

Modeliranje utjecaja različitih koncentracija glutena na aktivaciju imunoodgovora kod celijakije

Remenar, Sandra

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:544502>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported / Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerađivanja 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2020.

Sandra Remenar, 1185/N

**MODELIRANJE UTJECAJA
RAZLIČITIH KONCENTRACIJA
GLUTENA NA AKTIVACIJU
IMUNOODGOVORA KOD
CELIJAKIJE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za mjerenje, regulaciju i automatizaciju, na Zavodu za procesno inženjstvo Prehrambeno-bioteknološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ane Jurinjak Tušek.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc Ani Jurinjak Tušek na pruženoj pomoći pri izradi i pisanju diplomskog rada i pruženom znanju.

Veliko hvala mojim kolegicama Anji, Dodo i Tei na svim lijepim trenucima koje smo proživjele tijekom ovih 6 godina i koje su obogatile moj život novim prijateljstvima.

Najveće hvala mojoj obitelji mami Ivančici, tati Ivanu i seki Ivoni na razumijevanju, pruženoj ljubavi i podršci bez kojih ne bi bila osoba kakva sam danas. Posebno hvala Riji koja je jedina bila uz mene (spavajući) tijekom učenja za svaki ispit kao i pisanja ovog rada.

Hvala i mom Ivanu koji je bio uz mene u najtežim trenucima i koji me je ohrabrivao, gurao dalje svojom vjerom i ljubavi.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za procesno inženjerstvo
Laboratorij za mjerenje, regulaciju i automatizaciju

Diplomski rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

MODELIRANJE UTJECAJA RAZLIČITIH KONCENTRACIJA GLUTENA NA AKTIVACIJU IMUNOODGOVORA KOD CELIJAKIJE

Sandra Remenar, 1185/N

Sažetak: Celijakija je postala ozbiljan javnozdravstveni problem koji sa sobom nosi brojne popratne bolesti. Prehrana bez glutena trenutno je jedini lijek u borbi protiv te bolesti. U ovome radu proveden je dizajn i simulacije modela imunološkog odgovora kod celijakije u programskom paketu CellDesigner. Ispitan je utjecaj različitih početnih koncentracija glutena nakon čega se pratila koncentracija metabolita, odnosno jačina imunoodgovora. Početne koncentracije određene su na temelju osmišljenih jelovnika za opću populaciju i za osobe oboljele od celijakije. Određeni su ključni kinetički parametri modela analizom globalne i lokalne osjetljivosti. Matematičko modeliranje pokazalo se vrlo korisnim u razumijevanju složenih metaboličkih procesa unutar stanica.

Ključne riječi: celijakija, CellDesigner, imunoodgovor, modeliranje

Rad sadrži: 51 stranica, 5 tablice, 19 slika, 47 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *doc.dr.sc. Ana Jurinjak Tušek*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. *Jasenka Gajdoš Kljusurić*
2. Doc.dr.sc. *Ana Jurinjak Tušek*
3. Doc.dr.sc. *Maja Benković*
4. Izv.prof.dr.sc. *Irena Keser (zamjena)*

Datum obrane: 16. srpnja 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology

Graduation Thesis

Department of Process Engineering
Laboratory for Measurement, Regulation and Automatisation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

MODELING THE INFLUENCE OF DIFFERENT GLUTEN CONCENTRATIONS ON IMMUNORESPONSE ACTIVATION IN CELIAC DISEASE

Sandra Remenar, 1185/N

Abstract: Celiac disease has become a serious public health problem that carries with it a number of comorbidities. A gluten-free diet is currently the only cure for this disease. In this paper, the design and simulations of the immune response model in celiac disease in the CellDesigner software package were performed. The influence of different initial gluten concentrations was examined, after which the concentration of metabolites, and the strength of the immune response was monitored. Initial concentrations were determined on the basis of designed menus for the general population and for people with celiac disease. Key kinetic parameters of the model were determined by global and local sensitivity analysis. Mathematical modeling has proven to be very useful in understanding complex metabolic processes within cells.

Key words: Celiac disease, CellDesigner, immune response, modeling

Paper contains: 51 pages, 5 tables, 19 figures, 47 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *PhD. Ana Jurinjak Tušek, Assistant professor*

Reviewers:

1. PhD. *Jasenka Gajdoš Kljusurić*, Full professor
2. PhD. *Ana Jurinjak Tušek*, Assistant professor
3. PhD. *Maja Benković* Assistant professor
4. PhD. *Irena Keser* Associate professor (substitute)

Thesis defended: 16th July 2020.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. CELIJAKIJA	2
2.1.1. Dijagnoza	3
2.1.2. Metabolizam bolesti	5
2.2. PREHRANA KOD CELIJAKIJE	7
2.2.1. Preporuke	8
2.2.2. Nutritivni deficiti bezglutenske prehrane	11
2.3. MODELIRANJE NA RAZINI STANICE U NUTRICIONIZMU	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJALI	14
3.1.1. CellDesigner 4.4.2	14
3.1.2. Model imunološkog odgovora na celijakiju	17
3.1.3. Prehrambene preporuke korištene za planiranje jelovnika	23
3.2. METODE	23
3.2.1. Konstrukcija i simulacija modela za različite početne uvjete	23
3.2.2. Analiza ključnih parametara modela primjenom metode lokalne osjetljivosti parametara	23
3.2.3. Analiza globalne osjetljivosti parametara FAST metodom	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. PRIKAZ MODELA IMUNOLOŠKOG ODGOVORA NA CELIJAKIJU U PROGRAMU CELLDESIGNER 4.4.2	26
4.2. PRIKAZ GLUTENSKOG I BEZGLUTENSKOG JELOVNIKA	27
4.3. SIMULACIJA MODELA IMUNOLOŠKOG ODGOVORA NA CELIJAKIJU U PROGRAMSKOM PAKETU CELLDESIGNER	29
4.4. ANALIZA LOKALNE OSJETLJIVOSTI MODELA IMUNOLOŠKOG ODGOVORA KOD CELIJAKIJE	35
4.5. ANALIZA GLOBALNE OSJETLJIVOSTI PARAMETARA FAST METODOM MODELA IMUNOLOŠKOG ODGOVORA KOD CELIJAKIJE	41
5. ZAKLJUČCI	46
6. LITERATURA	47

1. UVOD

Celijakija je autoimuni poremećaj karakteriziran oštećenjem crijevnih resica i upalama sluznice tankog crijeva. Iz dana u dan raste broj novih pacijenata kako odraslih tako i djece. Liječenje celijakije oslanja se na prehranu bez glutena koja se pokazala kao trenutno najučinkovitija u kliničkom i histološkom oporavku. Kod osoba koje posjeduju halotipove HLA-DQ8 ili HLA-DQ2 dolazi do interakcije peptida glutena s halotipovima što uzrokuje aktivaciju urođenog i adaptivnog imunološkog odgovora. Genetski predisponirane osobe nemaju sposobnost probave velike količine unesenog glutena (Shannahan i Leffler, 2017).

Matematičko modeliranje pronašlo je svoju primjenu i u nutricionizmu. Pošto hrana predstavlja složen sustav mikronutrijenata i makronutrijenata potrebno je razumjeti ulogu svakog od njih zasebno, ali i u kombinacijama odnosno različitim interakcijama. Matematičko modeliranje koristi se za prikaz složenih biokemijskih sustava u pojednostavljenom obliku. Omogućava predviđanje staničnih događaja, otkrivanje potencijalnih lijekova, testiranje različitih hipoteza donesenih na temelju eksperimentalnih rezultata.

U ovome radu biti će provedena analiza modela imunološkog odgovora kod celijakije s obzirom na različite početne koncentracije glutena. Koncentracije glutena određivat će se na temelju osmišljenih jelovnika za opću populaciju i za osobe oboljele od celijakije. Također, definirat će se ključne točke matematičkog modela imunološkog odgovora kod celijakije analizom globalne i lokalne osjetljivosti.

TEORIJSKI DIO

1.1.CELIJAKIJA

Celijakija je kronična gastrointestinalna bolest s prevalencijom od 1-3 %. Podjednako se pojavljuje kod djece i odraslih. Iako češće obolijevaju žene, općenito je rasprostranjenost veća u područjima s velikom konzumacijom glutenskih proizvoda. Primarno zahvaća tanko crijevo na način da ono gubi resice te postaje ravno i glatko zbog čega se smanjuje apsorpcija hranjivih tvari (Woods-Avena i sur., 2018). Glavni uzročnik oštećenja je proteinska frakcija gluten kojeg nalazimo u pšenici, raži, ječmu i zobi. Glijadin i glutenin su glavni proteini glutena pšenice te su zajedno sa sekalinom iz raži, hordeinom iz ječma i aveninom iz zobi poznati pod nazivom gluten (Biesiekierski, 2017).

Svega 20 % ljudi ima potvrđenu dijagnozu celijakije zbog nepostojanja točnih kliničkih karakteristika. Manji broj pacijenata ima klasične simptome poput malapsorpcije, dijareje, steatoreje, gubitka težine i ograničenja rasta kod djece. S druge strane zabilježen je velik broj slučajeva s neklasičnim gastrointestinalnim simptomima, bez jasnih znakova malapsorpcije ili naizgled nepovezanih simptoma. Najčešće su to bolovi u trbuhu ili zatvor, kronični umor, migrena, smanjena koštana masa i lomovi kostiju. Također postoje slučajevi i bez simptoma, poznato pod nazivom tiha celijakija. U tom slučaju pacijenti se ne žale ni na kakve simptome, ali unatoč tome i kod njih dolazi do vilusne atrofije tankog crijeva (Oxentenko i Rubio-Tapia, 2019). Odrasli često imaju simptome poput sindroma iritabilnog crijeva zbog čega dolazi do pogrešne dijagnoze. Poremećaji povezani s celijakijom, uslijed vilusne atrofije, su anemija s nedostatkom željeza, limfom, artritis i metabolička bolest kostiju. Mogu se razviti neurološke bolesti koje uključuju glavobolju, ataksiju, depresiju, distimiju, tjeskobu i epilepsiju. Isto tako mogu se razviti autoimune bolesti poput dijabetesa tipa 1 i bolest štitnjače, ali dokazano je kako se rizik od navedenog povećava s trajanjem izloženosti glutenu (Shannahan i Leffler, 2017).

1.1.1. Dijagnoza

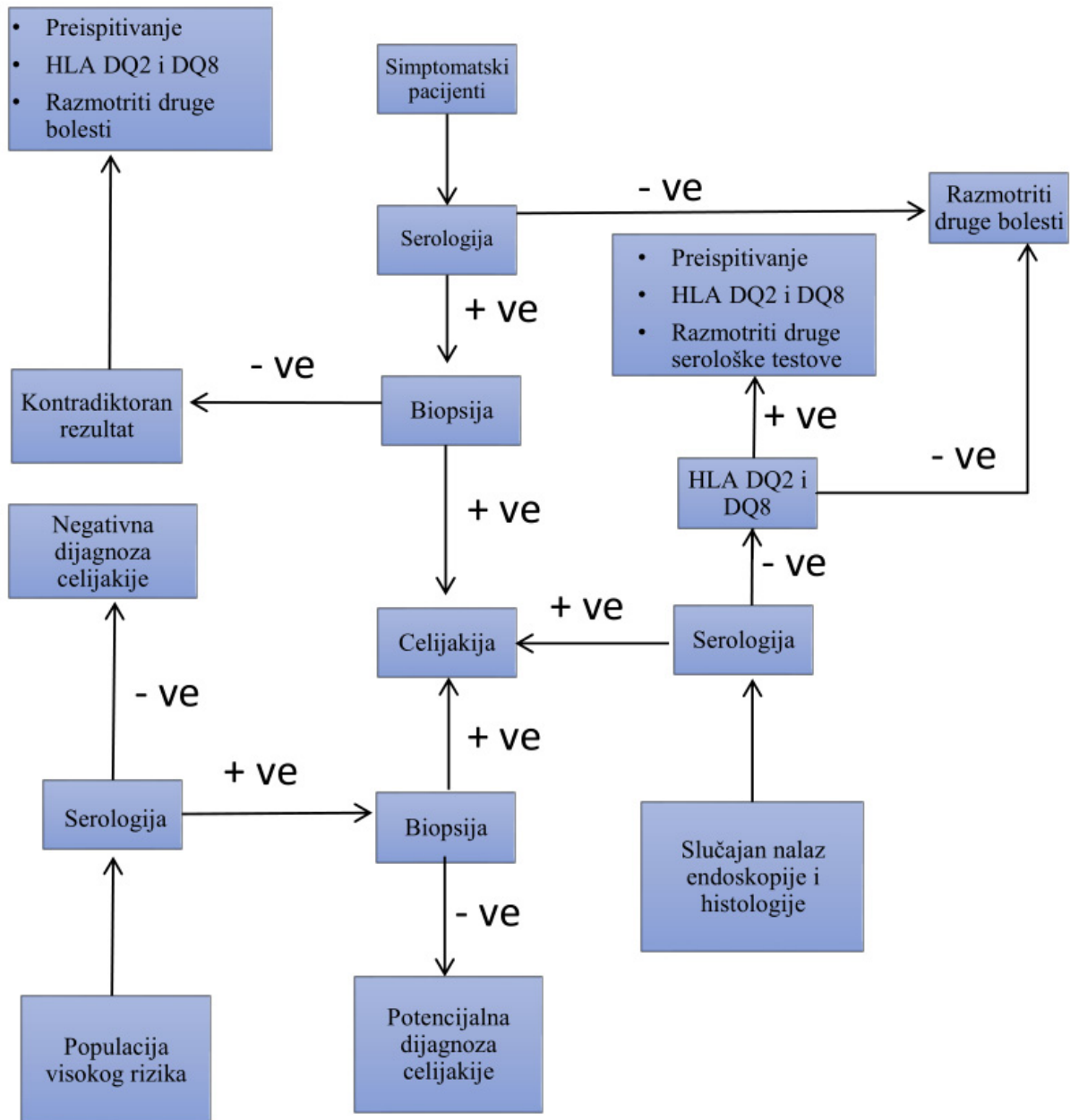
Rubio-Tapia i sur. (2013) su na temelju različitih simptoma pacijenata, od onih koji su imali crijevne simptome do onih koji nisu imali nikakvih simptoma, odredili koje osobe je potrebno testirati na celijakiju.

Potrebno je testirati:

1. Pacijente sa simptomima, znakovima ili laboratorijskim dokazima koji ukazuju na malapsorpciju, kao što su: dijareja s gubitkom težine, steatoreja, postprandijalna bol u trbuhu i natečenost.
2. Pacijenti koji imaju u obitelji osobu koja ima potvrđenu dijagnozu celijakije te uz to pokazuju simptome, znakove ili laboratorijski dokaz za celijakiju
3. Osobe koje u svojoj obitelji imaju osobu s potvrđenom dijagnozom celijakije dok one same nemaju simptoma
4. Osobe s povišenom razinom aminotransferaze u serumu ukoliko nije pronađen uzrok navedenom
5. Pacijenti s autoimunim bolestima poput dijabetesa tipa 1 koji imaju simptome, znakove ili laboratorijske dokaze koji upućuju na celijakiju

Potvrda dijagnoze rezultat je kombinacije anamneze, fizikalnog pregleda, serologije i biopsije tankog crijeva (slika 1). Nakon anamneze i fizikalnog pregleda slijedi provođenje seroloških testova koji se temelje na mjerenju specifičnih antitijela. Mjere se antitijela transglutaminaze IgA (anti-tTG), glijadinska peptidna antitijela (anti-DGP), endomizijska IgA antitijela (EMA) odnosno antiglijadinska antitijela (AGA). Navedeni AGA testovi imaju prednost pred drugim testovima zbog niske osjetljivosti i specifičnosti. Ukoliko serološki testovi budu pozitivni potrebno je potvrditi dijagnozu histopatologijom biopsije tankog crijeva koja je i dalje zlatni standard (Popp i sur., 2019). Potrebno je napraviti minimalno četiri biopsije kako bi se mogla postaviti točnija dijagnoza. Najčešće se radi iz proksimalnog djela tankog crijeva i dvanaesnika jer oko 13 % pacijenata ima celijakiju lokaliziranu samo na ovom području. Nažalost i tada može doći do pogrešne dijagnoze ukoliko je vilusna atrofija prisutna u neispitanom djelu tankog crijeva. Povećani intraepitelni limfociti, kripto hiperplazija i vilusna atrofija rezultati su dobiveni biopsijom kod osoba s celijakijom. Često se povećani intraepitelni limfociti i vilusna atrofija

pojavljaju i kod osoba s Chronovom bolesti ili *Helicobacter pylori* infekcijom zbog čega je važno slijediti prikazanu sliku 1. (Shannahan i Leffler, 2017).



Slika 1. Pojednostavljena shema pristupa u dijagnozi celijakije (Shannahan i Leffler, 2017)

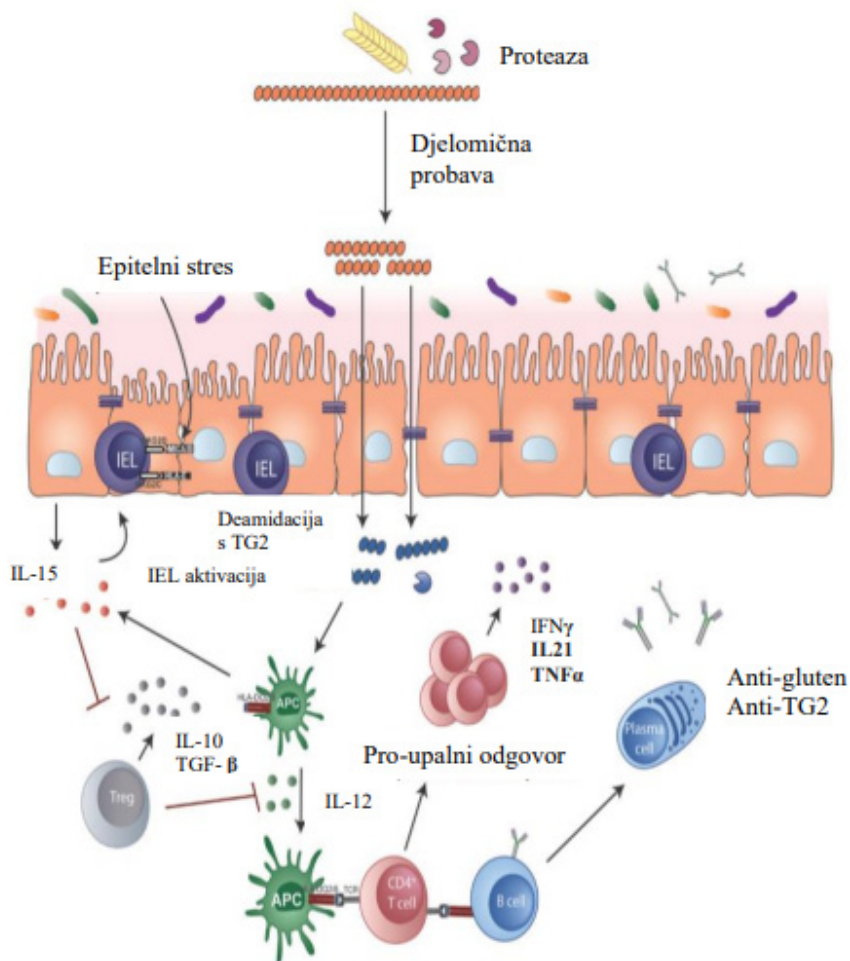
Mali broj pacijenata s celijakijom ima negativne rezultate na serološkim testiranjima. Ukoliko kod takvih pacijenata postoji klinička sumnja potrebno je napraviti biopsiju. Negativni rezultati testiranja HLA DQ2 i DQ8 alela najčešće odmah isključuju celijakiju. S druge strane, postoje pojedinci koji nemaju celijakiju a nositelji su alela zbog toga što imaju u obitelji osobu s celijakijom ili srodnim autoimunim poremećajem. Kod pacijenata bez simptoma, posebno kod djece, s blagim porastom seroloških markera nije potrebno odmah napraviti biopsiju tankog crijeva (Shannahan i Leffler, 2017). Ukoliko bi se odmah napravila moglo bi doći do lažno negativne dijagnoze jer kod osobe nije došlo do vilusne atrofije u vrijeme seroloških testiranja. Uz sve navedeno, aktivni unos glutena jedan je od najvažnijih čimbenika koji utječe na postavljanje dijagnoze kod osoba koje su svojevremeno izbacili gluten iz prehrane. Preporuča se uvođenje glutena nekoliko tjedana do mjesec dana prije testiranja. Točno trajanje unosa glutena prije testiranja nije moguće odrediti zbog različitih histoloških i seroloških odgovora na unos glutena (Tye-Din i sur., 2018).

1.1.2. Metabolizam bolesti

Osobe s celijakijom ne mogu probaviti sve proteine glutena koje unesu hranom. Dio se probavlja u gušterači, želucu i crijevima dok preostali neprobavljeni peptidi glutena zaostaju u tankom crijevu gdje prolaze kroz epitelnu barijeru, ulaze u laminu propriju pomoću transcelularnih i paracelularnih transportnih mehanizama gdje ih tkivna transglutaminaza modificira čime se povećava njihov afinitet prema MHC II molekulama (Shannahan i Leffler, 2017). Problem se javlja kod osoba koje posjeduju halotipove HLA-DQ8 ili HLA-DQ2 jer gluten ulazi s njima u interakciju te dovodi do aktivacije urođenog i adaptivnog imunološkog odgovora koji uzrokuje upale i oštećenja na tankom crijevu (Cecilio i Bonatto, 2016). Slika 2 prikazuje mehanizam imunološkog odgovora kod celijakije.

Glutenski peptidi koji sadrže epitope T-stanica otporni su na razgradnju u probavnom sustavu. Transglutaminaza je glavni enzim u inicijaciji imunološkog odgovora na gluten. U trenutku kada peptidi glutena dođu do lamina proprie transglutaminaza ih deamidira što ih čini imunogenijim, odnosno povećava se mogućnost vezanja na HLA-DQ molekule. Deaminacijom se specifični ostaci glutamina pretvaraju u glutaminsku kiselinu, nakon čega se povezuju glutenski fragmenti

čime se stvaraju agregati. Antigen prezentirajuće stanice (eng. antigen presentig cell APC) prenose agregate do specifičnih CD4+ T-stanica koje aktiviraju imunološki odgovor, točnije dovode do prekomjerne proizvodnje citokina koji uzrokuju upalu tankog crijeva. IFN- γ i IL-21 su citokini koji promoviraju upalu tankog crijeva i odgovor B-stanica. IL-10 i TGF- β su imunosupresivni citokini koji se detektiraju u visokim koncentracijama tijekom imunološkog odgovora. Unatoč tome ne mogu spriječiti aktivni oblik bolesti zbog visoke koncentracije citokina koji potiču upalne procese (Tye-Din i sur., 2018).



Slika 2. Mehanizam imunološkog odgovora kod celijakije (Tye-Din i sur., 2018)

1.2.PREHRANA KOD CELIJAKIJE

Bezglutenska prehrana još uvijek je jedini znanstveno dokazani učinkoviti tretman liječenja celijakije. Takav način prehrane postupno zacjeljuje atrofiju sluznice tankog crijeva te kod većine pacijenata unutar četiri tjedna dolazi do smanjivanja simptoma. Normalizacija seroloških testova je dugotrajniji proces koji može potrajati od nekoliko mjeseci do godine dana (Shannahan i Leffler, 2017).

Ovakav način prehrane dopušta konzumaciju hrane i pića sa sadržajem glutena manjim od 20 ppm (20 mg glutena na 1 kg hrane). Gotovo je nemoguće pridržavati se prehrane koja bi bila u potpunosti bez glutena. Pacijenti kod bezglutenske prehrane moraju izbjegavati konzumaciju žitarica poput pšenice, raži, ječma, pira, kamuta, kuskusa i tritikala. Kod nekih pacijenata čak i vrlo mali unos glutena može uzrokovati oštećenja tankog crijeva (Celiac Disease Foundation, 2020).

Zob je potrebno izbjegavati ne zato što sadrži gluten, već zato što je često kontaminirana u procesu skladištenja. Nepoznato je kakav je učinak zobi na simptome ili histologiju tankog crijeva kod pacijenata. Zob za razliku od pšenice sadrži oko 20% manji udio proteina te nije dokazano kako avenin iz zobi ima štetan utjecaj na zdravlje osoba oboljelih od celijakije (Ciacci i sur., 2015). Međutim, uvođenje zobi u prehranu kod pacijenata s celijakijom preporuča se tek nakon što su simptomi u remisiji, odnosno tek nakon pridržavanja bezglutenske prehrane minimalno šest mjeseci. Pretpostavlja se da su određene sorte nekontaminirane zobi okidači za imunološki odgovor kod pacijenata što objašnjava pogoršanje simptoma celijakije u određenim studijama (La Vieille i sur., 2015). Smatra se kako je dnevna konzumacija zobi od 50-70 grama kod odraslih te 20-25 kod djece sigurna ukoliko ista nije kontaminirana nekom drugom žitaricom poput pšenice, ječma ili raži. Dobar izvor topivih vlakana, proteina te brojnih minerala i vitamina isto tako pospješuje postprandijalno snižavanje glukoze u krvi, smanjuje lučenje inzulina, snižava razinu lipoproteina niske gustoće. Sve su to odlike zobi zbog čega je važno uvrstiti ovu žitaricu u prehranu kod osoba koje boluju od celijakije (Ciacci i sur., 2015).

Posljednjih godina veliki napredak prehrambene industrije, posebice proizvodnja hrane bez glutena, postala je jako popularna kako kod osoba s celijakijom tako i kod zdrave populacije. Razlog tome je široka lepeza dostupnih namirnica te naravno njihova kvaliteta i okus koji je

potrošačima najbitniji. Unatoč tome, zdravoj populaciji se ne preporuča izbacivanje namirnica koje sadrže gluten. Prehrambeni sastav namirnica iz kojih je izoliran gluten može sadržavati veći udio lipida, šećera i soli koje mogu razviti brojne nutritivne deficite. S druge strane, troškovi života za osobe s celijakijom veći su zbog čega si ljudi s manjim primanjima ne mogu priuštiti takvu prehranu. Također, tome se doskočilo uvođenjem recepata za ograničenu količinu namirnica bez glutena. Na taj način omogućeno je pacijentima da se pridržavaju bezglutenske prehrane, ali je i smanjen broj komplikacija bolesti što bi dugoročno bio veći trošak za zdravstveni sustav (Rotsami i sur., 2017).

1.2.1. Preporuke

U trenutku kada se osobi potvrdi dijagnoza celijakije potrebno je uputiti osobu nutricionistu kako bi joj sastavila način prehrane bez glutena koji bi ujedno bio i nutritivno adekvatan. Potrebno je educirati o križnoj kontaminaciji, prehrani, bezglutenskim proizvodima i označavanju hrane te ponuditi pacijentima moguća rješenja za probleme vezane uz prehranu izvan kuće što omogućava lakše slijeđenje nutritivnih smjernica. Prije svega važno je obratiti pažnju na utvrđenu toleriranu količinu glutena u prehrani koja neće pogoršavati zdravstveno stanje. Ukoliko se adekvatno educira pacijente, isti će smanjiti pojavu nutritivnih deficita i povećati si kvalitetu života koja im je bila narušena zbog bolesti. S vremenom će se smanjivati simptomi koje su prije dijagnoze imali te će izbjeći moguće komplikacije celijakije koje bi razvili kada se ne bi pridržavali prehrane bez glutena (Bascunan i sur., 2016).

Gutowski i sur. (2020) u svom su istraživanju otkrili kako osobe s celijakijom ne mogu utvrditi sadrži li pojedina hrana gluten na temelju podataka na deklaraciji. Neznanje može dovesti do kontinuiranog unosa glutena ili do izbjegavanja sigurnih namirnica što povećava rizik od nutritivnog deficita. Gluten se može nalaziti u namirnicama koje su prirodno bez glutena i u namirnicama iz koje je gluten izoliran kao rezultat križne kontaminacije. Do kontaminacije može doći u bilo kojem dijelu proizvodnog lanca, na polju za vrijeme rasta, tijekom žetve, u proizvodnom pogonu, ali i tijekom skladištenja ili transporta (Farage i sur., 2018). Lee i sur. (2014) analizirali su 78 uzoraka bezglutenskih žitarica i njihovih proizvoda s oznakom prekrštenog klasa.

Rezultati su pokazali kako je 20,5 %, odnosno 16 uzoraka, sadržavalo razinu glutena iznad propisanih granica od 20 mg kg⁻¹.

Važno je liječenje započeti povećanjem unosa energije, pojedinih mikronutrijenata i tekućine. Vremensko trajanje aktivne bolesti povezano je s nutritivnim statusom pacijenta u trenutku dijagnoze bolesti. Što je vremensko trajanje duže to je veće oštećenje gastrointestinalnog sustava i veći je stupanj malapsorpcije (Novak, 2017). Preporuča se konzumacija hrane iz koje je izoliran gluten i one koja je prirodno bez glutena poput mlijeka i mliječnih proizvoda, voća i povrća, biljnih ulja, mesa, ribe i jaja. Žitarice poput amaranta, kvinoje, prosa, kukuruza, heljde, riže mogu zamijeniti pšenicu, raž, ječam i zob. Prehrana se može upotpuniti sa sjemenkama, mahunarkama i orašastim plodovima čime se povećava nutritivna vrijednost prehrane. Namirnice iz kojih je izoliran gluten mogu se lako prepoznati zbog prekriženog klasa na ambalaži (Bascunan i sur., 2016). Pridržavati se ovakvog načina prehrane bilo bi jednostavno kada bi se gluten nalazio samo u prethodno navedenim žitaricama i proizvodima od tih žitarica. Gluten se koristi u proizvodnji različitih skupina namirnica da bi povezao masnoću i vodu, kao emulgator, stabilizator, nositelj aroma i začina. Isto tako, može biti skriven u industrijski procesiranoj hrani, pivu, dječjoj hrani ili dodacima prehrani (Meijer i sur., 2018). U tablici 1 prikazane su sve sigurne namirnice kao i one koje su potencijalni rizik za osobe s celijakijom. Do sada je navedena hrana koja je mogući izvor glutena, no postoje i neprehrambeni izvori glutena na što posebno treba obratiti pažnju pacijentima. Lijekovi, kapsule te kozmetički proizvodi poput paste za zube, ruževa za usne ili vodica za ispiranje usta mogu sadržavati gluten kao pomoćnu tvar, oblogu ili sastojak. Potrebno je savjetovati pacijente da se obrate proizvođaču proizvoda koji žele konzumirati kako bi se uvjerali nalazi li se u njemu gluten (Bascunan i sur., 2016).

Tablica 1. Popis dopuštenih i nedopuštenih namirnica u prehrani bez glutena (Panjkota Krbavčić, 2008)

Grupa namirnica	Dopuštene	Rizične	Zabranjene
ŽITARICE	amarant, heljda, slanutak, Jobove suze, leća, proso, grašak, kvinoa, sirak, soja, tapioka i divlja riža	Instant palenta, Kukuruzne pahuljice s raznim dodacima, čips od krumpira	pšenica,zob,ječam raž,pir i njihovi derivati, pšenoraž, mekinje gore navedenih žitarica,ječmeni slad; Müsli i žitarice za doručak napravljene od gore navedenih žitarica; Tjestenina (svježa, suha, s punjenjenjem ili bez njega); Slatki ili slani pečeni proizvodi (kruh, štapići, kolači, krekeri, pizza, keksi, pite, kroasani itd.)
VOĆE	Sve vrste svježeg ili smrznutog voća, sve vrste orašastih plodova sa soli ili bez nje; Voće u sirupu, suho ili dehidrirano voće koje nije preliveno brašnom	Kandirano voće	suho ili dehidrirano voće koje je preliveno brašnom
POVRĆE	Sve vrste svježeg,konzerviranog ili smrznutog povrća koje ne sadrži nedozvoljene sastojke navedenih žitarica	Gotova jela na bazi povrća	Povrće sa žitaricama, Panirano povrće ili povrće pečeno u brašnu
MLIJEKO I MLIJEČNI PROIZVODI	svježe mlijeko ili mlijeko u tetrapaku, prirodni jogurt (punomasni ili bez masnoća), svježe vrhnje ili UHT vrhnje, svježi i zreli sirevi	napici na bazi mlijeka, voćni jogurt, aromatizirano UHT vrhnje za kuhanje, tučeno vrhnje, kreme i pudinzi, sirni namazi, sirevi s plijesni	jogurt sa sladom, žitaricama ili keksima.
MESO,RIBA ,JAJA	Sve vrste mesa i ribe, svježi ili zamrznuti pršut, konzervirane ribe u ulju, dimljene ili zamrznute, jaja	Čajne salame, naresci, kobasice, hrenovke	Panirano meso ili riba, uvaljano u brašno ili kuhano s umacima koji sadržavaju brašno
NAPITCI	Gazirani napitci,bezalkoholna pića i dijetna pića,čaj , čaj bez kofeina, kamilica, kava, kava bez kofeina, biljni čajevi,	Voćni sirupi i sladoled, pripremljene mješavine za frape, topla čokolada	Pivo, Instant kava ili nadomjesci kave koji sadržavaju ječam ili ječmeni slad
SLATKIŠI	med, šećer; fruktoza,dekstroza, glukozni sirup	Čokoladne praline,kakao u prahu	Kupovni slatkiši prekriveni pšeničnim brašnom; Čokolada sa žitaricama i keksima

1.2.2. Nutritivni deficiti bezglutenske prehrane

Pšenica, raž i ječam dobar su izvor željeza, kalcija, folne kiseline i vitamina B12. Navedene nutrijente pacijenti bi trebali nadomjestiti zamjenskim namirnicama, no većina njih nije s tim upoznata. Prehrambena vlakna, vitamin D i ostali vitamini B skupine također su česti deficiti zabilježeni u bezglutenskoj prehrani. Istraživanja su pokazala kako je prehrana bez glutena kod većine pacijenata neuravnotežena, odnosno da unose hranom više masti dok je unos ugljikohidrata siromašan (Jnawali i sur., 2016).

Manjak prehrambenih vlakana susreće se kod novooboljelih pacijenata, ali i kod onih koji su duže vrijeme na bezglutenskoj prehrani. Smanjena apsorpcija zbog atrofije vila u tankom crijevu razlog je manjka vlakana kod novooboljelih. U bezglutenskoj prehrani deficit je povezan s lošom kvalitetom bezglutenskih proizvoda kao i s izborom namirnica. Dovoljno je izbjegavati konzumaciju nekoliko vrsta namirnica prirodno bogatih vlaknima kako bi se razvio deficit (Vici i sur., 2016). Kako bi se spriječio deficit vitamina B skupine važno je u prehranu uvrstiti pseudo žitarice poput amaranta ili kvinoje koje su ujedno dobar izvor proteina, folne kiseline i minerala (Pellegrini i Agostoni, 2015). Pseudo žitarice dobar su izvor aminokiselina arginin i histidin koje su važne za razvoj djece. Iako u usporedbi s ostalim žitaricama imaju veći udio masti karakterizira ih veći udio nezasićenih masnih kiselina, između ostalih i esencijalne omega 3 masne kiseline. Anemija i nedostatak željeza često se pojavljuju kod osoba s celijakijom kao posljedica oštećenja crijevne sluznice. Hrana koja prirodno sadrži gluten je dobar izvor željeza, dok hrana bez glutena nije, zbog čega je teško nadomjestiti pacijentima nedostatak željeza. Povrće i meso dobar su izvor željeza na što je potrebno uputiti pacijente kako bi u što kraćem vremenu nadomjestili nedostatak željeza (Vici i sur., 2016).

Bilo koji način liječenja, pa tako i prehrana bez glutena, može imati nepoželjne učinke. Obrazovanje pacijenata o hrani bez glutena i o mogućim nutritivnim deficitima ključno je za postizanje pravilne i uravnotežene prehrane bez glutena (Bascunan i sur., 2016).

1.3. MODELIRANJE NA RAZINI STANICE U NUTRICIONIZMU

Nutricionizam ili znanost o prehrani proučava odnos između čovjeka i hrane. Nastoji razumjeti na koji način prehrana utječe na zdravlje čovjeka. Sve veći broj prehrambenih istraživanja usmjereno je na otkrivanje prirodnih načina prevencije različitih kroničnih nezaraznih bolesti koje su u posljednje vrijeme u stalnom porastu. Nutricionizam stoga obuhvaća različita područja istraživanja poput molekularnih mehanizama, identifikacije biološki aktivnih sastojaka hrane i demonstracija njihove biološke učinkovitosti.

U posljednjem desetljeću primjena systemske biologije pokazala se kao korisno sredstvo za postizanje glavnih ciljeva nutricionizma (Badimon i sur., 2017). Systemska biologija je znanstvena disciplina koja proučava systemska svojstva i dinamičke interakcije bilo u organizmu, stanici, virusu ili zaraženom domaćinu. Temelji se na kombinaciji eksperimentalnog pristupa i matematičkog modeliranja, kojima se nastoji opisati i shvatiti kompleksne biološke sustave (Klipp i sur., 2016). Kontrola metaboličkih procesa kreće od prijenosa informacija s genoma, preko transkripcije i translacije do konačnog utjecaja na aktivnost enzima. Područja unutar systemske biologije su genomika, transkriptomika, i proteomika i metabolomika. Metabolomika uključuje potpunu i kvantitativnu procjenu metabolita unutar stanica, tkiva ili tjelesnih tekućina. Jedno je od važnijih područja za nutricionizam jer su metaboliti sastavni dio prehrane, nužni su za određivanje transkriptomskih i proteomskih promjena te su brojne bolesti izravno povezane s metabolitima. Koncept na kojem se temelji systemska biologija nije nimalo jednostavan. Koriste se općeniti podaci koji se predstavljaju u biološkim procesima s povećanom rezolucijom i točnošću. Ovakvim se pristupom nastoji eksperimentalno povezati sastavne modele bioloških sustava u složenije modele kako bi se pojasnilo njihovo ponašanje u različitim uvjetima (Diaz, 2019).

Prehrana se sastoji od mikronutrijenata i makronutrijenata gdje svaki od njih zasebno, ali i svojom kombinacijom na različite načine utječu na reakcije u metabolizmu. Cilj je predvidjeti utjecaj svih komponenata hrane jer bi se na taj način mogle uspješno liječiti kronične bolesti te upozoravati ljude kako mogu prevenirati pojedinoj kroničnoj bolesti. Postoje brojni modeli koji opisuju metaboličke puteve različitih nutrijenata unutar organizma. Kao što smo već naveli, moguće je mijenjati početne koncentracije parametara unutar modela te pratiti promjene u koncentracijama tijekom vremena. Beentjes i suradnici (2019) razvili su matematički model metaboličkog puta vitamina D pomoću kojeg su htjeli definirati utjecaj navedenog metabolizma na zdravlje opće

populacije, ali i trudnica pošto je manjak vitamina D povezan sa štetnim ishodima u trudnoći. Hassell Sweatman (2020) konstruirala je model dijabetesa koji je povezan s unosom ugljikohidrata i masti te služi za predviđanje učinka različitih načina prehrane. Postoje modeli koji su konstruirani s ciljem boljeg razumijevanja kvarenja hrane, primjer je rad Gu-a i suradnika (2019) koji su pratili promjene na proteinima sirutke tijekom termičke obrade. Iako postoje još brojni drugi radovi iz područja nutricionizma potrebno je još puno truda i vremena da se uslijed velikog broja različitih nutrijenata, kako po strukturi tako i po djelovanju, postignu željeni rezultati.

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. MATERIJALI

Od materijala u ovom radu korišteni su računalni programi *CellDesigner* verzija 4.4.2 (The Systems Biology Institute, Tokyo, Japan) i *WR Mathematica* v.10 (The Wolfram Centre Lower Road, Long Hanborough, Ujedinjeno Kraljevstvo) za numeričku integraciju diferencijalnih jednadžbi. Rezultati su grafički prikazani u Microsoft Office Excel-u 2016 (Microsoft, Redmond, Washington, SAD).

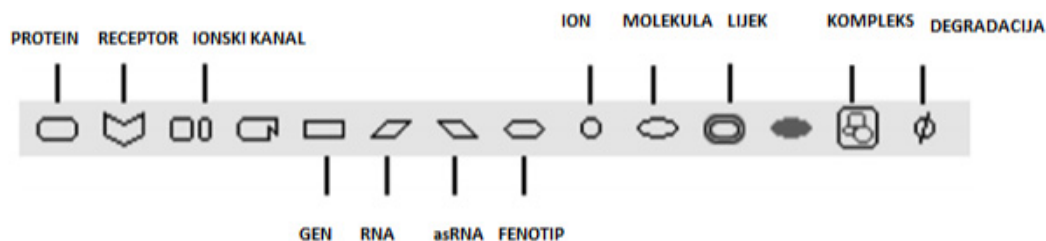
2.1.1. CellDesigner 4.4.2

Razumijevanje logike i dinamike gensko-regulatornih i biokemijskih mreža glavni je izazov biologije sustava. U svrhu lakšeg istraživanja navedenog područja koristi se računalni program CellDesigner koji omogućuje izradu modela. CellDesigner koristi grafički prikaz procesa u obliku dijagrama, koji je u skladu sa smjernicama grafičkih notacija biologije sustava. Svi modeli se pohranjuju u sustavu System Biology Markup Language (SBML). Glavne karakteristike programa su:

- lako razumljiv grafički prikaz,
- intuitivno korisničko sučelje,
- podržavanje SBML oblika datoteke,
- opsežni opis odjeljaka, vrsta, reakcija i proteina,
- povezanost s bazama podataka,
- integracija s alatima za analizu i ostalim simulatorima,
- podrška razvojnom okviru i
- pretvaranje slika u PNG, SVG, JPG i PDF formate (Matsuoka i sur., 2014).

Izrada modela u CellDesigneru započinje otvaranjem nove datoteke iz izbornika. U otvoreni prozor upisuje se veličina radnog prostora i naziv dokumenta. Slijedeći korak je odabir potrebnih vrsta iz alatne trake vidljive na slici 3. Moguće je izabrati proteine, gene, receptore, ione,

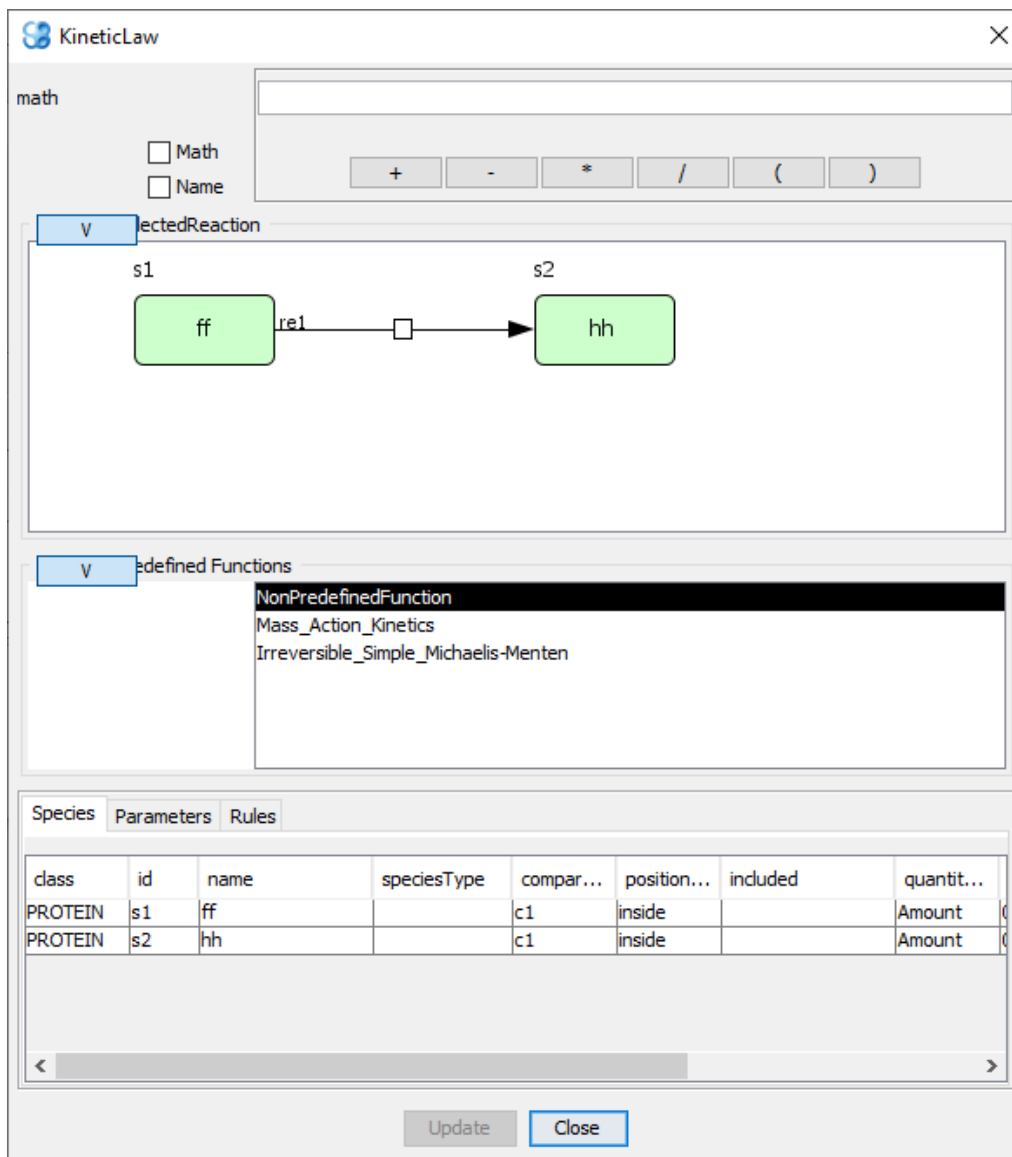
jednostavne molekule i slično. Svakoj odabranoj vrsti dodjeljuje se naziv i veličina, dok se pozicija svake pojedine vrste može mijenjati tijekom izrade modela (Funahashi i sur., 2003).



Slika 3. Alatna traka simbola vrsta u CellDesigneru (Matsuoka i sur., 2014)

Nakon odabira i imenovanja svih potrebnih vrste, potrebno ih je povezati u reakcije. Povezuju se sa strelicama iz alatne trake u kojoj su ponudeni različiti tipovi reakcija poput katalize, aktivacije, inhibicije i slično. Kako bi dobili funkcionalan model koji će vjerodostojno simulirati stanice u živom organizmu potrebno je upisati kinetičke jednadžbe za svaku reakciju. Pritiskom desnog klika miša na strelicu reakcije nudi se opcija upisa kinetičke jednadžbe, čime se otvara prozor za upis vidljiv na slici 4. U istom prozoru upisuju se i vrijednosti kinetičkih parametra koji sudjeluju u reakciji. Prije pokretanja simulacije potrebno je zadati početne koncentracije molekula s kojima je moguće manipulirati kako bi se vidjelo na koji način pojedina molekula utječe na druge tijekom simulacije. Simulacijom modela pratimo promjene koncentracija molekula tijekom zadanog vremena koje sudjeluju u procesu s obzirom na promjene početnih koncentracija molekula ili promjene vrijednosti kinetičkih parametara. Simulaciju se pokreće odabirom simulacije, odnosno upravljačke ploče u alatnoj traci programa. Dobiveni rezultati prikazani su u numeričkom i grafičkom obliku. U prozoru upravljačka ploča moguće je, kao što smo prethodno naveli, promijeniti početne vrijednosti molekula te svaku simulaciju spremi kao poseban eksperiment.

Konačan model sprema se u obliku SBML dokumenta sadržavajući sve potrebne informacije o molekulama, reakcijama, kinetikama, položaju dokumentu i ostalim podacima o modelu (Matsuoka i sur., 2014).



Slika 4. Grafički prikaz prozora za unos kinetičkog izraza

2.1.2. Model imunološkog odgovora na celijakiju

U ovome radu korišten je model urođenog i adaptivnog imunološkog odgovora kod osoba s celijakijom. Upravo sistemska biologija omogućuje opis svih izvanstaničnih i unutarstaničnih procesa povezanih s celijakijom, zajedno s integracijom prikupljenih eksperimentalnih podataka pomoću kojih se detaljno opisuje navedena bolest. Cilj izrade ovog modela bio je odrediti najvažnije procese imunološkog odgovora kod celijakije i razlike u koncentracijama nastalih metabolita s obzirom na različite početne koncentracije prehrambenog glutena.

Model se sastoji od 16 varijabli, 55 kinetičkih parametara i 34 biokemijskih reakcija. U nastavku navedeni su kinetički izrazi za svaku reakciju u modelu, kao i vrijednosti korištenih kinetičkih parametara (tablica 2 i 3) (Demin i sur., 2013).

Tablica 2. Popis kinetičkih izraza (Demin i sur., 2013)

Brzina reakcije	Opis
$V_1 = V_{lum} \cdot (k_{influx})$	Brzina ulaska glutena u lumen
$V_2 = V_{lum} \cdot (k_d^{gut} \cdot G_{gut})$	Razgradnja glutena u lumenu
$V_3 = V_{lam} \cdot (k_m^{iec} \cdot \frac{1}{1 + \frac{Ab}{K_d^{iec}}})$	Stopa sazrijevanja IEC
$V_4 = V_{lam} \cdot k_d^{iec} \cdot IEC \cdot (1 + \frac{Ab}{K_d^{ab}} + \frac{IEL_a}{K_d^{iel}} + \frac{IF21}{K_d^{if21}})$	Apoptoza IECa
$V_5 = V_{lam} \cdot (k_a^{iec} \cdot IEC \cdot (\frac{G_{gut}}{K_d^{iec}})^p \cdot \frac{1 - (\frac{G_{gut}}{K_d^{iec}})^{n-p+1}}{1 - (\frac{G_{gut}}{K_d^{iec}})^{n+1}})$	Aktivacija IEC ovisna o glutenskim peptidima
$V_6 = V_{lam} \cdot (k_d^{iec} \cdot IEC_a \cdot (1 + \frac{Ab}{K_d^{ab}} + \frac{IEL_a}{K_d^{iel}} + \frac{IF21}{K_d^{if21}})$	Apoptoza aktivnih IEC receptora

$V_7 = V_{lam} \cdot (k_{s_iec}^{il15} \cdot IEC_a + k_{s_apc}^{il15} \cdot APC_a)$	Sinteza IL-15
$V_8 = V_{lam} \cdot (k_d^{il15} \cdot IL15)$	Stopa raspada IL-15
$V_9 = V_{lam} \cdot (k_m^{iel})$	Brzina sazrijevanja IEL-a
$V_{10} = V_{lam} \cdot (k_d^{iel} \cdot IEL \cdot \frac{1}{1 + \frac{IL15}{K_{d_inh}^2}})$	Stopa raspada IEL-a
$V_{11} = V_{lam} \cdot (k_a^{iel} \cdot IL15 \cdot \frac{IEL}{IL15 + K_d^1})$	Aktivacija IEL-a
$V_{12} = V_{lam} \cdot (k_d^{iel} \cdot IEL_a \cdot \frac{1}{1 + \frac{IL15}{K_{d_inh}^2}})$	Stopa raspada aktivnih IEL
$V_{13} = V_{lum} \cdot (k_t^g \cdot ((1 - (\frac{IEC_{tot}}{0.0085})^3) + Permeability) \cdot (G_{gut} - G_{muc}))$	Ulazak peptida glutena u laminu propriju
$V_{14} = V_{lam} \cdot (k_{muc}^d \cdot G_{muc})$	Razgradnja nativnih peptida glutena
$V_{15} = V_{lam} \cdot (k_d^{deam} \cdot G_d)$	Razgradnja deamidiranih peptida glutena
$V_{16} = V_{lam} \cdot (k_{in}^{apc} \cdot (1 + \frac{IL15}{K_{d_stim}^{il15}}))$	Brzina regrutiranja APC-a
$V_{17} = V_{lam} \cdot (k_d^{apc} \cdot APC)$	Stopa raspada neaktivnih APC
$V_{18} = V_{lam} \cdot (k_a^{apc} \cdot APC \cdot (\frac{TG_G}{EC_{50}^{tg_g} + TG_G} + \frac{G_d}{EC_{50}^{deam} + G_d} + \frac{G_{muc}}{EC_{50}^{muc} + G_{muc}}))$	Aktivacija APC
$V_{19} = V_{lam} \cdot (k_d^{apc} \cdot APC_a)$	Stopa razgradnje aktivnih APC
$V_{20} = V_{lam} \cdot (k_m^t \cdot T)$	Brzina sazrijevanja T-stanica
$V_{21} = V_{lam} \cdot (k_d^t \cdot T)$	Stopa razgradnje neaktivnih T-stanica
$V_{22} = V_{lam} \cdot (k_a^t \cdot T \cdot APC_a \cdot (1 + \frac{IF21}{K_{d_stim}^{act}}))$	Aktivacija T-stanica
$V_{23} = V_{lam} \cdot (k_{s_1}^{if21} \cdot IEL_a + k_{s_2}^{if21} \cdot T_a)$	Sinteza IF-21

$V_{24} = V_{lam} \cdot (k_d^{if21} \cdot IF_{21})$	Stopa razgradnje IF-21
$V_{25} = V_{lam} \cdot (k_s^{ab} \cdot (1 + \frac{T_a \cdot k_{ab}^{ta}}{K_{d,ab}^{ta} + T_a}) \cdot (\frac{TG_G}{EC_{50}^{tg_g} + TG_G} + \frac{G_d}{EC_{50}^{deam} + G_d}))$	Sinteza antitijela
$V_{26} = V_{lam} \cdot (k_d^{ab} \cdot Ab)$	Stopa razgradnje antitijela
$V_{27} = V_{lam} \cdot (k_{ia} \cdot IEC_a)$	Stupanj inaktivacije IEC-a
$V_{28} = V_{lam} \cdot (k_d^t \cdot T_a)$	Stopa razgradnje aktivnih T-stanica
$V_{29} = V_{lam} \cdot (\frac{k_d^{ag-ab} \cdot G_{muc} \cdot Ab}{K_d^{ab,2}})$	Razgradnja kompleksa antitijelo-nativni peptidi glutena
$V_{30} = V_{lam} \cdot (\frac{k_d^{ag-ab} \cdot k_{rat} \cdot G_{deam} \cdot Ab}{K_d^{ab,2}})$	Razgradnja kompleksa antitijelo deamidirani peptidi glutena
$V_{31} = V_{lam} \cdot (k_s^{zn} \cdot IEC_a)$	Stupanj sinteze zonulina
$V_{32} = V_{lam} \cdot (k_d^{zn} \cdot Z_{ln})$	Stopa razgradnje zonulina
$V_{33} = V_{lam} \cdot (\frac{k_d^{cat} \cdot e_0 \cdot G_{muc} \cdot \frac{1}{1 + \frac{Ab}{K_d^{e,ab}}}}{K_m^{deam} + G_{muc}})$	Deamidacija peptida glutena
$V_{34} = V_{lam} \cdot (k_a^i \cdot T_i)$	Aktivacija T-stanica

Tablica 3. Popis vrijednosti kinetičkih parametara (Demin i sur., 2013)

	Parametar	Vrijednost	Opis
1	$k_{inf\ lux}$	750000/7500	Brzina prijenosa glutena u lumen
2	k_d^{gut}	0,26	Brzina degradacije glutena u lumenu
3	k_m^{iec}	0,0001315	Brzina sazrijevanja IEC
4	$K_{d_inh}^{iec}$	3490802	Brzina sazrijevanja IEC
5	k_d^{iec}	0,015462	Brzina smrti IEC
6	K_d^{ab}	3846978	Brzina degradacije antitijela
7	K_d^{iel}	0,003	Brzina degradacije IEL-a
8	$K_d^{if\ 21}$	43,39	Brzina degradacije IF-21
9	k_a^{iec}	0,5	Brzina aktivacije IEC
10	K_d^{iec}	5000	Brzina aktivacije IEC
11	P	3	Koncentracija receptora potrebnog za aktivaciju IEC
12	N	10	Koncentracija CXCR3 receptora u IEC-u
13	$k_{s_iec}^{il15}$	219	Brzina aktivacije od strane IEC
14	$k_{s_apc}^{il15}$	275	Brzina aktivacije od strane APC
15	k_d^{il15}	0,5794	Brzina degradacije IL-15
16	k_m^{iel}	0,00009	Brzina sazrijevanja IEL
17	k_d^{iel}	1152,5	Brzina smrti IEL

18	$K_{d_inh}^{iel}$	1,69	Brzina smrti IEL
19	k_a^{iel}	11,11	Brzina aktivacije IEL
20	K_d^1	0,6411	Brzina aktivacije IEL
21	k_t^g	1,13	Brzina transporta peptida iz lumena u laminu kroz epitel tankog crijeva
22	K_d^{zln}	0,8	Utjecaj zonulina na propusnost epitela
23	k^{zln}	0,26	Utjecaj zonulina na propusnost epitela
24	k_d^{muc}	0,26	Brzina degradacije deamidiranih peptida glutena
25	k_d^{deam}	0,0000096	Brzina degradacije nativnih peptida glutena
26	k_{in}^{apc}	2,32	Brzina regrutiranja APC
27	$K_{d_stim}^{il15}$	0,0096	Aktivacija regrutiranja APC-a od strane IL-15
28	k_d^{apc}	2,32	Brzina razgradnje APC
29	k_a^{apc}	0,35	Brzina razgradnje APC
30	EC_{50}^{tg-g}	700000	Brzina aktivacije APC
31	EC_{50}^{deam}	700000	Brzina aktivacije APC
32	EC_{50}^{muc}	3500000	Brzina aktivacije APC
33	k_m^t	0,0000058	Brzina sazrijevanja T-stanica
34	k_d^t	0,00675	Brzina smrti T-stanca
35	k_a^t	1,95	Brzina aktivacije T-stanica
36	$K_{d_stim}^{act}$	147	Aktivacija T-stanica od strane IF-21
37	$k_{s_1}^{if21}$	3303,1	Brzina sinteze IFN- γ pomoću IEL-a

38	$k_{s_2}^{if21}$	12071	Brzina sinteze IFN- γ pomoću T-stanica
39	k_d^{if21}	0,15	Brzina razgradnje IF-21
40	k_s^{ab}	1,66	Brzina sinteze antitijela
41	k_{ab}^{ia}	114703	Aktivacija brzine sinteze antitijela pomoću T-stanica
42	$K_{d_ab}^{ia}$	0,0042	Aktivacija brzine sinteze antitijela pomoću T-stanica
43	k_d^{ab}	0,001375	Brzina razgradnje antitijela
44	k_{ia}	1,46	Brzina inaktivacije IEC-a
45	k_d^{ag-ab}	0,00811	Poluživot kompleksa antigene-antitijelo
46	K_d^{ab-2}	3573320	Afinitet antitijela na antigen
47	k_{rat}	1,5	Deaminirani peptidi imaju veći afinitet za antitijela od nativnih peptida
48	k_s^{zln}	3327155	Brzina sinteze aktivnih IEC-a
49	k_d^{zln}	0,56	Utjecaj zonulina na propusnost epitela
50	k_d^{cat}	1140	Brzina deamidacije peptida glutena
51	$e0$	35087,72	Ukupna koncentracija TG_2
52	$K_{d_ab}^e$	147292,3	Inhibicija TG_2 od strane TG antitijela
53	K_m^{deam}	250000000	Brzina deamidacije peptida glutena
54	k_a^i	0,01	Brzina aktivacije T-stanica
55	k_{va}	48,23	Brzina aktivacije T-stanica

2.1.3. Prehrambene preporuke korištene za planiranje jelovnika

Planiranje jelovnika za zdravu populaciju manje je zahtjevno jer nema nikakvih ograničenja što se tiče izbora namirnica. Postoje opće preporuke koje omogućavaju planiranje raznolike i uravnotežene prehrane. Pravilna raspodjela energetske unosa bila bi 25-35 % unosa masti, 50-60 % unosa ugljikohidrata dok preostalih 10-20 % otpada na unos proteina. Navedena raspodjela vrijedi i za osobe koje su na prehrani bez glutena. Jelovnici za osobe oboljele od celijakije ne sadrže pšenicu, raž, ječam i zob te proizvode od navedenih žitarica. Važno je čitati deklaracije kako bi se izbjegao unos glutena iz ostalih namirnica (Odluka, 2015).

2.2.METODE

2.2.1. Razvoj i simulacija modela za različite početne uvjete

Provedene su simulacije imunološkog odgovora na celijakiju s obzirom na unos različitih koncentracija glutena. Korištene početne koncentracije su 0.1, 12, 1004 mg glutena nakon čega se prate koncentracije različitih oblika glutena, T-stanica kao i antitijela tijekom vremena.

2.2.2. Analiza ključnih parametara modela primjenom metode lokalne osjetljivosti parametara

Analiza osjetljivosti je metoda pomoću koje možemo utvrditi kako promjene pojedinih varijabli utječu na vrijednosti rezultata unutar modela. Na taj način se određuju ključni parametri, ali i početni uvjeti modela što je glavni cilj analize osjetljivosti (Marino i sur., 2008). U najvećem broju slučajeva primjenjuje se kako bi se pojednostavio model ili za donošenje zaključaka o različitim aspektima proučavane pojave. Analiza osjetljivosti pronašla je svoju primjenu u različitim područjima poput složenih kinetičkih sustava, ekoloških modela, energetske analiza zgrada, hidrogeologije i biologije sustava. Primjena u biološkim procesima iznimno je važna za formuliranje i testiranje hipoteza, dok je glavna prepreka što takvi modeli imaju velik broj

slobodnih parametara čije vrijednosti utječu na ponašanje modela i njegovu interpretaciju (Qian i Mahdi, 2020).

Analiza lokalne osjetljivosti je metoda pomoću koje se određuje parcijalna derivacija izlazne funkcije s obzirom na ulazne parametre samo kada su parametri i početni uvjeti poznati. Mijenja se jedan ulazni faktor, dok ostali ostaju na početno zadanim vrijednostima te se ponavlja postupak za sve ulazne faktore (Marino i sur., 2008).

U ovom radu analizirano je 16 izlaznih veličina modela (koncentracije metabolita uključene u imunološki odgovor na celijakiju). Prema navedenoj jednadžbi računa se relativni parametar koeficijenta osjetljivosti u nepromijenjenom stanju $S_{X/i}$, k_i je vektor koncentracija, dok je c_x vektor parametara sustava. Koeficijent lokalne osjetljivosti je $\frac{\partial c_{X^*}}{\partial k_i}$ (jednadžba 1).

$$S_{X/i} \% = \frac{k_i}{c_{X^*}} \cdot \frac{\partial c_{X^*}}{\partial k_i} \cdot 100\% \approx \frac{k_i \cdot \Delta c_{X^*}}{c_{X^*} \cdot \Delta k_i} \cdot 100\% = \quad [1]$$

$$= \frac{k_i}{c_{X^*}} \cdot \frac{c_{X^*} \cdot (1,03k_i) - c_{X^*} \cdot k_i}{0,3 \cdot k_i} \cdot 100\%$$

Analiza je primijenjena na 55 kinetičkih parametara modela. Program WR *Mathematica* 10 korišten je za simulaciju i određivanje lokalne analize osjetljivosti, nakon čega su rezultati obrađeni u Microsoft Office Excelu 2016.

2.2.3. Analiza globalne osjetljivosti parametara FAST metodom

Test osjetljivosti Fourierove amplitude (FAST) koristi sinusoidne funkcije i svojstvo ortogonalnosti te daje približan okvir stvarnih i imaginarnih koeficijenata modela (Qian i Mahdi, 2020). Promjenom vrijednosti ulaznih parametara dolazi do varijacija izlaznih vrijednosti. Fourierova analiza mjeri amplitude pri različitim frekvencijama svakog od parametara na kraju modela (Marino, 2008). Metoda je karakteristična po tome što je mjerenje osjetljivosti neovisno o modelu, mjerenje sadrži utjecaj svih zadanih varijacija svakog faktora. Također, sadrži efekte interakcije te se više faktora može definirati kao pojedinačni faktor (Crosetto i sur., 2000).

Korištenjem globalne osjetljivosti dolazi do nelinearne promjene normaliziranih parametara x_i (jednadžba 2):

$$x_i = \frac{1}{2} + \frac{1}{\pi} \arcsin (\sin (\pi \omega_i s + \varphi_i)) \quad [2]$$

Promjene parametara povezane su s parametrima frekvencije i faznog kuta. Jednadžba 3 prikazuje promjenu normaliziranih varijabli x_i u realni parameter k_i :

$$k_i = \frac{\hat{k}_i}{2} [10^n + 10^{-n} + x(10^n - 10^{-n})] \quad [3]$$

\hat{k}_i predstavlja nominalnu vrijednost parametra, dok eksponent n predstavlja raspon varijacije parametara. Dobivene izlazne varijable proširuju se Fourierovom serijom gdje je varijanca D izlazne funkcije rastavljena na zbrojeve kvadrata Fourierovih koeficijenata A_ω i B_ω (jednadžba 4-6):

$$D = 2 \sum_{\omega=1}^{\infty} (A_\omega^2 + B_\omega^2) \quad [4]$$

$$A_\omega = \frac{1}{2\pi} \cdot \int_{-\pi}^{\pi} y(s) \cdot \cos(\omega s) \cdot ds \quad [5]$$

$$B_\omega = \frac{1}{2\pi} \cdot \int_{-\pi}^{\pi} y(s) \cdot \sin(\omega s) \cdot ds \quad [6]$$

Parcijalni zbroj članova Taylorovog niza (s) određuje se pomoću jednadžbe u nastavku, gdje M predstavlja maksimalnu frekvenciju u Fourierovom proširenju. Koeficijenti osjetljivosti S_i određeni su prema Fourierovim koeficijentima, dok je djelomična suma usklađenosti dana jednadžbama 7-8.

$$D_i = 2 \cdot \sum_{p=1}^M A_{p\omega_i}^2 + B_{p\omega_i}^2 \quad [7]$$

$$S_i = \frac{D_i}{D} \quad [8]$$

Isto kao i u slučaju lokalne osjetljivosti, za određivanje globalne osjetljivosti i provođenje simulacije korišten je program WR *Mathematica* 10. Dobiveni rezultati obrađeni su u Microsoft Office Excelu 2016

3. REZULTATI I RASPRAVA

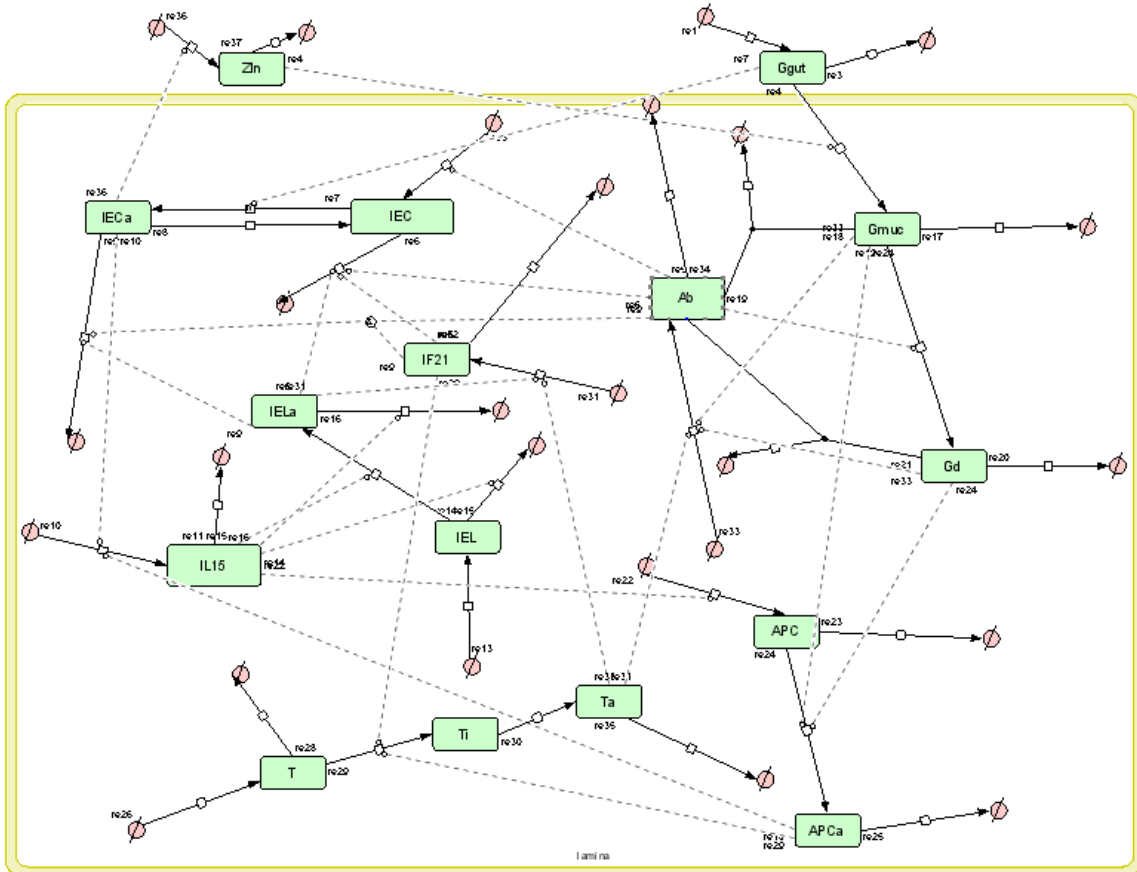
Provedbom simulacija modela imunološkog odgovora na celijakiju promatrana je promjena koncentracija metabolita tijekom 720 sati. Provedene su tri simulacije u programu CellDesigner koje se razlikuju s obzirom na početne koncentracije glutena (0.1 mg, 12 mg i 1004 mg). Rezultati su obrađeni u programu Microsoft Office Excel nakon čega su prikazani u grafičkom obliku. Također, određeni su ključni kinetički parametri modela pomoću analize lokalne i globalne osjetljivosti u programu *WR Mathematica* 10.

3.1. PRIKAZ MODELA IMUNOLOŠKOG ODGOVORA NA CELIJAKIJU U PROGRAMU CELLDISIGNER 4.4.2

U okviru ovoga rada provedena je analiza modela imunološkog odgovora na celijakiju u programskome paketu CellDesigner 4.4.2. Odabrani model sastoji se od 34 biokemijskih reakcija koje prikazuju imunološki odgovor s obzirom na različite koncentracije glutena. Popis kinetičkih izraza prikazan je u tablici 2, dok tablica 3 prikazuje popis vrijednosti 55 kinetičkih parametara korištenih u modelu. Slika 5 prikazuje CellDesigner model sa ključnim metabolitima imunološkog odgovora čijom simulacijom su dobiveni rezultati opisani u nastavku. Kaskada reakcija započinje prikazom ulaska peptida glutena u lamina propriju gdje prelazi u deamidirani oblik uz pomoć enzima transglutaminaze. Antigen prezentirajuće stanice (APC) prenose deamidirane peptide glutena do T-stanica nakon čega one prelaze u aktivni oblik. T-stanice aktiviraju upalni odgovor sintezom proupalnih citokina IF-21. Intestinalne epitelne stanice (IEC) zajedno s antigen prezentirajućim stanicama (APC) sintetiziraju IL-15 koji aktivira intraepitelne limfocite (IEL). IEL zajedno s IF-21 dovode do upalne reakcije izazvane peptidima glutena.

Primjena CellDesigner paketa omogućava modeliranje i analizu genetsko-regulatornih i biokemijskih mreža korištenjem precizno definiranoga grafičkog sučelja. Prema literaturi Matsuoka i suradnika (2014) najvažnije prednosti CellDesigner-a su: (i) omogućava prikaza različitih bioloških interakcija, (ii) da je zapis vizualno nedvosmislene (jedan simbol jedna komponenata modela), (iii) omogućava uvođenje oznaka u model (promjena imena

komponentama), (iv) moguće prevođenje grafički prikazanoga modela u matematički zapis primjenom programskih alata, (vi) moguće grafičko prikazivanje rezultata simulacije te (vi) shema notacije modela mora biti slobodno dostupna (u obliku on-line baza).



Slika 5. Prikaz modela imunološkog odgovora na celijakiju (Znl - zonulin, Ggut – peptidi glutena, Gm uc – nativni peptidi glutena, Gd – deaminirani peptidi glutena, APC – antigen prezentirajuće stanice, Ab – antitijelo, T – T stanice, IEL – intraepitelni limfociti, IL15 – interleukin 15, IF21 – interferon 21, IEC – intestinalne epitelne stanice)

3.2.PRIKAZ JELOVNIKA GLUTENSKOG I BEZGLUTENSKOG JELOVNIKA

Osmišljena su dva jelovnika, jedan za zdravu populaciju te drugi za osobe sa celijakijom. Jelovnici su samostalno izrađeni pomoću USDA baze podataka zbog velike količine dostupnih namirnica. Ograničenje navedene baze je što ne nudi podatak o koncentraciji glutena. Iz tog razloga korišteno

je istraživanje Assora i suradnika (2014) u kojem se određivala koncentracija glutena u određenim namirnicama. U jelovnik bez glutena uvrštene su bezglutenske namirnice kojima je određena koncentracija glutena u radu Šarić (2017). Energetska vrijednost jelovnika iznosi 1700 kcal, gdje su namirnice raspoređene u pet obroka (tablica 4).

Prilikom sastavljanja jelovnika bez glutena nije dovoljno izbjegavati namirnice koje prirodno sadrže gluten. Važno je pripaziti na kontaminaciju do koje može doći u bilo kojoj fazi proizvodnje i pripreme hrane. Namirnice koje sadrže zob se ne uvrštavaju u jelovnike ukoliko se ne zna tolerancija osobe na zob. Moguće ih je uvrstiti u slučaju da namirnica ima certifikat koji označava da ne sadrži gluten (Leonard i sur., 2017). Navedeni jelovnici osmišljeni su na temelju općih preporuka. Nastoji se zadovoljiti raznolikost prehrane uz poštivanje udjela makronutrijenata koji su navedeni u eksperimentalnom djelu. Važno je ograničiti unos zasićenih masnih kiselina, trans masnih kiselina, dodanih šećera i soli. Što je više moguće izbjegavati termičku obradu prženja. U konačnici poželjno je da su namirnice u jelovnicima ukusne, šarene i raznolike kako bi se osobama olakšalo pridržavanje istih.

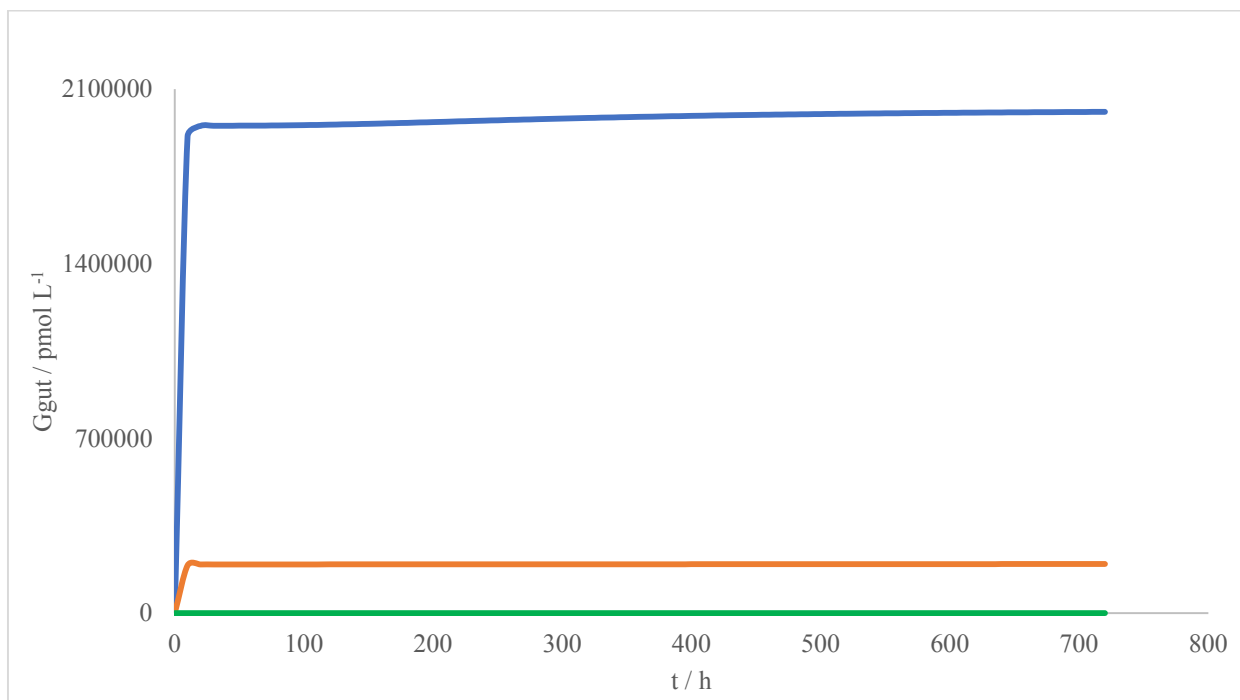
Tablica 4. Jelovnik za opću populaciju i jelovnik bez glutena

Cjelodnevni obrok	Masa g	Energija kcal	Proteini g	Gluten mg		Cjelodnevni obrok	Masa g	Energija kcal	Proteini g	Gluten mg
Zajuttrak						Zajuttrak				
Jaja	90	135	12	0		Kuhana jaja	90	135	12	0
Chia sjemenke	5	21	1	0		Sir kravljji svježi	100	95	14	0
Ementaler	100	7	1	0		Rajčica nezačinjena	150	22	1	0
Mlijeko (0,9 % m.m.)	50	195	15	0		Mlijeko (0,9 % m.m.)	100	42	1	0
Raženi kruh	100	222	7	500		Integralno pecivo	80	222	7	0.5
Doručak						Doručak				
Chapucino	250	165	8	4		Kikiriki	20	115	5	0
Keksi s čokoladom	50	142	4	300		Ručak				
Ručak						Pečena piletina	200	250	36	0
Pureći odrezak na naglo	150	242	27	0		Rizi - bizi	100	184	5	0.1
Kuhani krumpir	150	276	8	0		Kruške	150	47	0	0
Užina						Užina				
Lješnjaci	10	70	1	0		Kolač od badema	100	200	5	10
Limunada	200	17	0	0		Sok od jabuke	150	65	0	0.9
Večera						Večera				
Tjestenina s tunom	100	197	14	200		Toast od sira i šunke	100	313	10	0.5
Svježi krastavci	50	18	0	0		Svježi krastavci	50	18	0	0
Zelena paprika	50	9	0	0		Zelena paprika	50	9	0	0
Σ		1715	98	1004		Σ		1717	97	12

3.1.SIMULACIJA MODELA IMUNOLOŠKOG ODGOVORA NA CELIJAKIJU U PROGRAMSKOM PAKETU CELLDISIGNER

Celijakija je autoimuna bolest do koje dolazi zbog prehrambene izloženosti glutenu kod genetski predisponiranih osoba. Bezglutenska prehrana dovodi do postupnog smanjivanja simptoma bolesti i obnavljanja sluznice tankog crijeva zbog čega se pokazala kao učinkoviti tretman liječenja. Razlog pojave atrofije tankog crijeva je adaptivni imunološki odgovor kontroliran gluten specifičnim T-stanicama (Butterworth i Los, 2019).

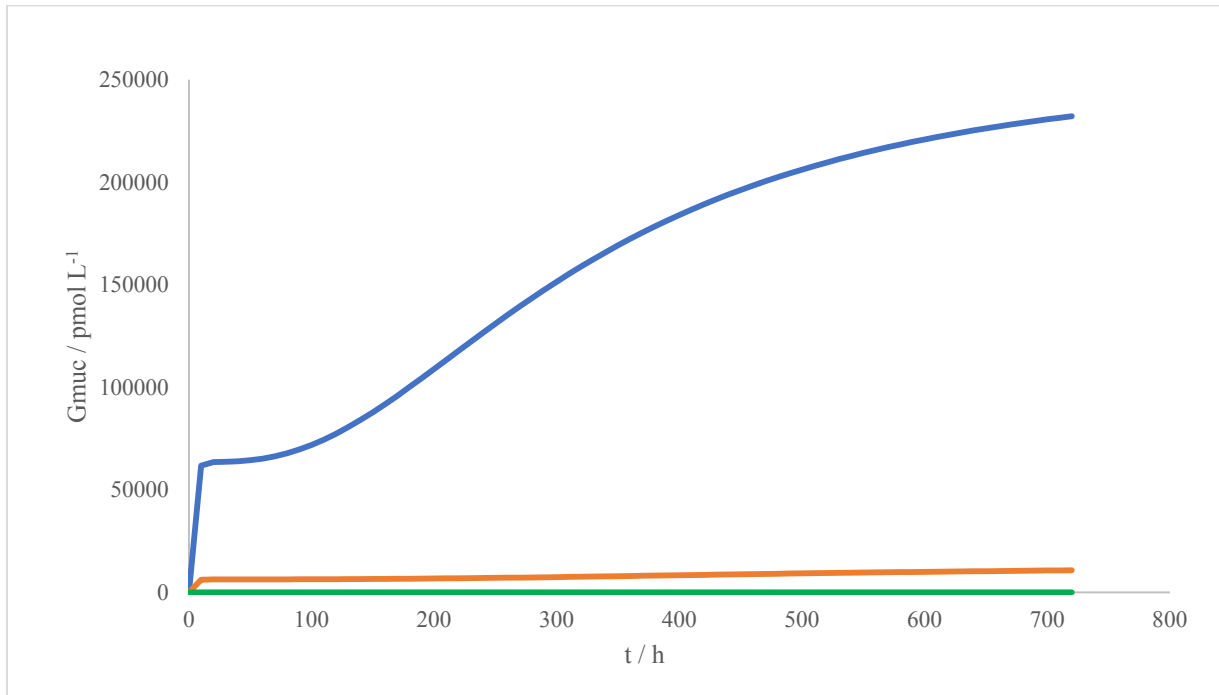
Provedene su tri simulacije modela s obzirom na unos različitih koncentracija glutena. Jelovnik za opću populaciju sadrži 1004 mg glutena, dok je koncentracija glutena u bezglutenskom jelovniku 12 mg. Koncentracija od 0.1 mg glutena predstavlja idealne uvjete koje je nemoguće postići zbog prirodno prisutnog glutena u velikom broju namirnica, kao i u ostalim namirnicama putem križne kontaminacije. Slika 6 prikazuje koncentraciju peptida glutena u lumenu tankog crijeva.



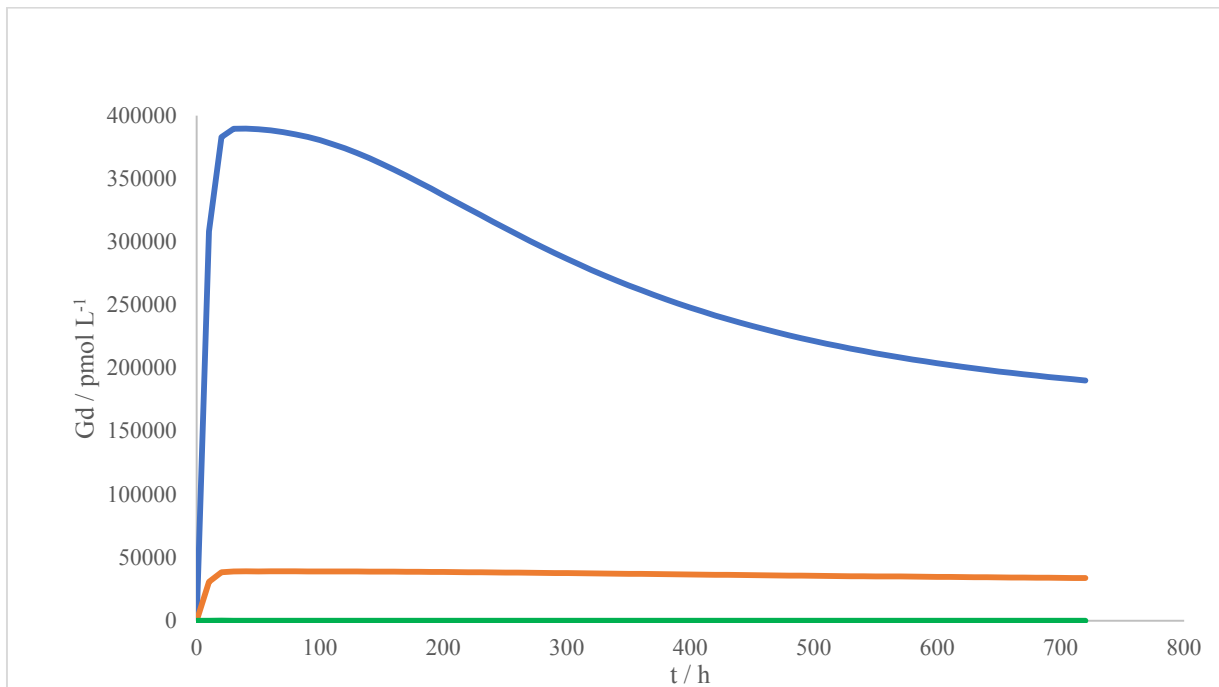
Slika 6. Koncentracije prehrambenog glutena u lumenu (plavo-Ggut/pm^{ol} L⁻¹ 1004 mg-koncentracija glutena u glutenskom jelovniku, narančasto Ggut/pm^{ol} L⁻¹-koncentracija glutena u bezglutenskom jelovniku, zeleno Ggut/pm^{ol} L⁻¹-koncentracija glutena u idealnim uvjetima)

Peptidi glutena prolaze kroz epitelnu barijeru tankog crijeva i ulaze u lamina propriju putem transcelularnih i paracelularnih transportnih mehanizama (Shannahan i Leffler, 2017). Na slici 7 možemo vidjeti kako je u prvih 10 sati najveća brzina ulaska peptida glutena u lamina propriju neovisno o unosu glutena prehranom. Kod najvećeg prehranbenog unosa nakon 10 sati brzina ulaska peptida glutena nastavlja eksponencijalno rasti.

Tkivna transglutaminaza je enzim koji katalizira deamidaciju glutenskih peptida u stanici. Glutaminske aminokiseline iz peptida se deamidacijom prevode u glutamat (Tye-Din i sur., 2018). Na taj način se povećava afinitet peptida glutena za vezanje na HLA molekule, odnosno ubrzavanja aktivacije T-stanica koje potiču kaskadu reakcija koje u konačnici dovode do stvaranja proupalnih citokina kod osjetljivih pojedinaca (Votava-Raić i sur., 2006). Koncentracija deamidiranog glutena u stanici se naglo povećava u prvih 10 sati kao i u slučaju ulaska peptida glutena u stanicu. Također možemo vidjeti kako se pri nižim početnim koncentracijama glutena u prvih 10 sati svi peptidi glutena deamidiraju te se njihova koncentracija polagano smanjuje kroz narednih 710 sati. Smanjenje koncentracije deamidiranog glutena predstavlja udio koji se veže na HLA molekule. U slučaju najvećeg prehranbenog unosa smanjenje koncentracije je eksponencijalno te dolazi do puno većeg broja vezanih HLA molekula i u konačnici do jače imunološke reakcije (slika 8).



Slika 7. Koncentracija peptida glutena u lamina propiji (plavo-Gmuc/pm^{ol} L⁻¹ 1004 mg, narančasto Gmuc/pm^{ol} L⁻¹, zeleno Gmuc/pm^{ol} L⁻¹)



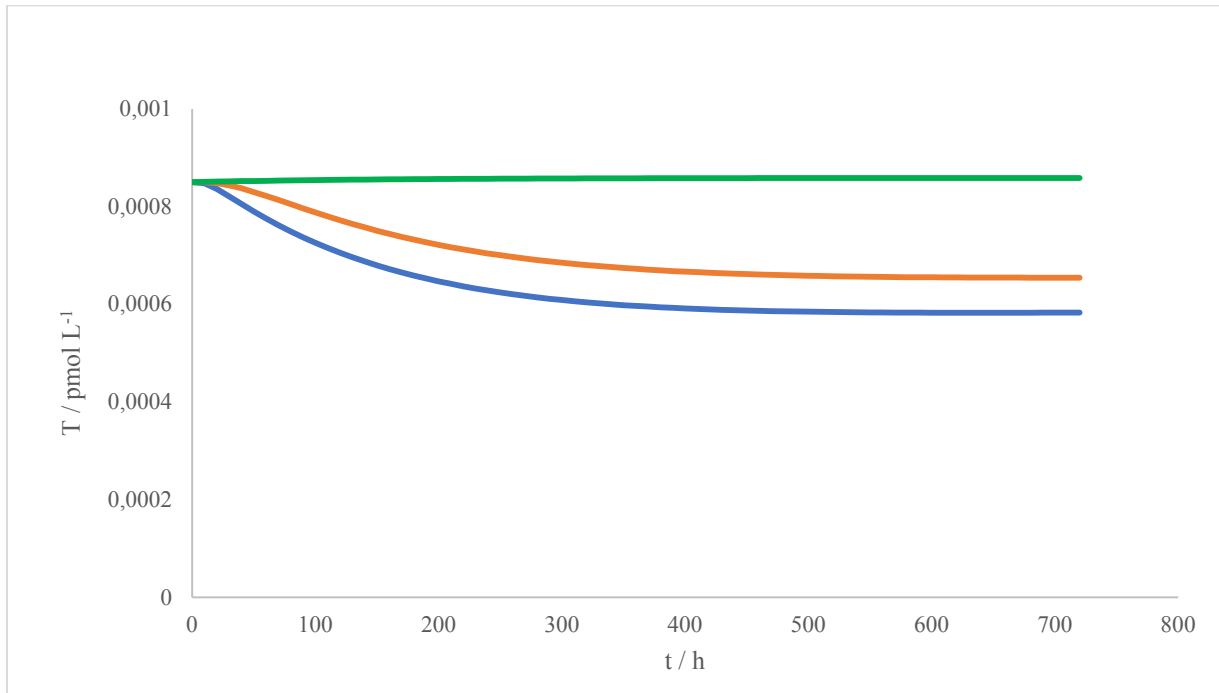
Slika 8. Koncentracija deamidiranih peptida glutena (plavo-Gd/pm^{ol} L⁻¹ 1004 mg, narančasto Gd/pm^{ol} L⁻¹, zeleno Gd/pm^{ol} L⁻¹)

Deamidirani gluteni dolaze do T-stanica vezanjem na HLA receptore antigen prezetirajućih stanica u lamina propriji. T-stanice ne mogu prepoznati peptide glutena ukoliko nije vezan na površinu HLA molekule. Navedenom interakcijom dolazi do aktivacije imunološkog odgovora posredovanog intestinalnim specifičnim CD4+ T-stanicama (Starčević-Čizmarević i sur., 2015). CD4+ je glikoprotein koji se nalazi na površini stanica poput T-pomoćnih stanica, monocita i dendritičkih stanica. Kako bi T-stanice pokrenule imunološku reakciju one moraju prijeći u aktivni oblik (Mazzarella, 2015).

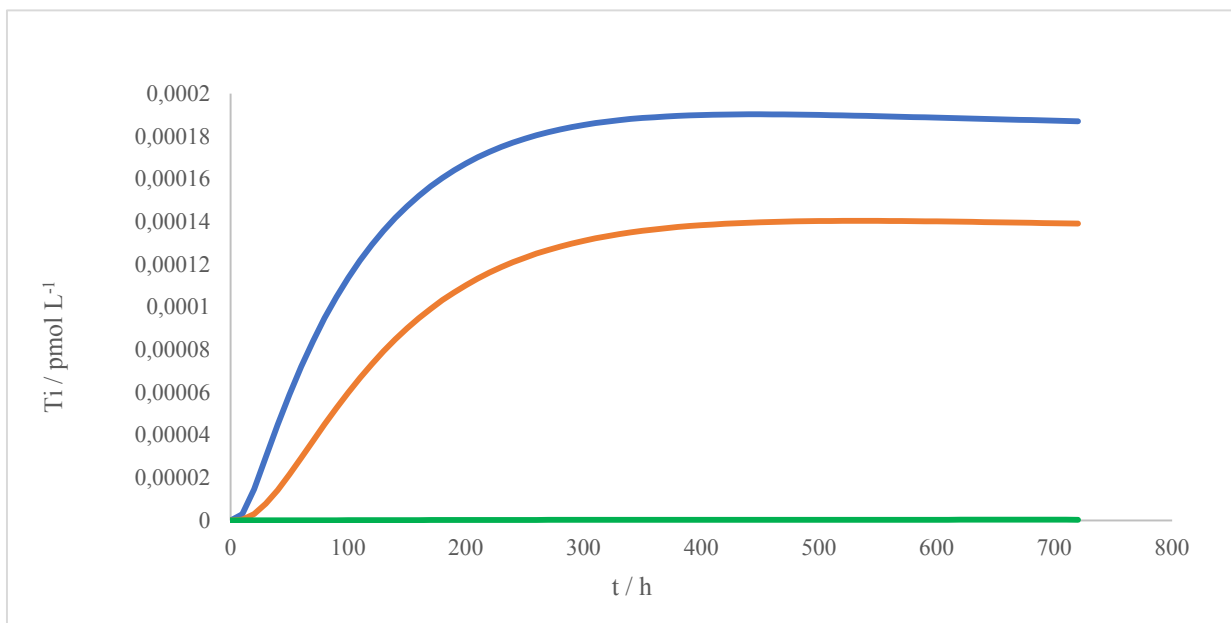
Na slici 9 vidimo smanjenje koncentracije neaktivnog oblika T-stanica, što zapravo predstavlja fazu aktivacije T-stanica i sazrijevanje B-stanica. Početna koncentracija neaktivnih T-stanica iznosi 0,00085 mg. Smanjenje koncentracije je brže, odnosno odmah počinje proces aktivacije T-stanica, što je veća početna koncentracija glutena. U slučaju unosa prehrambenog glutena od 0.1 mg ne dolazi do smanjenja koncentracije T-stanica, točnije neće doći do imunološkog odgovora.

Prije nego dođe do aktivacije T-stanica nastaje međuprodukt odnosno intermedijer T-stanica koji služi kako bi se prikazalo kašnjenje u proizvodnji antitijela uslijed aktivacije T-stanica i sazrijevanja B-stanica (Demin i sur., 2013). Brzina formiranja intermedijera T-stanica raste u prvih 300 sati nakon čega se polako smanjuje (slika 10).

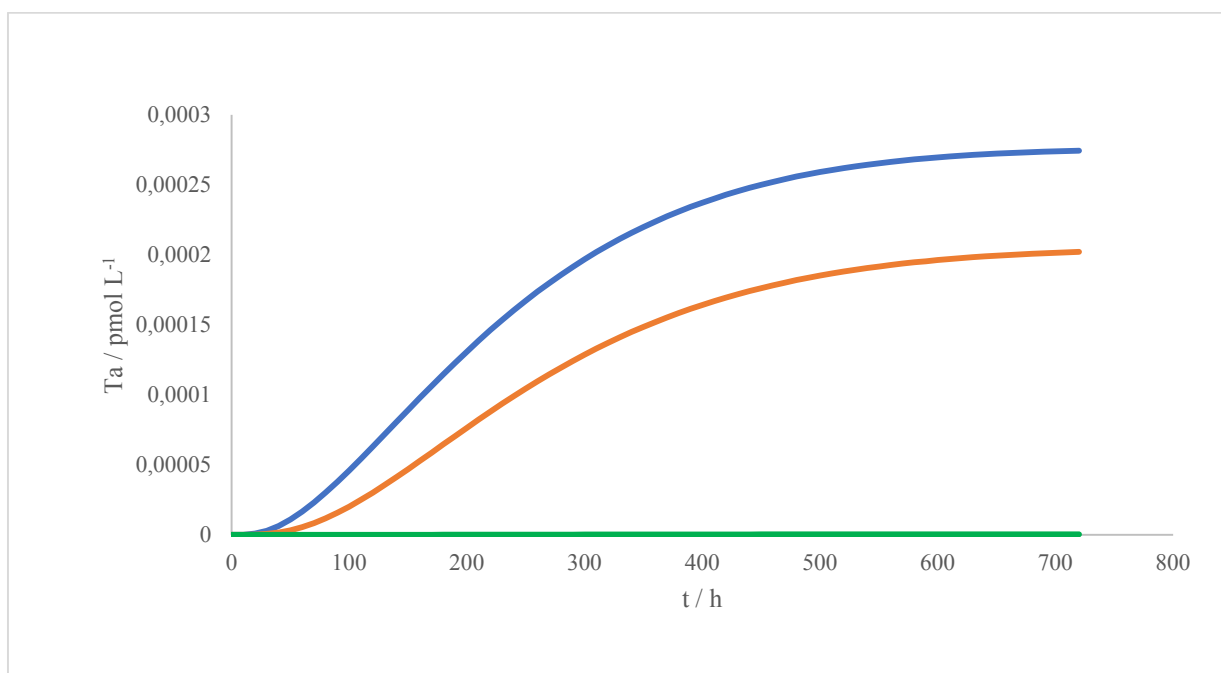
Koncentracija aktivnog oblika T-stanica u prvih nekoliko sati sporo raste zbog prethodno spomenutog među koraka. Nakon toga brzina aktivacije nastavlja eksponencijalno rasti što je vidljivo na slici 11. Aktivacijom T-stanica dolazi do proizvodnje citokina IFN- γ i IL-2, u modelu prikazani kao IF-21, koji uzrokuju upalu i atrofiju sluznice tankog crijeva (Christophersen i sur., 2019).



Slika 9. Koncentracija inaktivnog oblika T-stanica u lamina propriji (plavo-T/pm mol L^{-1} 1004 mg, narančasto T/pm mol L^{-1} , zeleno T /pm mol L^{-1})



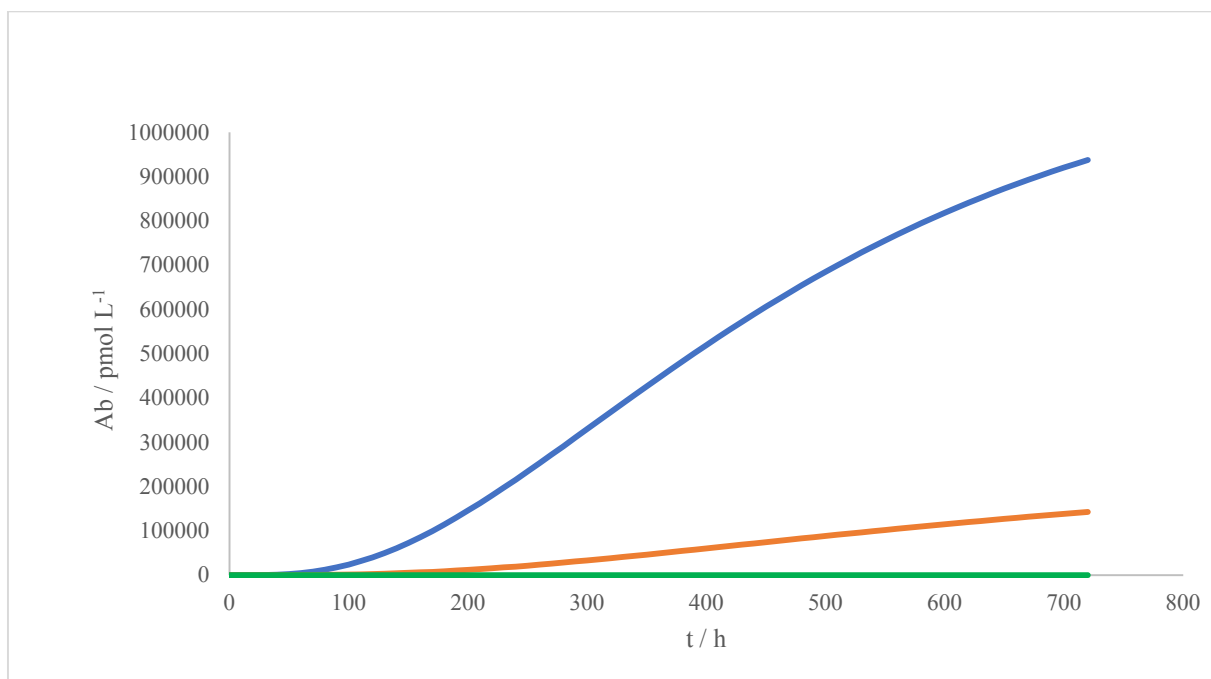
Slika 10. Koncentracija intermedijera T-stanica u lamina propriji (plavo-Ti/pm mol L^{-1} 1004 mg, narančasto Ti/pm mol L^{-1} , zeleno Ti/pm mol L^{-1})



Slika 11. Koncentracija aktivnog oblika T-stanica u lamina propriji (plavo-Ta/pmol L⁻¹ 1004 mg, narančasto Ta/pmol L⁻¹, zeleno Ta /pmol L⁻¹)

Aktivni oblik T-stanica zajedno s B-stanicama potiču proizvodnju antitijela u plazmi stanice koja je ovisna o unosu prehrambenog glutena (slika 12). Anti-TG2 antitijela specifična su za celijakiju te se često koriste kao dijagnostički kriterij. Antitijela se vežu na enzim transglutaminazu, koji sudjeluje u diferencijaciji stanica epitela u tankom crijevu, čime se smanjuje aktivnost enzima što dovodi do povećanja propusnosti epitela. Na taj način vidimo kako antitijela također sudjeluju u nastanku atrofije crijevnih resica (Yu i sur., 2018).

Izbacivanje glutena iz prehrane dovodi do smanjenja koncentracije antitijela u stanicama tankog crijeva. Vidimo kako je prehrambeni unos od 0.1 mg glutena doveo do minimalne proizvodnje antitijela. Do značajnog povećanja koncentracije antitijela dolazi nakon 50. sata te linearno raste kao u slučaju unosa od 1004 mg i 12 mg glutena. Kašnjenje u proizvodnji antitijela objašnjeno je fazom aktivacije T-stranica i sazrijevanjem B-stanica (slika 12).



Slika 12. Koncentracija antitijela u lamina propriji (plavo-Ab/pm mol L^{-1} 1004 mg, narančasto Ab/pm mol L^{-1} , zeleno Ab/pm mol L^{-1})

3.2. ANALIZA LOKALNE OSJETLJIVOSTI MODELA IMUNOLOŠKOG ODGOVORA KOD CELIJAKIJE

Svrha promjene metoda lokalne parametarske osjetljivosti je identifikacija ključnih ulaznih informacija modela (parametri ili početni uvjeti) ili kvantifikacija utjecaja ulaza na izlaz (Marino i sur., 2008). Prema Saltelli i sur. (1999a), analiza osjetljivosti omogućava uvid u ponašanje modela, međusobnu povezanost modela i okoline, te uzajamno djelovanje različitih dijelova modela. Kad je riječ o složenim biološkim modelima postoje različiti uzroci osjetljivost. Kao najvažniji ističu se: (i) potvrda modela (robusnost zaključka modela, kvaliteta pretpostavki modela), (ii) prioriteta istraživanja (koji faktor bi se trebao dalje analizirati ili mjeriti), (iii) pojednostavljenje modela (mogu li se neki dijelovi modela pojednostaviti ili ispraviti) (iv) identifikacija kritičnih ili zanimljivih ulaznih faktora; identifikacija faktora koji međusobno djeluju te koji stoga mogu dati ogromne vrijednosti (pouzdanost sustava), (v) prije procjene

parametara, kako bi se pravi ili numerički eksperiment pomogao postaviti u takvim uvjetima u kojima je osjetljivost izlaza na određeni faktor procijenjena na najveću vrijednost (Saltelli i sur., 2008).

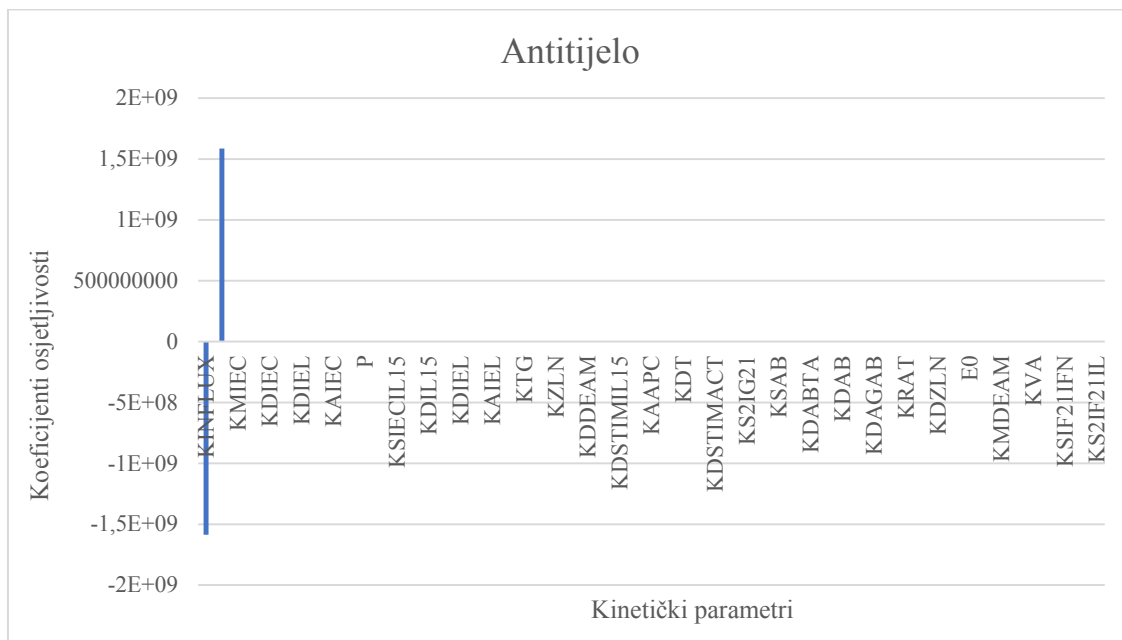
Kada su ulazni faktori kao što su parametri ili početni uvjeti poznati, može se istražiti parcijalna derivacija izlazne funkcije s obzirom na ulazne faktore, a numerički se postiže tako da se naprave brojne simulacije variranja ulaznih faktora oko određene vrijednosti. Takva tehnika se naziva analizom lokalne osjetljivosti jer proučava utjecaj na izlaz modela temeljen na promjenama bliskim određenoj vrijednosti.

Analizom lokalne osjetljivosti modela mijenja se jedan ulazni faktor dok ostali ostaju na početno zadanim vrijednostima te se ponavlja postupak. Matematički postupak se provodi parcijalnim derivacijama izlaznih funkcija s obzirom na ulazne faktore. Analiza je primijenjena na svih 55 kinetičkih parametara. Promatrana je koncentracija svih 16 metabolita modela, odnosno izlaznih veličina. Svaki kinetički parametar uvećan je za 3 % što dovodi do modifikacije rezultata promjenom koncentracija metabolita unutar modela.

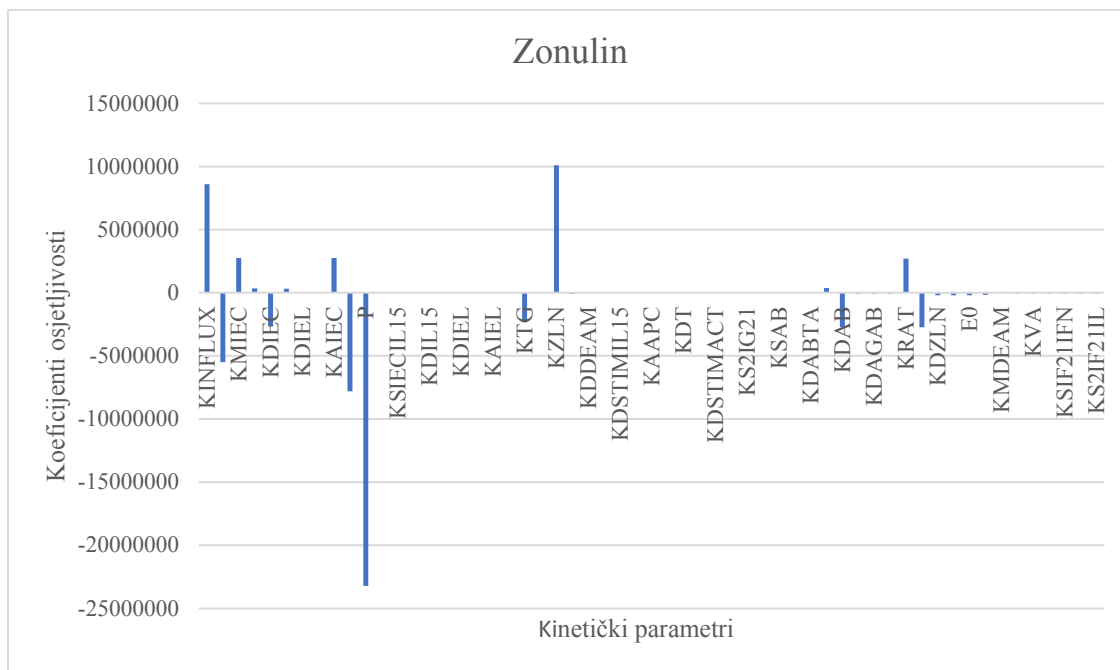
Tablica 5 prikazuje pet najvećih promjena koncentracija metabolita uzrokovanih promjenama kinetičkih parametara. Vidljivo je kako je antitijelo metabolit s najvećom relativnom osjetljivošću. Tri postotno povećanje $k_{inf\ lux}$ parametra dovelo je do najznačajnijeg smanjenja relativne koncentracije, dok je promjena k_d^{gut} parametara dovela do povećanja koncentracije istog metabolita za istu vrijednost. Navedeni parametri sudjeluju u reakcijama ulaska glutena u lumen ($k_{inf\ lux}$) i razgradnje (k_d^{gut}) peptida glutena u lumenu iz čega je vidljivo kako početna koncentracija peptida glutena utječe na koncentraciju antitijela. Slijedeći metabolit je zonulin koji pokazuje najveće osjetljivosti promjenom vrijednosti čak tri kinetička parametra. Parametri K_d^{zln} i $k_{inf\ lux}$ doveli su do povećanja koncentracije, dok je P uzrokovao smanjenje koncentracije zonulina. Parametar P dio je reakcije aktivacije intestinalnih epitelih stanica, dok je K_d^{zln} odgovoran za transport peptida glutena u lamina propriju. Grafički su prikazani najosjetljiviji metaboliti na slikama 13 i 14.

Tablica 5. Popis metabolita koji prikazuju najveću pozitivnu ili negativnu promjenu relativne koncentracije s obzirom na 3 % povećanja vrijednosti kinetičkih parametara

Uvećani kinetički parametar	Relativna osjetljivost metabolita (%)	Metabolit
$k_{inf\ lux}$	-1586303333,33	Antitijelo
k_d^{gut}	1586303333,33	Antitijelo
P	-23211151,28	Zonulin
$k_{inf\ lux}$	8595858,58	Zonulin
$K_d^{z\ln}$	10094606,57	Zonulin



Slika 13. Relativna osjetljivost koncentracije antitijela s obzirom na 3 %-tno povećanje kinetičkih parametara



Slika 14. Relativna osjetljivost koncentracije zonulina s obzirom na 3 %-tno povećanje kinetičkih parametara

Slika 13 grafički prikazuje promjene koncentracije najosjetljivijeg metabolita. Može se vidjeti kako samo 2 kinetička parametra (k_d^{gut} i $k_{inf\ lux}$) uzrokuju najveću promjenu koncentracije antitijela dok ostali parametri ne uzrokuju nikakvu promjenu. Navedeni kinetički parametri određuju reakcije ulaska u lumen i razgradnje peptida glutena u lumenu kao što je prethodno navedeno.

Slika 14 prikazuje drugi najosjetljiviji metabolit, gdje se vidi utjecaj puno više kinetičkih parametara. Najveći utjecaj imaju parametri navedeni u tablici 4. Promjena kinetičkih parametara k_d^{gut} , k_d^{iec} i k_r^g dovodi do umjerenog smanjenja koncentracije zonulina. Navedeni parametri redom utječu na razgradnju peptida glutena u lumenu, aktivaciju intestinalnih epitelih stanica te ulazak peptida glutena iz lumena u lamina propriju. S druge strane parametri k_m^{iec} (regrutacija intestinalnih epitelih stanica), k_a^{iec} (aktivacija intestinalnih epitelih stanica) i k_{rat} (razgradnja kompleksa antitijelo deamidirani peptidi glutena) dovode do povećanja koncentracije metabolita zonulina.

Rezultati relativnih parametarskih koeficijenata osjetljivosti modela imunološkog odgovora kod celijakije prikazani su grafički koristeći uvjetno formatiranje u Excel-u 2016. Korištene su crvena, plava i bijela boja. Crvena označava povećanje koncentracije metabolita, dok plava predstavlja smanjenje koncentracije te bijela boja koja označava područja najmanje osjetljivosti. Gradacija crvene i plave boje pokazuje kod kojih metabolita je došlo do najveće promjene u koncentraciji u odnosu na početnu vrijednost prije povećanja svakog kinetičkog parametara za 3 %.

Na slici 15 vidi se kako je središnji dio modela najintenzivnije obojan. Na temelju toga zaključuje se kako su ti kinetički parametri doveli do najvećih promjena u koncentraciji te se može reći da su 1. i od 13. do 18. reakcije najosjetljivije u modelu. Prva reakcija je ulazak peptida glutena u lumen. Ostale reakcije vezane su za peptide glutena u lamina propriji, počevši od brzine ulaska do razgradnje nativnih i deamidiranih peptida glutena. Također dio reakcija odnosi se na regrutaciju APC, njihovu aktivaciju i razgradnju aktivnog oblika. Iz toga se može zaključiti kako su najvažniji dio modela reakcije vezane uz peptide glutena i antigen prezentirajuće stanice koje prenose deamidirane peptide glutena do T-stanica i aktiviraju imunološku reakciju. Popis kinetičkih izraza nalazi se u eksperimentalnom djelu u tablici 2, dok se u tablici 3 nalazi popis vrijednosti kinetičkih parametara.



Slika 15. Grafički prikaz lokalne osjetljivosti svih metabolita modela imunološkog odgovora kod celijakije s obzirom na 3 % povećanje svih kinetičkih parametara modela

3.3. ANALIZA GLOBALNE OSJETLJIVOSTI PARAMETARA FAST METODOM MODELA IMUNOLOŠKOG ODGOVORA KOD CELIJAKIJE

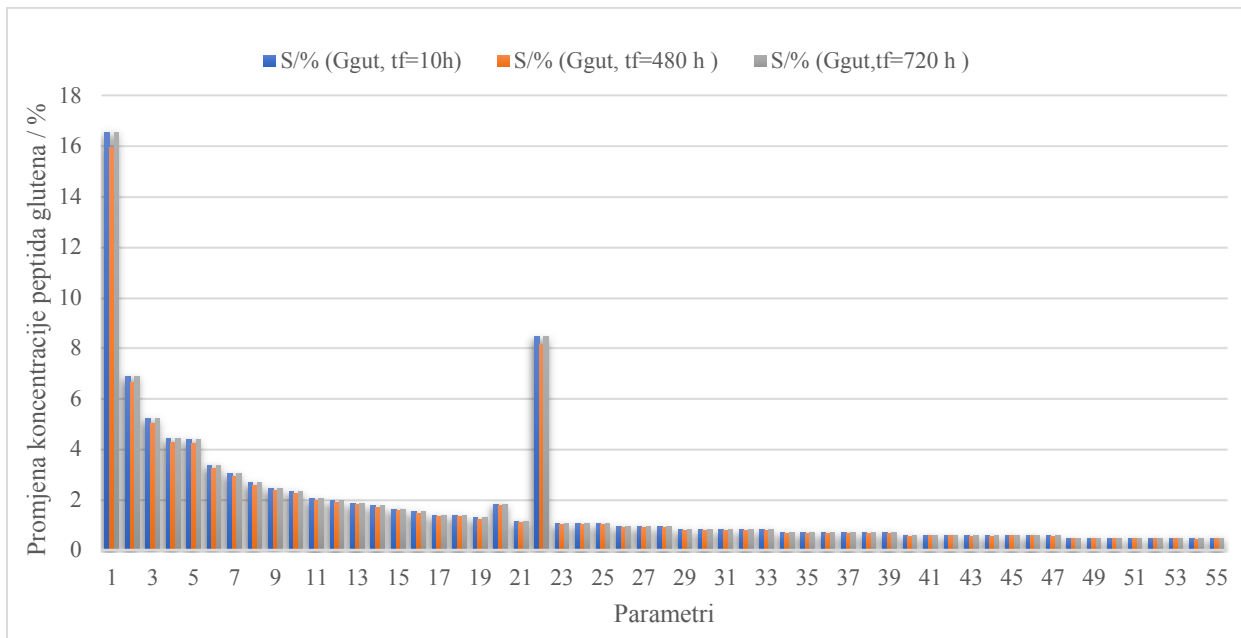
Nepouzdanost procjene parametara modela predstavlja veliki problem u matematičkom modeliranju. Kako bi se nepouzdanost procjene svela na minimum, koriste se analize lokalne i globalne osjetljivosti. FAST metoda se koristi za analizu globalne osjetljivosti. Temelji se na algoritmu pomoću kojeg se određuje osjetljivost kinetičkih parametara modela na način da se istovremeno ispituju promjene svih parametara. Dobiveni rezultati pokazuju koji su kinetički parametri važni za optimalno odvijanje ispitivanog modela (Saletli i sur., 1999). Metabolički putevi sastoje se od brojnih biokemijskih reakcija koje su pod utjecajem različitih kinetičkih parametara. Teško je konstruirati model uključivši sve reakcije pojedinog metaboličkog puta. Iz tog razloga koriste se metode globalne i lokalne osjetljivosti kako bi se odredili koji kinetički parametri nemaju značajan utjecaj na krajnji ishod metaboličkog puta. Na temelju tih rezultata moguće je konstruirati pojednostavljeni model koji će dati iste izlazne rezultate kao i metabolički put u cijelosti. Jedan od primjera je rad McGillen i suradnika (2014) u kojem je konstruiran model metaboličke suradnje glukoze i laktata u tumorskim stanicama nakon čega su istraživali osjetljivost sustava s obzirom na njegove parametre.

Primjenom FAST metode proučavani su istovremeni utjecaji promjena vrijednosti svih 55 kinetičkih parametara modela na promjene u koncentraciji peptida glutena u lumenu i antitijela s obzirom na zadani početni unos glutena iz hrane. Izdvojene su vrijednosti postotka globalne vrijednosti koncentracije peptida glutena i antitijela s obzirom na promjenu kinetičkih parametara u 10., 480. i 720. satu.

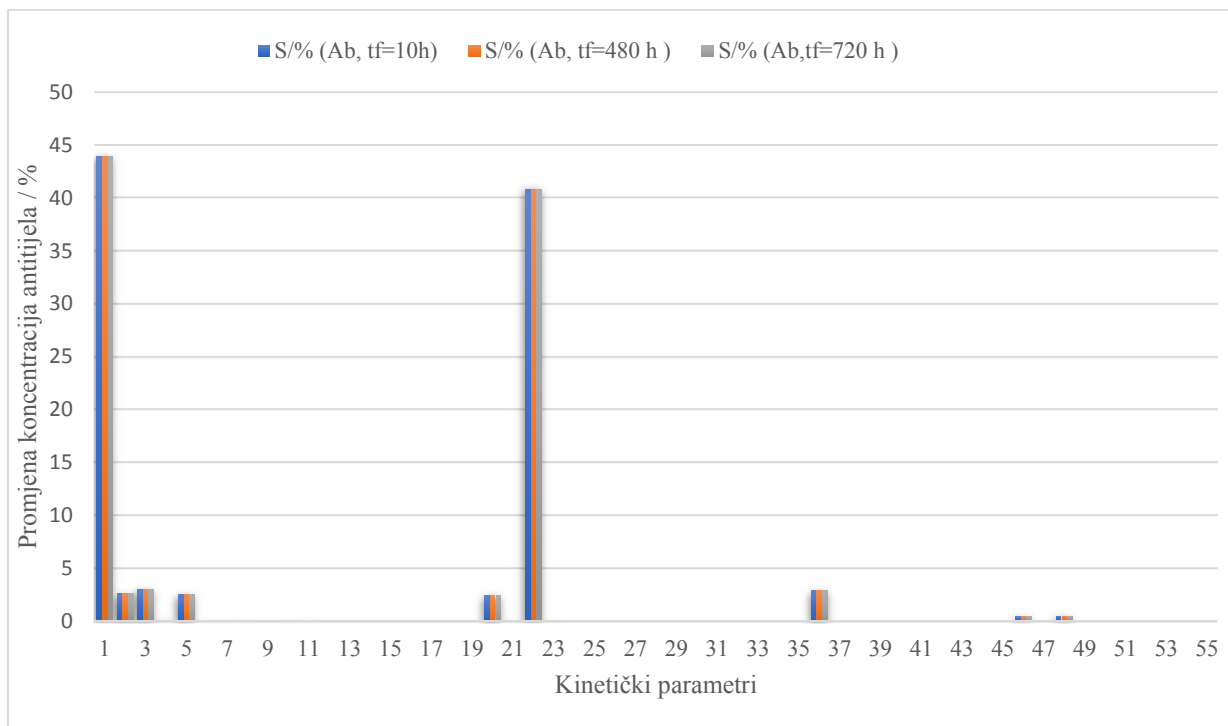
Slika 16 daje prikaz globalne osjetljivosti peptida gluten u lumenu u uvjetima konzumacije jelovnika za opću populaciju kojem je udio glutena 1004 mg. Vidljivo je kako je promjena 1. parametra (k_{inf_lux}) imala najveći utjecaj na promjenu koncentracije peptida glutena u lumenu od 16 %. Navedeni kinetički parametar odgovoran je za reakciju ulazak peptida glutena u lumen. Također promjena k_d^{gut} , k_m^{iec} i K_d^{zln} parametra dovela je do promjene u koncentraciji peptida glutena više od 5 %, dok ostali kinetički parametri svojom promjenom nisu značajno utjecali na izlaznu vrijednost ispitivanog metabolita. k_d^{gut} odgovoran je za reakciju degradacije peptida glutena u lumenu, dok parametar k_m^{iec} određuje stopu sazrijevanja intestinalnih epitelnih stanica. Drugi

najvažniji parametar je K_d^{zln} koji je zaslužan za transport peptida glutena iz lumena u lamina propriju. Nema značajne razlike u rezultatima utjecaja kinetičkih parametara na peptide glutena s obzirom na promatrana vremenska razdoblja.

U slučaju globalne osjetljivosti antitijela gdje je početna koncentracija glutena 1004 mg dobivene vrijednosti utjecaja kinetičkih parametara su jednake tijekom svih 720 sati simulacije. Na slici 17 vidi se kako promjena većine kinetičkih parametara nema utjecaj na promjenu koncentracije antitijela. Kinetički parametar $k_{inf\ lux}$ ima najveći utjecaj na promjenu koncentracije od čak 43,87 % isto kao i kod peptida glutena. Također značajan je K_d^{zln} koji uzrokuje 40,81 % promjene koncentracije antitijela. Može se istaknuti parametre čiji je utjecaj na promjenu koncentracije bio iznad 1 %, a to su: k_m^{iec} , $K_{d_stim}^{act}$, k_d^{gut} , k_d^{iec} i K_d^1 . U tekstu globalne parametarske osjetljivosti peptida glutena objašnjena je uloga značajnih kinetičkih parametara. Ostali navedeni parametri sudjeluju u brzini sazrijevanja T-stanica ($K_{d_stim}^{act}$), apoptozi aktivnog i neaktivnog oblika intestinalnih epitelnih stanica (k_d^{iec}) i aktivaciji intraepitelnih limfocita (K_d^1).



Slika 16. Prikaz globalne parametarske osjetljivosti peptida glutena u lumenu kada je početna koncentracija glutena 1004 mg

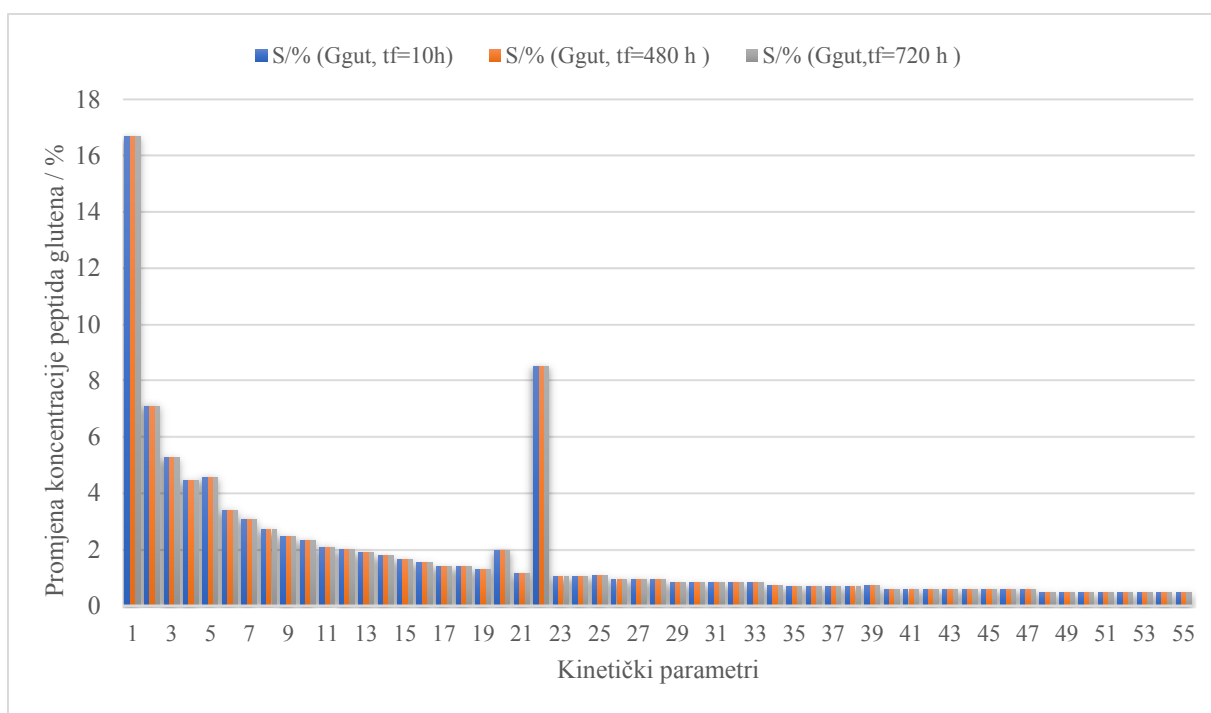


Slika 17. Prikaz globalne parametarske osjetljivosti antitijela kada je početna koncentracija glutena 1004 mg

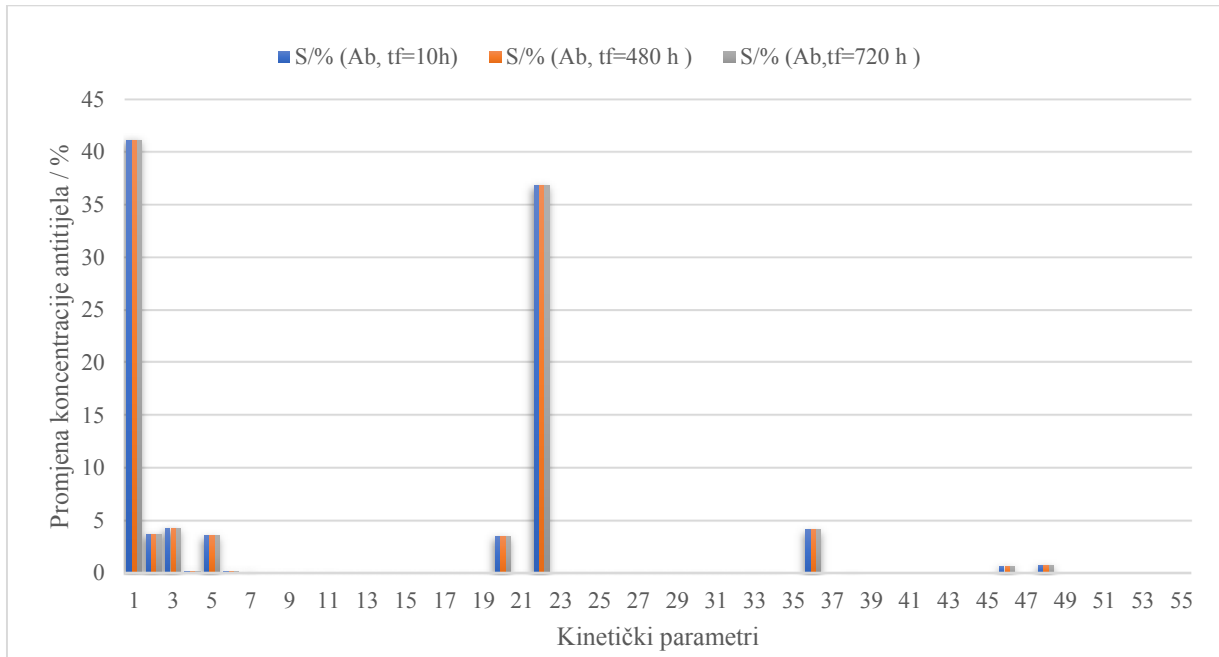
Ispitana je globalna parametarska osjetljivost istih metabolita u idealnim uvjetima, odnosno kada je unos prehranbenog glutena 0,1 mg. Rezultati su pokazali utjecaj istih kinetičkih parametara na promjene koncentracija peptida glutena u lumenu i antitijela kao u slučaju unosa prehranbenog glutena od 1004 mg. Vrijednosti promjena koncentracija razlikuju se u svega 2 %. Na temelju toga može se zaključiti kako početna koncentracija prehranbenog glutena ne utječe na rezultate globalne osjetljivosti (slika 18 i slika 19).

Usporedbom rezultata globalne i lokalne analize osjetljivosti vidljivo je kako se $k_{inf\ lux}$ parametar pokazao ključnim u oba slučaja. Gledajući samo rezultate antitijela, kod lokalne osjetljivosti vidi se utjecaj samo 2 kinetička parametara dok je u globalnoj osjetljivosti vidljiv utjecaj nešto više parametara (slika 17 i slika 19). Do razlike u dobivenim rezultatima dolazi zbog osnovnih pretpostavki svake od metoda. Globalna analiza temelji se na promjeni svih kinetičkih parametara

istovremeno i ne govori o tome ide li promjena u pozitivnom ili negativnom smjeru. S druge strane, lokalna analiza je temeljena na promjeni samo jednog kinetičkog parametra dok je ostalim vrijednost nepromijenjena. Saltelli i suradnici (2008) smatraju kako je globalna analiza točnija od lokalne analize posebno u slučajevima određivanja nelinearne osobine bioloških sustava koje se ne mogu odrediti lokalnom analizom osjetljivosti.



Slika 18. Prikaz globalne parametarske osjetljivosti peptida glutena u lumenu kada je početna koncentracija glutena 0,1 mg



Slika 19. Prikaz globalne parametarske osjetljivosti antitijela kada je početna koncentracija glutena 0,1 mg

4. ZAKLJUČCI

1. Manipulacijom početnih koncentracija peptida glutena u modelu imunološkog odgovora kod celijakije vidljivo je kako povećanjem koncentracije prehrambenog glutena dolazi do povećanja koncentracije T-stanica koje dovode do upale, kao i antitijela koji se koriste kao dijagnostički kriterij u otkrivanju celijakije.
2. Minimalna koncentracija od 0.1 mg glutena neće dovesti do upalnog procesa što dokazuje kako je prehrana bez glutena pravi lijek protiv celijakije. Postoje brojne namirnice u kojima se može „sakriti“ gluten zbog čega je potrebna cjeloživotna edukacija pacijenata.
3. Analizom lokalne osjetljivosti metaboliti antitijelo i zonulin pokazali su se kao najosjetljiviji promjenom vrijednosti pojedinih kinetičkih parametara.
4. Na temelju rezultata lokalne analize ključne reakcije imunološkog odgovora kod celijakije su reakcije koje određuju put peptida glutena u lumenu i lamini propriji. Također ključnim reakcijama pokazale su se reakcije regrutacije i aktivacije antigen prezentirajućih stanica, kao i razgradnju aktivnih oblika. Sve su to reakcije koje dovode do aktivacije T-stanica i početka imunološke reakcije.
5. Rezultati analize globalne i lokalne osjetljivosti potvrđuju kako je kinetički parametar $k_{inf lux}$ najvažniji u modelu imunološkog odgovora kod celijakije.
6. Model imunološkog odgovora kod celijakije ne pruža samo uvid u najvažnije procese tijekom imunološkog odgovor, već se može koristiti u druge svrhe poput predviđanja potencijalnih lijekova koji bi smanjili upale i oštećenja koja nastaju konzumacijom glutena kod osoba oboljelih od celijakije.

5. LITERATURA

- Assor, E., Daviesshaw, J., Marcon, M.A., Mahmud, F.H. (2014) Estimation of Dietary Gluten Content using Total Protein in Relation to Gold Standard Testing in a Variety of Foods. *J. Nutr. Food. Sci.* **4**, 1-4.
- Badimon, L., Vilahur, G., Padro, T. (2017) Systems biology approaches to understand the effects of nutrition and promote health. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **83**, 38-45.
- Bascunan, K.A., Vespa, M.C., Araya, M. (2016) Celiac disease: understanding the gluten-free diet. *Eur. J. Nutr.* **56**, 449-459.
- Beentjes, C. H. L., Taylor-King, J. P., Bayani A., Davis, C. N., Dunster, J. L., Jabbari, S., Mirams, G. R., Jenkinson, C., Kilby, M. D., Hewison, M., Tamblyn, J. A. (2019) Defining vitamin D status using multi-metabolite mathematical modelling: A pregnancy perspective. *J. Steriod. Biochem.* **190**, 152-160.
- Biesiekierski, J.R. (2017) What is gluten? *J. Gastroen. Hepatol.* **32**, 78-81.
- Butterworth, J., Los, L. (2019) Celiac disease. *Medicine* **47**, 314-319.
- Cecilio, A.L., Bonatto, W.B. (2015) The prevalence of HLA DQ2 and DQ8 in patients with celiac disease, in family and in general population. *Arq. Bras. Cardiol.* **28**, 183-185.
- Celiac Disease Foundation (2020) Celiac disease, <<https://celiac.org/celiacdisease/understanding-celiac-disease-2/what-is-celiac-disease/>>. Pristupljeno 28. travnja 2020.
- Christophersen, A., Risnes, L.F., Dahal-Koirala, S., Sollid, L.M. (2019) Therapeutic and Diagnostic Implications of T Cell Scarring in Celiac Disease and Beyond. *Trends. Mol. Med.* **25**, 836-852.
- Ciacci, C., Ciclitira, P., Hadjivassilou, M., Kaukinen, K., Ludvigsson, J.F., McGough, N., Sanders, D.S., Woodward, J., Leonard, J.N., Swift, G.L. (2015) The gluten-free diet and its current application in coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *United. Eur. Gastroent.* **3**, 121-135.
- Crosetto, M., Tarantola, S., Saltelli, A. (2000) Sensitivity and Uncertainty Analysis in Spatial Modelling Based on GIS. *Agric. Ecosyst. Environ.* **81**, 71-79.

- Demin, O. O., Smirnov, S. V., Sokolov, V. V., Cucurull-Sanchez, L., Pichardo-Almarza, C., Flores, V. M., Benson, N., Demin, O. V. (2013) Modeling of celiac disease immune response and the therapeutic effect of potential drugs. *BMC Syst. Biol.* **7**, 56. doi: [10.1186/1752-0509-7-56](https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-56)
- Diaz, F. (2019) System Biology Approaches for Nutrition Research. *Food. Sci. Technol. Res.* **8**, 1-16. doi: [10.1016/B978-0-08-100596-5.22916-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22916-8)
- Farage, P., Zandonadi, R. P., Ginani, V. C., Gandolfi, L., Yoshio Nakano, E., Pratesi, R. (2018) Gluten-Free Diet: From Development to Assessment of a Check-List Designed for the Prevention of Gluten Cross-Contamination in Food Services. *Nutrients.* **10**(9) 1274. doi:[10.3390/nu10091274](https://doi.org/10.3390/nu10091274)
- Funahashi, A., Morohashi, M., Kitano, H., Tanimura, N. (2003) CellDesigner: a process diagram editor for gene-regulatory and biochemical networks. *Biosilico.* **1**, 159-162.
- Gu, Y., Bouvier, L., Tonda, A., Delaplace, G. (2019) A mathematical model for the prediction of the whey protein fouling mass in a pilot scale plate heat exchanger. *Food. Control.* **106**, 106729.
- Gutowski, E. D., Weiten, D., Green, K. H., Rigaux, L. N., Bernstein, C. N., Graff, L. A., Walker, J. R., Duerksen, D. R., Silvester, J. A. (2020) Can individuals with celiac disease identify gluten-free foods correctly? *Clin. Nutr. ESPEN* **36**, 82-90.
- Hassell Sweatman, C. (2020) Mathematical model of diabetes and lipid metabolism linked to diet, leptin, sensitivity, insulin sensitivity and VLDL TG clearance predicts paths to health and type diabetes. *J. Theor. Biol.* . **486**, 110037. doi: [10.1016/j.jtbi.2019.110037](https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2019.110037)
- Jnawali, P., Kumar, V., Tanwar, B. (2016) Celiac Disease: Overview and considerations for development of gluten-free foods. *Food. Sci. Technol. Int.* **5**(4): 159-176.
- Klipp, E., Liebermeister, W., Wierling, C., Kowald, A. (2016). *Systems Biology*. 2nd ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, str. 3.
- La Vieille, S., Pulido, O. M., Abbott, M., Koerner, T. B., Godefroy, S. (2016) Celiac Disease and Gluten-Free Oats: A Canadian Position Based on a Literature Review. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, 10. doi: [10.1155/2016/1870305](https://doi.org/10.1155/2016/1870305)
- Lee, H. J., Anderson, Z., Ryu, D. (2014) Gluten contamination in foods labeled as “gluten free” in the United States. *J. Food. Prot.* **77**(10), 1830-1833.

- Leonard, M. M., Cureton, P., Fasano, A. (2017) Indications and use of the gluten contamination elimination diet for patients with non-responsive celiac disease. *Nutrients*. **9**(10) 1129. doi: [10.3390/nu9101129](https://doi.org/10.3390/nu9101129)
- Marino, S., Hogue, I. B., Ray, C. I., Kirschner, D. E. (2008) A Methodology For Performing Global Uncertainty And Sensitivity Analysis In Systems Biology. *J. Theor. Biol.* **254**, 178-196.
- Matsuoka, Y., Funahashi, A., Ghosh, S., Kitano, H. (2014) Modeling and Simulation Using CellDesigner. *Method. Mol. Cell. Biol.* **1164**, 45-121. doi: [10.1007/978-1-4939-0805-9_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0805-9_11)
- Mazzarella, G. (2015) Effector and suppressor T cells in celiac disease. *World. J. Gastroenterol.* **21**, 7349-7356.
- McGillen, J. B., Kelly, C. J., Martinez-Gonzalez, A., Martin, N. K., Gaffney E. A., Maini, P. K., Perez-Garcia, M. V. (2014) Glucose–lactate metabolic cooperation in cancer: Insights from a spatial mathematical model and implications for targeted therapy. *J. Theor. Biol.* **361**, 190-203.
- Meijer, C., Shamir, R., Szajewska, H., Mearin, L. (2018) Celiac Disease Prevention. *Front.Pediatr.* **6**, 368 . doi: [10.3389/fped.2018.00368](https://doi.org/10.3389/fped.2018.00368)
- Novak, S. (2017) Prehrana bez glutena – lijek za oboljele od celijakije. Udruga oboljelih od celijakije Sjeverozapadne Hrvatske, <<http://www.celijakija-szh.hr/2017/04/06/prehrana-bezglutena-lijek-za-oboljele-od-celijakije/>> pristupljeno 29. travnja 2020.
- Odluka o standardu prehrane bolesnika u bolnicama (2015) Narodne novine 59 (NN 59/2015), Zagreb.
- Oxentenko, A. S., Rubio-Tapia, A. (2019) Celiac Disease. *Mayo. Clin. Proc.* **94**(12): 2556-2571.
- Pellegrini, N., Agostoni, C. (2015) Nutritional aspects of gluten-free products. *J. Food. Agric. Environ.* **95**, 2380-2385.
- Panjkota Krbavčić, I. (2008) Prehrana kod celijakije. *Medicus* **18**, 87-92.
- Popp A., Kivela, L., Fuchs, V., Kurppa, K. (2019) Diagnosing Celiac Disease: Towards WideScale Screening and Serology-Based Criteria? *Gastroenterol. Res. Pract.* **2019**, 10-14. doi: [10.1155/2019/2916024](https://doi.org/10.1155/2019/2916024)

- Qian, G., Mahdi, A. (2020) Sensitivity analysis methods in the biomedical sciences. *Math. Biosci.* **323**, 108306. doi: [10.1016/j.mbs.2020.108306](https://doi.org/10.1016/j.mbs.2020.108306)
- Rostami, K., Bold, J., Parr, A., Johnson, M. W. (2017) Gluten-free Diet Indications, Safety, Quality, Labels and Challenges. *Nutrients.* **9** (8): 846 doi: [10.3390/nu9080846](https://doi.org/10.3390/nu9080846)
- Rubio-Tapia, A., Hill, I. D., Kelly, C., Calderwood, A. H., Murray, J. A. (2013) ACG Clinical Guidelines: Diagnosis and Management of Celiac Disease. *Gastroenterology* **108**, 656-676.
- Saltelli, A., Ratto, M., Andres, T., Campolongo, F., Cariboni, J., Gatelli, D., Saisana, M., Tarantola, S. (2008) *Global Sensitivity Analysis: The Primer*, Wiley, Chichester. 10-12.
- Saltelli, A., Tarantola, S., Chan, K. P. S. (1999) A Quantitative Model-Independent Method for Global Sensitivity Analysis of Model Output. *Technometrics.* **41**, 39-56.
- Shannahan, S., Leffler, D. A. (2017) Diagnosis and Updates in Celiac Disease. *Gastrointest. Endoscopy.* **27**, 79-92.
- Starčević-Čizmarević, B., Mijandrušić-Sinčić, V., Licul, M., Kapović, S., Ristić, S. (2015) Geni i celijakija. *Paediatr. Croat.* **59**, 88-94.
- Šarić, N. (2017) *Određivanje količine glutena u bezglutenskim proizvodima ELISA metodom.* Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
- Tye-Din, J. A., Galipeau, H. J., Agardh, D. (2018) Celiac Disease: A Review of Current Concepts in Pathogenesis, Prevention, and Novel Therapies. *Front. Pediatr.* **6**:350. doi: [10.3389/fped.2018.00350](https://doi.org/10.3389/fped.2018.00350)
- Vici, G., Belli, M., Biondi, M., Polzonetti, V. (2016) Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review. *Clin. Nutr.* **35**, 1236-1241.
- Votava-Raić, A., Tješić-Drinković, D., Omerza, L. (2006) CELIJAKIJA Coeliac Disease. *Pediatrics.* **2**(2),133–53.
- Woods-Avena, C., Mangione, R. A., Wu, W. K. (2018) Exploring the Community Pharmacist's Knowledge of Celiac Disease. *Am. J. Pharm. Educ.* **82**, 100- 105.
- Yu, X. B., Uhde, M. D., Green, P. H., Alaedini, A. (2018) Autoantibodies in the Extraintestinal Manifestations of Celiac Disease. *Nutrients.* **10** (8): 1123. doi: [10.3390/nu10081123](https://doi.org/10.3390/nu10081123)

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je moj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u izradi istoga nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Sandra Remenar

