

Izrada upitnika o čimbenicima koji utječu na sastav crijevne mikrobiote i usporedba s eksperimentalno određenim sastavom

Čermak, Dražena

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:844027>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, travanj 2023.

Dražena Čermak

IZRADA UPITNIKA O
ČIMBENICIMA KOJI UTJEČU NA
SASTAV CRIJEVNE MIKROBIOTE I
USPOREDBA S
EKSPERIMENTALNO ODREĐENIM
SASTAVOM

Rad je izrađen pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Jurice Žučka (Prehrambeno-biotehnološki fakultet), uz pomoć dr. sc. Luke Bočkora (Institut za antropologiju).

Diplomski rad izrađen je u okviru Pilot projekta crijevna mikrobiota radno-aktivne populacije RH, financiranog od strane Institucijskog projekta Instituta za antropologiju i Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, pod voditeljstvom dr. sc. Luke Bočkora i izv. prof. dr. sc. Jurice Žučka.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za bioinformatiku

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

IZRADA UPITNIKA O ČIMBENICIMA KOJI UTJEČU NA SASTAV CRIJEVNE MIKROBIOTE I
USPOREDBA S EKSPERIMENTALNO ODREĐENIM SASTAVOM

Dražena Čermak, univ. bacc. nutr. 0058208551

Sažetak: Ljudska mikrobiota u fokusu je istraživanja više no ikad zbog brojnih dokaza o njenoj povezanosti s ljudskim zdravljem i vitalnosti, neovisno o tome radi li se o bakterijama usne šupljine, kože, reproduktivnog sustava, očiju, uha ili gastrointestinalnog sustava. Sastav crijevne mikrobiote ovisi o brojnim biološkim čimbenicima (dob, rasa, spol, bolest) i čimbenicima životnog stila (tjelesna aktivnost, pušenje, alkohol). Bolesti poput dijabetesa, upalnih bolesti crijeva i pretilosti povezuju se s karakterističnim sastavom crijevne mikrobiote, bilo prisutnošću ili odsutnošću nekih rodova i vrsta ili promjenom njihove zastupljenosti. Zbog toga se mikrobiota istražuje kao svojevrsni biomarker zdravlja. Cilj ovog rada bio je istražiti i opisati sastav crijevne mikrobiote s obzirom na različite biološke čimbenike i čimbenike životnog stila. Podaci su prikupljeni anketom i iz bioloških uzoraka stolice ispitanika. Prema rezultatima nije uočena statistički značajna razlika u sastavu crijevne mikrobiote skupina ispitanika s obzirom na dob, spol, bračni status, tip prehrane, tip stolice, naviku pušenja i spavanja.

Ključne riječi: crijevna mikrobiota, životni stil, zdravlje, QIIME

Rad sadrži: 54 stranice, 17 slika, 3 tablice, 158 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Jurica Žučko

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Ivana Rumora Samarin
2. izv. prof. dr. sc. Jurica Žučko
3. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
4. prof. dr. sc. Antonio Starčević (zamjena)

Datum obrane: 28. travnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Bioinformatics

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

Graduate university study programme: Nutrition

THE DEVELOPMENT OF A QUESTIONNAIRE ON FACTORS AFFECTING THE COMPOSITION OF GUT MICROBIOTA AND COMPARISON WITH EXPERIMENTALLY DETERMINED COMPOSITION

Dražena Čermak, univ. bacc. nutr. 0058208551

Abstract: The human microbiota is at the focus of researcher because of its connection to health. The composition of gut microbiota is under the influence of many biological factors (age, sex, illness) and lifestyle habits (physical activity, smoking, drinking). Diseases such as diabetes, inflammatory bowel disease and obesity are linked to the specific bacterial composition caused by presence or loss of certain genera or change in their abundance. For this reason, the role of gut microbiota as a biomarker of health should be examined. The aim of this research was to analyse the composition of gut microbiota in regard to biological factors and lifestyle habits. The data was collected through a questionnaire and stool samples of participants. The results show no statistical significance in microbiota composition between groups in regard to age, sex, marital status, type of diet and stool, smoking and sleeping habits.

Keywords: *gut microbiome, lifestyle, health, QIIME*

Thesis contains: 54 pages, 17 figures, 3 tables, 158 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Jurica, Žučko, PhD, Full professor

Reviewers:

1. Ivana, Rumora Samarin, PhD, Associate professor
2. Jurica, Žučko, PhD, Associate professor
3. Andreja, Leboš Pavunc, PhD, Associate professor
4. Antonio, Starčević, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: April 28th, 2023

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. LJUDSKA MIKROBIOTA.....	3
2.2. SASTAV CRIJEVNE MIKROBIOTE	5
2.3. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA SASTAV CRIJEVNE MIKROBIOTE	8
2.3.1. Biološki čimbenici	9
2.3.2. Čimbenici životnog stila	11
2.4. DISBIOZA	14
2.5.1. Pretilost	16
2.5.3. Dijabetes.....	16
2.5. CRIJEVNA MIKROBIOTA KAO BIOMARKER ZDRAVLJA	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1. ODABIR ISPITANIKA	19
3.2. METODE KORIŠTENE ZA PRIKUPLJANJE PODATAKA	19
3.3. OBRADA PODATAKA.....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. OPĆI PODACI O ISPITANICIMA	23
4.2. TAKSONOMSKA KLASIFIKACIJA UZORAKA	26
4.3. ALFA RAZNOLIKOST U UZORCIMA.....	29
4.4. BETA RAZNOLIKOST U UZORCIMA.....	33
5. ZAKLJUČCI.....	36
6. LITERATURA.....	37

PRILOZI

PRILOG 1. UPITNIK O FAKTORIMA KOJI UTJEČU NA SASTAV CRIJEVNE MIKROBIOTE

1. UVOD

Crijevnu mikrobiotu sačinjavaju anaerobni mikroorganizmi koji za svoj rast preferiraju okoliš bez kisika. Takve je mikroorganizme bilo nemoguće izolirati i uspješno uzgojiti u laboratorijima sve do 50-ih i 60-ih godina prošlog stoljeća. Upravo zbog toga, proučavanje mikroorganizama uzgojenih na Petrijevim zdjelicama često nije davalo rezultate ili ih se trebalo uzimati s oprezom jer nisu predstavljali istinitu prisutnost i/ili aktivnost mikroorganizama u interakciji s drugim organizmima u njihovom prirodnom okruženju (Goins, 2019). Međusobnu isprepletenost mikrobne zajednice uočio je otac mikrobne ekologije Sergei Nikolaievich Winogradsky još u 19. stoljeću radeći na otkrivanju reakcija uključenih u ciklus dušika. Mikroorganizmi jedne vrste, zaključio je, mogu osiguravati idealne uvjete za život drugima tako da produkti metabolizma jednih postaju supstrati za druge mikroorganizme. Ovakav oblik simbioze može se pronaći posvuda u našem tijelu, od površine kože do duboko u probavnom traktu (Pariante, 2019).

Istraživanja crijevne mikrobiote sežu dublje u povijest nego što bi se na prvi pogled moglo pretpostaviti. Anthonie van Leeuwenhoek otkrio je prve mikroorganizme, odnosno animakule kako ih je sam opisao, koristeći se vlastitim mikroskopima iz kućne radinosti još u 17. stoljeću i utabao put razvoju mikrobiologije. Koch je definirao pojam patogenosti mikroorganizama imenujući ih uzročnicima ljudskih i životinjskih bolesti (Berg i sur., 2020). Taj se pojam i teorija među znanstvenicima i liječnicima duboko ukorijenio do 19. stoljeća. Usporedno, otkrića prisutnosti i raznolikosti mikroorganizama na ljudskom tijelu i u njemu rađala su nove ideje, a razmišljanje da su mikroorganizmi u ljudima i na ljudima tek bezazleni, neaktivni stanovnici našeg tijela polako se počinje preispitivati (Farré-Maduell i Casals-Pascual, 2019).

Istraživanje Theodora Eschericha značajno je iz nekoliko razloga; dalo je sveobuhvatni prikaz mikrobiote iz fecesa novorođenčadi opisujući po prvi puta bakteriju, kasnije nazvanu *Escherichia coli*, prisutnu u uzorcima fecesa zdrave djece, zatim opisan je bakterijski sastav crijeva novorođenčadi i njena promjena od rođenja nadalje te uloga u razgradnji hrane (Friedmann, 2014). Henry Tissier nadovezao se otkrićem anaerobne kulture u fecesu novorođenčadi, što je dovelo 1899. godine do spoznaje da najbrojnija bakterija u fecesu novorođenčadi ipak nije *E. coli*, nego anaerobna *Bacillus bifidus communis*, danas poznata kao

rod *Bifidobacterium*. Osim toga, opazio je i da se ovaj rod u velikim količinama nalazi u fecesu zdrave djece, no da ga je vrlo teško pronaći u slučaju proljeva (Milani i sur., 2017; Tanaka i Nakayama, 2017). Godine 1868. Herman Senator objavio je da otrov koji nastaje u gastrointestinalnom traktu može ući u krvotok i imati utjecaj na cijeli sustav, iz čega je kasnije proizašla teorija autointoksikacije (Bouchard, 2011). Istražujući bakterijski antagonizam, Alfred Nissle otkrio je tijekom Prvog svjetskog rata soj *E. coli*, kasnije nazvan *E. coli* Nissle 1917, koji je zaustavljao rast enteropatogena uzročnika proljeva na Balkanu. Izolirao ga je iz crijevne mikrobiote vojnika koji nije podlegao bolesti i patentirao kao terapiju pod nazivom Mutaflor koja je i danas dostupna na prodaju (Sonnenborn, 2016).

U posljednjim desetljećima istraživanje mikrobiote značajno je napredovalo u svakom pogledu. Danas se proučavaju fenomeni translokacije bakterija i propusnih crijeva kako bi se otkrilo jesu li samo posljedica ili čak uzročnik oboljenja te što je bio okidač za njihovo nastajanje (Farré-Maduell i Casals-Pascual, 2019). Spoznali smo postojanje odnosa između mozga i bakterija u crijevima te otkrivamo mehanizme kojima bakterije komuniciraju s neuronima izravno i neizravno. Fekalna transplantacija primjenjuje se kao uspješna terapija u liječenju brojnih bolesti, kao što su infekcije i upalne bolesti crijeva. Razvojem računalnih programa, metoda i moći obrade podataka omogućava se sve detaljnije proučavanje metagenoma, pa se i danas otkrivaju novi, u laboratoriju neuzgojene sojevi mikroorganizama. Spoznaje iz ovog područja, trebale bi pridonijeti razvoju personaliziranog pristupa liječenju pojedinaca ili, još poželjnije, personaliziranom pristupu prevenciji bolesti i povećanju kvalitete života duboko u starost (Pariente, 2019).

Cilj ovog istraživanja bio je izraditi i ocijeniti upitnik prepoznatih vanjskih čimbenika koji utječu na sastav crijevne mikrobiote sa sastavom crijevne mikrobiote ispitanika. Upitnik pokriva pitanja o osnovnim i antropometrijskim podacima, životnom stilu i načinu prehrane ispitanika. Odgovori na ova pitanja dobiveni su analizom ispunjenih upitnika i sekvencioniranjem crijevne mikrobiote ispitanika. Rezultati ovog istraživanja bit će korišteni kao baza podataka za raspisivanje i provođenje daljnjih istraživanja na području crijevne mikrobiote i zdravlja ljudi na području Republike Hrvatske.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. LJUDSKA MIKROBIOTA

Pojam mikrobiota dolazi od grčkih riječi μικρός koja znači mali i βίωτα koja znači živi organizmi ekosustava ili nekog određenog područja, dok pojam mikrobiom dolazi od grčkih riječi μικρός koja znači mali i βίος kojoj je dodan nastavak om, a znači život. Iako se smatra da je *mikrobiom* skovao Joshua Lederberg 2001. godine definirajući ga kao „zajednicu komenzalnih, simbiotskih i patogenih mikroorganizama u tijelu ili nekom drugom okolišu“, sam pojam se spominje u radu Whipps i sur. još 1988. godine (Goins, 2019). Potonja se definicija smatra znatno inkluzivnijom i točnijom jer uključuje i interakcije s okolišem, što je vrlo važno kad se govori o mikroorganizmima, stoga je predloženo da se ona i službeno upotrebljava uz određene nadopune. Prema Berg i sur. (2020) mikrobiom je definiran kao karakteristična mikrobna zajednica koja nastanjuje točno definirano stanište koje ima jasna fizikalno kemijska svojstva. Mikrobiom ne uključuje samo mikroorganizme poput bakterija, virusa, arheja, funga i protozoa, nego obuhvaća i njihovu lepezu aktivnosti što zajedno čini specifičnu ekološku nišu. Mikrobiom tvori dinamičan i interaktivan mali ekosustav koji je sklon promjenama tijekom vremena i u svojoj veličini, a integriran je u makro-ekosustave poput eukariotskih domaćina gdje ima važnu ulogu u njihovom funkcioniranju i zdravlju“. U lepezu aktivnosti ubrajaju se razni metaboliti (signalne molekule, toksini, anorganske i organske molekule), strukturni elementi (proteini, lipidi, nukleinske kiseline, polisaharidi), ali i fagi, virusi, izvanstanična DNA (Berg i sur., 2020).

Prosječnog muškarca gradi oko $30 \cdot 10^{12}$ ljudskih stanica i $38 \cdot 10^{12}$ bakterijskih stanica što čini omjer 1,2:1 u korist bakterija, dok je kod žena omjer 2,1:1 u korist bakterija s $21 \cdot 10^{12}$ ljudskih stanica i $44 \cdot 10^{12}$ bakterijskih (Sender i sur., 2016). Ovako velike brojke potaknule su rasprave koliko su ljudi zapravo „ljudski“ i kako redefinirati organizam čija je polovica stanica porijeklom drugi organizam. Odnos čovjeka i njegove mikrobiote mnogo je više od simbioze, stoga je osmišljen novi, holistički pojam za njegovu definiciju – holobiont. Holobiont je definiran kao jedinica biološke organizacije koja se sastoji od domaćina i njegove mikrobiote, a usko je vezana uz pojam hologenoma; predstavlja ukupni genom domaćina, njegovih organela i mikrobiote (Bordenstein i Theis, 2015).

Cjelokupna ljudska mikrobiota može se podijeliti na nekoliko manjih skupina koje su usko vezane uz dio tijela koji nastanjuju; mikrobiotu reproduktivnog sustava, kože, očiju, uha, nazofaringealnog trakta, usne šupljine i gastrointestinalnog trakta (Reynoso-García i sur., 2022).

Ženski reproduktivni sustav pokazuje najmanju raznolikost u vrstama mikroorganizama. Ovdje dominira rod *Lactobacillus* čiji metaboliti mliječna kiselina, bakteriocini, vodikov peroksid i reaktivne kisikove čestice imaju ulogu u održavanju optimalne pH vrijednosti manje od 4,5 i izgradnji kemijske barijere koja sprječava adherenciju i kolonizaciju patogenima (Valenti i sur., 2018). Ovisno o porijeklu, žene mogu imati jedan od 5 tipova mikrobiote spolnog sustava, od čega bjelkinje najčešće imaju tip 1 u kojem dominiraju *L. crispatus*, a afroamerikanke i latinoamerikanke imaju tip 4 gdje dominiraju rodovi *Prevotella*, *Atopobium*, *Sneathia* i *Gardnerella* (Paola i sur., 2017).

Mikrobiota kože pod utjecajem je različitih karakteristika teksture kože kao što su vlažnost, masnoća, žlijezde, pH kože, ali i vanjskih čimbenika poput svakodnevne higijene i njege, primjene antibiotika, opekline, odjeće (Chaudhari i sur., 2020; Sanjar i sur., 2020; Bouslimani i sur., 2019; Chien i sur., 2019). Najbrojniji rodovi bakterija su *Staphylococcus*, *Propionibacterium*, *Cornebacterium*, *Streptococcus*, dok su od funga zastupljeni *Malassezia*, *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp. i *Rhodotorula* spp. (Jo i sur., 2017; Gupta i Kohli, 2004).

Mikrobiotom oka dominiraju rodovi *Staphylococcus*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*. Disbioza ove mikrobiote povezana je s keratokonjuktivitisom, MALT limfomom i povišenim razinama šećera vezanim uz dijabetes (Suzuki i sur., 2020; Asao i sur., 2019).

Mikrobiota uha slična je mikrobioti kože te njome dominiraju *Corynebacterium*, *Staphylococcus* i *Propionibacterium*. Novije istraživanje otkrilo je da je i srednje uho, koje se prije smatralo sterilnim okruženjem, kolonizirano bakterijama i to Proteobacteria, Actinobacteria i Firmicutes (Jervis-Bardy i sur., 2019).

Nazofaringealni trakt dio je gornjeg dišnog sustava, a nastanjuju ga rodovi *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Alloiococcus*, *Haemophilis*, *Streptococcus*, *Granulicatella* i *Moraxella*. Promjene u sastavu i raznolikosti bakterija povezane su s pojavom astme, influence A virusa, bronhitisa, akutne respiratorne bolesti gornjeg dišnog sustava (Wen i sur., 2018; Teo i sur., 2015).

Mikrobiota usne šupljine druga je najraznovrsnija u ljudskom tijelu, s 10^{11} bakterija u plaku i slini (Sender i sur., 2016). Zube, jezik, slinu, meka i tvrda tkiva nastanjuju različite vrste bakterija (Chen i sur., 2018), a najbrojnija su bakterijska koljena *Firmicutes*, *Bacteroidetes*,

Proteobacteria, *Actinobacteria*, *Spirochaetes*, *Fusobacteria* te fungalni rodovi *Candida*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* (Welch i sur., 2016). Ove mikrobnе zajednice igraju važnu ulogu u razvoju bolesti poput karijesa, gingivitisa, periodontitisa i ispadanja zubi (Dewhirst i sur., 2010).

2.2. SASTAV CRIJEVNE MIKROBIOTE

Gastrointestinalni trakt obiluje bakterijama od svog početka do kraja. Prema procjenama, u želucu, duodenumu i jejunumu se nalazi oko 10^7 bakterija, u ileumu se 10^{11} , a debelo crijevo je bakterijama najnastanjeniji dio tijela čovjeka s 10^{12} stanica (Sender i sur., 2016). Tablica 1 ukratko prikazuje najzastupljenije predstavnike mikroorganizama u sedam dijelova gastrointestinalnog trakta. Različitošћ u zastupljenosti i brojnosti pojedinih vrsta rezultat je različite funkcije i fizikalno-kemijskih svojstava okoliša koji vlada u pojedinom organu. Želudac je izrazito kisela sredina s pH između 1,8 i 3,5 što je optimalni medij za djelovanje enzima pepsina čija je uloga razgradnja proteina. Nasuprot tome, tanko crijevo je zbog lučenja žuči i enzima gušćerače neutralan do blago lužnati medij s pH vrijednostima između 6 i 8 (Guyton i Hall, 2011).

Mikrobiota jednjaka slična je onoj iz usne šupljine, točnije mikrobioti koju se može pronaći u slini i koja je stabilna unatoč redovitom korištenju paste za zube. Promjene u mikrobioti jednjaka koreliraju sa znatnim promjenama u ekspresiji gena vezanih u tkivo jednjaka te su povezane s različitim bolestima poput eozinofilnog ezofagitisa, gastroezofagealne refluksne bolesti (GERB-a) i Barrettovog jednjaka. Stoga bi u budućnosti terapija namijenjena modulaciji mikrobiote mogla biti novi način ranog otkrivanja i liječenja ovih oboljenja (Annavajhala i sur., 2020).

Za želudac je vrlo karakteristično da ga nastanjuje, točnije inficira, bakterija *Helicobacter pylori* još od ranog djetinjstva. Prevalencija infekcije ovom bakterijom je i dalje stabilna, u industrijaliziranim zemljama je u opadanju zbog poboljšane higijene i aktivne eradikacije antimikrobnim lijekovima (Kusters i sur., 2006). Naime, *H. pylori* opisana je kao uzročnik gastritisa i njena je prisutnost povezana s rakom želuca, no novija istraživanja okreću se potencijalnim pozitivnim učincima prisutnosti *H. pylori* u želucu, poput smanjenja rizika od razvoja celijakije, astme ili adenokarcinoma jednjaka (Lebwohl i sur., 2013; Xie i sur., 2013;

Arnold i sur., 2011).

Tablica 1. Popis najzastupljenijih predstavnika mikroorganizama u gastrointestinalnom traktu (prema Reynoso-García i sur., 2022)

Organ GI trakta	Rodovi mikroorganizama
jednjak	<i>Streptococcus, Veillonella, Prevotella</i>
želudac	<i>Helicobacter pylori, Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes</i>
duodenum	<i>Prevotella, Stenotrophomonas, Streptococcus, Bacillus, Solibacillus, Pseudomonas, Lysinibacillus, Arthrobacter, Lactococcus, Escherichia coli, Enterococci, Lactobacillus</i>
jejunum	<i>Escherichia coli, Enterococci, Lactobacillus, Streptococcus, Haemophilus, Prevotella, Veillonella, Fusobacterium</i>
ileum	<i>Streptococcus, Escherichia coli, Clostridium, Cetobacterium, Cupriavidus, Enterobacteriaceae</i>
slijepo crijevo	<i>Lachnospiraceae, Enterobacteriaceae, Bacteroidaceae, Fusobacteriaceae, Bifidobacterium</i>
debelo crijevo	<i>Bacteroides, Faecalibacterium, Prevotella, Lachnospiraceae, Rikenellaceae</i>

Crijevena mikrobiota znatno se razlikuje proučava li se tanko i debelo crijevo ili pojedini dijelovi tankog crijeva. Specifičnosti tankog crijeva kao medija za rast bakterija su brzina prolaska himusa, prolazak probavnih enzima i žuči te isprekidan prolazak hrane koja je supstrat prisutnim bakterijama. Posljedica je prisutnost niske biomase bakterija niske raznolikosti, ali visoke dinamičnosti. Također, od proksimalnog do distalnog dijela tankog crijeva, povećava se omjer gram-pozitivnih naspram gram-negativnih bakterija i omjer fakultativnih anaeroba prema obaveznim anaerobima (Hayashi i sur., 2005). Brojnost bakterija ovdje iznosi od 10^7 u duodenumu do 10^{11} u ileumu (Sender i sur., 2016). Mikrobiota tankog crijeva je, izuzev utjecaja okoline, pod velikim utjecajem prehrambenih navika domaćina te makronutrijenti koji tamo dopijevaju oblikuju i podržavaju rast specifičnih vrsta bakterija. Metagenom bakterija tankog

crijeva bogat je genima uključenim u metabolizam ugljikohidrata, uključujući procese fosfotransferaza, pentoza fosfatnog puta, fermentacije laktata i propionata, sučimbenike biotin i kobalamin. Iz toga se može zaključiti da je glavna funkcija tankog crijeva metaboliziranje ugljikohidrata, zbog čega tu i prevladavaju bakterije koje iz razgrađuju, poput roda *Streptococcus*. Razgradnja jednostavnih ugljikohidrata događa se jednostavno i brzo, a omogućava opstanak bakterijskim zajednicama koje se nalaze u ovom dijelu crijeva (Zoetendal i sur., 2012). Razgradnja i apsorpcija masnih kiselina također je pod utjecajem bakterija crijeva, bez kojih je u miševima uočena veća koncentracija lipida u fekalnim uzorcima (Rabot i sur., 2010). Ovisno o tome kolika je zastupljenost masti u prehrani, razlikuje se i sastav mikrobiote. Tako je u slučaju prehrane bogate mastima prisutna veća količina *Clostridia*, smanjena količina *Bifidobacteria* i *Bacteroides*, odnosno mikrobiotu čine bakterije koje povećavaju apsorpciju lipida u krvotok (Martinez-Guryn i sur., 2018). Osim probave makromolekula, mikrobiota ima ulogu i u metabolizmu nekih mikronutrijenata. Vitamin K2 (menakinon) sintetizira se zahvaljujući bakterijama iz rodova *Veillonella*, *Bacteroides* i *Prevotella* i porodice *Enterobacteriaceae*. Vitamin B12 može biti iskorišten za metaboličke procese nekih gram-negativnih bakterija u crijevima i postati deficitaran za domaćina jer se dovoljno molekula B12 ne može vezati na intrinzični čimbenik (Rowley i Kendall, 2019).

Crvuljak se smatrao organom koji je tijekom evolucije izgubio na značaju i kirurški se uklanjao u slučaju akutnog apendicitisa, ali i preventivno (Souza i Nugent, 2016). Međutim, apendektomija mijenja sastav i međusobne interakcije crijevne mikrobiote. Točnije, sastav fungalne zajednice i njihova međusobna interakcija te interakcija s bakterijama se znatno mijenja (Cai i sur., 2021). U slučaju disbioze, prisutnost crvuljka je značajna jer može imati ulogu repopulacije narušene mikrobiote (Guinane i sur., 2013).

Debelo crijevo karakterizira visoka raznolikost i gustoća bakterija, izostanak probavnih enzima, nutritivno relativno siromašno okruženje i dugo vrijeme prolaska sadržaja (Kastl i sur., 2020). S 10^{12} bakterija, smatra se dijelom tijela s najvećim brojem bakterija (Sender i sur., 2016). Mikrobiota debelog crijeva filogenetski je znatno raznovrsnija od mikrobiote tankog crijeva (Hayashi i sur., 2005). Bakterije su zbog izostanka kisika anaerobne, i većinom dominira rod *Bacteroidetes* (James i sur., 2020). Uloge anaerobnih bakterija debelog crijeva uključuju od metaboliziranja složenih ugljikohidrata, koji neprobavljeni prolaze kroz tanko crijevo, do kratkolančanih masnih kiselina koje su važan supstrat epitela debelog crijeva (Mauerhofer i sur., 2019). Zatim, imaju proteolitičku aktivnost; razgrađuju proteine hrane, endogene proteine,

enzime i mucin na manje peptide, aminokiseline ili njihove derivate. Također sudjeluju u sintezi vitamina B skupine; biotina, kobalamina, folata, nikotinske kiseline, pantotenske kiseline, piridoksina, riboflavina i tiamina (Rowland i sur., 2018).

2.3. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA SASTAV CRIJEVNE MIKROBIOTE

Najznačajniji čimbenici koji utječu na sastav crijevne mikrobiote su biološki; dob, rasa, bolest (disbioza), okoliš, epigenetika, genetika, i čimbenici životnog stila u koje se ubrajaju prehrana, tjelesna aktivnost, alkohol, pušenje, stres, lijekovi (Mousa i sur., 2022). Stoga je vrlo teško odrediti što čini zdravu mikrobiotu i može li se ona zapravo definirati na taj način (Fischbach, 2018). Temeljna mikrobiota (engl. *core microbiome*) bila bi ona koja je stabilna, otporna i elastična tijekom vremena i među različitim pojedincima, a to se odnosi na kapacitet mikrobiote da se odupire narušavanju i da se vrati u početno stanje nakon narušavanja (Fassarella i sur., 2021). Trenutno je zagonetno na koji način ispravno opisati onu mikrobiotu koja će se nakon narušavanja vratiti u zdravo stabilno stanje, a primijeniti se mogu četiri pristupa. Opisivanjem sastava zajednice pretpostavlja se da su za zdravlje odgovorni točno određeni taksoni bakterija, no nedostatak je činjenica se podaci mogu prikupiti samo na visokim taksonomskim razinama i da je sastav i zastupljenost mikroba promjenjiva među pojedincima i tijekom vremena (David i sur., 2014a). Opisom funkcije mikrobiote fokus je stavljen na metaboličke puteve i funkcije koje različiti taksoni bakterija obavljaju u crijevima, poput probave kompleksnih ugljikohidrata, osiguravajući da se funkcija i dalje obavlja čak i kad jedan od taksona bakterija nestane (Gutiérrez i Garrido, 2019). Nedostatak ovog pristupa je kvaliteta i količina podataka koja se nalazi u bazama podataka, npr. ispitanici su uglavnom Amerikanci i Europljani (Abdill i sur., 2022). Pristupi koji su znatno manje istraženi, a jednako važni, su opisi ekologije i stabilnosti mikrobnih zajednica. Stabilna mikrobiota ne znači da je i statična, smatra se da je mikrobiota dinamična zajednica koja tijekom života domaćina konstantno prelazi između tri stabilna stanja; zdravom, alternativnom, nezdravom (Lozupone i sur., 2012). Mikrobna ekologija odnosi se na zastupljenost određenih taksona, njihove interakcije, ali i interakcije s domaćinom. U međusobne interakcije bakterija ubrajaju se amenzalizam, antagonistička koevolucija, kompeticija, komenzalizam, kooperacija, mutualizam, parazitizam te predatorstvo (Fassarella i sur., 2021) i sasvim sigurno su dublje povezane s ljudskim zdravljem. Međutim ne postoje općeprihvaćene metode evaluacije stabilnosti i mikrobne

ekologije i to otežava istraživanja (Li i sur., 2013; Shade i Handelsman, 2012).

2.3.1. Biološki čimbenici

Mikrobiota čovjeka drastično se mijenja tijekom prvih nekoliko godina života (Yassour i sur., 2016), a sve započinje načinom rođenja. Djeca rođena vaginalno kao najznačajnije vrste bakterija imaju *Bifidobacterium* i *Bacteroides* koje su zadužene za probavu oligosaharida iz majčinog mlijeka (Marcobal i Sonnenburg, 2012). Spomenuti se rodovi nalaze u manjim količinama u djece rođene carskim rezom i hranjene dojenačkim formulama i u njih je raznolikost bakterija općenito niža u prve dvije godine života (Jakobsson i sur., 2014). Smatra se da slabije razvijena mikrobiota može imati dugoročne posljedice na razvoj imunološkog i limfnog sustava, što vodi riziku od pojave bolesti posredovanih imunološkim sustavom (Vatanen i sur., 2019). U prvim mjesecima života, mikrobiota je također pod utjecajem korištenja antibiotika, prebiotika, probiotika i uvođenja krute hrane. Korištenje antibiotika povezano je sa smanjenom raznolikosti mikrobiote još u trećoj godini života, te se pretpostavlja da je u tom slučaju razvoj imunološkog sustava ograničen, posebice pri prepoznavanju komenzalnih bakterija. Također, djeca koja su liječena antibioticima imaju nestabilniju mikrobiotu od onih koja nisu primala takve lijekove (Yassour i sur., 2016). Uvođenjem dohrane, odnosno komplementarne prehrane, mikrobiota povećava raznovrsnost u vidu rodova i vrsta, sve više dominiraju *Firmicutes* i *Bacteroidetes*. Unutar rodova pojavljuje se sve veći broj bakterija bakterija i sastav je sve sličniji mikrobioti odraslog čovjeka (Fallani i sur., 2011; Laursen i sur., 2016). Razvoj mikrobiote ovisno o dobi mogao bi biti važan prediktor nutritivnih potreba čovjeka, a za primjer se može uzeti metabolizme vitamina B12 i folata. Mikrobiom novorođenčadi i male djece bogat je genima koji sudjeluju u sintezi folata iznova, dok su kod odraslih znatnije izraženi geni koji metaboliziraju folat i tetrahidrofolat iz namirnica. U slučaju gena povezanih s metabolizmom vitamina B12, B7 i B1, s godinama se događa se suprotan proces (Yatsunenکو i sur., 2012).

Važnost snažne mikrobne zajednice u crijevima jasna je i kod starijih osoba i njihovog zdravlja te se postavlja pitanje kakav je odnos zdravlja i dugovječnosti s crijevnim bakterijama – jesu li promjene u sastavu i funkciji mikrobiote posljedica starenja ili je mikrobiota uzrok promjena vezanih uz starenje. Uočeno je da se zdravo starenje može opisati tipom mikrobiote koja općenito ima smanjenu raznolikost vrsta bakterija kao što su *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* i *Bacteroidaceae*, do izražaja više dolaze vrste koje prije nisu bile toliko

dominantne, prisutne su bakterije povezane sa zdravljem poput *Akkermansia* i *Bifidobacterium* (Lau i sur., 2021; Wilmanski i sur., 2021). Zanimljivo je i kako uključenost starijih u društvu može oblikovati sastav bakterija na način da starije osobe koje su u kontaktu s ljudima u svojoj okolini imaju veću prisutnost bakterija vezanih uz zdravlje poput koljena *Firmicutes*, rodova *Coprococcus* i *Roseburia*, dok starije osobe koje su izolirane od zajednice, npr. tijekom dužeg boravka u bolnici, imaju mikrobiotu bogatiju rodovima *Parabacteroides*, *Eubacterium*, *Anaerotruncus*, *Lactonifactor*, *Coprobacillus* (Claesson i sur., 2012). Kod zdravih ljudi u dubokoj starosti, uočena je veća zastupljenost *Akkermansia*, *Bifidobacterium* i *Christensenellaceae* (Biagi i sur., 2016).

Osim dobi, na mikrobiotu znatno utječu i geografske, kulturne i socio-ekonomske karakteristike mjesta u kojem ljudi žive. Istraživanje u koje su uključene populacije zdravih pojedinaca svih dobnih skupina iz metropolitanskih gradova Amerike, ruralnog Malavija i amazonskog područja Venezuele donijelo je zanimljive podatke. Analiza podataka pokazala je značajne razlike u filogenetskom sastavu mikrobiote Amerikanaca u usporedbi sa stanovnicima Malavija i Venezuele, dok nije pronađena značajna razlika između dva naselja unutar iste zemlje. Fekalna mikrobiota ispitanika iz Amerike imala je najmanju raznolikost u usporedbi s ostale dvije populacije i to je vidljivo za dobne skupine starije od tri godine (Yatsunenکو i sur., 2012). Oko 15 % mikrobiote imigranata iz Južne Azije je izgubljeno vrlo brzo po useljenju u SAD, iza čega stoji promjena u načinu prehrane, pitkoj vodi i korištenju antibiotika kao prilagodba na novu životnu okolinu. Sa svakom novom generacijom imigranata koja živi u SAD-u, raznolikost mikrobiote sve je manja i sve je više nalik zapadnjačkim zajednicama mikroorganizama. Rodovi *Prevotella* zamijenjeni su rodovima *Bacteroides*, sve je manje bakterija čija je funkcija razgradnja složenih ugljikohidrata poput celuloze, škroba i manana, a sve više onih koji razgrađuju jednostavne ugljikohidrate poput saharoze (Vangay i sur., 2018). Ova se pojava može opisati teorijom nestajućih mikroba, nastalom uspoređujući mikrobiote ljudi u razvijenim zemalja zapadnog svijeta i naših predaka te plemenima koja i danas žive u skladu s prirodom (Blaser, 2017).

U prijašnjem istraživanju zaključeno je da je nasljednost mikrobiote generalno niska jer nije postojala značajna razlika u sličnosti između jednojajčanih i dvojajčanih blizanaca te je važan utjecaj izloženosti hrani, okolišu, domaćim životinjama i ljubimcima te vertikalnog prijenosa unutar obitelji koja živi u istom domaćinstvu (Turnbaugh i sur., 2009a, Turnbaugh i sur., 2009b). Prema „*The Dutch Micobiome Project*“, oko 6,6 % taksona je nasljedno, uključujući

Proteobacteria, *Phascolarctobacterium*, *Akkermansia muciniphila*, *Parabacteroides goldsteinii*, *Bacteroides coprocola*, *Bifidobacterium longum*. Zajedničko stanovanje ima puno veći utjecaj na sastav mikrobiote, uključeno je čak 48,5 % taksona, te je mikrobiota ispitanika koji žive zajedno bila međusobno sličnija bez obzira na rodbinsku povezanost, u usporedbi s ispitanicima koji nisu živjeli zajedno (Gacesa i sur., 2022).

Međutim, novija istraživanja preispituju utjecaj genetike i nasljeđivanja na mikrobnu zajednicu jer je do određene mjere moguće predvidjeti etničku pripadnost pojedinca s obzirom na ukupne razlike u mikrobioti te je opisano dvanaest taksona bakterija čija je zastupljenost u zajednici povezana s određenom etničkom skupinom i većina njih se pokazala nasljednom (Brooks i sur., 2018).

2.3.2. Čimbenici životnog stila

Nutrijenti mogu utjecati na mikrobiotu direktnim i indirektnim putevima promovirajući i inhibirajući rast pojedinih bakterija ili djelovanjem na imunološki sustav i metabolizam domaćina (Zmora i sur., 2019). Crijevna mikrobiota je osjetljiva na brojne prehrambene intervencije. Prehrana koja se sastoji samo od namirnica životinjskog porijekla favorizirat će rast bakterijskih rodova koji dobro podnose žučne soli, poput *Alistipes*, *Bilophila*, *Bacteroides*, a smanjit će se zastupljenost pripadnika koljena *Firmicutes* (*Roseburia*, *Eubacterium rectale*, *Ruminococcus bromi*) koji metaboliziraju biljne polisaharide (David i sur., 2014b). Tipična američka prehrana bogata je proteinima, dok se prehrana u Malaviju i Venezueli zasniva na kukuruzu i kasavi i bogata je ugljikohidratima. Ove se razlike očitavaju u mikrobiomu na način da su u mikrobiomu stanovnika Malavija i Venezuele izraženi geni za glutamat sintazu i alfa amilazu, koji su izraženi i u mikrobiomu sisavaca biljojeda, a u mikrobiomu Amerikanaca geni za razgradnju glutamina i jednostavnih šećera, kao i kod mikrobioma sisavaca mesojeda (Yatsunenko i sur., 2012). Veća raznolikost bakterija, a time i veće bogatstvo gena mikrobiote, pozitivno korelira s unosom voća, povrća i ribe (Cotillard i sur., 2013). Malnutricija, odnosno manjak nutrijenata također ima velik utjecaj na sastav mikrobiote i razvoj organizma; miševi kojima je transplantirana mikrobiota zakržljale djece iz Malavija razvili su slična oštećenja u raznim organima (Smith i sur., 2013).

Fermentacija vlakana jedna je od glavnih funkcija crijevne mikrobiote, a nastajući metaboliti - kratkolančane masne kiseline imaju brojne pozitivne učinke na organizam; kao signalne molekule inhibiraju histon diacetilazu i ligandi su receptorima G proteina (Koh i sur.,

2016), preveniraju povećanje tjelesne mase (Chambers i sur., 2015) i popravljaju toleranciju glukoze (Cantarel i sur., 2012), održavaju homeostazu imunološkog sustava u crijevima i štite od upale i karcinogeneze (Singh i sur., 2014; Maslowski i sur., 2009). Prehrana kojoj manjka vlakana, što je slučaj u zapadnjačkom tipu prehrane, potiče rast koljena *Firmicutes*, a smanjenje *Bacteroidetes* (Turnbaugh i sur., 2009b). Istraživanje na gnotobiotičkim miševima pokazalo je da je prelazak s prehrane bogate vlaknima na prehranu siromašnu vlaknima dovelo do znatnih promjena u sastavu mikrobiote (Desai i sur., 2016); bakterije koje razgrađuju sluz počinju se gomilati, a smanjuje se količina bakterija koje probavljaju vlakna, dolazi do veće razgradnje glikana iz sluzi crijeva domaćina što narušava integritet crijevne barijere (Sonnenburg i sur., 2005). Suplementacija vlaknima može dovesti do promjene u mikrobioti u vremenu od jednog dana pa sve do više od dvanaest tjedana, pokazujući veliku individualnost mikrobiote (David i sur., 2014b Lappi i sur., 2013). Suprotno tome, promjena prehrane s dominantno biljnim porijeklom na dominantno životinjsko porijeklo pokazala je veliku promjenu sastava i funkcije mikrobiote i u ljudima i u miševima (David i sur., 2014b; Turnbaugh i sur., 2009b).

Restrikcija kalorijskog unosa kratkoročno smanjuje zastupljenost bakterija koje stvaraju butirat, dugoročno se smanjuje zastupljenost roda *Blautia*, a povećava *Bacteroides* (Santacruz i sur., 2009). Mikrobiota također igra ulogu u povećanju tjelesne masne uslijed opetovanog ciklusa gubitka i dobivanja na tjelesnoj masi na restriktivnim dijetama (Chatelier i sur., 2013). Zanimljivo je istraživanje s plemenom Hadza iz Tanzanije kod kojeg je uočena sezonska promjena u sastavu mikrobiote koja reflektira promjenu u dostupnosti namirnica u suhoj ili vlažnoj sezoni, što nije uočeno kod populacije iz industrijaliziranih gradova koji imaju i nisku zastupljenost tih bakterijskih taksona (Smits i sur., 2017).

Istraživanja vezana uz masne kiseline na ljudima i životinjama pokazuju oprečne rezultate. Po trenutno dostupnoj literaturi, može se reći da zasićene masne kiseline oblikuju mikrobiotu promovirajući štetno djelovanje na metabolizam kratkolančanih masnih kiselina i stvarajući rizik od metaboličkog sindroma, kolitisa ili autoimunih bolesti središnjeg živčanog sustava. Ono što je nepoznanica jest koji je mehanizam kojim se utječe na razine kratkolančanih masnih kiselina te kako tip masne kiseline u prehrani zajedno s nekim drugim čimbenicima djeluje na mikrobiotu (Zmora i sur., 2019).

Crveno i prerađeno meso povezuje se s povećanim rizikom od razvoja kardiovaskularnih bolesti zbog trimetilamina, metabolita koji nastaje razgradnjom L-karnitina djelovanjem roda *Prevotella* (Koeth i sur., 2013; Siri-Tarino i sur., 2010), i raka debelog crijeva zbog sadržaja

heterocikličkih amina tijekom prerade mesa (Bouvard i sur., 2015; Butler i sur., 2003). Trimetilamin se prevodi u trimetilaminoksid, spoj koji je povezan s razvojem ateroskleroze, hiperaktivnošću trombocita i trombozom (Zhu i sur., 2016). Djelovanje heterocikličkih amina može biti umanjeno kad ih razgrade bakterije koje stvaraju mliječnu kiselinu (npr. *Lactobacillus*). Prehrana bogata hem željezom promovira rast bakterija koje razgrađuju sluz crijevnog epitela (Ijssennagger i sur., 2015), a dodatno se oštećuje djelovanjem N-nitrozo spojeva koji nastaju metabolizmom crijevne mikrobiote (Hullar i sur., 2014).

Ne smije se zaboraviti djelovanje prehrambenih aditiva i bioaktivnih spojeva iz biljaka. Mikronutrijenti poput željeza, magnezija, cinka, selena, nitrita i nitrata, vitamina A i D te flavonoida mogu utjecati na sastav mikrobiote (Zmora i sur., 2019). Mnoge patogene bakterije uspješno se koriste željezom u svom metabolizmu pa bi prehrana bogata željezom ili suplementacija mogla promovirati rast patogena (Dostal i sur., 2012). Zanimljiva skupina prehrambenih aditiva su umjetna sladila, poput saharina, sukraloze, aspartama, ciklamata, acesulfama-K, čija je uloga zamjena kaloričnih zaslađivača (šećera, meda) u prehrambenim proizvodima. Oprečni rezultati dobiveni su u istraživanjima gubitka tjelesne mase na ljudima i glodavcima, te bi razlog tome mogla biti specifičnost sastava mikrobiote ispitanika te načina na koji pojedine bakterije metaboliziraju umjetna sladila – i posljedično možda i potiču veću apsorpciju nutrijenata i energije iz hrane (Palmnäs i sur., 2014; Suez i sur., 2014). Fitokemikalije imaju povoljan učinak na zdravlje u interakciji s bakterijama. Suplementacija polifenolima iz grožđa i brusnica rezultirala je smanjenjem upalnog i obesogenog učinka visokomasne prehrane u miševa, a sličnih je primjera još mnoštvo (Anhê i sur., 2015; Roopchand i sur., 2015).

Mikrobiota tjelesno aktivnih pojedinaca je raznovrsnija i ima veću zastupljenost bakterija koje su vezane uz zdravlje; *Faecalibacterium. prausnitzii*, *Roseburia hominis*, *Akkermansia muciniphila* (Bressa i sur., 2017). Kardiorespiratorno zdravlje povezano je s većom zastupljenošću koljena *Firmicutes* (Durk i sur., 2019), a promjena u mikrobioti kod osoba koje vježbaju nastaje većom prisutnošću bakterija koje proizvode poželjne kratkolančane masne kiseline poput *Faecalibacterium* i *Lachnospiraceae* (Allen i sur., 2018).

Nasuprot tome, pušenje, čak i elektroničkih cigareta, mijenja oralnu i crijevnu mikrobiotu stvarajući zajednice koje domaćina izlažu infekcijama i upalnim bolestima (Chopyk i sur., 2021; Lee i sur., 2018). U ovom slučaju prevladavaju bakterije roda *Bacteroides*, a smanjena je zastupljenost koljena *Firmicutes* i *Proteobacteria*, iako se prisutnost *Firmicutes* može obnoviti prestankom pušenja, ali tek djelomično (Shanahan i sur., 2018).

Izloženost društvenom stresu, koji proizlazi iz društvenog okruženja pojedinca i smatra se najjačim stresorom (Wood i Bhatnagar, 2015), smanjuje zastupljenost bakterija s protuupalnim djelovanjem poput rodova *Bacteroides*. Posljedično dolazi do smanjenja poželjnih metabolita kao što su kratkolančane masne kiseline i povećanja upalnih procesa u organizmu te podložnosti bolestima i njihovim težim posljedicama (Maltz i sur., 2019; Maltz i sur., 2018). Stres može utjecati na sastav mikrobne zajednice još od najranijih dana. Kod novorođenčadi koja je bila izložena povišenim majčinim razinama kortizola tijekom trudnoće zabilježene su promjene u sastavu i kolonizaciji mikrobiote, što ih je kasnije izložilo većem riziku od razvoja gastrointestinalnih simptoma i alergijskih reakcija (Zijlmans i sur., 2015).

Primjena antibiotika često je neizbježan korak u zaustavljanju oboljenja, ali osim uništavanja patogena njihova upotreba utječe i na mikrobiotu crijeva koju se želi sačuvati, a promjene mogu biti vidljive i do godinu dana (Konstantinidis i sur., 2020). Posljedice primjene antibiotika čine se individualnima; različito je vrijeme oporavka mikrobiote nakon njihove primjene u stanje prije upotrebe te oporavak može biti nepotpun. Zanimljivo je dodati da je u slučaju opetovanog narušavanja sastava mikrobiote primjenom druge doze antibiotika zajednica trajno izmijenjena te se nije oporavila na početni sastav mikroba (Dethlefsen i Relman, 2011).

2.4. DISBIOZA

Disbioza se može definirati kao „promjena u relativnom bogatstvu mikrobnih taksona u usporedbi s bogatstvom mikrobnih taksona u zdravih pojedinaca“ (Spor i sur., 2011).

Bolesti i stanja koja se povezuju s disbiozom crijevne mikrobiote su pretilost, metabolički sindrom, nealkoholni steatohepatitis, upalne bolesti crijeva (Crohnova bolest, ulcerozni kolitis), sindrom iritabilnog crijeva, ateroskleroza, dijabetes tipa 1, dijabetes tipa 2, hipertenzija, autizam, alergije, astma, celijakija, anksioznost, depresija, bipolarni poremećaj. U tablici 2 nalazi se prikaz uočenih promjena u sastavu mikrobiote kod nekih od navedenih oboljenja.

Tablica 2. Popis promjena u bakterijskim vrstama koje su uočene za pojedine bolesti
(prema Mousa i sur., 2022; Spor i sur., 2011)

Bolest	Promjena u sastavu mikrobiote	Rod bakterija
Hipertenzija	Povećanje	<i>Prevotella, Bacteroides, Faecalibacterium</i>
	Smanjenje	
Alzheimerova bolest	Povećanje	<i>Basidiomycota, Sclerotiniaeeae, Phaffomyceteceae, Trichocomaceae, Cystofilobasidiaceae, Togniniaceae, rodovi Botrytis, Kazachstania, Phaeoacremonium, Cladosporium</i>
	Smanjenje	<i>Ascomycota, Cladosporiaceae, Meyerozyma</i>
Demencija	Povećanje	<i>Lactobacillales, Bifidobacterium</i>
	Smanjenje	<i>Bacteroides</i>
Pretilost	Povećanje	<i>Firmicutes</i>
	Smanjenje	<i>Bacteroidetes: Flavobacteriaceae, Prphyromonadaceae, Sphingobacteriaceae</i>
Depresija	Povećanje	<i>Alistipes, Flavonifractor, Butyricimonas, Clostridium XIVb, Phascolarctobacterium, Bacteroidetes, and Proteobacteria</i>
	Smanjenje	<i>Faecalibacterium, Blautia and Eubacterium</i>
Autizam	Povećanje	<i>Eisenbergiella, Klebsiella, Faecalibacterium, Blautia, Lactobacillus Enterobacter, Bacteroides</i>
	Smanjenje	<i>Faecalibacterium, Bifidobacteria, Escherichia, Shigella, Veillonella, Akkermansia, Provindencia, Dialister, Bifidobacterium, Streptococcus, Ruminococcaceae UCG_002, Megasphaera, Eubacterium_coprostanol, Citrobacter, Ruminiclostridium_5, Ruminiclostridium_6</i>
Dijabetes tip 2	Povećanje	<i>Bacteroidetes, Verrucomicorbia, Proteobacteria</i>
	Smanjenje	<i>Firmicutes</i>

2.5.1. Pretilost

Mikrobiota pretilih osoba razlikuje se od mikrobiote osoba normalne tjelesne mase tako što sadrži manje tipova bakterija i razlikuje se u zastupljenosti pojedinih taksona te posljedično i njihovih gena vezanih uz energetske metabolizam. Tu se prvenstveno misli na *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, čiji je omjer znatno veći kod pretilosti (Turnbaugh i sur., 2006). *Bacteroidetes* su zastupljeno oko 50 % manje nego u zdravih pojedinaca, dok je zastupljenost *Firmicutes* za toliko povećana (Ley i sur., 2005). Samo na temelju analize mikrobiote, osobe se mogu klasificirati u pretilu ili normalne tjelesne mase (Knights i sur., 2011). Istraživanja na gnotobiotičkim miševima potvrdila su postojanje specifične mikrobiote u pretilih; oni miševi kojima je transplantirana mikrobiota pretilih miševa znatno su brže dobivali na tjelesnoj masi nego oni kojima je transplantirana mikrobiota miševa normalne tjelesne mase (Turnbaugh i sur., 2006). Osim toga, povećana zastupljenost porodica *Ruminococcaceae* i *Rikenellaceae* uočena je u pretilim miševima koji su rezistentni na leptin, molekulu koja promovira sitost (Kim i sur., 2012). Mikrobiota pretilih ima veći kapacitet za razgradnju hrane i dobivanje energije iz nje i ta se karakteristika može mikrobiotom prenijeti na drugi organizam, pa se može zaključiti da postoji veza između sastava mikrobiote i patofiziologije pretilosti (Turnbaugh i sur., 2006).

2.5.2. Upalne bolesti crijeva

U upalne bolesti crijeva ubrajaju se ulcerozni kolitis i Crohnova bolest koje su kronične i s čestim relapsima. Kod ulceroznog kolitisa zabilježena je smanjena zastupljenost bakterija koje proizvode butirat poput *Roseburia hominis* i *Faecalibacterium prausnitzii* (Machiels i sur., 2014), dok je kod Crohnove bolesti općenito smanjena raznolikost vrsta mikroba i smanjena je zastupljenost *Faecalibacterium prausnitzii*, *Dialister invisus* i *Bifidobacterium adolescentis*, a povećana je zastupljenost *Ruminococcus gnavus* (Joossens i sur., 2011). Disbioza mikrobiote pridonosi pogoršanju simptoma, ali ne može se utvrditi uzročno-posljedična veza s patofiziologijom oboljenja (Rinninella i sur., 2019). Sukladno tome, primjena probiotika, npr. *Faecalibacterium prausnitzii*, pokazala je smanjenje jačine simptoma (Sokol i sur., 2008).

2.5.3. Dijabetes

Oboljeli od dijabetesa imaju promijenjeni sastav mikrobiote, no nije jasno je li ta promjena

jedan od uzroka ili samo posljedica (Walsh i sur., 2014). Povišeni omjeri *Bacteroidetes* naspram *Firmicutes*, *Bacteroides* naspram *Prevotella*, i *Betaproteobacteria* je znatno povišen i pozitivno korelira s glukozom u plazmi (Larsen i sur., 2010). Također je zabilježena smanjena zastupljenost bakterija koje proizvode butirat poput *Roseburia* spp. (Wang i sur., 2012). Transplantacija mikrobiote zdravih pojedinaca normalne tjelesne mase pretilim pacijentima dovela je do poboljšanja inzulinske osjetljivosti (Vrieze i sur., 2012). Neprobavljiva vlakna dovela su do klinički značajnih poboljšanja metabolizma i povećanja zastupljenosti bakterija koje proizvode kratkolančane masne kiseline u pacijenata s dijabetesom tipa 2 (Zhao i sur., 2009).

2.5. CRIJEVNA MIKROBIOTA KAO BIOMARKER ZDRAVLJA

Crijevna mikrobiota ima potencijal biti dio standardnih dijagnostičkih postupaka u procesu liječenja. Štoviše, ona je bitan segment medicinskog kartona budućnosti, koji bi također sadržavao podatke o genomu, krvnoj slici, transkriptomu, čimbenicima životnog stila poput tjelesne aktivnosti, tjelovježbe, spavanja i izloženosti stresu. Na taj bi se način definiralo zdravstveno stanje pojedinca u vidu P4 medicine. P4 medicina je vizija Leroya Hooda i drugih o medicini koja je prediktivna, preventivna, personalizirana i participativna (Flores i sur., 2013), odnosno nastoji analizirati rizike i predvidjeti razvoj bolesti, ponuditi preventivne korake i ponašanja koja pojedinac može usvojiti, uzima u obzir pojedinačne razlike ljudi na razini njihovog metabolizma te nastoji uključiti pojedinca u aktivno praćenje vlastitog zdravlja i bolesti i sudjelovanje u kreiranju liječenja.

Na tržištu su već dostupni testovi za crijevnu mikrobiotu, kao što su KÄLLA Microbiome Test i VIOME Gut Intelligence Test: Cijene testova kreću se u rasponu od 150 do 200 eura, a funkcija im je odrediti sastav mikrobiote te ga povezati s mogućim negativnim nuspojavama i personalizirati prehranu pojedinca za optimalno zdravlje (Anonymous 1, Anonymous 2).

Rezultati analize mikrobiote mogli bi biti komplementaran biomarker prilikom dijagnosticiranja mnogih oboljenja, a u skladu s trenutnim saznanjima o povezanosti sastava crijevne mikrobiote i bolesti (tablica 2), još se mogu izdvojiti:

- omjer koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* može indicirati homeostazu ili disbiozu tako da je povišeni omjer povezan s pretilosti, a sniženi s upalnim bolestima crijeva. Osobe normalne tjelesne mase u istraživanjima su ostvarila omjer do 1, dok su osobe s prekomjernom tjelesnom masom i pretilosti ostvarile omjer veći od 1 (Stojanov i sur.,

- 2020). Važno je spomenuti da je ovaj omjer pod utjecajem dobi pojedinca i ne bi se trebao primjenjivati kod djece i starijih osoba (Mariat i sur., 2009).
- omjer rodova *Prevotella* i *Bacteroides* (P/B) može se upotrebljavati kao indikator načina prehrane te će omjer biti veći u slučaju prehrane bogate povrćem i vlaknima (npr. vegetarijanci, vegani, mediteranski način prehrane), a manji u slučaju prehrane bogate mastima, proteinima i jednostavnim šećerima (zapadnjački tip prehrane) (Gorvitovskaia i sur., 2016). Također, uočeno je da su pojedinci s visokim omjerom P/B podložniji gubitku tjelesne mase i masnog tkiva na prehrani bogatoj vlaknima u usporedbi s pojedincima koji imaju nizak omjer P/B (Hjorth i sur., 2019).
 - alfa raznolikost predstavlja raznolikost vrsta u uzorku i čini ju broj različitih vrsta u zajednici i zastupljenost svake vrste u zajednici te je veća alfa raznolikost poželjna (Simpson i sur., 2020).
 - beta raznolikost izražava sličnost između različitih uzoraka. Veća beta raznolikost znači manju sličnost u bakterijskom sastavu između uzoraka (Simpson i sur., 2021). Kod žena oboljelih od sindroma policističnih jajnika (engl. *PCOS*) uočene su smanjena alfa i beta raznolikost crijevne mikrobiote u usporedbi sa ženama koje nemaju *PCOS* (Gu i sur., 2022).
 - rod *Alistipes* čini 13 različitih vrsta, a u istraživanjima je uočeno kako prisutnost bakterija iz ovog roda ima zaštitni učinak od fibroze jetre, kardiovaskularne bolesti, kolitisa, a ulogu u patogenezi nekih mentalnih bolesti, raka debelog crijeva (Parker i sur., 2020).
 - rod *Blautia* je obrnuto povezan s nakupljanjem visceralnog masnog tkiva u odraslih osoba (Ozato i sur., 2019).
 - rod *Prevotella* u istraživanjima je povezan s prehranom koja se temelji na namirnicama biljnog porijekla (Tomova i sur., 2019).
 - prehrana bogata životinjskim proteinima, odnosno zapadnjački način prehrane bogat mastima i proteinima, povećava *Bacteroides* spp., *Alistipes* spp., *Bilophila* spp., a smanjuje *Lactobacillus* spp. i *Roseburia* spp. (Beam i sur., 2021).
 - mediteranski način prehrane povezan je s povećanjem *Prevotella* i omjera P/B, *Firmicutes* (Filippis i sur., 2016), a miševi hranjeni po načelima mediteranske prehrane imali su znatno veću raznolikost mikrobiote od miševa hranjenih po načelima zapadnjačke prehrane (Nagpal i sur., 2018).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ODABIR ISPITANIKA

Istraživanje je provedeno u sklopu projekta Pilot projekt crijevna mikrobiota radno-aktivne populacije RH od studenog 2021. do studenog 2022. godine na Institutu za antropologiju i Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a odobreno je od strane Etičkog povjerenstva Instituta za antropologiju. Odabir ispitanika odvijao se putem osobnih poznanstava i društvenih mreža istraživača uključenih u projekt. Kriteriji za uključivanje ispitanika u istraživanje bili su sljedeći:

- dob od 20 do 60 godina;
- bez kroničnih bolesti (npr. dijabetes, upalne bolesti crijeva, i sl.);
- antibiotik nije upotrebljavan u zadnja 3 mjeseca.

U istraživanje je uključeno 58 ispitanika, od toga 34 žene i 24 muškaraca. Ispitanici su detaljno informirani o ciljevima i metodologiji projekta i načinu na koji će se njihovi podaci upotrebljavati te su potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju.

3.2. METODE KORIŠTENE ZA PRIKUPLJANJE PODATAKA

Za ovo istraživanje važni su bili podaci o prehrambenim i životnim navikama ispitanika te biološki uzorak stolice za analizu sastava crijevne mikrobiote. Kako bi se prikupili biološki uzorci, ispitanicima su podijeljene posudice za uzorak stolice, a svaka od njih bila je šifrirana kako bi se omogućila anonimnost. Ispitanici su dobili uputu da nakon prikupljanja biološkog uzorka ispune upitnik. Uzorak je bilo važno zamrznuti odmah kako bi se očuvao što vjerniji izvorni sastav mikrobiote i spriječilo prerastanje aerobnih mikroorganizama. Također, budući da sastav mikrobiote i tip stolice ovise o prehrani, upitnik se trebao ispuniti na dan uzorkovanja.

Upitnik je sastavljen proučavanjem literature na temu sastava crijevne mikrobiote i različitih prehrambenih navika, životnog stila, i zdravstvenih stanja. Osim osam općih i socio-ekonomskih pitanja, sadrži 15 pitanja o životnom stilu i zdravstvenom stanju (tjelesna aktivnost, navike spavanja, i slično), a kao dijetetičke metode upotrijebljeno je 36 pitanja o učestalosti konzumacije određenih skupina namirnica te 24-satno prisjećanje. Ispitanici su 24-satno

prisjećanje provodili sami u obliku vođenih pitanja, a količinu konzumirane hrane procjenjivali su priborom (npr. žlice, tanjuri, šalice, zdjelice) ili brojem komada namirnica (npr. kriška kruha, jedno jaje). Upitnik je ispunjavan na mreži i korištena je platforma Google Forms. Ispis upitnika dostupan je kao prilog ovog rada.

Uzorci stolica ispitanika čuvani su u zamrzivaču na -80 °C. Za izolaciju DNA uzorke je bilo potrebno otopiti i homogenizirati. Sekvenciranje DNA odvijalo se *paired-end* metodom na uređaju Illumina MiSeq. Regije V3 i V4 16S rRNA gena umnožene su metodom lančane reakcije polimeraze (engl. *polymerase chain reaction, PCR*) u 30 ciklusa pomoću početnica 341F (5-CCTAYGGGRBGCASCAG-3) i 806R (5-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3). Uspješnost umnažanja i veličina bandova provjerena je na 2 %-tnom agarom gelu. Uzorci su pročišćeni pomoću kuglica Ampure XP i korišteni za pripremu DNA knjižnice pomoću protokola Nextera DNA Library Prep (Illumina, 2016). Rezultati sekvencioniranja zapisani su u FASTQ formatu koji se dalje mogu čitati i analizirati u programu QIIME 2.

3.3. OBRADA PODATAKA

QIIME 2 (engl. *quantitative insights into microbial ecology*) je softver otvorenog koda kojim se podaci nakon sekvencioniranja mogu analizirati, vizualizirati i interpretirati (Caporaso i sur., 2010). Za instalaciju i optimizaciju programa bilo je potrebno pažljivo pratiti upute dostupne na internetskoj stranici <http://qiime.org/install/index.html>. Kao osnova za provođenje analize korišten je *Moving pictures* protokol dostupan na službenoj stranici QIIME 2 platforme. FASTQ datoteke su učitane u program i provučene kroz paket DADA 2 koji služi za ispravljanje pogrešaka nastalih tijekom sekvencioniranja Illuminom. Rad u QIIME-u omogućio je određivanje taksonomske klasifikacije te alfa i beta raznolikosti. Kao metrika za mjerenje alfa raznolikosti korišteni su opaženi OTU (engl. *operational taxonomic units*) i Faithova filogenetska raznolikost (engl. *Faith's Phylogenetic Diversity*) koje prikazuju procijenjeni broj bakterijskih vrsta, odnosno filogenetsku raznolikost pojedinog uzorka. Beta raznolikost opisana je filogenetskom udaljenošću pomoću UniFrac (engl. *unique fraction metric, UniFrac*) težinske i netežinske metrike.

Statistička obrada podataka odrađena je u programu MS Excel te QIIME. Za obranu općih podataka ispitanika korišten je Studentov T-test za male nezavisne uzorke. Za analizu omjera F/B korištena je jednofaktorska ANOVA. Alfa raznolikost analizirana je Kruskal-Wallisovim H testom, a beta raznolikost testom PERMANOVA. Razina značajnosti za sve testove je iznosila $p < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

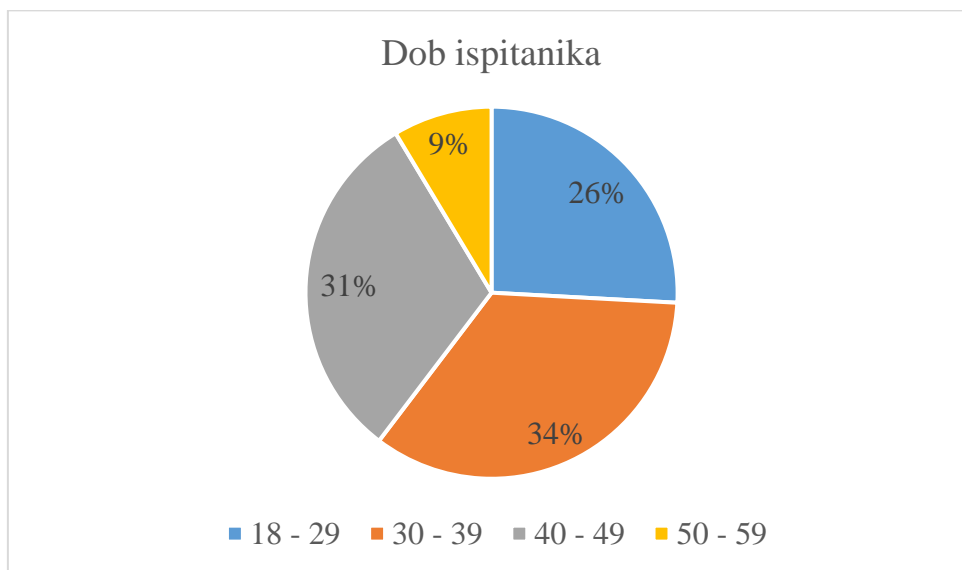
U ovom radu istražila se poveznica između općih i antropometrijskih podataka te životnih navika dobivenih iz upitnika sa sastavom crijevne mikrobiote u dobnim skupinama koje pripadaju radno-aktivnom stanovništvu Republike Hrvatske. Opći podaci uključivali su pitanja o dobi, spolu, bračnom statusu, obrazovanju, načinu rođenja, tjelesnoj aktivnosti, vrsti tjelesne aktivnosti, pušenju, načinu prehrane, učestalosti stolice, tipu stolice, količini sna, nadutosti, uzimanju lijekova, a antropometrijska o tjelesnoj masi i tjelesnoj visini. Prikupljeni su i podaci o prehrambenim navikama ispitanika kroz 24-satno prisjećanje i pitanjima o broju obroka, najčešćim obrocima, alergijama, uzimanju dodataka prehrani, učestalosti konzumacije točno određenih namirnica i slično. Ove su podaci korelirani sa sastavom mikrobiote analiziranom iz uzoraka stolice.

Rezultati su podijeljeni u dva dijela radi lakšeg razumijevanja. U prvom dijelu prikazani su opći i antropometrijski podaci ispitanika u obliku 1 tablice i 4 slike. U drugom dijelu prikazani su podaci dobiveni analizom sastava crijevne mikrobiote ispitanika u obliku 13 slika, odnosno prikaz taksonomske klasifikacije, alfa i beta raznolikosti za različite životne čimbenike ispitanika te analize značajnosti.

Taksonomska klasifikacija bakterija u uzorcima stolice ispitanika prikazana je pomoću stupčastog dijagrama na kojem se na x-osi nalaze uzorci, a na y-osi relativna frekvencija. Svaki stupac različitim bojama prikazuje udjele pojedinih taksonomskih kategorija u testiranom uzorku, pri čemu taksonomska kategorija „d“ označava domenu, „p“ koljeno, „c“ razred, „o“ red, „f“ porodicu, „g“ rod, a „s“ vrstu. Kao metrika za mjerenje alfa raznolikosti korišten je broj opaženih OTU koji procjenjuje broj vrsta u uzorku, a prikazuje se rarefakcijskom krivuljom - tako da se na y-osi nalazi broj opaženih OTU, a na x-osi nalazi dubina sekvencioniranja koja određuje broj slučajno izuzetih sekvenci iz uzorka na koji se onda procjenjuje broj vrsta. Beta raznolikost je grafički prikazana metodom PCoA (engl. *principal coordinates analysis*) u kojoj su uzorci prikazani kao točke u trodimenzionalnom prostoru čija je međusobna udaljenost obrnuto proporcionalna njihovoj sličnosti; što su točke međusobno udaljenije, to su manje slične jedna drugoj i obrnuto.

4.1. OPĆI PODACI O ISPITANICIMA

U istraživanju je sudjelovalo 58 ispitanika, od čega je 59 % bilo žena, a 41 % muškaraca. Dobna raspodjela ispitanika vidljiva je na slici 1. Najviše ih pripada skupini od 30 do 39 godina (34 %), slijedi skupina od 40 do 49 godina (31 %), zatim 18 do 25 godina (26 %), a najmanje od 50 do 59 godina (9 %).



Slika 1. Grafički prikaz raspodjele ispitanika po dobnih skupinama

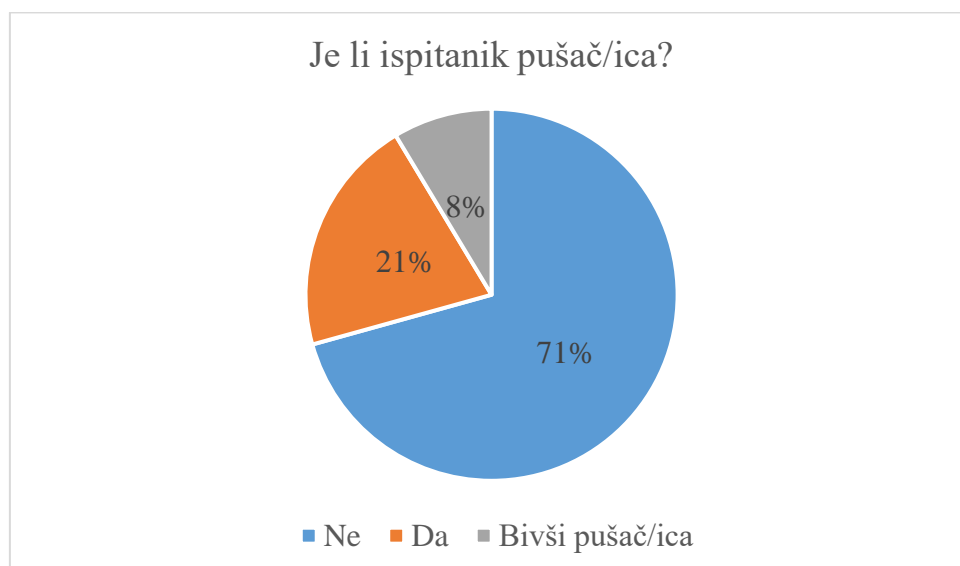
Što se tiče bračnog statusa, 38 % ispitanika se izjasnilo da je oženjeno/udano, 34 % slobodno, 24 % živi u izvanbračnoj zajednici. Jedna osoba se izjasnila kao rastavljen/a i jedna osoba nije željela odgovoriti. 47 % ispitanika ima završen diplomski studij, 29 % doktorski studij, 14 % preddiplomski studij, a ostatak ispitanika završilo je višu školu (3 %) ili srednju školu (7 %). Većina ispitanika rođena je vaginalnim porodom (90 %), dok je 7 % rođeno carskim rezom, a 3 % ne zna na koji način je rođeno. Sa slike 2 vidljivo je da se 71 % ispitanika izjasnilo kao nepušači, 21 % kao pušači, o ostatak se izjasnio kao bivši pušači (8 %). Za izračun indeksa tjelesne mase ispitanici su podijeljeni u skupine s obzirom na dob i spol prema tablici 3. Vidljiva je statistički značajna razlika između muškaraca i žena u dobnim skupinama od 30 do 39 te od 40 do 49 godina, pri čemu žene imaju niži indeks tjelesne mase od muškaraca. U dobnim skupinama od 18 do 29 i od 50 do 59 godina nije uočena statistički značajna razlika u indeksu tjelesne mase između muškaraca i žena.

Tablica 3. Prosječni indeks tjelesne mase (izražen u kg/m²) ispitanika s obzirom na dob i spol

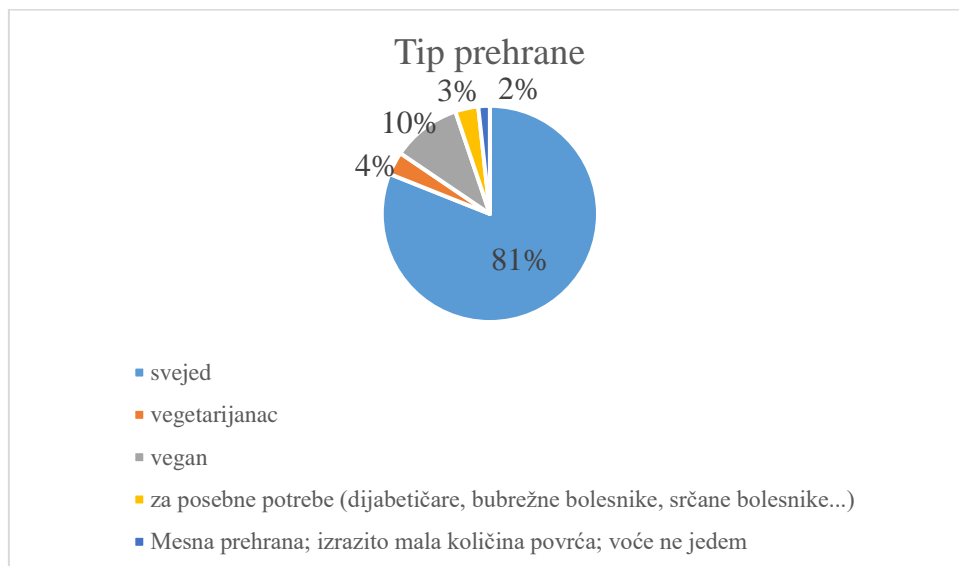
dob	Spol	ITM (kg/m ²) $\bar{x} \pm SD$	p*
18 – 29	Muški	24,33±4,62	0,4633
	Ženski	21,99±2,99	
30 – 39	Muški	25,92±3,16	0,0233
	Ženski	21,46±8,00	
40-49	Muški	27,93±2,91	0,0006
	Ženski	20,31±3,64	
50 - 59	Muški	27,91±0,63	0,9241
	ženski	27,60±5,01	

*p<0,05 smatra se statistički značajno

Ispitanici su se većinom izjasnili kao svejedi (81 %), a zatim vegani (10 %) i vegetarijanci (4 %). Njih 3 % nalazi se na prehrani za posebne potrebe, a 2 % ispitanika konzumira mesnu prehranu s izrazito malo povrća i bez voća, vidljivo na slici 3. 46 % ispitanika uobičajeno ima tip stolice 3, dok 36 % ima tip 4, 9 % ima tip 2 i 5 % ima tip stolice 5, što se vidi na slici 4. Nije utvrđena statistički značajna razlika između tipa prehrane i tipa stolice ispitanika.

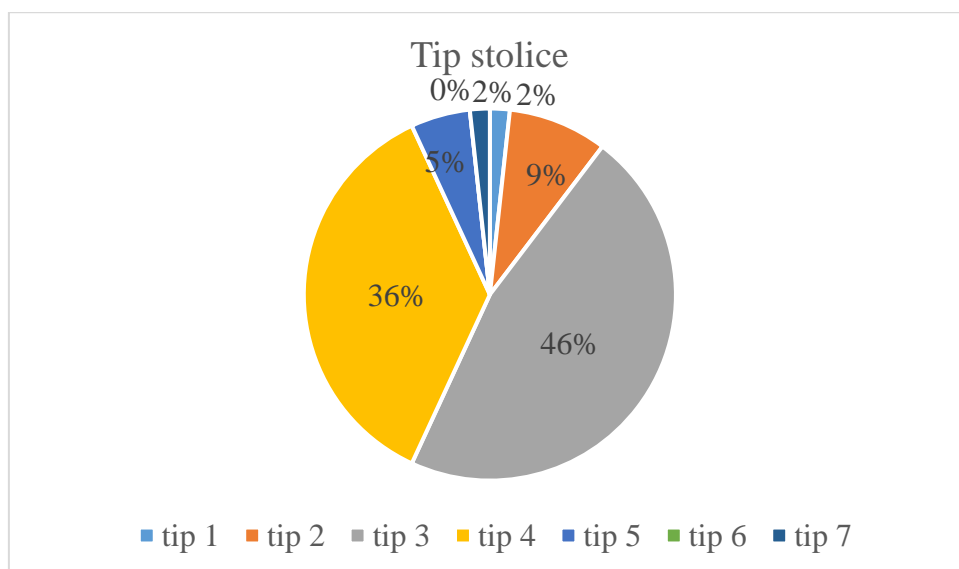


Slika 2. Grafički prikaz raspodjele ispitanika s obzirom na naviku pušenja



Slika 3. Grafički prikaz raspodjele ispitanika s obzirom na tip prehrane

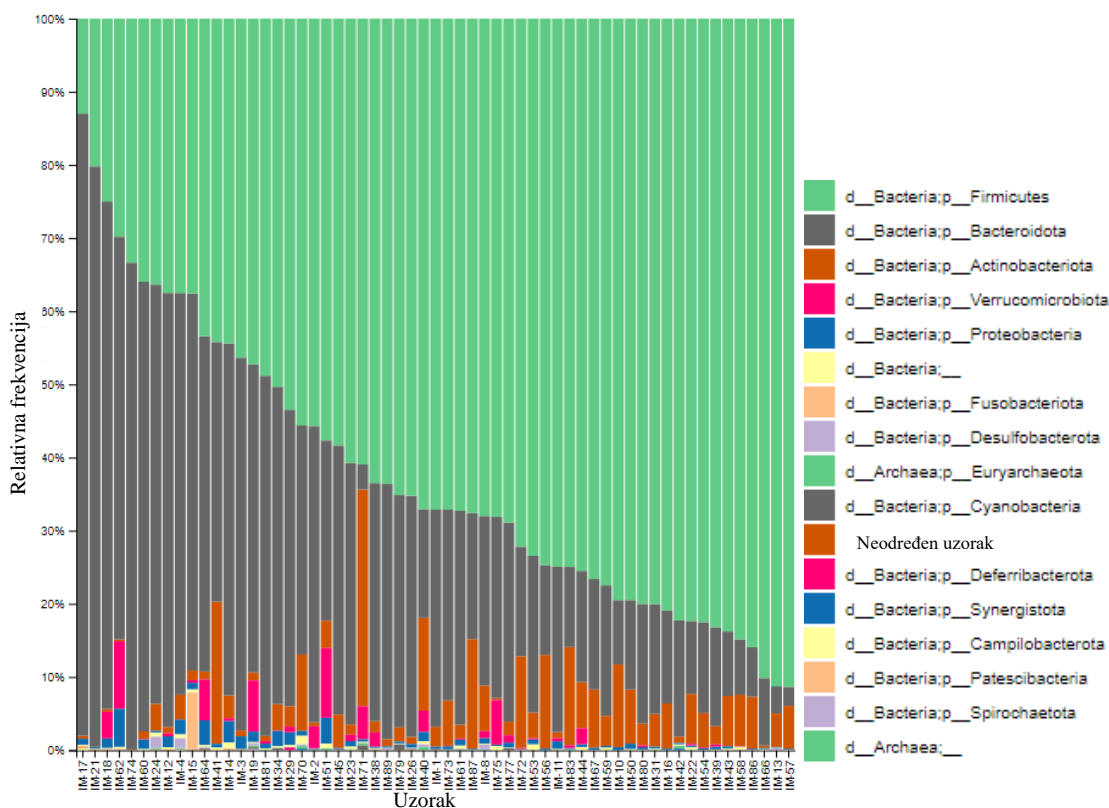
Što se tiče količine sna, 74 % ispitanika izjavilo je da uobičajeno spava između 5 i 7 sati, a 26 % je izjavilo da spava više od 7 sati dnevno.



Slika 4. Grafički prikaz raspodjele ispitanika s obzirom na tip stolice

4.2. TAKSONOMSKA KLASIFIKACIJA UZORAKA

Na slici 5 vidljiv je prikaz taksonomske klasifikacije uzoraka s udjelom koljena *Firmicutes* u padajućem poretku; od najmanjeg do najvećeg udjela. Najmanju zastupljenost koljena *Firmicutes* imaju uzorci IM-17 (13,006 %), IM-21 (20,196 %), IM-18 (24,999 %), IM-62 (29,837 %). Najveću zastupljenost imaju uzorci IM-22 (82,342 %), IM-42 (82,266 %), IM-16 (80,898), IM-31 (80,043 %).



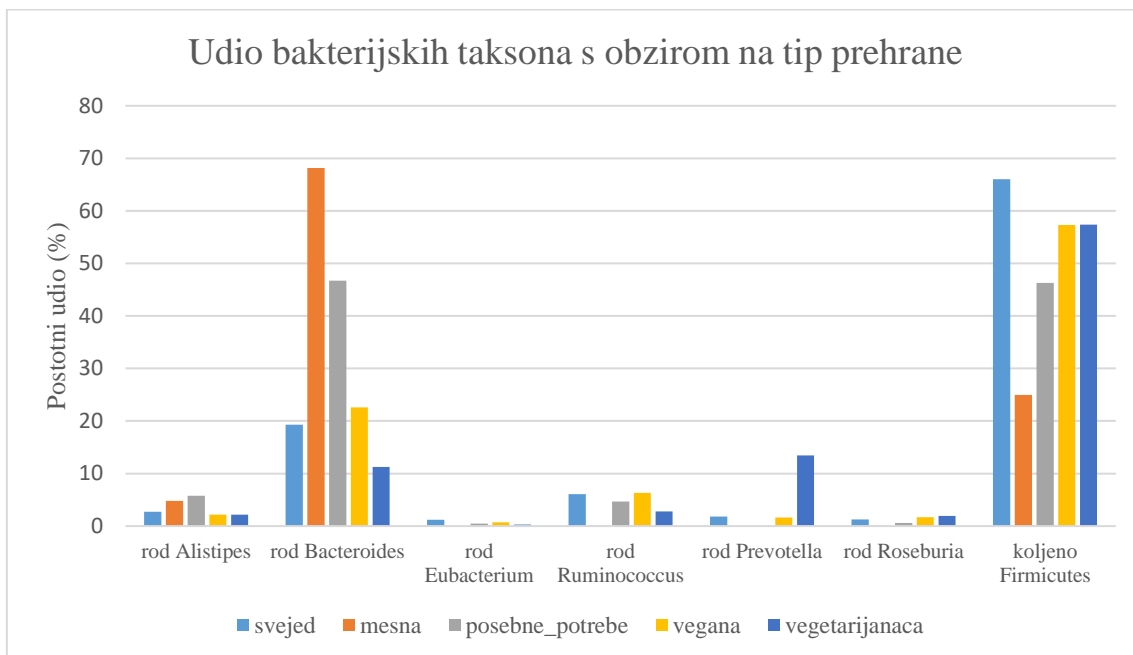
Slika 5. Grafički prikaz zastupljenosti bakterijskih koljena u uzorcima

Uzorak ispitanika IM-71 ističe se od ostalih uzoraka zbog visokog udjela koljena *Actinobacteriota* (29,628 %), a niskog udjela koljena *Bacteroidota* (3,425 %), dok je udio koljena *Firmicutes* 60,954 %. Radi se o ženskoj osobi između 30 i 39 godina, s ITM 24,50 kg/m², koja ne puši, hoda 1 do 2 sata tjedno, izjašnjava se kao svejed i alergična je na pelud, orašaste plodove, te određeno voće i povrće.

Izračunat je omjer koljena *Firmicutes* i *Bacteroidota* te su vrijednosti ispitanika grupirane ovisno o njihovom indeksu tjelesne mase. Nije utvrđena statistički značajna razlika između omjera F/B ispitanika s obzirom na indeks tjelesne mase. U preglednom radu (Magne i sur., 2020) zaključeno je kako omjer F/B nije dovoljno pouzdan kao biomarker za razvoj pretilosti. Neka od istraživanja koja su potaknula raspravu o omjeru F/B kao jednom od biomarkera zdravlja i rizika za razvoj pretilosti su istraživanje Ley i sur. (2006) u kojem je opisana povećana zastupljenost *Firmicutes* nauštrb *Bacteroidetes*, i istraživanje Krajmalnik-Brown i sur. (2012) u kojem je predloženo kako su pripadnici koljena *Firmicutes* učinkovitiji u razgradnji hrane i dobivanju energije od *Bacteroidetes*. Međutim, brojna druga istraživanja nisu uspjela povezati omjer F/B s pretilosti ili su čak iznijela suprotan zaključak, da je smanjeni omjer F/B povezan s pretilosti (Tims i sur., 2013; Ppatil i sur., 2012; Jumpertz i sur., 2011). Upravo zbog nekonzistentnosti rezultata, omjer F/B kao biomarker u istraživanjima crijevne mikrobiote i pretilosti polako se napušta, a nastoji se osmisliti upitnike za procjenu sastava crijevne mikrobiote i korelacije sa stvarnim podacima te utvrditi usklađenost takvih upitnika s eksperimentalno određenim sastavom.

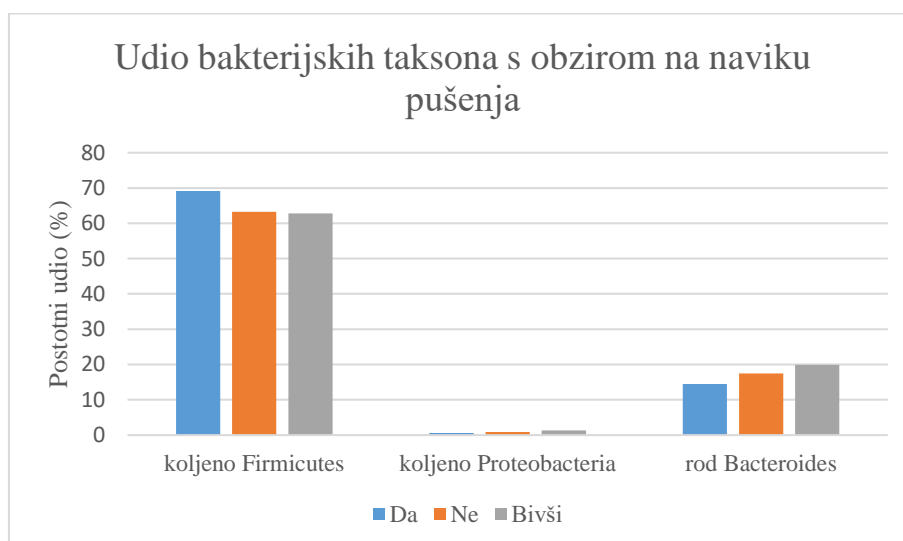
Zanimljivo je istaknuti ispitanicu IM-14 koja boluje od ulceroznog kolitisa i kod koje nije zabilježena prisutnost roda *Roseburia*, ispitanika IM-31 koji ima bolest jetre, a kod kojeg je zabilježen nizak udio bakterijskog roda *Alistipes* (0,450 %), što je u skladu sa zaključcima Parker i sur. (2020).

Tip prehrane znatno utječe na sastav crijevne mikrobiote pojedinca. Taksonomskom klasifikacijom sekvenci uočen je veći udio rodova *Alistipes* i *Bacteroides* kod tipova prehrane mesna i za posebne potrebe, dok su udjeli kod tipova prehrane svejeda, vegetarijanaca i vegana manji, kao što je vidljivo na slici 6. Također, općenito je smanjen udio koljena *Firmicutes* kod tipova prehrane mesna i za posebne potrebe, i smanjen je udio rodova *Eubacterium*, *Roseburia*, *Ruminococcus* i *Prevotella*. Važno je naglasiti da je uzorak za ove dva tipa prehrana jako mali zbog čega su podaci nepouzdana. Udio koljena *Firmicutes* i rodova *Eubacterium*, *Roseburia*, *Ruminococcus* i *Prevotella* povećan je kod tipova prehrane svejeda, vegana i vegetarijanaca, a smanjen je udio rodova *Alistipes* i *Bacteroides*, što odgovara opažanjima Beam i sur. (2021) i Filippis i sur. (2016).



Slika 6. Udio bakterijskih rodova i koljena *Firmicutes* u ukupnom sastavu mikrobiote s obzirom na tip prehrane

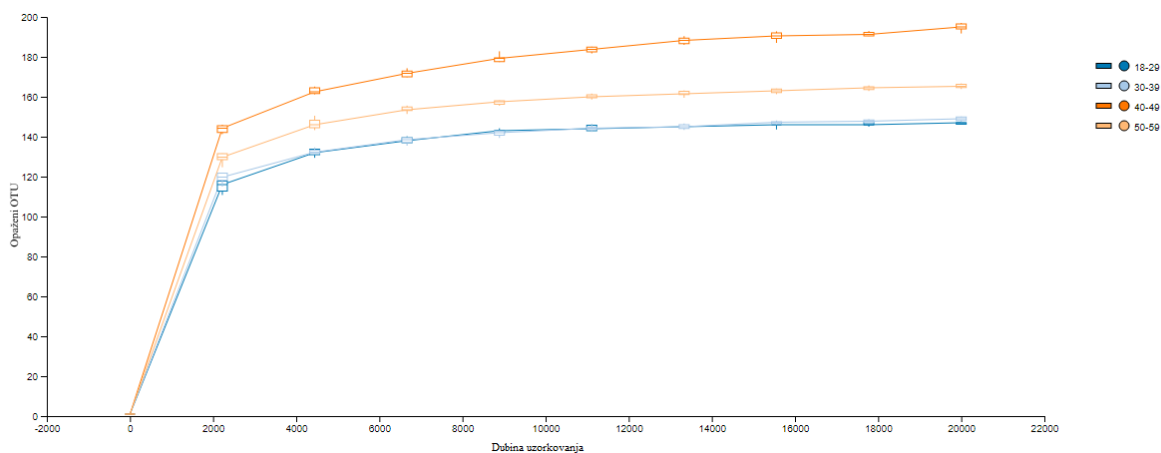
Što se tiče navike pušenja, rezultati se razlikuju od istraživanja Shanahan i sur. (2018). Nepušači nemaju veći udio koljena *Firmicutes* ni manji udio roda *Bacteroides* i *Proteobacteria* od pušača, što je vidljivo na slici 7. No, ovi se rezultati trebaju uzeti s oprezom zbog znatno većeg udjela nepušača u odnosu na pušače i bivše pušače među ispitanicima.



Slika 7. Udio bakterijskog rodova *Bacteroides* i koljena *Firmicutes* i *Proteobacteria* u ukupnom sastavu mikrobiote s obzirom na naviku pušenja

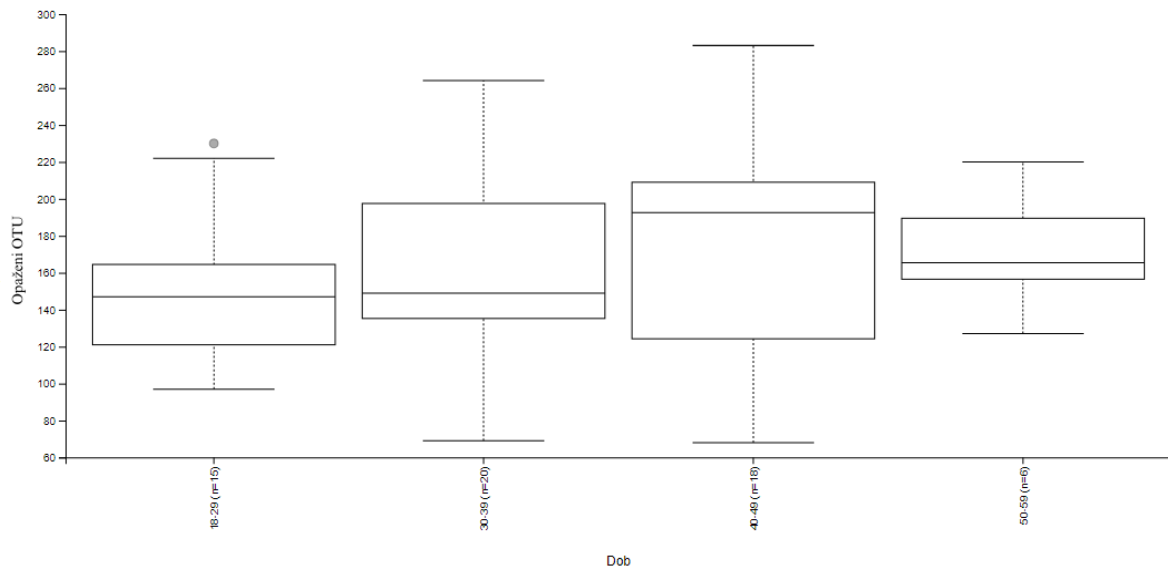
4.3. ALFA RAZNOLIKOST U UZORCIMA

Na slici 8 prikazana je rarefakcijska krivulja alfa raznolikosti mjerena metrikom opaženi OTU iz koje je vidljiva razlika u alfa raznolikosti između dobnih skupina ispitanika takva da ispitanici u dobi od 40 do 49 godina imaju najveću raznolikost, zatim slijede ispitanici od 50 do 59 godina, dok su ispitanici u dobi od 18 do 29 i od 30 do 39 godina. Ipak, ove razlike nisu statistički značajne, što je vidljivo na slici 9, i to je u suglasnosti s istraživanjem (Odamaki i sur., 2016) koji su uočili porast alfa raznolikosti crijevne mikrobiote od rođenja pa do 20 godine života, nakon čega slijedi stabilan period u odrasloj dobi od 20. do 60. godine života. Nakon 60. pa do 100. godine života, zabilježen je ponovni porast alfa raznolikosti koji se povezuje s vitalnošću do u duboku starost. Cuesta-Zuluaga i sur. (2019) također su opisali ovakav trend u promjeni alfa raznolikosti crijevne mikrobiote.



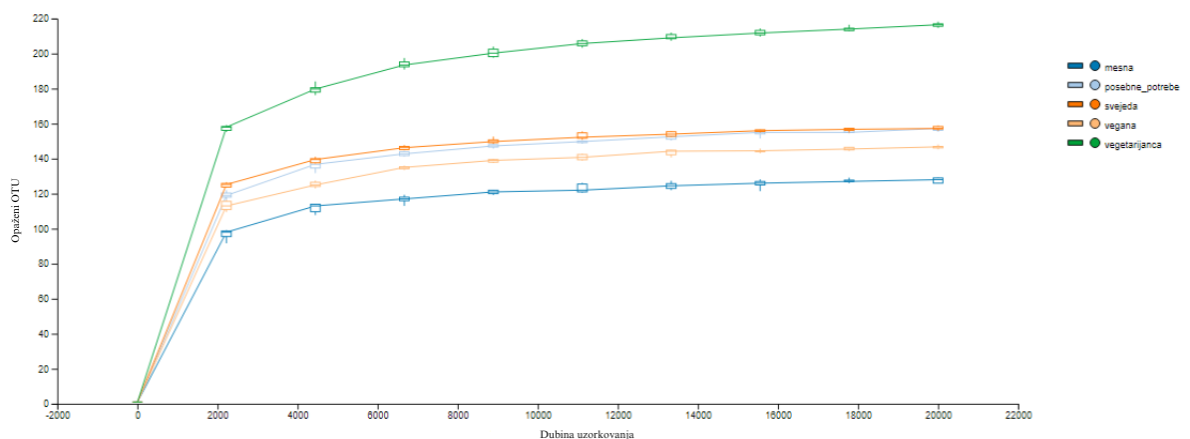
Slika 8. Grafički prikaz alfa raznolikosti između ispitanika s obzirom na njihovu dob

Za ovu razliku u alfa raznolikosti, valjalo bi istražiti dublje socio-ekonomske čimbenike koji bi mogli utjecati na životne i prehrambene navike ispitanika. Na primjer, postoji li povezanost između visine primanja i alfa raznolikosti, uzevši u obzir da viša primanja znatno olakšavaju nabavku raznovrsnih namirnica i dodataka koji mogu obogatiti prehranu i povećati raznolikost konzumiranih namirnica. Također, valjalo bi istražiti je li i u kojoj mjeri alfa raznolikost mikrobiote najmlađe skupine rezultat prehrane u studentskim restoranima.

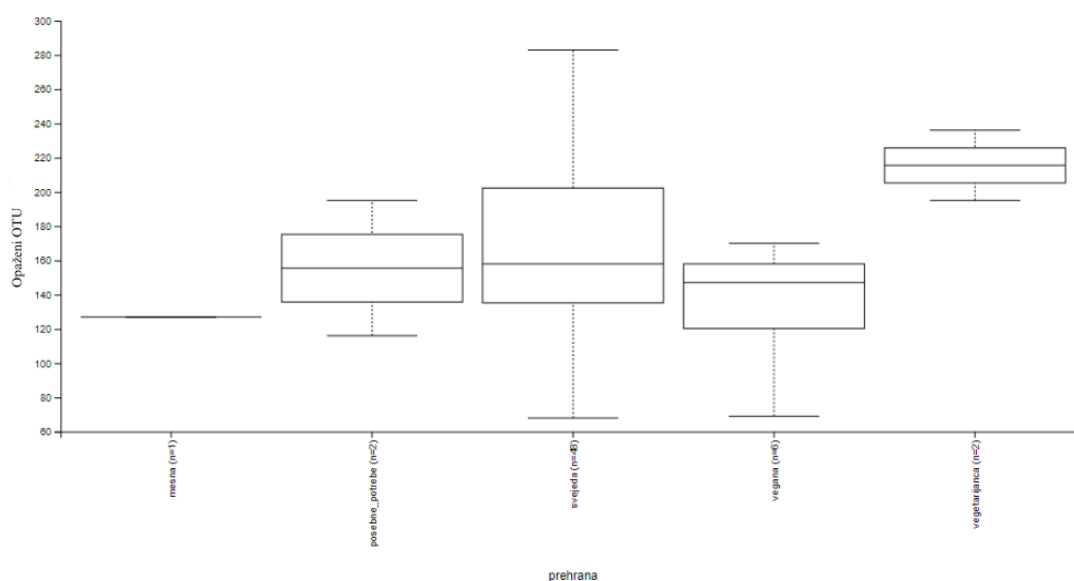


Slika 9. Grafički prikaz analize značajnosti alfa raznolikosti između ispitanika s obzirom na njihovu dob

Alfa raznolikost ispitanika na vegetarijanskom tipu prehrane je najveća i znatno odskaače od ostalih skupina, dok ispitanik na mesnoj prehrani ima najmanju alfa raznolikost, što je vidljivo na slici 10, no analiza značajnosti, vidljiva na slici 11, nije pokazala statistički značajnu razliku među skupinama. Istraživanje (Tomova i sur., 2019) pokazuje da se prehrambeni obrasci temeljeni na namirnicama biljnog porijekla mogu povezati s povećanjem raznolikosti crijevne mikrobiote. Klimentko i sur. (2018) uočili su pozitivnu povezanost alfa raznolikosti i dugotrajnog unosa voća i povrća, a Martínez i sur. (2013) opisali su povećanje alfa raznolikosti kao rezultat dodatka cjelovitih žitarica u prehranu.

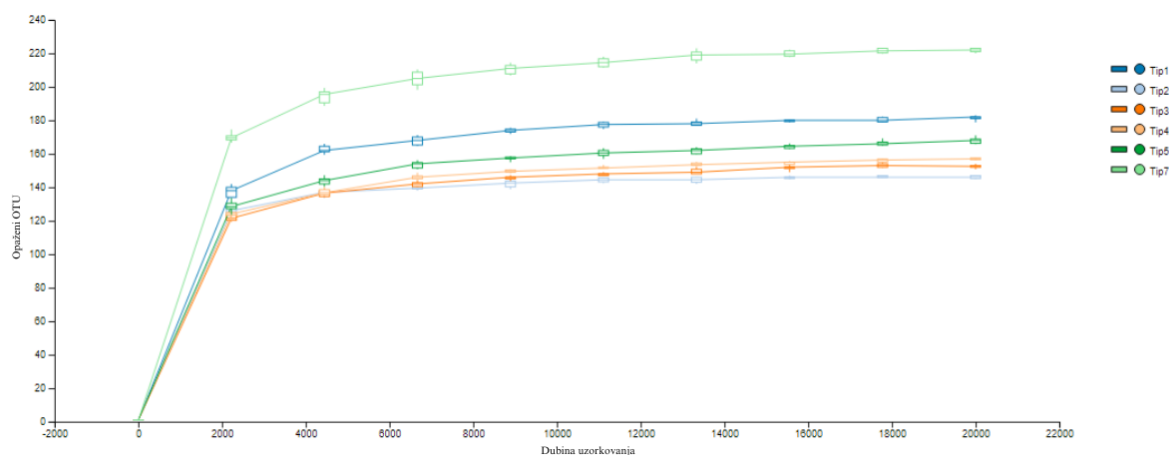


Slika 10. Grafički prikaz alfa raznolikosti između ispitanika s obzirom na tip prehrane

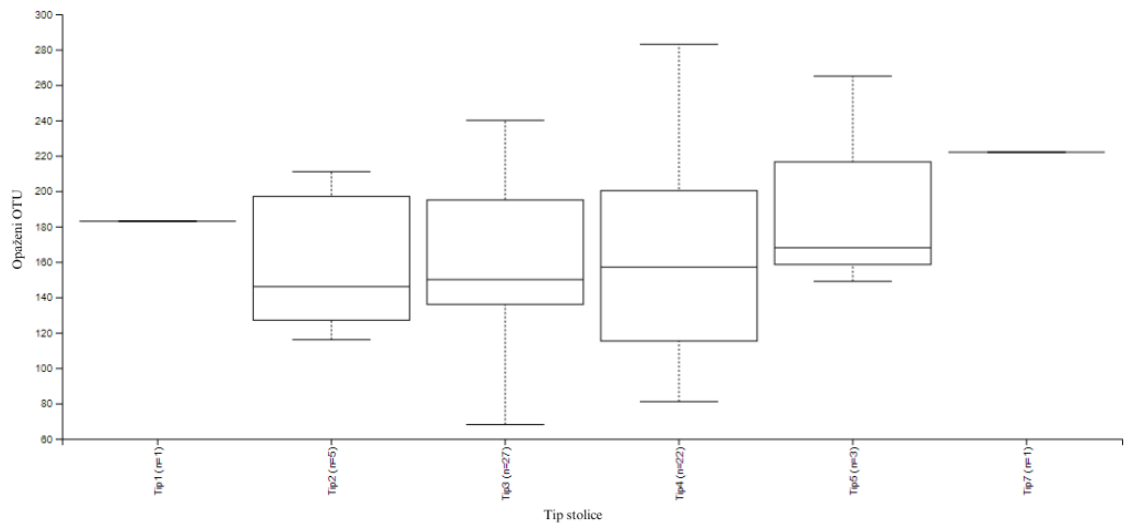


Slika 11. Grafički prikaz analize značajnosti alfa raznolikosti između ispitanika s obzirom na tip prehrane

U preglednom članku (Wang i sur., 2022) zaključeno je da istraživanja na životinjama pokazuju negativne učinke crvenog mesa na sastav mikrobiote i zdravlje, dok su istraživanja na ljudima kontradiktorna i često manjkava. Visoka konzumacija mesnih proizvoda povezana je često s prehranom bogatom mastima (tzv. zapadnjački tip prehrane) koja je povezana s negativnim učinkom na crijevnu mikrobiotu (Shi, 2019).

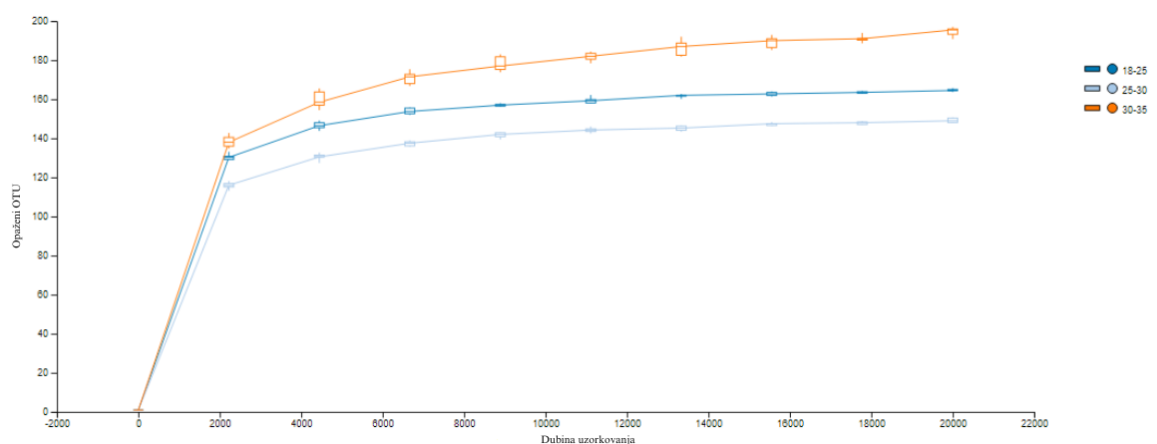


Slika 12. Grafički prikaz alfa raznolikosti između uzoraka s obzirom na tip stolice

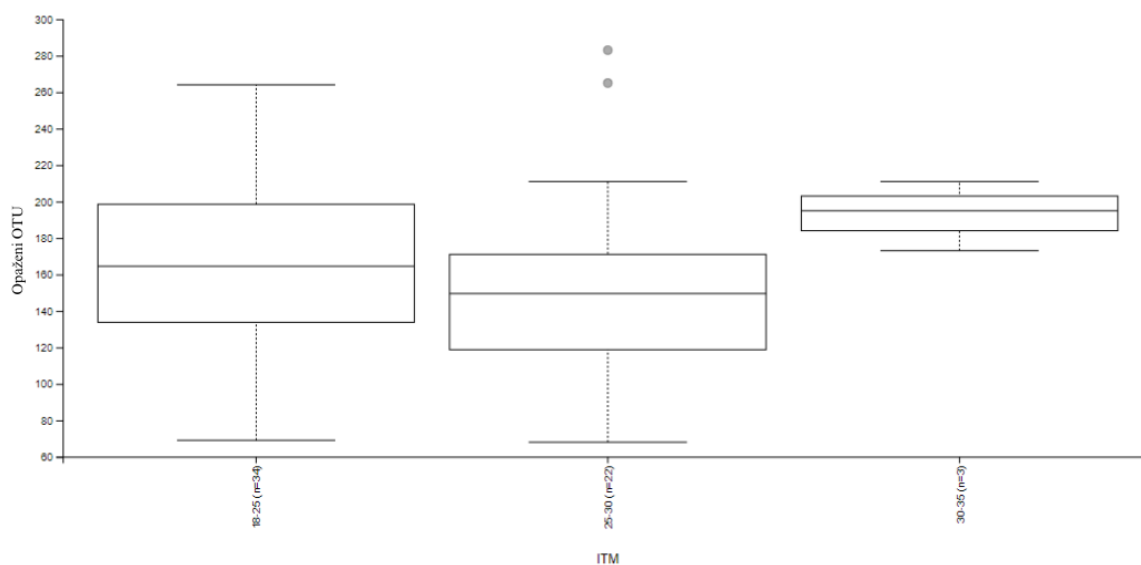


Slika 13. Grafički prikaz analize značajnosti alfa raznolikosti između ispitanika s obzirom na tip stolice

Analiza alfa raznolikosti crijevne mikrobiote s obzirom na tip stolice (prema *Bristol Stool Form Scale* gdje je broj 1 najtvrđa konzistencija, a 7 vodena), vidljiva na slikama 12 i 13, nije pokazala statistički značajnu razliku između ispitanika. Ovaj rezultat je suprotan rezultatu istraživanja (Vandeputte i sur., 2016) u kojem je uočena poveznica između konzistencije stolice i raznolikosti mikrobiote takva da raznolikost znatno opada s padom konzistencije stolice i najmanja je kod ispitanika s najmekšom stolicom.



Slika 14. Grafički prikaz alfa raznolikosti između ispitanika s obzirom na indeks tjelesne mase



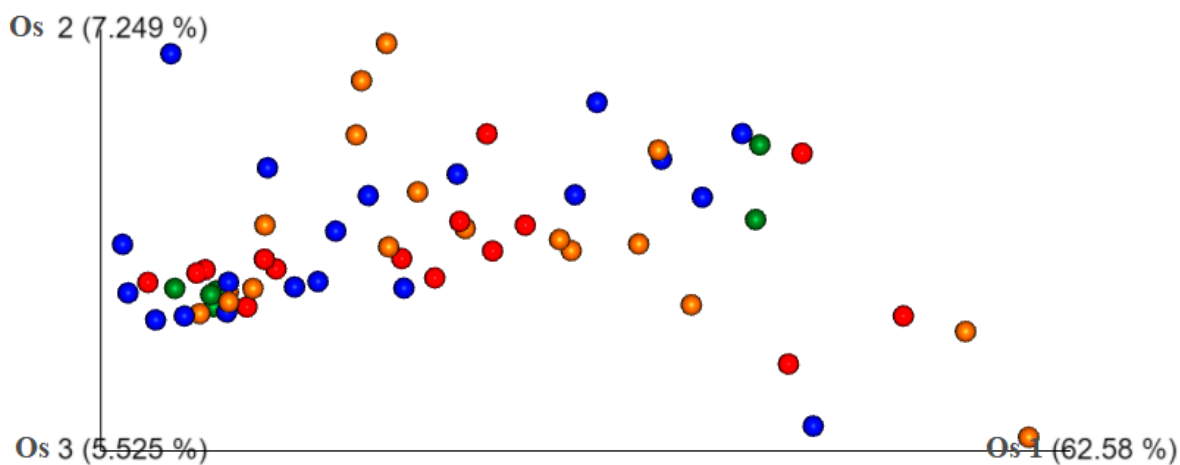
Slika 15. Grafički prikaz analize značajnosti alfa raznolikosti između ispitanika s obzirom na indeks tjelesne mase

Prikaz alfa raznolikosti s obzirom na tjelesnu masu na slici 14 pokazuje kako je najveća raznolikost u skupini ispitanika s indeksom tjelesne mase od 30 do 35 kg/m², a najmanja kod ispitanika s indeksom tjelesne mase od 25 do 30 kg/m². Analiza značajnosti nije pokazala razlike u između skupina ispitanika, što se vidi na slici 15. Većina istraživanja pokazala je nižu alfa raznolikost kod povišenog indeksa tjelesne mase u usporedbi s poželjnim indeksom tjelesne mase (18 – 25 kg/m²) (Pinart i sur., 2022). Kim i sur. (2020) također su uočili da postoji razlika u alfa raznolikosti pretilih i osoba s prekomjernom tjelesnom koji su metabolički zdravi i koji nisu. Nižu raznolikost imala je skupina koja je imala simptome metaboličkog sindroma.

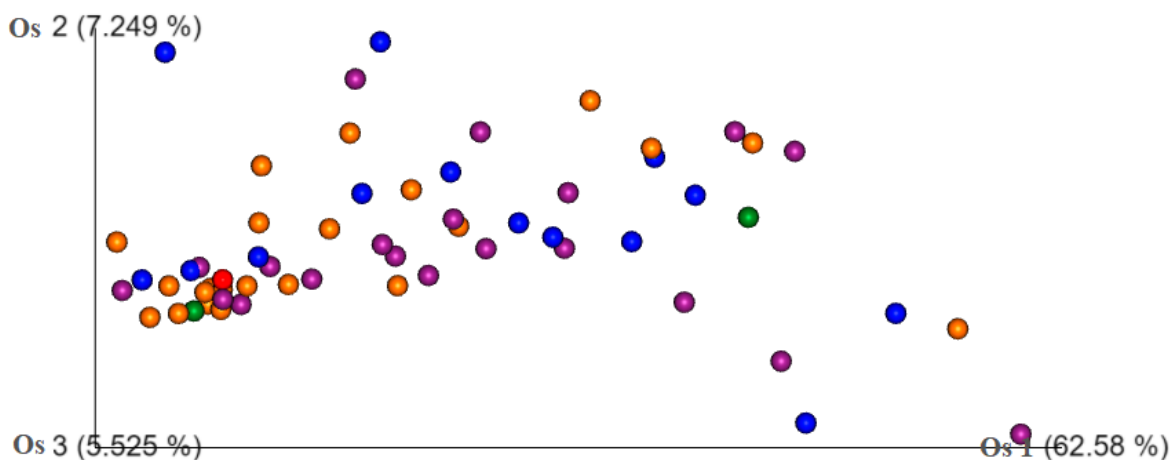
4.4. BETA RAZNOLIKOST U UZORCIMA

Analiza beta raznolikosti uzoraka ispitanika s obzirom na njihovu dob metrikom težinske UniFrac vidljiva je na slici 16 i može se uočiti grupiranje uzoraka za dob od 50 do 59 godina (zelena boja) što znači da su uzorci filogenetski sličniji u prisutnosti i zastupljenosti bakterija u odnosu na ostale uzorke. No, jedan uzorak odskače od ostalih, a to je IM-24. Ispitanica se od ostalih ispitanika u svojoj dobnoj skupini razlikuje po tome što nema alergiju niti kroničnu bolest, te je po indeksu tjelesne mase u skupini normalne tjelesne mase, dok su dva ispitanika u

skupini prekomjerne tjelesne mase, a jedan u skupini pretilosti.



Slika 16. Grafički prikaz beta raznolikosti ispitanika s obzirom na dob gdje je udaljenost određena metrikom težinski UniFrac (crveno – 18-29; plavo – 30-39; narančasto – 40-49; zeleno – 50-59)



Slika 17. Grafički prikaz beta raznolikosti ispitanika s obzirom na bračni status gdje je udaljenost određena metrikom težinski UniFrac (plavo – izvanbračna zajednica; narančasto – oženjen/udana; zeleno – rastavljen/a; ljubičasto – slobodan/na)

Gacesa i sur. (2022) opisali su kako suživot u istom kućanstvu također oblikuje sastav mikrobiote tako da je on sličniji u ispitanika koji žive zajedno iako nisu rodbinski povezani

u usporedbi s ispitanicima koji ne žive zajedno. Proučavanjem raspodjele ispitanika na slici 17, te usporedbom s raspodjelom ispitanika na grafikonu beta raznolikosti gdje je udaljenost određena metrikom netežinski UniFrac, uočeno je kako se ispitanici IM-10 i IM-57 nalaze vrlo blizu na oba grafikona. To označuje filogenetsku sličnost u prisutnosti i zastupljenosti vrsta bakterija u njihovim uzorcima iz čega bi se moglo zaključiti da žive u istom kućanstvu.

Provedbom analize značajnosti nije utvrđena statistički značajna razlika između grupa niti za jedan od odabranih čimbenika životnog stila; dobi, spola, bračnog statusa, indeksa tjelesne mase, tipa prehrane, tipa stolice, navike pušenja, navike spavanja.

Nedostaci provedenog istraživanja su mali broj ispitanika i nedovoljno raznolika zastupljenost ispitanika po različitim skupinama (npr. vrlo malo pušača u odnosu na nepušače, vrlo malo vegetarijanaca i vegana u odnosu na svejede) što je zasigurno utjecalo na statističku analizu i rezultate testova značajnosti, zbog čega se opažanja ne podudaraju s dostupnom literaturom. Također prilikom provedbe eksperimentalnog dijela rada, došlo je do pogreške prilikom prilagodbe protokola laboratoriju u kojem je rad odrađen zbog čega je na u grafikonima taksonomske klasifikacije na nižim taksonomskim razinama za pojedine skupine bakterija vidljivo neuspješno određivanje bakterija (engl. *uncultured*, *unidentified*). Iz istog razloga, nije bilo moguće točno usporediti prisutnost tih bakterija u uzorcima koje se u literaturi povezuju uz određena bolesna stanja (npr. zastupljenost vrsta bakterija kod Crohnove bolesti).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju ovog istraživanja i dobivenih rezultata, mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Omjer F/B ne može se povezati s indeksom tjelesne mase kod ispitanika, a time ni rizikom za razvoj pretilosti, jer nije uočena statistički značajna razlika između omjera F/B u skupinama ispitanika koji pripadaju grupama s normalnom tjelesnom masom, prekomjernom tjelesnom masom i pretiloj.
2. Alfa raznolikosti ispitanika s obzirom na dob i tip prehrane u skladu su s dostupnom literaturom, dok se alfa raznolikosti s obzirom na indeks tjelesne mase i tip stolice razlikuju od dostupne literature u rezultatima.
3. Analiza značajnosti alfa raznolikosti nije pokazala statistički značajnu razliku između grupa ispitanika za dob, spol, bračni status, indeks tjelesne mase, tip prehrane, tip stolice, naviku pušenja i naviku spavanja.
4. Beta raznolikost između ispitanika pokazala je grupiranje uzoraka za ispitanike dobne skupine od 50 do 59 godina, no ta razlika nije statistički značajna.
5. Analizom Beta raznolikosti nije se pokazalo grupiranje ispitanika s obzirom na dob, spol, bračni status, indeks tjelesne mase, tip prehrane, tip stolice, naviku pušenja, naviku spavanja što je i potvrđeno analizom značajnosti između grupa kojom nije utvrđena statistički značajna razlika.
6. Usporedbom odgovora iz upitnika i sastava crijevne mikrobiote ispitanika nisu nađene korelacije potvrđene ranijim istraživanjima. Razlozi mogu biti mala i neizbalansirana populacija ispitanika.

6. LITERATURA

Abdill RJ, Adamowicz EM, Blekhman R (2022) Public human microbiome data are dominated by highly developed countries. *PLoS Biology* **20(2)**. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001536>

Allen JM, Mailing LJ, Niemi GM, Moore R, Cook MD, White BA, i sur. (2018) Exercise Alters Gut Microbiota Composition and Function in Lean and Obese Humans. *Med Sci Sports Exer* **50(4)**, 747–757. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001495>

Anhê FF, Roy D, Pilon G, Dudonné S, Matamoros S, Varin TV, i sur. (2015) A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. Population in the gut microbiota of mice. *Gut* **64(6)**, 872–883. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307142>

Annavajhala MK, May M, Compres G, Freedberg DE, Graham R, Stump S, i sur. (2020) Relationship of the Esophageal Microbiome and Tissue Gene Expression and Links to the Oral Microbiome: A Randomized Clinical Trial. *Clin Transl Gastroen* **11(12)**, e00235. <https://doi.org/10.14309/ctg.0000000000000235>

Anonymous 1 (2023) KÄLLA Microbiome Test. <https://kalla.com/products/microbiome-test>. Pristupljeno 25. veljače 2023.

Anonymous 2 (2023) V I O M E Gut Intelligence Test. <https://www.viome.com/products/gut-intelligence>. Pristupljeno 25. veljače 2023.

Arnold IC, Dehzad N, Reuter S, Martin H, Becher B, Taube C, i sur. (2011) Brief report *Helicobacter pylori* infection prevents allergic asthma in mouse models through the induction of regulatory T cells. *J Clin Invest* **121**. <https://doi.org/10.1172/JCI45041DS1>

Asao K, Hashida N, Ando S, Motooka D, Kurakami H, Nakamura S, i sur. (2019) Conjunctival dysbiosis in mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Sci Rep-UK* **9(1)**. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44861-5>

- Beam A, Clinger E, Hao L (2021) Effects of Diet and Dietary Components on the Composition of the Gut Microbiota. *Nutrients* **13(8)**, 2795. <https://doi.org/10.3390/nu13082795>
- Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Verges MCC, Charles T i sur. (2020) Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* **8**, 103. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
- Biagi E, Franceschi C, Rampelli S, Severgnini M, Ostan R, Turrioni S, i sur. (2016) Gut Microbiota and Extreme Longevity. *Curr Biol* **26(11)**, 1480–1485. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.04.016>
- Blaser MJ (2017) The theory of disappearing microbiota and the epidemics of chronic disease. *Nat Rev Immunol* **17**, 461-463. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.77>
- Bordenstein SR, Theis KR (2015) Host biology in light of the microbiome: Ten principles of holobionts and hologenomes. *PLOS Biol* **13(8)**. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002226>
- Bouchard C (2011) Lectures on Auto-intoxication In Disease; Or, Self-poisoning Of the Individual, Nabu Press, Charleston, str. 282.
- Bouslimani A, Silva RD, Kosciulek T, Janssen S, Callewaert C, Amir, i sur. (2019) The impact of skin care products on skin chemistry and microbiome dynamics. *BMC Biol* **17(1)**. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0660-6>
- Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, Ghissassi FE, Benbrahim-Tallaa L (2015) Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol* **16(16)**, 1599-1600. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00444-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00444-1)
- Bressa C, Bailén-Andrino M, Pérez-Santiago J, González-Soltero R, Pérez M, Montalvo-Lominchar M, i sur. (2017) Differences in gut microbiota profile between women with active lifestyle and sedentary women. *PLOS ONE* **12(2)**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171352>

Brooks AW, Priya S, Blekhman R, Bordenstein SR (2018) Gut microbiota diversity across ethnicities in the United States. *PLOS Biol* **16**(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006842>

Butler LM, Sinha R, Millikan RC, Martin CF, Newman B, Gammon MD, i sur. (2003) Heterocyclic amines, meat intake, and association with colon cancer in a population-based study. *Am J Epidemiol* **157**(5), 434–445. <https://doi.org/10.1093/aje/kwf221>

Cai S, Fan Y, Zhang B, Lin J, Yang X, Liu Y, i sur. (2021) Appendectomy Is Associated With Alteration of Human Gut Bacterial and Fungal Communities. *Front Microbiol* **12**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.724980>

Cantarel BL, Lombard V, Henrissat B (2012) Complex carbohydrate utilization by the healthy human microbiome. *PLOS ONE* **7**(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028742>

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* **7**(5), 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>

Chambers ES, Viardot A, Psichas A, Morrison DJ, Murphy KG, Zac-Varghese SE, i sur. (2015) Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut* **64**(11), 1744–1754. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307913>

Chatelier EL, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, i sur. (2013) Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **500**(7464), 541–546. <https://doi.org/10.1038/nature12506>

Chaudhari DS, Dhotre DP, Agarwal DM, Gaikhe AH, Bhalerao D, Jadhav P, i sur. (2020) Gut, oral and skin microbiome of Indian patrilineal families reveal perceptible association with age. *Sci Rep-UK* **10**(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62195-5>

Chen C, Hemme C, Beleno J, Shi ZJ, Ning D, Qin Y, i sur. (2018) Oral microbiota of periodontal health and disease and their changes after nonsurgical periodontal therapy. *ISME J* **12**(5), 1210–1224. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0037-1>

- Chien AL, Tsai J, Leung S, Mongodin EF, Nelson AM, Kang S, i sur. (2019) Association of Systemic Antibiotic Treatment of Acne with Skin Microbiota Characteristics. *JAMA Dermatol* **155**(4), 425–434. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2018.5221>
- Chopyk J, Bojanowski CM, Shin J, Moshensky A, Fuentes AL, Bonde SS, i sur. (2021) Compositional Differences in the Oral Microbiome of E-cigarette Users. *Front Microbiol* **12**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.599664>
- Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O’connor EM, Cusack S, i sur. (2012) Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* **488**(7410), 178–184. <https://doi.org/10.1038/nature11319>
- Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, Prifti E, Chatelier EL, Almeida M (2013) Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* **500**, 585-588. <https://doi.org/10.1038/nature12480>
- Cuesta-Zuluaga J de la, Kelley ST, Chen Y, Escobar JS, Mueller NT, Ley RE, i sur. (2019) Age- and Sex-Dependent Patterns of Gut Microbial Diversity in Human Adults. *mSystems* **4**(4). <https://doi.org/10.1128/msystems.00261-19>
- David LA, Materna AC, Friedman J, Campos-Baptista MI, Blackburn MC, Perrotta A, i sur. (2014a) Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome Biol* **15**(7). <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-7-r89>
- David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, i sur. (2014b) Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* **505**(7484), 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
- Desai MS, Seekatz AM, Koropatkin NM, Kamada N, Hickey CA, Wolter M, i sur. (2016) A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell* **167**(5), 1339-1353.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.043>
- Dethlefsen L, Relman DA (2011) Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *P Nat Acad Sci USA* **108**(1), 4554–4561. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000087107>

Dewhurst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu WH, i sur. (2010) The human oral microbiome. *J Bacteriol* **192(19)**, 5002–5017. <https://doi.org/10.1128/JB.00542-10>

Dostal A, Chassard C, Hilty FM, Zimmermann MB, Jaeggi T, Rossi S, i sur. (2012) Iron depletion and repletion with ferrous sulfate or electrolytic iron modifies the composition and metabolic activity of the gut microbiota in rats. *J Nutr* **142(2)**, 271–277. <https://doi.org/10.3945/jn.111.148643>

Durk RP, Castillo E, Márquez-Magaña L, Grosicki GJ, Bolter ND, Lee CM, i sur. (2019) Gut microbiota composition is related to cardiorespiratory fitness in healthy young adults. *Int J Sport Nutr Exe* **29(3)**, 249–253. <https://doi.org/10.1123/ijsnem.2018-0024>

Fallani M, Amarri S, Uusijarvi A, Adam R, Khanna S, Aguilera M, i sur. (2011) Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. *Microbiology* **157(5)**, 1385–1392. <https://doi.org/10.1099/mic.0.042143-0>

Fassarella M, Blaak EE, Penders J, Nauta A, Smidt H, Zoetetal EG (2020) Gut microbiome stability and resilience: elucidating the response to perturbations in order to modulate gut health. *Gut* **0**, 1-11. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-321747>

Farre-Maduell E, Casals-Pascual C (2019) The origins of gut microbiome research in Europe: From Escherich to Nissle. *Hum Microbiome J* **14**, 100065.

Filippis FD, Pellegrini N, Vannini L, Jeffery IB, Storia AL, Laghi L, i sur. (2016) High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut* **65(11)**. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309957>

Fischbach MA (2018) Microbiome: Focus on causation and mechanism. *Cell* **174(4)**, 785-790. <https://doi.org/doi:10.1016/j.cell.2018.07.038>

Flores M, Glusman G, Brogaard K, Hood L (2013) P4 medicine: how systems medicine will transform the healthcare sector and society. *Per Med* **10(6)**, 565-576. <https://doi.org/10.2217/PME.13.5>

Friedmann HC (2014) Escherich and *Escherichia*. *Adv Appl Microbiol* **60**, 133-196.

Gacesa R, Kurilshikov A, Vila AV, Sinha T, Klaassen MAY, Bolte LA, i sur. (2022) Environmental factors shaping the gut microbiome in a Dutch population. *Nature* **604(7907)**, 732–739. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04567-7>

Goins J (2019) Microbiomes: An Origin Story. <https://asm.org/Articles/2019/March/Microbiomes-An-Origin-Story>. Pristupljeno 11. prosinca 2022.

Gorvitovskaia A, Holmes SP, Huse SM (2016) Interpreting prevotella and bacteroides as biomarkers of diet and lifestyle. *Microbiome* **4**. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0160-7>

Gu Y, Zhou G, Zhou F, Li Y, Wu Q, He H (2023) Gut and Vaginal Microbiomes in PCOS: Implications for Women's Health. *Front Endocrinol* **13**, 808508. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.808508>

Guinane CM, Tadrous A, Fouhy F, Ryan CA, Dempsey EM, Murphy B, i sur. (2013) Microbial composition of human appendices from patients following appendectomy. *MBIO* **4(1)**. <https://doi.org/10.1128/mBio.00366-12>

Gupta AK, Kohli Y (2004) Prevalence of Malassezia species on various body sites in clinically healthy subjects representing different age group. *Med Mycol* **42(1)**, 35–42. <https://doi.org/10.1080/13693780310001610056>

Gutiérrez N, Garrido D (2019) Species Deletions from Microbiome Consortia Reveal Key Metabolic Interactions between Gut Microbes. *MSystems* **4(4)**. <https://doi.org/10.1128/msystems.00185-19>

Guyton AC, Hall EH (2011) *Gastrointestinal Physiology*. U: Textbook of Medical Physiology, 12. izd., Saunders Elsevier, Philadelphia, str. 751-807. Hayashi H, Takahashi R, Nishi T, Sakamoto M, Benno Y (2005) Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and rectosigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *J Med Microbiol* **54(11)**, 1093–1101. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45935-0>

Hayashi H, Takahashi R, Nishi T, Sakamoto M, Benno Y (2005) Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and rectosigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene

libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *J Med Microbiol* **54(11)**, 1093–1101. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45935-0>

Hjorth MF, Blædel T, Bendtsen LQ, Lorenzen JK, Holm JB, Kiilerich P, i sur. (2019) Prevotella-to-Bacteroides ratio predicts body weight and fat loss success on 24-week diets varying in macronutrient composition and dietary fiber: Results from a post-hoc analysis. *Int J Obesity* **43(1)**, 149–157. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0093-2>

Hullar MAJ, Burnett-Hartman AN, Lampe JW (2014) Gut microbes, diet, and cancer. *Canc Treat* **159**, 377–399. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38007-5_22

Ijssennagger N, Belzer C, Hooiveld GJ, Dekker J, Mil SWCV, Müller M, i sur. (2015) Gut microbiota facilitates dietary heme-induced epithelial hyperproliferation by opening the mucus barrier in colon. *P Natl Acad Sci USA* **112(32)**, 10038–10043. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507645112>

Illumina (2016) Customize a short end-to-end workflow guide with the Custom Protocol Selector Nextera ® DNA Library Prep Reference Guide. <https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_nextera_nextera_dna/nextera-dna-library-prep-reference-guide-15027987-01.pdf> Pristupljeno 25. veljače 2023.

Jakobsson HE, Abrahamsson T R, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, Jernberg C, i sur. (2014) Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarean section. *Gut* **63(4)**, 559–566. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303249>

James KR, Gomes T, Elmentaite R, Kumar N, Gulliver EL, King HW, i sur. (2020) Distinct microbial and immune niches of the human colon. *Nat Immunol* **21(3)**, 343–353. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0602-z>

Jervis-Bardy J, Leong LEX, Papanicolas LE, Ivey KL, Chawla S, Woods CM, i sur. (2019) Examining the Evidence for an Adult Healthy Middle Ear Microbiome. *MSphere* **4(5)**. <https://doi.org/10.1128/msphere.00456-19>

- Jo JJ, Kennedy EA, Kong HH (2016) Topographical and physiological differences of the skin mycobiome in health and disease. *Virulence* **8(3)**, 324-333. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1249093>
- Joossens M, Huys G, Cnockaert M, Preter VD, Verbeke K, Rutgeerts P, i sur. (2011) Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut* **60(5)**, 631-637. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.223263>
- Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, Trinidad C, Bogardus C, Gordon JI, i sur. (2011) Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am J Clin Nutr* **94(1)**, 58-65. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.010132>
- Kastl Jr AJ, Terry NA, Wu GD, Albenberg LG (2020) The Structure and Function of the Human Small Intestinal Microbiota: Current Understanding and Future Directions. *CMGH* **9(1)**, 33-45. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.07.006>
- Kim KA, Gu W, Lee IA, Joh EH, Kim DH (2012) High Fat Diet-Induced Gut Microbiota Exacerbates Inflammation and Obesity in Mice via the TLR4 Signaling Pathway. *PLOS ONE* **7(10)**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047713>
- Kim MH, Yun, KE, Kim, J, Park E, Chang Y, Ryu S, i sur. (2020) Gut microbiota and metabolic health among overweight and obese individuals. *Sci Rep-UK* **10(1)**. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76474-8>
- Klimenko NS, Tyakht, AV, Popenko AS, Vasiliev AS, Altukhov IA, Ischenko D, i sur. (2018) Microbiome responses to an uncontrolled short-term diet intervention in the frame of the citizen science project. *Nutrients* **10(5)**. <https://doi.org/10.3390/nu10050576>
- Knights D, Parfrey LW, Zaneveld J, Lozupone CA, Knight R (2011) Human-associated microbial signatures: examining their predictive value. *Cell Host Microbe* **10(4)**. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.09.003>
- Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, i sur. (2013) Intestinal microbiota metabolism of l-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med* **19(5)**, 576-585. <https://doi.org/10.1038/nm.3145>

Koh A, Vadder FD, Kovatcheva-Datchary P, Backhed F (2016) From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell* **165**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041>

Konstantinidis T, Tsigalou C, Karvelas A, Stavropoulou E, Voidarou C, Bezirtzoglou E (2020) Effects of Antibiotics upon the Gut Microbiome: A Review of the Literature. *Biomedicines* **502**. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8110502>

Krajmalnik-Brown R, Ilhan ZE, Kang DWK, DiBaise JK (2012) Effects of Gut Microbes on Nutrient Absorption and Energy Regulation. *Nutr Clin Pract* **27(2)**, 201-214. <https://doi.org/10.1177/0884533611436116>

Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ (2006) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* **19(3)**, 449-490. <https://doi.org/doi:10.1128/CMR.00054-05>

Lappi J, Salojärvi J, Kolehmainen M, Mykkänen H, Poutanen K, de Vos WM, i sur. (2013) Intake of whole-grain and fiber-rich rye bread versus refined wheat bread does not differentiate intestinal microbiota composition in finnish adults with metabolic syndrome. *J Nutr* **143(5)**, 648–655. <https://doi.org/10.3945/jn.112.172668>

Larsen N, Vogensen FK, Berg FWJVD, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, i sur. (2010) Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLOS ONE* **5(2)**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009085>

Lau AWY, Tan LTH, Mutalib NSA, Wong SH, Letchumanan V, Lee LH (2021) The chemistry of gut microbiome in health and diseases. *PMMB* **4(1)**. <https://doi.org/10.36877/pmmb.a0000175>

Laursen MF, Andersen LBB, Michaelsen KF, Mølgaard C, Trolle E, Bahl MI, i sur. (2016) Infant Gut Microbiota Development Is Driven by Transition to Family Foods Independent of Maternal Obesity. *MSphere* **1(1)**. <https://doi.org/10.1128/msphere.00069-15>

Lebwohl B, Blaser MJ, Ludvigsson, JF, Green PHR, Rundle A, Sonnenberg A, i sur. (2013) Decreased risk of celiac disease in patients with helicobacter pylori colonization. *Am J Epidemiol* **178(12)**, 1721–1730. <https://doi.org/10.1093/aje/kwt234>

Lee SH, Yun Y, Kim SJ, Lee EJ, Chang Y, Ryu S, i sur. (2018) Association between cigarette smoking status and composition of gut microbiota: Population-based cross-sectional study. *J Clin Med* **7(9)**. <https://doi.org/10.3390/jcm7090282>

Ley RE, Ckhed FB, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA* **102(31)**, 11070-11075. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504978102>

Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444(7122)**, 1022-1023. <https://doi.org/10.1038/4441022a>.

Li K, Bihan M, Methé BA (2013) Analyses of the Stability and Core Taxonomic Memberships of the Human Microbiome. *PLOS ONE* **8(5)**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063139>

Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R (2012) Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **489(7415)**, 220-230. <https://doi.org/10.1038/nature11550>

Machiels K, Joossens M, Sabino J, Preter VD, Arijis I, Eeckhaut V, i sur. (2014) A decrease of the butyrate-producing species *roseburia hominis* and *faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* **63(8)**, 1275–1283. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-304833>

Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pessoa S, Navarrete P, i sur. (2020) The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker for Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients* **12**, 1474. <https://doi.org/10.3390/nu12051474>

Maltz RM, Keirse J, Kim SC, Mackos AR, Gharaibeh RZ, Moore CC, i sur. (2018) Prolonged restraint stressor exposure in outbred CD-1 mice impacts microbiota, colonic inflammation, and short chain fatty acids. *PLOS ONE* **13(5)**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196961>

Maltz RM, Keirse J, Kim SC, Mackos AR, Gharaibeh RZ, Moore CC, i sur. (2019) Social Stress Affects Colonic Inflammation, the Gut Microbiome, and Short-chain Fatty Acid

Levels and Receptors. *J Pediatr Gastr Nutr* **68(4)**, 533–540. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002226>

Marcobal A, Sonnenburg JL (2012) Human milk oligosaccharide consumption by intestinal microbiota. *Clin Microbiol Infec* **18(4)**, 12–15. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03863.x>

Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães VD, Sokol H, Doré J, i sur. (2009) The firmicutes/bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol* **9**. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-123>

Martínez I, Lattimer JM, Hubach KL, Case JA, Yang J, Weber CG, i sur. (2013) Gut microbiome composition is linked to whole grain-induced immunological improvements. *ISME J* **7(2)**, 269–280. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.104>

Martinez-Guryn K, Hubert N, Frazier K, Urlass S, Musch MW, Ojeda P, i sur. (2018) Small Intestine Microbiota Regulate Host Digestive and Absorptive Adaptive Responses to Dietary Lipids. *Cell Host Microbe* **23(4)**, 458-469.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.03.011>

Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, i sur. (2009) Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* **461(7268)**, 1282–1286. <https://doi.org/10.1038/nature08530>

Mauerhofer LM, Pappenreiter P, Paulik C, Seifert AH, Bernacchi S, Rittmann SKMR (2019) Methods for quantification of growth and productivity in anaerobic microbiology and biotechnology. *Folia Microbiol* **64(3)**, 321–360. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0658-4>

Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, i sur. (2017) The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev* **81(4)**. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-17>

Mousa WK, Chehadeh F, Husband S (2022) Recent Advances in Understanding the Structure and Function of the Human Microbiome. *Front Microbiol* **13**, 825338. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.825338>

- Nagpal R, Shively CA, Appt SA, Register TC, Michalson KT, Vitolins MZ, i sur. (2018) Gut Microbiome Composition in Non-human Primates Consuming a Western or Mediterranean Diet. *Front Nutr* **5**. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00028>
- Odamaki T, Kato K, Sugahara H, Hashikura N, Takahashi S, Xiao JZ, i sur. (2016) Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: A cross-sectional study. *BMC Microbiol* **16(1)**. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0708-5>
- Ozato N, Saito S, Yamaguchi T, Katashima M, Tokuda I, Sawada K, i sur. (2019) Blautia genus associated with visceral fat accumulation in adults 20–76 years of age. *NPJ Biofilms Microbiomes* **5(1)**. <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0101-x>
- Palmnäs MSA, Cowan TE, Bomhof MR, Su J, Reimer RA, Vogel HJ, i sur. (2014) Low-dose aspartame consumption differentially affects gut microbiota-host metabolic interactions in the diet-induced obese rat. *PLOS ONE* **9(10)**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109841>
- Paola MD, Sani C, Clemente AM, Iossa A, Perissi E, Castronovo G, i sur. (2017) Characterization of cervico-vaginal microbiota in women developing persistent high-risk Human Papillomavirus infection. *Sc Rep-UK* **7(1)**. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09842-6>
- Pariante N, Clark H, Stone L, Brunello L, Tang L, York A (2019) Human microbiota research. www.nature.com/collections/microbiota-milestone. Pristupljeno 14. prosinca 2022.
- Ppatil D, Pdhotre D, Gchavan S, Sultan A, Jain DS, Lanjekar VB, i sur. (2012) Molecular analysis of gut microbiota in obesity among Indian individuals. *J Biosciences* **37(4)**, 647–657. <https://doi.org/10.1007/s12038-012-9244-0>
- Parker BJ, Wearsch PA, Veloo ACM, Rodriguez-Palacios A (2020) The Genus *Alistipes*: Gut bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer and Mental Health. *Front Immunol* **11**, 906. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00906>
- Pinart M, Dotsch A, Schlicht K, Laudes M, Bouwman J, Forslund Sk (2021) Gut Microbiome Composition in Obese and Non-Obese Persons: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* **14**, 12. <https://doi.org/10.3390/nu14010012>

- Rabot S, Membrez M, Bruneau A, Gérard P, Harach T, Moser M, i sur. (2010) Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *FASEB J* **24(12)**, 4948–4959. <https://doi.org/10.1096/fj.10-164921>
- Reynoso-García J, Miranda-Santiago AE, Meléndez-Vázquez NM, Acosta-Pagán K, Sánchez-Rosado M, Díaz-Rivera J, i sur. (2022) A complete guide to human microbiomes: Body niches, transmission, development, dysbiosis, and restoration. *Front Biol* **2**. <https://doi.org/10.3389/fsysb.2022.951403>
- Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggianno GAD, Gasbarrini A, i sur. (2019) What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms* **7(1)**. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>
- Roopchand DE, Carmody RN, Kuhn P, Moskal K, Rojas-Silva P, Turnbaugh PJ, i sur. (2015) Dietary polyphenols promote growth of the gut bacterium *akkermansia muciniphila* and attenuate high-fat diet-induced metabolic syndrome. *Diabetes* **64(8)**, 2847–2858. <https://doi.org/10.2337/db14-1916>
- Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, i sur. (2018) Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr* **57**, 1-24. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1445-8>
- Rowley CA, Kendall MM (2019) To B 12 or not to B 12: Five questions on the role of cobalamin in host-microbial interactions. *PLOS Pathog* **15(1)**. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007479>
- Sanjar F, Weaver AJ, Peacock TJ, Nguyen JQ, Brandenburg KS, Leung KP (2020) Identification of Metagenomics Structure and Function Associated with Temporal Changes in Rat (*Rattus norvegicus*) Skin Microbiome during Health and Cutaneous Burn. *J Burn Care Res* **41(2)**, 347–358. <https://doi.org/10.1093/jbcr/irz165>
- Santacruz A, Marcos A, Warnberg J, Marti A, Martin-Matillas M, Campoy C (2009) Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity* **17(10)**, 1906-1915. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.112>

Sender R, Fuchs S, Milo R (2016) Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* **14**(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>

Shade A, Handelsman J (2012) Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. *Environ Microbiol* **14**(1), 4-12. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x>

Shanahan ER, Shah A, Koloski N, Walker MM, Talley NJ, Morrison M, i sur. (2018) Influence of cigarette smoking on the human duodenal mucosa-associated microbiota. *Microbiome* **6**(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0531-3>

Shi Z (2019) Gut Microbiota: An Important Link Between Western Diet and Chronic Diseases. *Nutrients* **11**, 2287. <https://doi.org/10.3390/nu11102287>

Simpson CA, Diaz-Arteche C, Eliby D, Schwartz OS, Simmons JG, Cowan CSM (2020) The gut microbiota in anxiety and depression – A systematic review. *Clin Psychol Rev*. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2020.101943>

Singh N, Gurav A, Sivaprakasam S, Brady E, Padia R, Shi H, i sur. (2014) Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity* **40**(1), 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.007>

Siri-Tarino PW, Sun Q, Hu FB, Krauss RM (2010) Meta-analysis of prospective cohort studies evaluating the association of saturated fat with cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* **91**(3), 535–546. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27725>

Smith MI, Yatsunenko T, Manary MJ, Trehan I, Mkakosya R, Cheng J, i sur. (2013) Gut microbiomes of Malawian twin pairs discordant for kwashiorkor. *Science* **339**(6119), 548–554. <https://doi.org/10.1126/science.1229000>

Smits SA, Leach J, Sonnenburg ED, Gonzalez CG, Lichtman JS, Reid G, i sur. (2017) Seasonal cycling in the gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers of Tanzania. *Science* **357**(6353), 802–805. <https://doi.org/10.1126/science.aan4834>

Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, dez-Humará LGB, Gratadoux JJ, i sur. (2008) *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut

microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* **105(43)**, 16731-16736. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>

Sonnenborn U (2016) Escherichia coli strain Nissle 1917 – from bench to bedside and back: history of a special Escherichia coli strain with probiotic properties. *FEMS Microbiol Lett* **363(19)**. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw212>

Sonnenburg JL, Xu J, Leip DD, Chen CH, Westover BP, Weatherford J, et al. (2005) Glycan Foraging in Vivo by an Intestine-Adapted Bacterial Symbiont. *New Ser* **307(5717)**, 1955–1959. <https://doi.org/10.1126/science.1>

Souza ND, Nugent K (2016) Appendicitis. *Am Fam Physician* **93(2)**, 142-143.

Spor A, Koren O, Ley R (2011) Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat Rev Microbiol* **9(4)**, 279–290. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2540>

Stojanov S, Berlec A, Štrukelj B (2020) The Influence of Probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Treatment of Obesity and Inflammatory Bowel Disease. *Microorganisms* **8**, 1715. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111715>

Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss CA, Maza O, et al. (2014) Artificial Sweeteners Induce Glucose Intolerance by Altering the Gut Microbiota. *Nature* **51**, 183–186.

Suzuki T, Sutani T, Nakai H, Shirahige K, Kinoshita S (2020) The microbiome of the meibum and ocular surface in healthy subjects. *Invest Ophth Vis Sci* **61(2)**. <https://doi.org/10.1167/iovs.61.2.18>

Tanaka M, Nakayama J (2017) Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergol Int* **66**, 515-522. <http://dx.doi.org/10.1016/j.alit.2017.07.010>

Teo SM, Mok D, Pham K, Kusel M, Serralha M, Troy N, et al. (2015) The infant nasopharyngeal microbiome impacts severity of lower respiratory infection and risk of asthma development. *Cell Host Microbe* **17(5)**, 704–715. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.03.008>

Tims S, Derom C, Jonkers DM, Vlietinck R, Saris WH, Kleerebezem M, i sur. (2013) Microbiota conservation and BMI signatures in adult monozygotic twins. *ISME J* **7**(4), 707–717. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.146>

Tomova A, Bukovsky I, Rembert E, Yonas W, Alwarith J, Barnard ND i sur. (2019) The Effects of Vegetarian and Vegan Diets on Gut Microbiota. *Front Nutr* **6**, 47. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00047>

Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, i sur. (2009a) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* **457**(7228), 480–484. <https://doi.org/10.1038/nature07540>

Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**(7122), 1027–1031. <https://doi.org/10.1038/nature05414>

Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI (2009b) The effect of diet on the human gut microbiome: A metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med* **1**(6). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000322>

Valenti P, Rosa L, Capobianco D, Lepanto MS, Schiavi E, Cutone A, i sur. (2018) Role of Lactobacilli and Lactoferrin in the Mucosal Cervicovagial Defense. *Front Immunol* **9**, 376. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00376>

Vandeputte D, Falony G, Vieira-Silva S, Tito RY, Joossens M, Raes J (2016) Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. *Gut* **65**(1), 57–62. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309618>

Vangay P, Johnson AJ, Ward TL, Al-Ghalith GA, Shields-Cutler RR, Hillmann BM, i sur. (2018) US Immigration Westernizes the Human Gut Microbiome. *Cell* **175**(4), 962-972. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.029>

Vatanen T, Plichta DR, Somani J, Münch PC, Arthur TD, Hall AB, i sur. (2019) Genomic variation and strain-specific functional adaptation in the human gut microbiome during early life. *Nat Microbiol* **4**(3), 470–479. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0321-5>

- Vrieze A, Nood EV, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartelsman JFWM, i sur. (2012) Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology* **143(4)**. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.06.031>
- Walsh CJ, Guinane CM, O'Toole PW, Cotter PD (2014) Beneficial modulation of the gut microbiota. *FEBS Letters* **588**, 4120-4130. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.03.035>
- Wang J, Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, i sur. (2012) A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* **490(7418)**, 55–60. <https://doi.org/10.1038/nature11450>
- Wang M, Wang Z, Lee Y, Lai HTM, Otto MCDO, Lemaitre RN, i sur. (2022) Dietary Meat, Trimethylamine N-Oxide-Related Metabolites, and Incident Cardiovascular Disease Among Older Adults: The Cardiovascular Health Study. *ATVB* **42(9)**, 273-288. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.121.316533>
- Welch JLM, Rossetti BJ, Rieken CW, Dewhirst FE, Borisy GG (2016) Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc Natl Acad Sci USA* **113(6)**, 791–800. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522149113>
- Wen Z, Xie G, Zhou Q, Qiu C, Li J, Hu Q, i sur. (2018) Distinct Nasopharyngeal and Oropharyngeal Microbiota of Children with Influenza A Virus Compared with Healthy Children. *BioMed Res Int* **2018**, <https://doi.org/10.1155/2018/6362716>
- Wilmanski T, Diener C, Rappaport N, Patwardhan S, Wiedrick J, Lapidus J, i sur. (2021) Gut microbiome pattern reflects healthy ageing and predicts survival in humans. *Nat Metab* **3(2)**, 274–286. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00348-0>
- Wood S, Bhatnagar S (2015) Resilience to the effects of social stress: Evidence from clinical and preclinical studies on the role of coping strategies. *Neurobiol Stress* **1** 164-173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.11.002>

Xie FJ, Zhang YP, Zheng QQ, Jin HC, Wang FL, Chen M, i sur. (2013) Helicobacter pylori infection and esophageal cancer risk: An updated meta-analysis. *World J Gastroentero* **19(36)**, 6098–6107. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i36.6098>

Yassour M, Vatanen T, Siljander H, Hämäläinen AM, Härkönen T, Ryhänen SJ, i sur. (2016) Natural history of the infant gut microbiome and impact of antibiotic treatment on bacterial strain diversity and stability. *Sci Transl Med* **8(343)**. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad0917>

Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, i sur. (2012) Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486(7402)**, 222-227. <https://doi.org/10.1038/nature11053>

Zmora N, Suez J, Elinav E (2019) You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nat Rev Gastroentrol Hepatol* **16(1)**, 35-56. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0061-2>

Zhao L, Zhang F, Ding X, Wu G, Lam YY, Wang X, i sur. (2009) Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. *Science* **359(6390)**, 1151-1156. <https://doi.org/10.1126/science.aao5774>

Zhu W, Gregory JC, Org E, Buffa JA, Gupta N, Wang Z, i sur. (2016) Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk. *Cell* **165(1)**, 111–124. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.011>

Zijlmans MAC, Korpela K, Riksen-Walraven JM, de Vos WM, de Weerth C (2015) Maternal prenatal stress is associated with the infant intestinal microbiota. *Psychoneuroendocrinology* **53**, 233–245. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.01.006>

Zoetendal EG, Raes J, Bogert BVD, Arumugam M, Booijink CC, Troost FJ, i sur. (2012) The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. *ISME J* **6(7)**, 1415–1426. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.212>

PRILOZI

PRILOG 1. UPITNIK O FAKTORIMA KOJI UTJEČU NA SASTAV CRIJEVNE MIKROBIOTE

Pilot projekt: Crijevna mikrobiota radno-aktivne populacije RH

Istraživanje provode Institut za Antropologiju i Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu s ciljem određivanja sastava crijevne mikrobiote u zdravoj, radno-aktivnoj populaciji stanovništva RH koja bi se koristila kao kontrolna skupina u budućim istraživanjima. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Instituta za antropologiju. Istraživanje će biti provedeno u Republici Hrvatskoj. Pružene informacije će se koristiti pri analizi Vašeg mikrobioma te se mogu koristiti sada i u budućnosti u znanstvenim publikacijama i dodatnim istraživanjima. Ispitivanjem ovog upitnika pristajem pružiti minimalne potrebne informacije bez otkrivanja vlastitog identiteta i jamčim da neću krivotvoriti informacije.

Crijevna mikrobiota je zajednica mikroorganizama (bakterije, arheje, gljive i virusi) koja živi u našim crijevima. Ona se mijenja tijekom našeg života ovisno o prehrani, aktivnosti, zdravlju i mnogim drugim faktorima s kojima se svatko od nas u životu susreće i jedinstvena je u svakom pojedincu. Novija istraživanja sve veću važnost pridaju mikrobioti jer je "zdrava" mikrobiota povezana s pozitivnim zdravstvenim ishodima, dok se u slučaju "nezdrave", odnosno neuravnotežene mikrobiote, ona povezuje s bolestima u rasponu od sindroma iritabilnog crijeva preko alergija do karcinoma. Zdrava crijevna mikrobiota jedan je od faktora koji pojedincu osiguravaju zdrav i aktivan život.

* Required

1. Molimo unesite šifru s posudice za uzimanje uzorka stolice: *

2. Spol *

Mark only one oval.

- Muški
 Ženski

3. Dob *

Mark only one oval.

- 18 - 29
 30 - 39
 40 - 49
 50 - 59

4. Bračni status *

Mark only one oval.

- oženjen/udana
- živim u izvanbračnoj zajednici
- rastavljen/a
- slobodan/na
- ne želim odgovoriti

5. Obrazovanje *

Mark only one oval.

- Osnovna škola
- Srednja škola
- Viša škola
- Prediplomski studij
- Diplomski studij
- Doktorat
- ne želim odgovoriti

6. Visina u centimetrima: *

7. Masa u kilogramima: *

8. Na koji način ste rođeni? *

Mark only one oval.

- vaginalni porod
- carski rez
- ne znam

9. Jeste li uzimali antibiotike u zadnja 3 mjeseca? *

Mark only one oval.

DA

NE

10. Ako da, koji?

11. Jeste li tjelesno aktivni? *

Mark only one oval.

DA

NE

12. Koliko ste tjelesno aktivni na tjednoj bazi? *

Mark only one oval.

Manje od 1 sata

1 do 2 sata

2 do 3 sata

3 do 4 sata

Više od 4 sata

13. Kojim tjelesnim aktivnostima se bavite? *

Check all that apply.

Hodanje

Trčanje

Biciklizam

Plivanje

Društveni sportovi (nogomet, košarka, odbojka, hokej...)

Fitness, aerobik, pilates, joga i sl.

Other: _____

14. Pušite li? *

Mark only one oval.

- Da
- Ne
- Bivši sam pušač/ica

15. Moja prehrana se općenito može opisati kao prehrana: *

Mark only one oval.

- svejeda
- vegetarijanca
- vegana
- za posebne potrebe (dijabetičare, bubrežne bolesnike, srčane bolesnike...)
- Other: _____








16. Prosječna učestalost stolice? *

Mark only one oval.

- Više od 2 puta dnevno
- Jednom do 2 puta dnevno
- Jednom dnevno
- Svaki drugi dan
- Manje od 3 puta tjedno
- Patim od zatvora (manje od 2 stolice tjedno)

17. Izaberite uobičajeni tip stolice *

The Bristol Stool Form Scale

1		Odvojene tvrde kuglice (poput lješnjaka)
2		Poput kobasice, ali sa jasno vidljivim kuglicama
3		Poput kobasice sa raspucanom površinom
4		Poput kobasice, glatko
5		Mekane grudice s jasno raspoznatljivim rubovima
6		Komadići s nejasnim rubovima, konzistencije kaše
7		U potpunosti vodeno, bez ikakvih čvrstih dijelova

Mark only one oval.

- Tip 1
- Tip 2
- Tip 3
- Tip 4
- Tip 5
- Tip 6
- Tip 7

18. Za sebe smatrate da ste: *

Mark only one oval.

- Premršav/a
- Normalne tjelesne mase
- Imam nekoliko kilograma viška
- Pretio/la

19. Smatrate li da se debljate brzo? *

Mark only one oval.

- Ne
- Da
- Samo ako dulje vrijeme previše jedem

20. Želite li biti u boljoj formi? *

Mark only one oval.

- Da
- Ne

21. Što radite da biste poboljšali zdravstveno stanje ili smanjili tjelesnu masu? *

Check all that apply.

- Pokušavam se hraniti pravilnije
- Pazim na veličinu porcija
- Radim vježbe izdržljivosti (trčanje, hodanje, biciklizam, ples...)
- Radim vježbe za jačanje i tonus mišića (sklekovi, dizanje utega, čučnjevi, trbušnjaci..) Na
- restrikcijskoj dijeti sam
- Ne radim ništa

22. Ako želite poboljšati formu, a ne uspijevate koji su razlozi koji Vas sprečavaju? *

Check all that apply.

- Stres
- Nedostatak vremena
- Nedostatak potpore okoline
- Financijski razlozi
- Nedostatak informacija
- Nedostatak upornosti

Other: _____

23. Koliko prosječno spavate dnevno? *

Mark only one oval.

- Manje od 5 sati
- Između 5 i 7 sati
- Više od 7 sati

24. Koliko prosječno jedete obroka dnevno? *

Mark only one oval.

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5 i više

25. Koliko često doručkujete? *

Mark only one oval.

- svaki dan
- ponekad
- rijetko
- nikad

26. Za ručak na poslu/školi: *

Check all that apply.

- donosite ručak od doma
- jedete hranu iz menze
- jedete brzu hranu (fast food)
- jedete grickalice
- jedete slatkiše
- preskačete ručak

Other: _____

27. Koristite li umjetne zaslađivače? *

Podrazumijevaju se saharin (E954), aspartam (E951), ciklamat (E952) i dr. Na deklaraciji prehrambenih proizvoda nalaze se istaknuti tekstualno ili kao E-brojevi

Mark only one oval.

- Da
- Ne
- Zasebno ne, ali pijem/jedem proizvode koji ih sadržavaju

28. Koliko ste često naduti? *

Mark only one oval.

- Nikad
- 1 mjesečno
- 2 - 3 puta mjesečno
- 1 tjedno
- 2 - 3 puta tjedno
- Svaki dan

29. Uzimate li neke od sljedećih lijekova? *

Check all that apply.

- Hormonalna terapija
- Analgetici
- Antidepresivi Dodaci
- prehrani Statini
- (kolesterol) Ništa od
- navedenog

Other: _____

30. Bolujete li od sljedećih bolesti/poremećaja: *

Check all that apply.

- Artritis
- Depresija
- Problemi sa spavanjem
- Astma
- Srčane bolesti
- Visok krvni tlak
- Dijabetes
- Sindrom iritabilnog crijeva
- Crohnova bolest
- Ulcerozni kolitis
- Celijakija
- Bolesti jetre
- Hepatitis
- Ništa od navedenog

31. Kakav Vam je COVID-19 status? *

Check all that apply.

- Prebolio/la
- Cijepljen/na
- Ništa od navedenog
- Ne želim odgovoriti

32. Alergičan/na sam na: *

Check all that apply.

- Pelud
- Orašaste plodove (badem, lješnak, orah, brazilski oraščić, indijski oraščić, pistacije...)
- Kikiriki
- Voće (jagoda, kruška, banana, breskva, limun, naranča, ananas, jabuka) Povrće
- (rajčica, špinat, kupus, paprika)
- Meso (svinjetina, govedina, piletina, puretina) Ribe,
- rakovi, školjke i ostali mekušci
- Žitarice s glutenom (pšenica, raž, ječam, pir..)
- Žitarice bez glutena (riža, kukuruz, proso, heljda...)
- Jaja i proizvode od jaja
- Mlijeko i mliječne proizvode
- Celer
- Lupina/vučji bob
- Soja i proizvodi od soje
- Sezam
- Sumporni dioksid i sulfiti
- Goruščica
- Nemam alergiju

Other: _____

33. Uzimate li probiotike? *

Mark only one oval.

- Da
- Ne
- Ne kao dodatke prehrani, ali pijem probiotičke jogurte

34. Uzimate li dodatke prehrani? *

Check all that apply.

- Ne
- Da, vitamine (C, E, multivitamine...)
- Da, minerale (magnezij, cink, kalcij...)
- Da, amino kiseline (BCAA, karnitin, glutamin)
- Da, proteinske dodatke (proteine sirutke, soje, konoplje...)Da,
- vlakna (prebiotike)
- Da, biljne suplemente (ginko, gospina trava, valerijana...)
- Omega 3 masne kiseline

Other: _____

Prehrambene navike

35. Koliko često konzumirate kavu? *

Mark only one oval.

- Više puta dnevno
- Jednom dnevno
- Nekoliko puta tjedno
- Jednom tjedno
- Nekoliko puta mjesečno
- Jednom mjesečno
- Nekoliko puta godišnje
- Ne konzumiram

36. Koliko često konzumirate čaj? *

Pod čaj ubrajamo crni, zeleni, bijeli, žuti i oolong tip čaja

Mark only one oval.

- Više puta dnevno
- Jednom dnevno
- Nekoliko puta tjedno
- Jednom tjedno
- Nekoliko puta mjesečno
- Jednom mjesečno
- Nekoliko puta godišnje
- Ne konzumiram

37. Koliko često konzumirate jedno serviranje alkoholnog pića? *

Jedno serviranje alkoholnog pića odgovara 30 mL žestokog pića, 150 mL vina i 330 mL piva

Mark only one oval.

- Nikad
- Manje od 1 mjesečno
- 1 - 3 puta mjesečno
- 1 tjedno
- 2 - 3 puta tjedno
- 4 - 6 puta tjedno
- 1 dnevno
- Više puta dnevno

38. Koliko često konzumirate 100-postotne prirodne sokove? *

Prirodni sok dobiven je cijedenjem voća/povrća uz dodatak vode i bez dodanog šećera

Mark only one oval.

- Više puta dnevno
- Jednom dnevno
- Nekoliko puta tjedno
- Jednom tjedno
- Nekoliko puta mjesečno
- Jednom mjesečno
- Nekoliko puta godišnje
- Ne konzumiram

39. Koliko često konzumirate gazirana bezalkoholna pića? *

Mark only one oval.

- Više puta dnevno
- Jednom dnevno
- Nekoliko puta tjedno
- Jednom tjedno
- Nekoliko puta mjesečno
- Jednom mjesečno
- Nekoliko puta godišnje
- Ne konzumiram

40. Koliko često konzumirate mlijeko i mliječne proizvode? *

Pod mlijeko ubrajamo sva mlijeka životinjskog porijekla (kravlje, kozje, ovčje...) i njihove prerađevine (sir, jogurt, vrhnja...), a ne uključujemo mlijeka dobivena iz biljnih sirovina (sojino, bademovo, kokosovo...)

Mark only one oval.

- Više puta dnevno
- Jednom dnevno
- Nekoliko puta tjedno
- Jednom tjedno
- Nekoliko puta mjesečno
- Jednom mjesečno
- Nekoliko puta godišnje
- Ne konzumiram

41. Koliko često konzumirate voće? *

Odnosi se isključivo na svježe, neprerađeno voće

Mark only one oval.

- Više puta dnevno
- Jednom dnevno
- Nekoliko puta tjedno
- Jednom tjedno
- Nekoliko puta mjesečno
- Jednom mjesečno
- Nekoliko puta godišnje
- Ne konzumiram

42. Koliko često konzumirate povrće? *

Ne uključuje krumpir

Mark only one oval.

- Više puta dnevno
- Jednom dnevno
- Nekoliko puta tjedno
- Jednom tjedno
- Nekoliko puta mjesečno
- Jednom mjesečno
- Nekoliko puta godišnje
- Ne konzumiram

43. Koliko često konzumirate meso? *

Mark only one oval.

- Više puta dnevno
- Jednom dnevno
- Nekoliko puta tjedno
- Jednom tjedno
- Nekoliko puta mjesečno
- Jednom mjesečno
- Nekoliko puta godišnje
- Ne konzumiram

44. Koliko često konzumirate ribu? *

Mark only one oval.

- Više puta dnevno
- Jednom dnevno
- Nekoliko puta tjedno
- Jednom tjedno
- Nekoliko puta mjesečno
- Jednom mjesečno
- Nekoliko puta godišnje
- Ne konzumiram

45. Koliko često konzumirate kruh i pekarske proizvode? *

Mark only one oval.

- Više puta dnevno
- Jednom dnevno
- Nekoliko puta tjedno
- Jednom tjedno
- Nekoliko puta mjesečno
- Jednom mjesečno
- Nekoliko puta godišnje
- Ne konzumiram

46. Što ste jučer jeli za doručak? *

Molimo navedite namirnice i procijenjenju količinu (npr, 2 kriške kruha s maslacem i marmeladom, zdjelicu mlijeka s čokoladnim rižinim pahuljicama..)

47. Što ste jučer jeli za ručak? *

Molimo navedite namirnice i procijenjenju količinu (npr. tanjur bistre juhe s tjesteninom, zagrebački odrezak s krumpirom, zdjelica zelene salate..)

48. Što ste jučer jeli za večeru? *

Molimo navedite namirnice i procijenjenju količinu (npr. 2 jaja na oko i 2 kajzerice...)

49. Što ste prekjučer jeli za doručak? *

Molimo navedite namirnice i procijenjenju količinu (npr. 2 kobasice i 2 jaja na oko..)

50. Što ste prekjučer jeli za ručak? *

Molimo navedite namirnice i procijenjenju količinu (npr. porciju variva od graška s noklicama i kobasicom)

51. Što ste prekjučer jeli za večeru? *

Molimo navedite namirnice i procijenjenju količinu (npr. tanjur tjestenine s umakom od tune i rajčice)

52. Koristite li maslinovo ulje kao glavni izvor masnoća u kuhanju? *

Mark only one oval.

DA

NE

53. Procijenite koliko kuhinjskih žlica maslinovog ulja konzumirate dnevno (uključuje ulje za prženje, u salatama, kad jedete vani...) *

54. Koliko porcija povrća jedete dnevno (porcija = 200 g) ? *
-
55. Koliko porcija voća jedete dnevno (porcija = 200 g), uključujući prirodne sokove ? *
-
56. Koliko porcija crvenog mesa ili mesnih prerađevina (šunka, kobasice...) jedete dnevno (porcija = 100-150 g) ?
-
57. Koliko porcija maslaca, margarina ili vrhnja jedete dnevno (porcija = 12 g) ?
-
58. Koliko zaslađenih ili gaziranih napitaka pijete dnevno?
-
59. Koliko čaša vina pijete tjedno?
-
60. Koliko porcija mahunarki jedete tjedno (porcija = 150g) ? *
-
61. Koliko porcija ribe ili školjkaša jedete tjedno (riba porcija = 100-150g, školjkaši porcija = 200g) ? *
-
62. Koliko kupovnih slatkiša ili kolača jedete tjedno? *
-
63. Koliko porcija orašastih plodova (uključujući kikiriki) jedete tjedno (porcija = 30g) ? *
-

64. Volite li više jesti piletinu, puretinu i zeččinu od junetine, svinjetine i kobasica? *

Mark only one oval.

Da

Ne

65. Koliko puta tjedno jedete povrće, tjesteninu ili rižu u umaku od rajčice? *

This content is neither created nor endorsed by Google.

Google Forms

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, DRAŽENA ČERMAK, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis