun A, Bromiker R, Wilschanski M, Kaplan M, Rudensky B, Caplan M, Hammerman C (2005) Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. *J Pediatr* 147:192–196.

Björkstén B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M (1999) The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy* 29:342–346.

Boirivan M, Strober W (2007) The mechanism of action of probiotics. *Curr Opin Gastroenterol* 23:679-692.

Bousvaros A, Guandalini S, Baldassano RN, Botelho C, Evans J, Ferry GD, Goldin B, Hartigan L, Kugathasan S, Levy J, Murray KF, Oliva-Hemker M, Rosh JR, Tolia V, Zholudev A, Vanderhoof JA, Hibberd PL (2005) A randomized, double-blind trial of *Lactobacillus* GG versus placebo in addition to standard maintenance therapy for children with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 11:833–839.

Boyle RJ, Bath-Hextall FJ, Leonardi-Bee J, Murrell DF, Tang ML (2008) Probiotics for treating eczema. *Cochrane Database Syst Rev* (4):CD006135.

Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang ML (2006) Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *Am J Clin Nutr* 83:1256–1264.

Breitenfeld V, Beus A, Desnica B (2006) Gastrointestinalne infekcije i otrovanja hranom. U: Begovac J, Božinović D, Lisić M, Baršić B, Schönwald S. *Infektologija*. Zagreb: Profil international; str. 277-300.

Broughton RA, Gruber WC, Haffar AA, Baker CJ (1983) Neonatal meningitis due to *Lactobacillus*. *Pediatr Infect Dis* 2:382–384.

Burns AJ, Rowland IR (2000) Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Curr Issues Intest Microbiol* 1:13–24.

Commane DM, Shortt CT, Silvi S, Cresci A, Hughes RM, Rowland IR (2005) Effects of fermentation products of pro- and prebiotics on trans-epithelial electrical resistance in an in vitro model of the colon. *Nutr Cancer* 51:102–109.

Corrêa NB, Péret Filho LA, Penna FJ, Lima FM, Nicoli JR (2005) A randomized formula controlled trial of *Bifidobacterium lactis* and *Streptococcus thermophilus* for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants. *J Clin Gastroenterol* 39:385–389.

Costalos C, Skouteri V, Gounaris A, Sevastiadou S, Triandafilidou A, Ekonomidou C, Kontaxaki F, Petrochilou V (2003) Enteral feeding of premature infants with *Saccharomyces boulardii*. *Early Hum Dev* 74:89–96.

Cotten CM, Taylor S, Stoll B, Goldberg RN, Hansen NI, Sánchez PJ, Ambalavanan N, Benjamin DK Jr; NICHD Neonatal Research Network (2009) Prolonged duration of initial empirical antibiotic treatment is associated with increased rates of necrotizing enterocolitis and death for extremely low birth weight infants. *Pediatrics* 123:58–66.

Council for Agricultural Science and Technology (2007) Probiotics: Their Potential to Impact Human Health. [http://www.cast-science.org/publications/?probiotics\\_their\\_potential\\_to\\_impact\\_human\\_health&show=product&productID=2930](http://www.cast-science.org/publications/?probiotics_their_potential_to_impact_human_health&show=product&productID=2930). Accessed 7 April 2015

Dani C, Biadaioli R, Bertini G, Martelli E, Rubaltelli FF (2002) Probiotics feeding in prevention of urinary tract infection, bacterial sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants: a prospective double-blind study. *Biol Neonate* 82:103–108.

Day AS, Whitten KE, Bohane TD (2004) Use of complementary and alternative medicines by children and adolescents with inflammatory bowel disease. *J Paediatr Child Health* 40:681–684.



De Smet I, De Boever P, Verstraete W (1998) Cholesterol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity. *Br J Nutr* 79:185–194.

Demirel G, Celik IH, Erdeve O, Dilmen U (2013) Impact of probiotics on the course of indirect hyperbilirubinemia and phototherapy duration in very low birth weight infants. *J Matern Fetal Neonatal Med* 26:215-218.

D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt CJ (2002) Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *BMJ* 324:136.

European Food Safety Authority (2004) Microorganisms in food and feed: qualified presumption of safety-QPS. <http://www.efsa.europa.eu/en/events/event/colloque041213.htm>. Accessed 7 April 2015

Falony G, Vlachou A, Verbrugghe K, De Vuyst L (2006) Cross-feeding between *Bifidobacterium longum* BB536 and acetate-converting, butyrate-producing colon bacteria during growth on oligofructose. *Appl Environ Microbiol* 72:7835–7841.

Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization (2001) Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>. Accessed 7 April 2015

Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization (2002) Guidelines for the evaluation of probiotics in food: joint FAO/WHO Working Group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. Accessed 7 April 2015

Freedman SB, Al-Harthy N, Thull-Freedman J (2009) The crying infant: diagnostic testing and frequency of serious underlying disease. *Pediatrics* 123:841–848.

Gewolb IH, Schwalbe RS, Taciak VL, Harrison TS, Panigrahi P (1999) Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 80:F167–173.

Gupta SK (2007) Update on infantile colic and management options. *Curr Opin Investig Drugs* 8:921–926.

Hatakka K, Savilahti E, Pönkä A, Meurman JH, Poussa T, Näse L, Saxelin M, Korpela R (2001) Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *BMJ* 322:1327.

Hawrelak JA, Whitten DL, Myers SP (2005) Is *Lactobacillus rhamnosus* GG effective in preventing the onset of antibiotic-associated diarrhoea: a systematic review. *Digestion* 72:51–56.

Heine RG (2008) Allergic gastrointestinal motility disorders in infancy and early childhood. *Pediatr Allergy Immunol* 19:383–391.

Heller F, Duchmann R (2003) Intestinal flora and mucosal immune responses. *Int J Med Microbiol* 293:77–86.

Heuschkel R, Afzal N, Wuerth A, Zurakowski D, Leichtner A, Kemper K, Tolia V, Bousvaros A (2002) Complementary medicine use in children and young adults with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 97:382–388.

<http://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/10929/Sto-su-probiotici.html>.

Accessed 7 April 2015

<http://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/20876/Utjecaj-ciroze-jetre-na-mozak.html>. Accessed 27 April 2015

Huang JS, Bousvaros A, Lee JW, Diaz A, Davidson EJ (2002) Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children: a meta-analysis. *Dig Dis Sci* 47:2625–2634.

Iacono G, Merolla R, D'Amico D, Bonci E, Cavataio F, Di Prima L, Scalici C, Indinnimeo L, Aversa MR, Carroccio A; Paediatric Study Group on Gastrointestinal Symptoms in Infancy (2005) Gastrointestinal symptoms in infancy: a population-based prospective study. *Dig Liver Dis* 37:432–438.

Ishikawa H, Akedo I, Umesaki Y, Tanaka R, Imaoka A, Otani T (2003) Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria-fermented milk on ulcerative colitis. *J Am Coll Nutr* 22:56–63.

Kačić M, Mardešić D (2003) Bolesti probavnog sustava. U: Mardešić D. *Pedijatrija*. 7. izd. Zagreb: Školska knjiga; str. 815-874.

Kalima P, Masterton RG, Roddie PH, Thomas AE (1996) *Lactobacillus rhamnosus* infection in a child following bone marrow transplant. *J Infect* 32:165–167.

Kalliomäki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E (2001) Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol* 107:129–134.

Kalliomäki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E (2003) Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 361:1869–1871.

Kitajima H, Sumida Y, Tanaka R, Yuki N, Takayama H, Fujimura M (1997) Early administration of *Bifidobacterium breve* to preterm infants: randomised controlled trial. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 76:F101–F107.

Kliegman RM (2003) The relationship of neonatal feeding practices and the pathogenesis and prevention of necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* 111:671–672.

Kopp MV, Salfeld P (2009) Probiotics and prevention of allergic disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12:298–303.

Kruis W, Frick P, Pokrotnieks J, Lukás M, Fixa B, Kascák M, Kamm MA, Weismueller J, Beglinger C, Stolte M, Wolff C, Schulze J (2004) Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 53:1617–1623.

Kruis W, Schutz E, Frick P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M (1997) Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 11:853–858.

Kumar M, Nagpal R, Kumar R, Hemalatha R, Verma V, Kumar A, Chakraborty C, Singh B, Marotta F, Jain S, Yadav H (2012) Cholesterol-Lowering Probiotics as Potential Biotherapeutics for Metabolic Diseases. *Exp Diabetes Res* doi:10.1155/2012/902917

Kunz AN, Noel JM, Fairchok MP (2004) Two cases of *Lactobacillus* bacteremia during probiotic treatment of short gut syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 38:457–458.

Kunze WA, Mao YK, Wang B, Huizinga JD, Ma X, Forsythe P, Bienenstock J (2009) *Lactobacillus reuteri* enhances excitability of colonic AH neurons by inhibiting calcium dependent potassium channel opening. *J Cell Mol Med* 13:2261–2270.

Land MH, Rouster-Stevens K, Woods CR, Cannon ML, Cnota J, Shetty AK (2005) *Lactobacillus sepsis* associated with probiotic therapy. *Pediatrics* 115:178–181.

Li Y, Shimizu T, Hosaka A, Kaneko N, Ohtsuka Y, Yamashiro Y (2004) Effects of *Bifidobacterium breve* supplementation on intestinal flora of low birth weight infants. *Pediatr Int* 46:509–515.

Lin HC, Hsu CH, Chen HL, Chung MY, Hsu JF, Lien RI, Tsao LY, Chen CH, Su BH (2008) Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight preterm infants: a multicenter, randomized, controlled trial. *Pediatrics* 122:693–700.

Lin HC, Su BH, Chen AC, Lin TW, Tsai CH, Yeh TF, Oh W (2005) Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* 115:1–4.

Liong MT, Shah NP (2005) Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains. *International Dairy Journal* 15:391–398.

Liu Q, Duan ZP, Ha DK, Bengmark S, Kurtovic J, Riordan SM (2004) Synbiotic modulation of gut flora: Effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Hepatology* 39:1441–1449.

Lucassen PL, Assendelft WJ, van Eijk JT, Gubbels J, Douwes A, van Geldrop WJ (2001) Systematic review of the occurrence of infantile colic in the community. *Arch Dis Child* 84:398–403.

Majamaa H, Isolauri E (1997) Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 99:179–185.

Malchow HA (1997) Crohn's disease and *Escherichia coli*: a new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? *J Clin Gastroenterol* 25:653–658.

Mallon P, McKay D, Kirk S, Gardiner K (2007) Probiotics for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* (4):CD005573.

Manzoni P, Mostert M, Leonessa ML, Priolo C, Farina D, Monetti C, Latino MA, Gomirato G (2006) Oral supplementation with *Lactobacillus casei* subspecies *rhamnosus* prevents enteric colonization by *Candida* species in preterm neonates: a randomized study. *Clin Infect Dis* 42:1735–1742.

Mardešić D (2003) Novorođenče. U: Mardešić D. *Pedijatrija*. 7. izd. Zagreb: Školska knjiga; str. 303-394.

Matsuzaki T, Takagi A, Ikemura H, Matsuguchi T, Yokokura T (2007) Intestinal microflora: probiotics and autoimmunity. *J Nutr* 137:798S–802S.

Miele E, Pascarella F, Giannetti E, Quaglietta L, Baldassano RN, Staiano A (2009) Effect of a probiotic preparation (VSL#3) on induction and maintenance of remission in children with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 104:437–443.

Millar MR, Bacon C, Smith SL, Walker V, Hall MA (1993) Enteral feeding of premature infants with *Lactobacillus GG*. *Arch Dis Child* 69:483–487.

Mimura T, Rizzello F, Helwig U, Poggioli G, Schreiber S, Talbot IC, Nicholls RJ, Gionchetti P, Campieri M, Kamm MA (2004) Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut* 53:108–114.

Moore DJ (2009) Inflaming the debate on infant colic. *J Pediatr* 155:772–773.

Neaville WA, Tisler C, Bhattacharya A, Anklam K, Gilbertson-White S, Hamilton R, Adler K, Dasilva DF, Roberg KA, Carlson-Dakes KT, Anderson E, Yoshihara D, Gangnon R, Mikus LD, Rosenthal LA, Gern JE, Lemanske RF Jr (2003) Developmental cytokine response profiles and the clinical and immunologic expression of atopy during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* 112:740–746.

Nollet LJA, Pereira DI, Verstraete W (1999) Effect of a Probiotic Bile Salt Hydrolytic *Lactobacillus reuteri* on the Human Gastrointestinal Microbiota as Simulated in the SHIME Reactor System. *Microb Ecol Health Dis* 11:13–2.

Oberhelman RA, Gilman RH, Sheen P, Taylor DN, Black RE, Cabrera L, Lescano AG, Meza R, Madico G (1999) A placebo-controlled trial of *Lactobacillus GG* to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children. *J Pediatr* 134:15–20.

Osborn DA, Sinn JK (2007) Probiotics in infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity. *Cochrane Database Syst Rev* (4):CD006475.

Pärty A, Kalliomäki M, Endo A, Salminen S, Isolauri E (2012) Compositional Development of Bifidobacterium and Lactobacillus Microbiota Is Linked with Crying and Fussing in Early Infancy. *PLoS ONE* doi: 10.1371/journal.pone.0032495

Peakman M (2012) The immune system and disease. U: Kumar P, Clark M (Ur.) Clinical Medicine. 8<sup>th</sup> ed. Edinburgh: Elsevier Saunders; str. 49-72.

Pedone CA, Arnaud CC, Postaire ER, Bouley CF, Reinert P (2000) Multicentric study of the effect of milk fermented by *Lactobacillus casei* on the incidence of diarrhoea. *Int J Clin Pract* 54:568–571.

Penders J, Stobberingh EE, van den Brandt PA, Thijs C (2007) The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy* 62:1223–1236.

Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, van den Brandt PA, Stobberingh EE (2006) Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118:511–521.

Perapoch J, Planes AM, Querol A, López V, Martínez-Bendayán I, Tormo R, Fernández F, Peguero G, Salcedo S (2000) Fungemia with *Saccharomyces cerevisiae* in two newborns, only one of whom had been treated with ultra-levura. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19:468–470.

Pereira DI, Gibson GR (2002) Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37:259-281.

Petschow BW, Figueroa R, Harris CL, Beck LB, Ziegler E, Goldin B (2005) Effects of feeding an infant formula containing *Lactobacillus GG* on the colonization of the intestine: a dose-response study in healthy infants. *J Clin Gastroenterol* 39:786–790.

Pietzak M (2004) Bacterial colonization of the neonatal gut. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 38:389–391.



Plein K, Hotz J (1993) Therapeutic effects of *Saccharomyces boulardii* on mild residual symptoms in a stable phase of Crohn's disease with special respect to chronic diarrhea: a pilot study. *Z Gastroenterol* 31:129–134.

Prantera C, Scribano ML, Falasco G, Andreoli A, Luzi C (2002) Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with *Lactobacillus GG*. *Gut* 51:405–409.

Prescott SL, Björkstén B (2007) Probiotics for the prevention or treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 120:255–262.

Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT (1999) Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 354:635–639.

Reuman PD, Duckworth DH, Smith KL, Kagan R, Bucciarelli RL, Ayoub EM (1986) Lack of effect of *Lactobacillus* on gastrointestinal bacterial colonization in premature infants. *Pediatr Infect Dis* 5:663–668.

Rhoads JM, Fatheree NY, Norori J, Liu Y, Lucke JF, Tyson JE, Ferris MJ (2009) Altered fecal microflora and increased fecal calprotectin in infants with colic. *J Pediatr* 155:823–828.

Rolfe VE, Fortun PJ, Hawkey CJ, Bath-Hextall F (2006) Probiotics for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* (4):CD004826.

Saavedra JM, Abi-Hanna A, Moore N, Yolken RH (2004) Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. *Am J Clin Nutr* 79:261–267.

Salminen MK, Rautelin H, Tynkkynen S, Poussa T, Saxelin M, Valtonen V, Järvinen A (2004) Lactobacillus bacteremia, clinical significance, and patient outcome, with special focus on probiotic L. rhamnosus GG. Clin Infect Dis 38:62–69.

Salminen MK, Tynkkynen S, Rautelin H, Saxelin M, Vaara M, Ruutu P, Sarna S, Valtonen V, Järvinen A (2002) Lactobacillus bacteremia during a rapid increase in probiotic use of Lactobacillus rhamnosus GG in Finland. Clin Infect Dis 35:1155–1160.

Sartor RB (2004) Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. Gastroenterology 126:1620–1633.

Savino F (2007) Focus on infantile colic. Acta Paediatr 96:1259–1264.

Savino F, Cordisco L, Tarasco V, Calabrese R, Palumeri E, Matteuzzi D (2009) Molecular identification of coliform bacteria from colicky breastfed infants. Acta Paediatr 98:1582–1588.

Savino F, Cordisco L, Tarasco V, Palumeri E, Calabrese R, Oggero R, Roos S, Matteuzzi D (2010) Lactobacillus reuteri DSM 17938 in infantile colic: a randomised double blind, placebo controlled trial. Pediatrics 126:e526–e533.

Savino F, Pelle E, Castagno E, Palumeri E, Oggero R (2007) Must infants with colic really be hospitalized? Acta Paediatr 96:1109.

Savino F, Pelle E, Palumeri E, Oggero R, Miniero R (2007) Lactobacillus reuteri (American type culture collection strain 55730) versus simethicone in the treatment of infantile colic: a prospective randomized study. Pediatrics 119:124–130.

Savino F, Tarasco V (2010) New treatment for infant colic. *Curr Opin Pediatr* 22:791-797.

Schultz M, Timmer A, Herfarth HH, Sartor RB, Vanderhoof JA, Rath HC (2004) Lactobacillus GG in inducing and maintaining remission of Crohn's disease. *BMC Gastroenterol* 4:5.

Soleman N, Laferl H, Kneifel W, Tucek G, Budschedl E, Weber H, Pichler H, Mayer HK (2003) How safe is safe? A case of Lactobacillus paracasei ssp. paracasei endocarditis and discussion of the safety of lactic acid bacteria. *Scand J Infect Dis* 35:759–762.

Sýkora J, Valecková K, Amlerová J, Siala K, Dedek P, Watkins S, Varvarovská J, Stozický F, Pazdiora P, Schwarz J (2005) Effects of a specially designed fermented milk product containing probiotic Lactobacillus casei DN-114 001 and the eradication of H. pylori in children: a prospective randomized double-blind study. *J Clin Gastroenterol* 39:692–698.

Szajewska H, Kotowska M, Mrukowicz JZ, Armanska M, Mikolajczyk W (2001) Efficacy of Lactobacillus GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *J Pediatr* 138:361–365.

Szajewska H, Mrukowicz JZ (2001) Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 33:S17–S25.

Szajewska H, Ruszczynski M, Radzikowski A (2006) Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Pediatr* 149:367–372.

Szymański H, Pejcz J, Jawień M, Chmielarczyk A, Strus M, Heczko PB (2006) Treatment of acute infectious diarrhoea in infants and children with a mixture of three *Lactobacillus rhamnosus* strains: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 23:247–253.

Tannock G (2003) The intestinal microflora. U: Fuller R, Perdigon G (Ur.) *Gut Flora, Nutrition, Immunity and Health*. Oxford, England: Blackwell Press; str. 1–23.

Taranto MP, Medici M, Perdigon G, Ruiz Holgado AP, Valdez GF (2000) Effect of *Lactobacillus reuteri* on the prevention of hypercholesterolemia in mice. *J Dairy Sci* 83:401-403.

Thibault H, Aubert-Jacquin C, Goulet O (2004) Effects of long-term consumption of a fermented infant formula (with *Bifidobacterium breve* c50 and *Streptococcus thermophilus* 065) on acute diarrhea in healthy infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 39:147–152.

Thomas DW, Greer FR; American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition; American Academy of Pediatrics Section on Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (2010) Probiotics and prebiotics in pediatrics. *Pediatrics* 126:1217-1231.

Thompson C, McCarter YS, Krause PJ, Herson VC (2001) *Lactobacillus acidophilus* sepsis in a neonate. *J Perinatol* 21:258–260.

Van Niel CW, Feudtner C, Garrison MM, Christakis DA (2002) *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics* 109:678–684.

Viljanen M, Savilahti E, Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela R, Poussa T, Tuure T, Kuitunen M (2005) Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. *Allergy* 60:494–500.

Walter J, Britton RA, Roos S (2011) Host-microbial symbiosis in the vertebrate gastrointestinal tract and the *Lactobacillus reuteri* paradigm. *Proc Natl Acad Sci U S A* doi: 10.1073/pnas.1000099107

Weizman Z, Asli G, Alsheikh A (2005) Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents. *Pediatrics* 115:5–9.

Weng M, Walker W (2006) Bacterial colonization, probiotics, and clinical disease. *J Pediatr* 149:S107–S114.

Wessel MA, Cobb JC, Jackson EB, Harris GS Jr, Detwiler AC (1954) Paroxysmal fussing in infancy, sometimes called 'colic'. *Pediatrics* 14:421- 435.

Weston S, Halbert A, Richmond P, Prescott SL (2005) Effects of probiotics on atopic dermatitis: a randomised controlled trial. *Arch Dis Child* 90:892–897.

Yoshioka H, Iseki K, Fujita K (1983) Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics* 72:317–321.

Yuan Q, Walker WA (2004) Innate immunity of the gut: mucosal defense in health and disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 38:463–473.

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 19. 05. 1991. u Zagrebu. Nakon završene Osnovne škole Kreativni razvoj i XV. gimnazije u Zagrebu, 2009. godine sam upisala Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Dobitnica sam Dekanove nagrade za uspjeh u akademskoj godini 2010./2011. kao najbolja studentica druge godine. Trenutno sam studentica 6. godine i prosjek ocjena mi je 4,82. Tijekom studija sam bila demonstrator iz kliničke propedeutike na Katedri za internu medicinu i pedijatrije na Katedri za pedijatriju. Tečno govorim engleski i njemački jezik, a odlično se služim talijanskim i španjolskim jezikom. Dobro poznajem rad na računalu. Moja područja interesa su pedijatrija, ginekologija i opstetricija te neurologija.