

Povezanost tjelesne aktivnosti i sastava crijevne mikrobiote u ispitanika s različitim stupnjem uhranjenosti

Bačić, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:159:972345>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-06**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Valentina Bačić

1039/N

**POVEZANOST TJELESNE
AKTIVNOSTI I SASTAVA
CRIJEVNE MIKROBIOTE U
ISPITANIKA S RAZLIČITIM
STUPNJEM UHRANJENOSTI**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i biokemiju hrane na Zavodu za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivana Rumora Samarin, Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Diplomski rad je izrađen u okviru znanstveno istraživačkog projekta: Istraživanje ravnoteže mikrobioma debelog crijeva (MicroEquilibrium) (IP-2016-06-3509), financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

ZAHVALA

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Ivani Rumora Samarin koja mi je pomogla svojim stručnim savjetima te uvijek imala strpljenja i vremena za moje upite pri izradi ovog diplomskog rada. Također, zahvaljujem se svim djelatnicima Kabineta za bioinformatiku koji su dali doprinos u izradi ovog rada.

Posebnu zahvalu dugujem svojoj obitelji i prijateljima koji su bili uz mene, pružajući mi razumijevanje, strpljenje i ljubav te me ohrabivali i poticali da ustrajem na svom životnom putu.

Najveću zahvalu dugujem svojoj teti Branki, za beskrajno strpljenje i najveću potporu tijekom studiranja. Teta, ovaj rad je za tebe. Hvala ti!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda

Laboratorij za kemiju i biokemiju hrane

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

POVEZANOST TJELESNE AKTIVNOSTI I SASTAVA CRIJEVNE MIKROBIOTE U ISPITANIKA S RAZLIČITIM STUPNJEM UHRANJENOSTI

Valentina Bačić, 1039/N

Sažetak: Tjelesna aktivnost trebala bi biti sastavni dio života svakog pojedinca. U novije vrijeme zabilježen je trend porasta neredovitog provođenja aktivnosti odnosno neaktivnosti. Crijevna mikrobiota zajednica je mikroorganizama koji nastanjuju probavni trakt, vrlo je kompleksna te je podložna promjenama tijekom vremena, a posebice pod utjecajem različitih čimbenika, kao što je prehrana, a ispituje se i kakav je utjecaj životnog stila što uključuje i tjelesnu aktivnost.

Cilj ovoga rada bio je utvrditi postojanje povezanosti utjecaja stupnja tjelesne aktivnosti na sastav crijevne mikrobiote u mlađoj populacijskoj skupini, različitog stupnja uhranjenosti. U istraživanje je uključeno 40 ispitanika, oba spola, prosječne dobi $25,8 \pm 4,3$ godina. Ispitanici su raspodijeljeni u tri skupine s obzirom na stupanj uhranjenosti. Tjelesna aktivnost se procjenjivala upitnikom o tjelesnoj aktivnosti - GPAQ. S obzirom na prikupljene podatke te povezujući tjelesnu aktivnost i sastav mikrobiote ne može se donijeti konzistentan zaključak, no može se primijetiti trend promjena udjela bakterijskih vrsta koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes*.

Ključne riječi: indeks tjelesne mase, crijevna mikrobiota, tjelesna aktivnost, GPAQ

Rad sadrži: 53 stranica, 19 slika, 5 tablica, 92 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Ivana Rumora Samarin

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. *Jurica Žučko*
2. doc. dr. sc. *Ivana Rumora Samarin*
3. doc. dr. sc. *Andrea Leboš Pavunc*
4. prof. dr. sc. *Zvonimir Štalić* (zamjena)

Datum obrane: 29. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Chemistry and Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

ASSOCIATION BETWEEN PHYSICAL ACTIVITY AND INTESTINAL MICROBIOTA IN SUBJECTS WITH DIFFERENT NUTRITIONAL STATUS

Valentina Bačić, 1039/N

Abstract: Physical activity should be a part of everyday life of every individual. Recently, there has been a growing trend of people that are physically inactive. The intestinal microbiota is a group of microorganisms that inhabit intestinal tract, it is immensely complex and is susceptible to change, especially under the influence of various factors, such as nutrition. Studies are also being performed in order to prove an impact of a regular physical activity. The main goal of this thesis was to prove the influence of the amount of physical activity on the intestinal microbiota, in younger population and different body masses. The research included 40 individuals of both sexes, average age 25.8 ± 4.3 years. Subjects were divided in three different groups depending on their body mass index. The physical activity was being estimated by Global Physical Activity Questionnaire - GPAQ. Based on the research and the collected data on the relationship between physical activity and the intestinal microbiota no consistent conclusion can be made, however the change of the amount of *Firmicutes* and *Bacteroidetes* bacteria is noticeable.

Keywords: body mass index, intestinal microbiota, physical activity, GPAQ

Thesis contains: 53 pages, 19 figures, 5 tables, 92 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD, Ivana Rumora Samarin

Reviewers:

1. PhD. Jurica Žučko Associate professor
2. PhD. Ivana Rumora Samarin Assistant professor
3. PhD. Andrea Leboš Pavunc Assistant professor
4. PhD. Zvonimir Šatalić Full professor (substitute)

Thesis defended: 29th September 2021

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. CRIJEVNA MIKROBIOTA	2
2.1.1. Bioraznolikost crijevne mikrobiote	3
2.1.2. Razvoj crijevne mikrobiote i čimbenici koji na njega utječu	6
2.1.3. Funkcije crijevne mikrobiote u ljudskom organizmu	8
2.2. DISBIOZA CRIJEVNE MIKROBIOTE	10
2.2.1. Pretilost	12
2.2.2. Pothranjenost	14
2.3. TJELESNA AKTIVNOST	15
2.3.1. Utjecaj tjelesne aktivnosti na crijevnu mikrobiotu	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1. ISPITANICI	19
3.2. METODE	20
3.2.1. Prikupljanje općih, biokemijskih i dijetetičkih podataka	20
3.2.2. Upitnik o tjelesnoj aktivnosti - GPAQ	22
3.2.3. Antropometrijske metode	23
3.2.4. Genomičke metode	24
3.2.5. Statističke metode	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. OPĆI, ANTROPOMETRIJSKI I BIOKEMIJSKI PODACI TE PODACI O TJELESNOJ AKTIVNOSTI	28
4.2. PODACI DOBIVENI SEKVENCIONIRANJEM CRIJEVNE MIKROBIOTE	37
4.2.1. Povezanost sastava crijevne mikrobiote i razine tjelesne aktivnosti ispitanika	41
5. ZAKLJUČCI	44
6. LITERATURA	45

1. UVOD

Čovjek je superorganizam koji funkcionira u skladu s trilijunima simbiotskih bakterija i eukariotskih stanica (Adak i Khan, 2019). Ljudski organizam kolonizira znatan broj mikroorganizama koji se nalaze na samoj površini i unutar organizma te teže više od 1 kg. Većina mikroorganizama se nalazi unutar gastrointestinalnog trakta tvoreći takozvanu crijevnu mikrobiotu. Sastav crijevne mikrobiote je pod utjecajem brojnih čimbenika, no kod zdravih pojedinaca je relativno stabilan. Njome dominiraju bakterijske vrste iz koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes*. Istraživanja su pokazala da crijevna mikrobiota ima brojne uloge u ljudskom organizmu, no među najvažnijima se ističe rast i razvoj imuniteta te regulacija nekoliko temeljnih metaboličkih puteva (Singh i sur., 2017; Bibbò i sur., 2016).

Disbioza crijevne mikrobiote se definira kao promjena u količini i funkciji crijevnih mikroorganizama te je povezana s etiologijom kroničnih nezaraznih bolesti: u rasponu od kardiovaskularnih, neuroloških, respiratornih i metaboličkih bolesti poput pretilosti sve do raka (Illiano i sur., 2020). S obzirom na to da je jedan od vodećih javnozdravstvenih problema današnjice upravo pretilost, istraživanja ukazuju na moguće razlike u sastavu crijevne mikrobiote s obzirom na stupanj uhranjenosti. Čini se da je disbioza kod pretilih osoba upravo povezana s povećanjem bakterijskih koljena *Firmicutes* i roda *Clostridium* u odnosu na *Bacteroidetes* (Gomes i sur., 2018).

Pretilost, prehrana i crijevna mikrobiota su u međusobnoj vezi, a sve je više dokaza da tjelesna aktivnost ima značajan utjecaj na crijevnu mikrobiotu. Tjelesna aktivnost potiče promjene u sastavu mikrobiote crijeva te podržava protuupalno stanje organizma. Također promjene koje se događaju uslijed tjelesne aktivnosti mogu utjecati na energijsku bilancu samog organizma ili pak utjecati na os crijeva - mozak. Doprinos tjelesne aktivnosti crijevnoj mikrobioti čovjeka može uključivati nekoliko mehanizama poput moduliranja imunološkog odgovora ili utjecaja na proizvodnju metabolita crijevne mikrobiote (Shahar i sur., 2020).

Cilj ovog rada je bio utvrditi povezanost između tjelesne aktivnosti i sastava crijevne mikrobiote u ispitanika mlađe životne dobi, koji su bili podijeljeni u skupine s obzirom na stupanj uhranjenosti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. CRIJEVNA MIKROBIOTA

Mikrobiota je pojam koji se odnosi na znatan broj mikroorganizama koji koloniziraju određeno mjesto u ljudskom organizmu i uključuje ne samo bakterije već i druge mikrobe kao što su gljive, arheje, virusi i protozoe (Sekirov i sur., 2010). Bakterije su glavna sastavnica zdrave ljudske mikrobiote te se smatra da oko 99 % mikrobioma čine bakterijski geni (Antal i sur., 2019). Lederberg i McCray su dali prvu definiciju mikrobiote naglašavajući važnost mikroorganizama koji nastanjuju ljudski organizam (2001). Mikrobiom je pojam koji se odnosi na cijelo stanište, uključujući mikroorganizme, njihove genome (tj. gene) i okolišne čimbenike (Marchesi i Ravel, 2015). Mikrobne zajednice se mogu naći na svakom dijelu ljudskog organizma, međutim raznolikost mikrobiote određenog područja ovisi o određenom stanju okoliša. Na tim mjestima će prevladavati samo mikrobi koji mogu rasti pod uvjetima koji karakteriziraju sam okoliš (Schwiertz, 2016). Tako se ljudski mikrobiom sastoji od brojnih mikrobiota koje se mogu naći na koži, u ustima, nosu, ušima, vagini i u crijevnom traktu (Li, 2014).

Crijevna mikrobiota se definira kao kompleksna bakterijska zajednica koja se nalazi unutar gastrointestinalnog trakta koji, od usta do anusa, tvori 9 metara dugu cijev s procijenjenom površinom između 25 i 400 m², što odgovara površini teniskog terena (Strandwitz, 2018; Lutgendorff i sur., 2008). Procjenjuje se da broj mikroorganizama koji nastanjuju gastrointestinalni trakt premašuje 10¹⁴ i odgovara približno broju tjelesnih stanica, za razliku od prijašnjih istraživanja koje su tvrdile da je taj omjer bio 10:1 u korist tjelesnih stanica (Thursby i Juge, 2017; Sender i sur., 2016).

Sastav crijeвне mikrobiote se uvelike razlikuje između pojedinaca, a ta se različitost često povezuje s prehranom, starosnom dobi, spolom, indeksom tjelesne mase i bolestima (Brooks i sur., 2018). Nadalje, zemljopisna lokacija i socioekonomski status utječu na formiranje mikrobiote (Kriss i sur., 2018). Studije su pokazale da je mikrobiota dugoročno stabilna ako na nju ne djeluju potencijalni negativni ometajući faktori (npr. uporaba antibiotika, restriktivske dijetе ili putovanja), odnosno da se tijekom godina mijenja samo njihova brojnost, ali ne i prisutnost specifičnih mikrobnih vrsta (Rajilić-Stojanović i sur., 2012). Također, na sastav same crijeвне mikrobiote mogu utjecati brojni parametri iz okoliša, poput pH, koncentracije

kisika (redoks stanja), dostupnosti hranjivih sastojaka, aktivnosti vode te temperature (Milani i sur., 2017).

Uloga crijevne mikrobiote u održavanju normalne funkcije crijeva je već dugo poznata, no sve je više znanstvenih dokaza o njezinom utjecaju na druge organske sustave koji su djelomično ili potpuno povezani s probavom i probavnim organima. Neka istraživanja pokazala su korisne funkcije normalne crijevne mikrobiote na zdravlje sve do genske razine pa se o njoj govori kao o „zaboravljenom organu“, „drugom mozgu“ i slično (Bokan i Hauser, 2018).

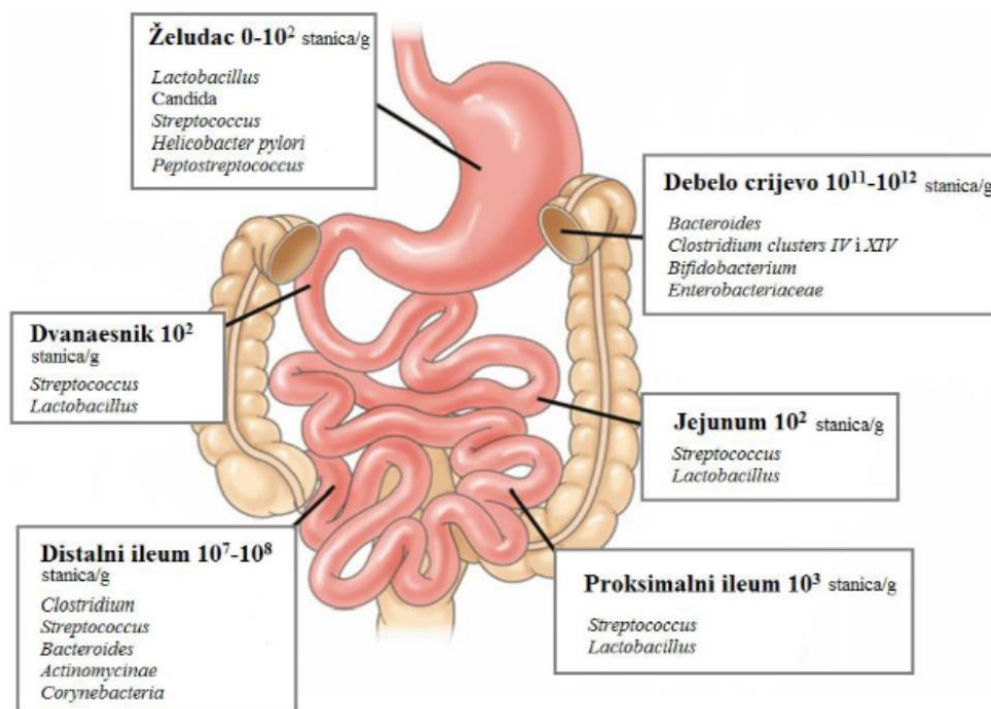
2.1.1. Bioraznolikost crijevne mikrobiote

Iako je točan sastav crijevne mikrobiote još uvijek otvoreno pitanje, nedavni napredak metagenomske tehnologije dale su nove informacije. U ljudskom gastrointestinalnom sustavu živi 10^{13} do 10^{14} mikroorganizama, od čega je više od 1000 vrsta i preko 7000 sojeva, većinom iz 14 „glavnih“ rodova (Wiley i sur., 2017).

Mikrobiota je taksonomski klasificirana prema vrsti, rodu, obitelji, redu, razredu i koljenu. Većina mikroorganizama u gastrointestinalnom traktu su anaerobi te pripadaju koljenima: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* i *Verrucomicrobia*, s time da koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* predstavljaju 90 % mikrobiote crijeva. Koljeno *Firmicutes* (64 % crijevne mikrobiote) sastoji se od više od 200 različitih rodova poput *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* i *Ruminococcus*. Rod *Clostridium* predstavlja 95 % koljena *Firmicutes*. Dominantni rodovi u koljenu *Bacteroidetes* (23 % crijevne mikrobiote) su *Bacteroides* i *Prevotella*. Po zastupljenosti zatim slijedi koljeno *Proteobacteria* s 8 % i *Actinobacteria* s 3 %, u kojem je uglavnom zastupljen rod *Bifidobacterium*. Manje od 1 % crijevne mikrobiote čini koljena *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria* i *Fusobacteria* (Rinninella i sur., 2019; Šušković i Kos, 2017).

Opći profil crijevne mikrobiote ostaje konstantan, no ona pokazuje vremenske i prostorne razlike u raspodijeli na razini roda i izvan njega. Distalno iz jednjaka do rektuma, vidljiva je razlika u raznolikosti i broju bakterija u rasponu od 10^1 g⁻¹ sadržaja u jednjaku i želucu do 10^{12} g⁻¹ sadržaja u debelom crijevu (Bokan i Hauser, 2018). Gornji dio gastrointestinalnog trakta ima niži pH, višu koncentraciju kisika i antimikrobnih lijekova te takvi uvjeti omogućuju preživljavanje samo brzo rastućih fakultativnih anaeroba, za razliku od donjeg dijela trakta gdje prevladavaju veće koncentracije anaeroba koji mogu iskoristiti složene ugljikohidrate.

Fakultativni anaerobi dominiraju tankim crijevom tako što mogu podnijeti uvjete niskog pH, žučnih kiselina i prisutnost enzima gušterače te se uz to učinkovito natjecati za jednostavne ugljikohidrate koji su dostupni u ovom dijelu gastrointestinalnog trakta (Donaldson i sur., 2016). Zonu prijelaza iz pretežito aerobnih u anaerobne bakterije predstavlja terminalni ileum (DiBaise i sur., 2008). Sastav i koncentracije dominantnih mikrobnih vrsta u pojedinim dijelovima gastrointestinalnog trakta prikazani su na slici 1.

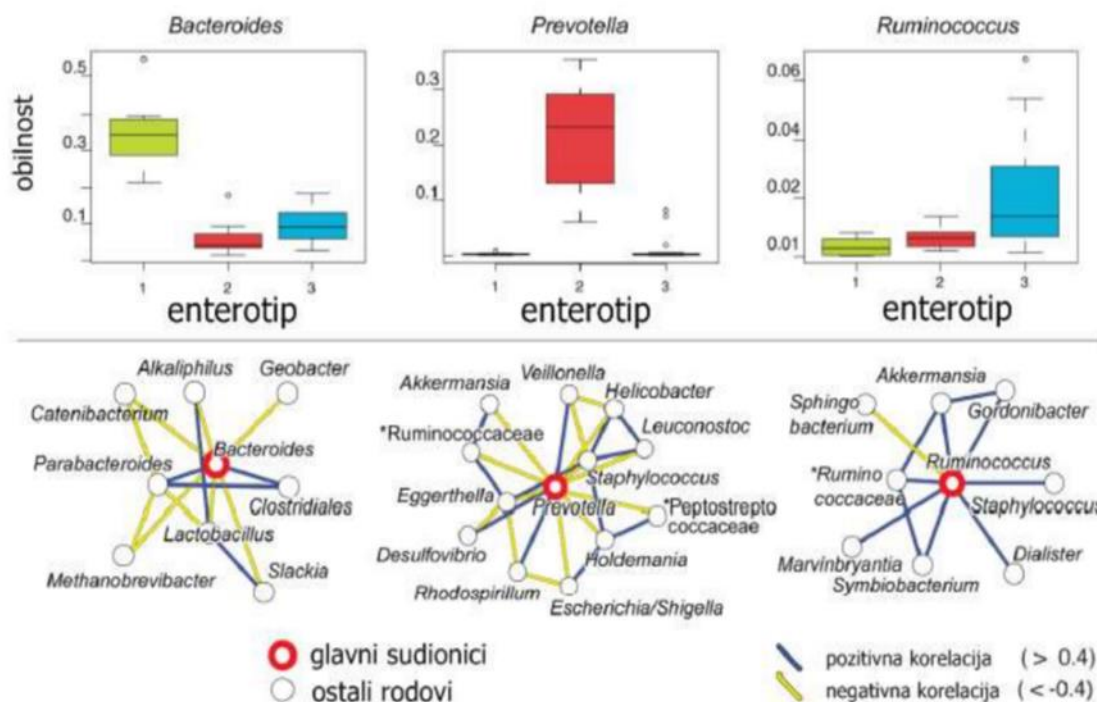


Slika 1. Sastav i koncentracije dominantnih mikrobnih vrsta u pojedinim dijelovima gastrointestinalnog trakta (Sartor, 2008)

Mikroorganizmi iz crijeva se mogu izolirati iz uzorka stolice ili iz uzorka biopsije. Uzorak stolice sadržava bakterije koje se nalaze u lumenu crijeva dok uzorak biopsije sadržava bakterije koje se nalaze u mukoznom sloju. Uzorak mikroba iz lumena najčešće sadrži vrste kao što su *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* i *Ruminococcus*. Dok su najčešći mikroorganizmi prisutni u mukoznom sloju *Clostridium*, *Lactobacillus* i *Enterococcus*. Iz navedenog se može vidjeti da je u lumenu prisutan veći broj rodova te da broj i vrsta prisutnih mikroorganizama ovise o smještaju u probavnom sustavu. Osim tih rodova, ljudsko debelo crijevo također ima primarne patogene, npr. vrste poput *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* i *Bacteroides fragilis*, ali s niskim obiljem (0,1 % ili manje cjelokupnog

mikrobioma crijeva). *Streptococcus* se čini dominantnim rodом u distalnom jednjaku, duodenumu i jejunumu. *Helicobacter pylori* dominantna je vrsta prisutna u želucu i određuje cijeli mikrobiološki krajolik želučane flore, a tu se nalaze još i bakterije iz rodova *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella* i *Rothia* (Bokan i Hauser, 2018; Donaldson i sur., 2016).

Konzorcij MetaHIT (engl. *Metagenomics Of The Human Intestinal Tract*) je predložio način klasifikacije crijevne mikroflore, koji se temelji na specifičnom sastavu mikrobiote. Mikrobiota crijeva svakog pojedinca posebno je karakterizirana grupama bakterija koje su nazvane enterotipovi. Te su grupe dobro uravnoteženi simbiotski sustav domaćin – mikrob koji ne uzima u obzir dob, spol, geografsko podrijetlo ili tjelesnu težinu, a međusobno se razlikuju po sastavu i dominantnoj ulozi pojedinih bakterijskih rodova. Tri enterotipa karakteriziraju tri dominantne skupine bakterija: enterotip 1, koji sadržava veliki broj bakterija iz roda *Bacteroides*, enterotip 2, koji sadržava većinom bakterije iz roda *Prevotella* i enterotip 3, koji sadržava bakterije iz roda *Ruminococcus* (Rinninella i sur., 2019; Jandhyala i sur., 2015). Bakterije koje pripadaju enterotipu 1 energiju dobivaju prvenstveno iz ugljikohidrata i proteina glikolizom i pentoza fosfatnim putem te sadrže gene koji kodiraju enzime: proteaze, heksoaminidaze i galaktozidaze. U enterotipu 2, bakterije uglavnom razgrađuju glikoproteine koji se nalaze u mukoznom sloju crijeva. Najčešći, enterotip 3, sadrži bakterije koje mogu razgraditi mucin i obogaćen je membranskim transporterima, koji uglavnom prenose šećere, što ukazuje na učinkovito vezanje mucina i njegovu naknadnu hidrolizu kao i unos nastalih jednostavnih šećera. Enterotipovi imaju i druge specifične metaboličke funkcije. Sinteza biotina, riboflavina, pantotenata i askorbata češće je prisutna kod enterotipa 1, dok sinteza tiamina i folata prevladava u enterotipu 2. Također se čini da su enterotipovi uglavnom definirani prema prehrambenim navikama pojedinca (Rinninella i sur., 2019; Jandhyala i sur., 2015; Arumugam i sur., 2011). Postojanje navedenih enterotipova ukazuje na to da postoji ograničeni broj uravnoteženih simbiotskih stanja između ljudskog organizma i njegove mikrobiote (Arumugam i sur., 2011). Iako klasifikacija crijevnog mikrobioma u zasebne enterotipove predstavlja dobar alat za povezivanje određenih bolesti s mikrobiotom, potrebne su daljnje studije da bi se to potvrdilo. Osim enterotipova u obzir se mora uzeti metabolički kapacitet crijevnih mikroba, potencijalni uzroci nastanka takvih enterotipova, ostali mikrobi koji su povezani s određenim enterotipom i da li enterotip uzrokuje bolest ili samo povećava rizik od nastanka bolesti (Cani i sur., 2021). Enterotipovi u ljudskoj mikrobioti i njihove filogenetske razlike prikazani su na slici 2.

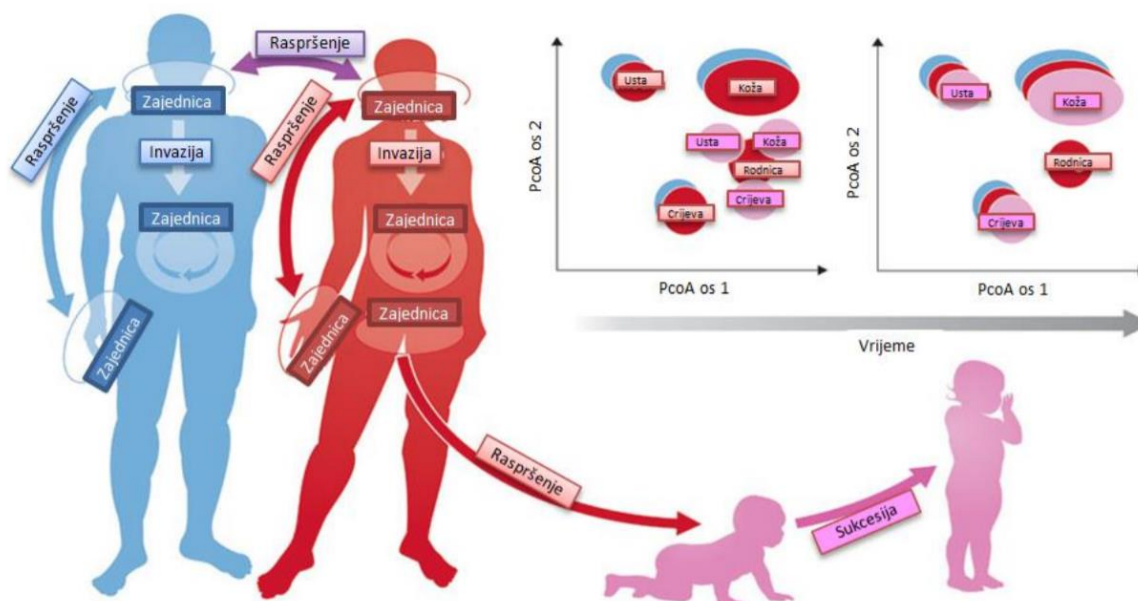


Slika 2. Enterotipovi u ljudskoj mikrobioti i njihove filogenetske razlike (Arumugam i sur., 2011)

2.1.2. Razvoj crijevne mikrobiote i čimbenici koji na njega utječu

Mikrobiota je sastavljena od značajnog broja različitih bakterija, otprilike 160 vrsta po osobi po fekalnom uzorku te ovaj ekosustav ima značajnu ulogu u ljudskom zdravlju (Rodríguez i sur., 2015). Nekoliko čimbenika ima ključne uloge u oblikovanju normalne crijevne mikrobiote. To su: način porođaja (vaginalni ili carski rez), prehrana tijekom dojenja (hranjenje majčinim mlijekom ili adaptiranim mlijekom) i u odrasloj dobi (svežedi ili vegetarijanci), okolišni faktori te upotreba antibiotika (Jandhyala i sur., 2015). Prije se vjerovalo da je gastrointestinalni sustav djeteta prilikom rođenja sterilan, odnosno da proces kolonizacije započinje tek kada dijete dođe u doticaj s bakterijama iz okoliša, prolaskom kroz porođajni kanal, te u doticaju s majčinim fekalnim bakterijama (Edwards i Parrett, 2002). Međutim, kolonizacija gastrointestinalnog trakta, prema novim spoznajama, započinje već *in utero*. To se može potvrditi činjenicom da je prisutnost mikroba pronađena u posteljici, pupkovini, plodnoj vodi i mekoniju (Collado i sur., 2016). Pretpostavlja se da fetus započinje kolonizaciju gastrointestinalnog trakta tako što guta amnionsku tekućinu i njezine bakterije unutar maternice. Mekonij, prvi uzorak stolice dojenčadi, također sadrži mikroorganizme, ali pokazuje značajno drugačiji sastav od onog koji je dobiven nakon prvog tjedna života gdje se može vidjeti normalna kolonizacija crijeva tijekom fetalnog razvoja (Cresci i Bawden, 2015).

Prikaz kako se ljudski mikrobiom susreće s ekologijom prikazan je na slici 3.



Slika 3. Prikaz kako se ljudski mikrobiom susreće s ekologijom (prilagođeno prema Gonzalez i sur., 2011)

Inicijalna mikrobna zajednica se sastoji od mikroorganizama kojima je novorođenče direktno izloženo: za djecu rođenu vaginalnim porodom, majčina vagina služi kao izvor inicijalno kolonizirajućih bakterija, a za djecu rođenu carskim rezom, ruke koje dodiruju dijete (mikrobiota kože) su dominantan izvor (Spor i sur., 2011). Novorođenčad koja je rođena vaginalnim putem ima veću raznolikost mikrobiote što se smatra povoljnim jer se slaba raznolikost povezuje s razvojem upalne bolesti crijeva i pretilosti u odraslom životu. Nadalje, mikrobiotom novorođenčadi rođene vaginalno dominiraju bakterije iz roda *Lactobacillus*, *Prevotella* i *Sneathia spp.*, dok mikrobiotom novorođenčadi rođene carskim rezom bakterije iz roda *Staphylococcus*, koje imaju patogeni potencijal, *Corynebacteria* i *Propionibacterium spp.* Kod novorođenčadi stare mjesec dana i rođene vaginalnim putem broj bakterija rodova *Bifidobacterium* je bio 1300 puta veći nego kod novorođenčadi rođene carskim rezom (Nicholson i sur., 2012; Huurre i sur., 2008).

Rast i razvoj snažne crijevne mikrobiote važni su za razvitak imunološkog sustava koji se nastavlja tijekom dojenja. Majčino mlijeko je optimalna hrana za dojenče jer odgovara svim prehrambenim i fiziološkim potrebama, sadrži ugljikohidrate, proteine i masti, imunoglobuline i endokanabinoide. Majčino mlijeko nije sterilno, sadrži više od 600 različitih vrsta bakterija.

Oligosaharidi prisutni u majčinom mlijeku, služe kao prebiotici i potiču rast rodova bakterija *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, koji dominiraju u gastrointestinalnom sustavu dojenčadi te se samim time može ojačati ili potaknuti razvoj imunološkog sustava te pomoći u prevenciji stanja poput ekcema i astme. Prehrambene navike utječu na raznolikost mikrobiota kroz čitav život. Do značajne promjene u populaciji crijevne mikrobiote dolazi kada dojenčad prelazi na čvršću i raznovrsniju prehranu te je to popraćeno kolonizacijom *Bacteroides* i *Clostridium spp.* Potrebna je velika raznolikost mikroorganizama da bi se iskoristila mnoga vlakna i drugi hranjivi sastojci prisutni u prehrani odraslih (Conlon i Bird, 2015; Cresci i Bawden, 2015). Do navršene treće godine života, crijevna mikrobiota u djeteta poprima stabilnost i sastav koji 40-60 % nalikuje onom u odraslih osoba (Hollister i sur., 2014).

Tijekom dojenja, mikrobna zajednica razvija se brzo; promjena raznolikosti mikroorganizama javlja se tijekom djetinjstva i odrasle dobi, dok u starosti dolazi do smanjenja broja *Bacteroidetes* vrsta i povećanja *Firmicutes* vrsta (Nicholson i sur., 2012). Istraživanja su pokazala da vegani i vegetarijanci imaju značajno veći broj bakterija iz roda *Bacteroidetes* u odnosu na svejede. Vlakna, odnosno neprobavljivi ugljikohidrati koje se nalaze isključivo u biljkama, doprinose porastu broja bakterija mliječne kiseline, dok polifenoli povećavaju broj *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* koji pružaju antipatogene i protuupalne učinke te kardiovaskularnu zaštitu. Visok udio vlakana potiče rast vrsta koje fermentacijom daju metabolite kratko lančanih masnih kiselina (engl. *Short-Chain Fatty Acids*, SCFA) (acetat, propionat i butirat) (Tomova i sur., 2019). Mikrobiom starije populacije (> 65 godina starosti) pokazuje veće interindividualne varijacije u usporedbi s mlađom odraslom populacijom. To istraživanje je ukazalo na povezanost crijevne mikrobiote s prehranom te životom u zajednici (obitelj, dom za starije osobe). Starije osobe imaju različitu i manju raznolikost mikrobiota u usporedbi s mlađom populacijom (Claesson i sur., 2012). Čimbenici životnog stila, pušenje i nedostatak tjelesne aktivnosti mogu značajno utjecati na debelo crijevo i potencijalno na crijevnu mikrobiotu čime postaju čimbenici rizika kolorektalnog karcinoma. Stres, još jedan od čimbenika životnog stila, dokazano smanjuje koncentraciju bakterija roda *Lactobacillus* (Conlon i Bird, 2015).

2.1.3. Funkcije crijevne mikrobiote u ljudskom organizmu

Nedavna istraživanja su otkrila da mikrobiota komunicira s domaćinom kroz četiri mehanizma: normalna mikrobiota djeluje kao barijera protiv patogena; drugo, kao modulator propusnosti sluznice domaćina; treće, kao modulator dobivanja energije i njezine metaboličke upotrebe

kroz konzumiranu hranu; i na kraju, kao modulator imunološkog sustava. Promjena sastava normalne mikrobiote povećava predispoziciju za nastajanje bolesti (Aurora i Sanford, 2015).

Mikrobiota sudjeluje u regulaciji metabolizma ugljikohidrata, proteina, masti i žuči, u razgradnji toksina i neprobavljivih sastojaka hrane, proizvodnji vitamina i SCFA te se djelovanje mikrobiote u ovoj sferi zasniva na lučenju vlastitih enzima, utjecaju na domaćinove enzime i na fermentaciji te se to smatra njezinom metaboličkom ulogom (Antal i sur., 2019; Ramakrishna, 2013). Pokazalo se da crijevna mikrobiota pozitivno utječe na metabolizam masti supresijom inhibicije lipoprotein lipaze u adipocitima. Također, crijevna mikrobiota metabolizira proteine koji funkcioniraju putem mikrobnih proteinaza i peptidaza u tandemu s humanim proteinazama. Nekoliko transportera na bakterijskoj stijenci olakšava ulazak aminokiselina iz crijevnog lumena u bakterije, pri čemu nekoliko genskih produkata pretvara aminokiseline u male signalne molekule i antimikrobne peptide (bakteriocine). Crijevna mikrobiota je ključna za *de novo* sintezu esencijalnih vitamina koje domaćin nije sposoban proizvesti. Bakterije mliječne kiseline ključni su organizmi u proizvodnji vitamina B₁₂, koji ne mogu sintetizirati životinje, biljke, a ni gljive. Bifidobakterije su glavni proizvođači folata, vitamina uključenih u vitalne metaboličke procese domaćina, uključujući sintezu i popravak deoksiribonukleinske kiseline (DNK). Ostali vitamini u čijoj sintezi sudjeluje mikrobiota jesu vitamin K, riboflavin, biotin, nikotinska kiselina, pantotenska kiselina, piridoksin i tiamin (Bokan i Hauser, 2018). Nadalje, studije su pokazale da crijevna mikrobiota ima utjecaj na metabolizam ksenobiotika i lijekova (Antal i sur., 2019).

Antimikrobna zaštitna uloga se očituje kroz otpornost na kolonizaciju patogenih bakterija. Crijevni komenzali se izravno bore protiv mikroba zauzimajući životni prostor i natječući se za hranjive tvari te tako način sprečavaju njihovu kolonizaciju i prevladavanje. Osim toga, doprinose obrani od mikroba i neizravno, među ostalim stimuliranjem lokalnog imunskog odgovora i sintezom raznih spojeva koji imaju antimikrobni učinak. Na primjer, mliječna kiselina, koja je produkt metabolizma vrsta roda *Lactobacillus*, sudjeluje u razaranju bakterijske stanične stijenke, dok sastav žučnih kiselina, u kojem se održava ukupni metabolizam mikrobiote, znatno utječe na germinaciju spora vrste *Clostridioides difficile* (Antal i sur., 2019). Nedavne studije su pokazale da je crijevna mikrobiota uključena u razgradnju različitih polifenola. Polifenoli se biotransformiraju u aktivne spojeve nakon što crijevna mikrobiota ukloni ugljikohidratni dio. Strukturna specifičnost polifenola i

individualno bogatstvo mikrobiote određuju razinu biotransformacije koja se javlja u crijevu (Bokan i Hauser, 2018).

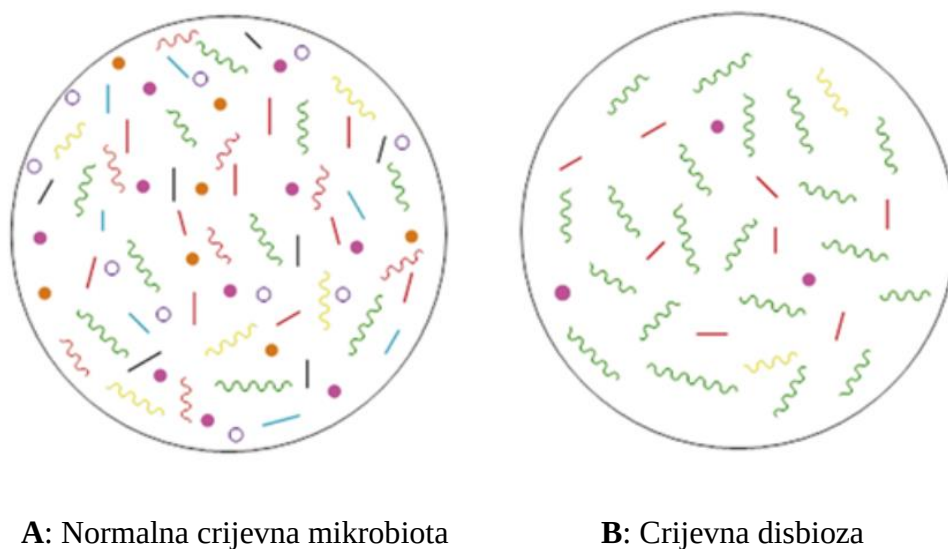
Crijevna mikrobiota pridonosi modulaciji imunskog sustava tako što utječe na oblikovanje crijevima pridruženog limfnog tkiva (engl. *GALT-gut associated lymphoid tissues*), sudjelujući u razvoju i djelovanju regulacijskih limfocita T (engl. *Treg-T regulatory cells*) te regulirajući prirodene limfoidne stanice (engl. *ILCs-innate lymphoid cells*). Razvoj mikrobiote u ranoj životnoj dobi djeteta ima važnu ulogu u sazrijevanju imunološkog sustava i razvoju alergijskih bolesti (Antal i sur., 2019).

Postoje dokazi o pozitivnom učinku crijevnog mikrobiote na održavanje strukturne barijere gastrointestinalnog sustava kao na primjer djelovanjem na međustanične veze (engl. *tight junctions*, održavanje dezmosoma). Uz to djeluje i na transkripcijski faktor angiogenin-3 koji ima ulogu u razvoju krvnih žila u crijevima (Antal i sur., 2019).

2.2. DISBIOZA CRIJEVNE MIKROBIOTE

Već 400. godine prije Krista Hipokrat je rekao „smrt je u crijevima“ i „loša probava ishodište zla“. Metchnikoff naziva stanje u kojem „dobre“ bakterije više nisu u stanju kontrolirati „loše“ bakterije disbiozom (Iebba i sur., 2016). Probavni sustav sadržava korisne bakterije, ali i bakterije koje mogu biti potencijalno štetne za domaćina. U normalnim uvjetima zdravih osoba dolazi do međusobne komunikacije i regulacije između domaćina i crijevnog mikrobiote te se tako stvara homeostatska ravnoteža bez prekomjernog razmnožavanja potencijalno patogenih bakterija. Mikrobiota ispoljavaju komenzalnu vezu s domaćinom: bakterije uspijevaju u bogatom okolišu crijeva, a domaćin uživa u koristima od brojnih funkcija bakterija. Homeostaza mikrobiote i domaćina pogoduje domaćinu, no ako dođe do promjene u sastavu mikrobiota, to dovodi do drastične neravnoteže između korisnih i potencijalno patogenih bakterija te probavni sustav postaje osjetljiv na napad patogena kao posljedica promjene u mikrobiotama. Ova neravnoteža se naziva disbiozom, odnosno definira se kao poremećaj u homeostazi (eubiozi) mikrobiote zbog neravnoteže same mikrobiote, promjena u funkcionalnom sastavu i metaboličkim aktivnostima ili promjene u lokalnoj distribuciji (DeGruttola i sur., 2016). Eubioza je ravnotežno stanje mikrobnog ekosustava. Eubiozom prevladavaju potencijalno korisne bakterijske vrste *Firmicutes* i *Bacteroides* (Iebba i sur., 2016). Crijevni patogeni pripadaju bakterijskoj porodici *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Yersinia spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*), *Vibrionaceae* (*Vibrio cholerae*) i *Campylobacteriaceae*

(*Campylobacter spp.*) koje pripadaju koljenu *Proteobacteria* prisutni su, ali u manjem postotku crijevne mikrobiote (Stecher, 2015). Brojne studije potvrđuju da porast *Proteobacteria* u crijevima označava disbiozu ili nestabilnost crijevne mikrobiote te pogoduje nastanku bolesti (Shin i sur., 2015). Homeostaza i promjene tijekom disbioze crijevne mikrobiote prikazane su na slici 4.



Slika 4. Homeostaza i promjene tijekom disbioze crijevne mikrobiote (DeGruttola i sur., 2016)

Disbioza se može kategorizirati u tri različite skupine: prvo kao gubitak korisnih mikroorganizama, drugo kao pretjeran rast potencijalno štetnih mikroorganizama i treće kao gubitak mikrobne raznolikosti. U većini slučajeva ove vrste disbioza se javljaju istovremeno (DeGruttola i sur., 2016). Do disbioze može doći zbog utjecaja okolišnih faktora, no još uvijek nije razjašnjeno je li disbioza uzrok ili posljedica bolesti, odnosno da li disbioza stvara put kroničnoj bolesti ili kronična bolest dovodi do promjena u crijevnoj mikrobioti (Antal i sur., 2019). Disbiozu se povezuje s patogeneom mnogih upalnih bolesti i infekcija (Thursby i Juge, 2017). Neka od najčešće spominjanih patoloških stanja kod koji se nailazi na disbiozu su kronične gastrointestinalne bolesti poput kroničnih upalnih bolesti crijeva, ulceroznog kolitisa, Chronove bolesti, sindroma iritabilnog crijeva, jetrene encefalopatije, nealkoholne masne jetra, kolorektalnog karcinoma pa sve do različitih neuroloških poremećaja (Antal i sur., 2019; Bokan i Hauser, 2018). Također, disbioza može utjecati i na razvoj pretilosti i malnutricije, dijabetesa tipa 1 i tipa 2 (DeGruttola i sur., 2016).

2.2.1. Pretilost

Pretilost je jedan od najvećih javnozdravstvenih problema današnjice, istodobno je i zanemaren, s ozbiljnim društvenim i psihološkim posljedicama koje utječu na gotovo sve dobne i socioekonomske skupine. Nekoć su se prekomjerna tjelesna masa i pretilost smatrale problemom samo u visokorazvijenim zemljama, dok danas postaju problem i u niskorazvijenim zemljama te u zemljama u razvoju, osobito u urbanom području (Musić Milanović i Bukal, 2018). Hrvatska prati svjetske trendove jer 38,1 % odraslog stanovništva ima prekomjernu tjelesnu masu, a 20,3 % je pretilo (Mihaljević i sur., 2018). Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) definira prekomjernu tjelesnu masu i pretilost prekomjernim nakupljanjem masnog tkiva koje predstavlja rizik za zdravlje. Metoda za ocjenu stupnja pretilost je određivanje indeksa tjelesne mase (ITM, engl. *body mass index* BMI) koji predstavlja omjer tjelesne mase i kvadrata visine (izraženo jedinicama kg m^{-2}) (WHO, 2020). Osoba s ITM-om nižim ili jednakim $18,5 \text{ kg m}^{-2}$ smatra se pothranjenom, ITM u rasponu od $18,5$ do $24,9 \text{ kg m}^{-2}$ označava adekvatnu tjelesnu masu, $25,0$ do $29,9 \text{ kg m}^{-2}$ prekomjernu tjelesnu masu, dok pretila osoba ima ITM viši ili jednak $30,0 \text{ kg m}^{-2}$. Prema 10. međunarodnoj klasifikaciji bolesti i srodnih zdravstvenih problema, prekomjerna tjelesna masa i pretilost definirane su kao bolesti (Musić Milanović i Bukal, 2018).

Pretilost nastaje uslijed promjena u energetske ravnoteži, odnosno uslijed nastanka neravnoteže unosa, pohrane i potrošnje energije dobivene konzumacijom hrane (Moreno-Indias i sur., 2014). U ostvarivanje te ravnoteže uključeni su brojni fiziološki procesi koji reguliraju tjelesnu masu i metabolizam, osjećaj sitosti i gladi, kako na razini središnjeg živčanog sustava, tako i popratnih gastrointestinalnih odgovora na unos hrane (Perić i sur., 2011). Značajan čimbenik koji utječe na razvoj pretilosti je prehrana bogata ugljikohidratima i mastima, nedostatak tjelesne aktivnosti te crijevna mikrobiota (Wolf i Lorenz, 2012). Konzumacija prehrane bogate ugljikohidratima i mastima mijenja crijevu ekologiju čime crijevna mikrobiota postaje okolišni faktor koji utječe na nastajanje pretilosti (de Clercq i sur., 2016).

Najpoznatije istraživanje koji ukazuju na ulogu crijevnih mikrobita u energetske ravnoteži je ono na „sterilnim“ i „normalnim“ laboratorijskim miševima, gdje se pokazalo da transplantacija mikrobita izolirane iz debelog crijeva pretilih miševa u miševima sa sterilnim crijevima dovodi do povećanja udjela masnog tkiva i pojave inzulinske rezistencije kod sterilnih miševa (Antal i sur., 2019). U pretilih osoba dolazi do općeg smanjenja bakterijske

raznolikosti u crijevima. Rezultati istraživanja na ljudima i životinjama pokazuju da pretili osobe imaju niži udio bakterija koljena *Bacteroidetes*, a viši udio koljena *Firmicutes* u usporedbi s kontrolnom skupinom koja je imala normalnu tjelesnu masu. Ovaj omjer je u korelaciji s tjelesnom masom i nakupljanjem tjelesne mase, što pokazuje da pretili osobe imaju veći nerazmjerni omjer ovih bakterija (DeGruttola i sur., 2016).

Ley i sur. (2005) su pokazali smanjenje u omjeru *Firmicutes* naprema *Bacteroidetes* koji je bio praćen gubitkom tjelesne mase kod ljudi. Pokazano je kako kod pretilih osoba postoji niža koncentracija *Bacteroidetes*, povišena koncentracija *Actinobacteria* dok je koncentracija *Firmicutes* koljena ostala nepromijenjena. Međutim to još uvijek nije do kraja razjašnjeno jer postoje i druge studije koje pokazuju nikakvu ili čak i pozitivnu povezanost s prekomjernom tjelesnom masom i pretilošću (John i Mullin, 2016).

Nadalje, smatra se da crijevna mikrobiota smanjuje oksidaciju SCFA u mišićima i jetri supresijom adenozin monofosfat kinaze (AMPK), enzima u jetrenim i mišićnim stanicama koji nadgleda stanje stanične energije. Inhibicija AMPK rezultira smanjenom oksidacijom masnih kiselina u mišićima i jetri, što u konačnici dovodi do pohrane viška masnih kiselina u tim tkivima. Crijevna mikrobiota proizvodnjom SCFA može utjecati na metabolizam domaćina i razvoj pretilosti promjenom hormonskog sastava u crijevima i drugim organima. SCFA, uključujući acetat, propionat i butirat, djeluju kao ligandi za aktivaciju receptora vezanih za G-protein (Bokan i Hauser, 2018). Istraživanja su pokazala da je količina proizvedenih SCFA veća kod osoba s prekomjernom tjelesnom masom i pretilih osoba. Bakterijski lipopolisaharid (LPS) iz stijenki Gram-negativnih bakterija potiče lučenje protuupalnih citokina poput interleukina 6 (IL-6) i čimbenika nekroze tumora α (engl. *tumor necrosis factor α* , TNF- α), a poznato je da je kronična upala nižeg stupnja povezana s pretilošću (Antal i sur., 2019). Dugoročne promjene u crijevnoj mikrobioti kao što su smanjenje broja *Bifidobacteria* i povećanje broja *Bacteroides* primijećene su kod djece koja su ranom djetinjstvu uzimala antibiotike. Modulacija mikroorganizama crijeva s antibioticima mijenja ekspresiju gena jetre i crijeva koji su uključeni u upalu i metabolizam, čime se mijenja hormonska, upalna i metabolička sredina domaćina (Bokan i Hauser, 2018).

2.2.2. Pothranjenost

Malnutricija je opći pojam koji obuhvaća različite manifestacije neadekvatne prehrane, uključujući usporeni rast djece, znakove nedostatka vitamina i minerala, esencijalnih masnih kiselina i proteina te ona uključuje pretilost i pothranjenost (Gordon i sur., 2012). Pothranjenost se definira kao nedovoljan unos energije i hranjivih tvari da bi se zadovoljile potrebe pojedinca za održavanjem dobrog zdravlja (Maleta, 2006). Malo je istraživanja koja su se bavila proučavanjem crijevne mikrobiote pothranjenijih odraslih osoba. Većina istraživanja rađenih na tu temu je proučavala crijevnu mikrobiotu pothranjene djece jer je pothranjenost u djece jedan od vodećih zdravstvenih problema u svijetu s više od 3 milijuna smrtnih slučajeva godišnje (de Clercq i sur., 2016).

Smith i sur. (2013) su u svom istraživanju proučavali ulogu crijevne mikrobiote u teško akutnoj pothranjenosti (kwashiorkor) kod djece. Proučavano je 317 malavijskih parova blizanaca od rođenja do 3 godine starosti. Tijekom tog razdoblja 50 % blizanaca je ostalo dobro uhranjeno, 43 % neadekvatno, a 7 % je razvilo akutnu pothranjenost. Uzorci fekalne mikrobiote iz 3 neskladna para su transplantirani u „sterilne“ miševe. Kombinacija malavijske prehrane i mikrobioma kwashiorkor rezultirala je značajnim gubitkom tjelesne mase kod „sterilnih“ miševa, popraćenim poremećajima u metabolizmu aminokiselina i ugljikohidrata. Ovo otkriće implicira da je crijevna mikrobiota uzročni čimbenik u nastanku kwashiorkora.

Još jedan od poremećaja koji rezultira ozbiljnom pothranjenošću je anoreksija. Anoreksiju karakterizira iskrivljena slika tijela te ekstremna dijeta koja dovodi do ozbiljnog gubitka kilograma s patološkom anksioznošću zbog pretilosti. Promijenjena regulacija apetita i energetska homeostaza su povezane s promijenjenim sastavom crijevne mikrobiote. Istraživanja su pokazala povećanu koncentraciju *Methonobrevibacter smithii*, arheje koji proizvodi metan, kod pacijenata s anoreksijom u usporedbi s osobama normalne tjelesne mase i pretilim osobama. Nadalje, u uzorcima stolice kod osoba s anoreksijom uočene su znatno niže količine ukupnih bakterija i obaveznih anaeroba (*Clostridium coccoides*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium leptum*, *Streptococcus*). Također, uočena je smanjena koncentracija butirata koji proizvode bakterije vrste *Roseburia spp.* i veća koncentracija bakterija koje razgrađuju mucin (*Verrucomicrobia*) te roda *Clostridium* (de Clercq i sur., 2016).

2.3. TJELESNA AKTIVNOST

Tjelesna aktivnost se definira kao pokretanje tijela s pomoću skeletne muskulature uz potrošnju energije veće od one u mirovanju. Tjelesno vježbanje je podskupina tjelesne aktivnosti koja je planirana, strukturirana, ponavljana i sa svrhom poboljšanja ili održavanja tjelesne sposobnosti. Redovita tjelesna aktivnost reducira rizik od kroničnih bolesti kao što su pretilost, dijabetes tipa 2, metabolički sindrom, osteoporoza, depresija i neke vrste karcinoma (Babić, 2018). Pojavu ovih bolesti se često povezuje s raznim čimbenicima poput tjelesne neaktivnosti, nepravilnom prehranom, konzumacijom alkohola i cigareta te socio-ekonomskim statusom (Cleland i sur., 2014). Nadalje, tjelesna aktivnost se može svrstati u četiri domene: tjelesna aktivnost na poslu, tjelesna aktivnost vezana uz transport, tjelesna aktivnost vezana uz održavanje kućanstva i tjelesna aktivnost u slobodno vrijeme (Caspersen i sur., 1985). Prema podacima WHO, tjelesna neaktivnost je jedan od vodećih rizičnih čimbenika i uzroka smrtnosti u svijetu. Istraživanja pokazuju da se u Hrvatskoj čak 56 % odraslih osoba ne bavi sportom ili vježbanjem, a 20 % njih se bavi sportom rijetko (3 puta na mjesec ili rjeđe) (Greblo Jurakić i Jurakić, 2019).

Tjelesna aktivnost se može pratiti pomoću apsolutnog i relativnog intenziteta. Doza tjelesne aktivnosti je ukupna količina energije potrošene tijekom tjelesne aktivnosti, dok je intenzitet tjelesne aktivnosti udio potrošene energije tijekom takve aktivnosti. Apsolutni intenzitet jest udio energije potrošene tijekom tjelesnog vježbanja obično izražen u metaboličkim ekvivalentima (MET), gdje jedan MET jest metabolički udio u mirovanju, odnosno 1 MET odgovara primtku kisika u mirovanju oko $3,5 \text{ ml kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ i kalorijskoj potrošnji od $1 \text{ kcal kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$. To znači da osoba koja miruje u jednom satu potroši onoliko kalorija kolika je njezina masa. Na temelju MET-a aktivnosti se mogu svrstati u one niskog, umjerenog i visokog intenziteta (slika 5). Aktivnost niskog intenziteta obuhvaća onu manju od 3 MET-a i veću od 1,5 MET-a (ili 4 kcal min^{-1}). Tjelesne aktivnosti umjerenog intenziteta su one relativnog intenziteta od 40 do 60 % ili apsolutnog intenziteta od 3 do 6 MET-a (ili $4 \text{ do } 7 \text{ kcal min}^{-1}$), dok su one visokog intenziteta s energetsom potrošnjom od 6,0 MET-a i više (ili 7 kcal min^{-1}). Sedentarnim ponašanjem smatra se ono koje iziskuje 1,5 ili manje MET-a (Babić, 2018; Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2018). Neaktivnost ili nedovoljna tjelesna aktivnost je stanje u kojem nema značajnijeg povećanja energetske potrošnje iznad one u mirovanju (Hagstromer i sur., 2007). Novija istraživanja pokazuju značajnu povezanost kontinuiranog sjedilačkog ponašanja s abnormalnim metabolizmom glukoze i kardiovaskularnim

morbiditetima. Preporuka koju daje WHO radi unaprjeđenja zdravlja je minimalno 600 MET-a tjelesne aktivnosti tjedno, to bi bilo oko 150 minuta na tjedan brzog hoda ili 75 minuta na tjedan trčanja (Kyu i sur., 2013). Relativni intenzitet odnosi se na udio aerobne snage iskorišten za vrijeme tjelesnog vježbanja i izražava se postotkom maksimalne frekvencije srca ili VO_{2max} (Babić, 2018). Primjeri niskog, umjerenog i visokog apsolutnog intenziteta tjelesnih aktivnosti prikazani su na slici 5.

NISKI INTENZITET (< 3 MET-a)	UMJERENI INTENZITET (3-6 MET-a)	VISOKI INTENZITET (> 6 MET-a)
• spori hod (4 km h⁻¹) • lakši kućanski poslovi (usisavanje, manji popravci) • vrtlarenje (lakši poslovi) • lagano igranje s djetetom, čuvanje djeteta u sjedećem ili stojećem položaju • lagano, sporo plivanje	• brzi hod (6 km h⁻¹) • umjereno teški kućanski poslovi • umjereno teški rad u vrtu • igranje s djetetom u hodu ili trčkanje • ples (valcer) (28 m min⁻¹) • trčanje (oko 7 km h⁻¹) • prsno plivanje (1,2 km h⁻¹) • vožnja biciklom (15km h⁻¹)	• brzi hod (8 km h⁻¹) • teži kućanski poslovi (nošenje teških predmeta) • teški rad u vrtu • trčanje (> 9 km h⁻¹) • plivanje - kraul (3 km h⁻¹) • vožnja biciklom (> 21 km h⁻¹) • tenis (8 MET-a) • nogomet (7 - 15 MET-a) • košarka (7 - 15 MET-a) • rukomet (8 - 12 MET-a) • odbojka (5 - 12 MET-a)

Slika 5. Primjeri niskog, umjerenog i visokog apsolutnog intenziteta tjelesnih aktivnosti (Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2018)

2.3.1. Utjecaj tjelesne aktivnosti na crijevnu mikrobiotu

Crijevna mikrobiota, prehrana i tjelesna aktivnost su međusobno povezane kompleksnim mehanizmima. Tjelesna aktivnost može utjecati na promjene u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu crijevne mikrobiote te najveći broj dokaza o ovoj povezanosti proizlazi s istraživanja na miševima (Valeriani i sur., 2020). Tjelesna aktivnost potiče na promjene u sastavu crijevne mikrobiote koje potpomažu ponovnu uspostavu energetske ravnoteže i održavanje protuupalnog stanja organizma te čak utječe na os crijeva-mozak. Doprinos tjelesne aktivnosti gastrointestinalnom sustavu čovjeka i crijevnoj mikrobioti može uključivati nekoliko mehanizama kao što su smanjenje vremena koje je potrebno za prolazak hrane kroz crijeva,

odnosno skraćanje vremenskog kontakta između crijevne sluznice i tvari koje promoviraju nastanak raka, moduliranje imunološkog odgovora ili utjecaj na proizvodnju metabolita crijevne mikrobiote. Nadalje tjelesna aktivnost može diversificirati crijevnju mikrobiotu povećavajući broj benignih mikrobnih zajednica ili pridonoseći crijevnoj propusnosti (Shahar i sur., 2020).

Istraživanje provedeno na štakorima od strane Matsumoto i sur. (2008) pokazalo je kako dobrovoljno trčanje utječe na modifikaciju sastava crijevne mikrobiote, povećava promjer slijepog crijeva i koncentraciju butirata koji štiti od nastanka raka debelog crijeva i upalne bolesti crijeva (eng. *Inflammatory bowel disease*, IBD) te ima ulogu u sintezi mucina i zaštiti crijevnog epitela. Ovi učinci su bili djelomično objašnjeni i u drugim istraživanjima gdje je pokazano kako dobrovoljno trčanje ili povećava broj bakterijskih rodova *Bifidobacteria* i *Lactobacillus* koji moduliraju imunitet sluznice te sprečavaju invaziju patogena ili broj *Blautia coccoides* i *Eubacterium rectale* koji pretvaraju laktat u butirat. Nadalje, tjelesna aktivnost može spriječiti povećanje tjelesne mase te nastanak pretilosti promjenom postotka bakterija roda *Bacteroidetes* i *Firmicutes*. Promjene koje nastaju u sastavu crijevne mikrobiote sugeriraju na mogući terapijski učinak tjelesne aktivnosti u liječenju pretilosti (Gallè i sur., 2019). Neka istraživanja su pokazala da postoji značajna bioraznolikost kod sportaša, dok druga ukazuju na smanjeni broj bakterija roda *Bacteroidetes* i povećani broj bakterija *Firmicutes* kod osoba koje preaktivne (Valeriani i sur., 2020). Razlike u sastavu mikrobiote crijeva uočena je kod aktivnih i neaktivnih žena. Kod žena koje su se svakodnevno bavile preporučenom tjelesnom aktivnošću uočena je veća količina bakterija roda *Akkermansia muciniphila*, *Fecalibacterium prausnitzii*, *Bifidobacteria longum* i *Roseburia hominis* što se povezuje sa zdravljem. Nadalje, čini se da aerobni trening tijekom 6 tjedana mijenja mikrobiološki sastav i funkciju crijeva jer su uočene veće sličnosti između pretilih i mršavih osoba, bez obzira na unos hrane. Istraživanje koja je rađeno u skupini žena s rakom dojke sugerira da razina kondicije nije značajno povezana s relativnim obiljem specifičnih crijevnih mikroba (Whisner i sur., 2018).

Clarke i sur. (2014) su uočili da je alfa raznolikost crijevne mikrobiote profesionalnih ragbijaša statistički veća od kontrolnih skupina osoba koje su provodile sjedilački način života (prva skupina ITM < 25 kg m⁻², druga skupina ITM > 28 kg m⁻²), dok se alfa raznolikost između kontrolnih skupina ne razlikuje. Taksonomskom analizom kod sportaša je primijećeno 22 koljena, 68 porodica i 113 rodova. Kod kontrolne skupine s ITM < 25 kg m⁻², 11 koljena, 33

porodice i 65 rodova, a kod kontrolne skupine s ITM $> 28 \text{ kg m}^{-2}$, 9 koljena, 33 porodice i 61 rod. Konzumacija proteina i tjelesna aktivnost povećavaju mikrobnu raznolikost u usporedbi s kontrolnom skupinom. Također, kod sportaša i kontrolne skupine s niskim ITM pronađen je znatno veći udio bakterija roda *Akkermansia* koje razgrađuju mucin, a čija brojnost obrnuto korelira s pretilošću i metaboličkim poremećajima (Gallè i sur., 2019). Mörkl i sur. (2017) su promatrali crijevnu mikrobiotu između ispitanika koji su pothranjeni, koji imaju adekvatnu tjelesne masu, onih s povećanom tjelesnom masom, pretilih ispitanika i sportaša. Pretili i pothranjeni ispitanici su imali smanjeno bogatstvo mikrobne zajednice dok je ono najveće kod sportaša u usporedbi sa svim ostalim skupinama. Nekoliko istraživanja pokazuju kako crijevna mikrobiota ima strukturnu i histološku funkciju u ljudskom organizmu, sudjeluje u rastu i diferencijaciji mišićnih vlakana i epitelnih stanica. Tjelesna aktivnost utječe na crijevnu mikrobiotu neovisno o vrsti prehrane, a ovisno o specifičnim mikrobnim vrstama te mikrobiota mršavih osoba može biti osjetljivija na tjelesnu aktivnost u odnosu na mikrobiotu osoba prekomjerne tjelesne mase ili pretilih osoba (Gallè i sur., 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ISPITANICI

Istraživanje je provedeno u sklopu projekta *MicroEquilibrium* – Istraživanje ravnoteže mikrobioma debelog crijeva, financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost, u vremenskom periodu od siječnja do travnja 2018. godine na Prehrambeno – biotehnološkom fakultetu u Zagrebu.

Regrutacija ispitanika u navedeno istraživanje provedena je pomoću javnih letaka, oglasa na web stranici projekta *MicroEquilibrium* te društvenim mrežama i preko osobnih poznanstava istraživača uključenih u projekt.

Prilikom regrutacije ispitanika, kriteriji za uključivanje u istraživanje su bili:

- indeks tjelesne mase (ITM) ($<18,5 \text{ kg m}^{-2}$; $20\text{-}22 \text{ kg m}^{-2}$; $>27 \text{ kg m}^{-2}$);
- oba spola;
- dob: od 18 do 35 godina;
- zdravi ispitanici (bez poznatih kroničnih oboljenja).

Dok je kriterij za isključivanje bio konzumiranje antibiotika tijekom posljednja tri mjeseca prije uključivanja u istraživanje.

Svi ispitanici u istraživanje su se uključivali na dragovoljnoj osnovi, a prije samog uključivanja u istraživanje svaki je od ispitanika detaljno informiran o ciljevima samog istraživanja i metodologiji koja će se koristiti te je potpisao informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju.

Broj prijavljenih ispitanika zainteresiranih za sudjelovanje u istraživanju bio je 136 od kojih je, s obzirom na ranije postavljene kriterije uključivanja/isključivanja, 56 osoba bilo prikladno za sudjelovanje u istraživanju, a od njih se u konačnici 40 odazvalo na sva mjerenja i ispunilo sve potrebne upitnike. Ispitanici koji su sudjelovali u istraživanju su bili oba spola i to 20 žena i jednako toliko muškaraca. Ispitanici su u svrhu istraživanja podijeljeni u tri kategorije ovisno o indeksu tjelesne mase; 13 pothranjenih ispitanika, 10 ispitanika adekvatne tjelesne mase te 17 ispitanika s prekomjernom tjelesnom masom ili pretilošću.

Istraživanje cijelog znanstvenog projekta je provedeno u suglasju s preporukama Helsinške deklaracije o ljudskim pravima te sa Zakonom o potvrđivanju Konvencije o zaštiti ljudskih prava i dostojanstva ljudskog bića u pogledu primjene biologije i medicine (Hrvatski Sabor, 2003) odnosno dijelova koji se odnose na istraživanja na ljudima, kao i na zaštitu privatnosti i anonimnosti te u skladu sa Zakonom o provedbi Opće uredbe o zaštiti podataka (Zakon, 2018). Također, istraživanje je prije početka provedbe Projekta odobreno pozitivnim rješenjima (suglasnostima za provođenje istraživanja) Etičkog povjerenstva Dječje bolnice Srebrnjak te Etičkog povjerenstva Instituta za antropologiju.

3.2. METODE

Metode koje su se koristile u istraživanju se mogu podijeliti na: antropometrijske, dijetetičke, biokemijske, genomičke te statističke metode.

3.2.1. Prikupljanje općih, biokemijskih i dijetetičkih podataka

Zdravstvenim kartonom i Općim upitnikom o prehranbenim navikama prikupljeni su podaci o zdravstvenom stanju i životnim navikama ispitanika (vrsta prehrane, broj obroka, uzimanje dodataka prehrani i lijekova, konzumacija kave alkohola i cigareta, tjelesna aktivnost i dr.). Pitanja su podijeljena na opća – 15; pitanja o zdravstvenom stanju – 12 te pitanja o prehranbenim navikama – 33. Od svakog ispitanika dodatno je prikupljen uzorak stolice potreban za izolaciju deoksiribonukleinske kiseline (engl. deoxyribonucleic acid, DNA) iz koje se dalje radi analiza genomičkim metodama.

Dijetetička metoda koja se koristila u ovom istraživanju bio je trodnevni dnevnik prehrane, a koristio se kako bi se prikupio i analizirao unos energije, makronutrijenata i mikronutrijenata u ispitanika. Ovom dijetetičkom metodom je omogućen uvid u obrazac prehrane, a sama metoda može se definirati kao dijetetička metoda koja bilježi unos hrane u sadašnjici. Njezine prednosti su što se ne oslanja na pamćenje, a daje detaljne informacije o konzumiranoj hrani i piću te je pogodna za procjenu uobičajenog unosa. Nedostatak ove metode je taj što zahtjeva puno vremena i truda i ispitanika i ispitivača, što u konačnici može izazvati promjene u prehranbenim navikama (Štalić i Jirka Alebić, 2008). Svi ispitanici su dobili detaljne upute za vođenje dnevnika prehrane s oglednim primjerkom te su ga vodili kroz tri uzastopna dana neposredno prije davanja uzorka stolice i provođenja antropometrijskih mjerenja. Procjenu konzumirane hrane i pića ispitanici su vršili uz pomoć kuhinjskog pribora (npr. žlica, čajna žličica, čaša, šalica, tanjur i dr.) i /ili vaganjem, a za kupovne namirnice pomoću mase (g)

navedene na deklaraciji. Također, ispitanici su u dnevnik prehrane bilježili i konzumaciju pripravaka i dodataka prehrani te njihovu količinu (Coolinarika, 2020).

Svakom ispitaniku izmjeren je krvni tlak uređajem *OMRON M6 Comfort* (slika 6), te su određene vrijednosti glukoze i kolesterola iz uzoraka kapilarne krvi uređajem *Accutrend® Plus System* (*Roche Diagnostic USA*) (slika 7).



Slika 6. Tlakomjer *OMRON M6 Comfort* (vlastita fotografija)



Slika 7. Uređaj za mjerenje glukoze i kolesterola iz kapilarne krvi *Accutrend® Plus System* (*Roche Diagnostic USA*) (vlastita fotografija)

3.2.2. Upitnik o tjelesnoj aktivnosti - GPAQ

Uvid u učestalost i jačinu tjelesne aktivnosti ispitanika dobiven je upitnikom o tjelesnoj aktivnosti Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) – Global Physical Activity Questionnaire (GPAQ) (WHO, 2006).

GPAQ - The Global Physical Activity Questionnaire razvijen je 2002. godine u sklopu programa WHO za kontrolu nad rizičnim čimbenicima kardiovaskularnih bolesti (Bull i sur., 2009, Armstrong i Bull, 2006). Njegovu uporabu u nacionalnom praćenju tjelesne aktivnosti preporučio je WHO je u svom programu *Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health* 2004.

GPAQ upitnik se sastoji od 16 pitanja raspodijeljenih u 3 skupine pitanja, od čega 6 pitanja u kategoriji aktivnosti na poslu, 3 pitanja u kategoriji putovanje, 6 pitanja u kategoriji rekreacije (slobodno vrijeme) te 1 pitanje vezano uz procjenu vremena sjedenja (Cleland i sur., 2014). Nastao je kao kombinacija dugačkog i kratkog međunarodnog upitnika za procjenu tjelesne aktivnosti (IPAQ), a uključena su područja procjene – posao, prijevoz i slobodno vrijeme, a unatoč tome što je značajno kraći procjenjuje i vrijeme sjedenja. Prema WHO -u, GPAQ se primjenjuje u više od 100 zemalja, uglavnom u okviru STEPS-a (*STEPwise Approach to NCD Risk Factor Surveillance*) i to u zemljama s niskim / srednjim dohotkom (Guthold i sur., 2011).

Intenzitet tjelesnih aktivnosti izražava se u terminu metaboličkog ekvivalenta (MET). MET se definira kao količina potrošene energije dok osoba sjedi ili miruje i jednaka je kalorijskoj potrošnji od $1 \text{ kcal kg}^{-1} \text{ sat}^{-1}$. Za izračun ukupne potrošnje energije osobe pomoću GPAQ-a dodijeljene su sljedeće vrijednosti MET-a koje su u skladu sa smjernicama WHO-a. Umjerene aktivnosti na poslu, putovanje i rekreacija troše 4 MET-a, dok snažne aktivnosti troše 8 MET-ova. Ukupno utrošeno vrijeme i potrošnja energije u MET-u izračunavaju se u sva tri područja djelovanja. Ukupno vrijeme provedeno u fizičkim aktivnostima tjedno zbroj je vremena provedenog u svih pet okruženja u jednom tjednu, gdje ukupna potrošnja energije ili MET tjedno je jednaka zbroju potrošnje energije u svih pet okruženja aktivnosti u jednom tjednu. Za osobu se kaže da ima sjedeći način života ako su ukupne aktivnosti koje osoba obavlja u tjedan dana manje od bilo koje od sljedećih: 1. 150 minuta tjelesne aktivnosti umjerenog intenziteta ili 2. 75 minuta tjelesne aktivnosti snažnog intenziteta ili 3. ekvivalentna kombinacija tjelesne aktivnosti umjerenog i snažnog intenziteta koja postiže najmanje 600 MET minuta. Aktivnosti

snažnog i umjerenog intenziteta zabilježene su ako se to radi najmanje 10 minuta neprekidno (Veer i sur., 2018).

3.2.3. Antropometrijske metode

Istraživačka metoda čiji je cilj utvrđivanje dimenzija ljudskog tijela i njihovo prosuđivanje naziva se antropometrija (Hrvatska enciklopedija, 2017). U ovom istraživanju ispitanicima su mjerene tjelesna masa, tjelesna visina, opseg struka, bokova, nadlaktice i zapešća te sastav tijela (udio i masa masnog tkiva te masa mišićnog tkiva).

Tjelesna visina mjerena je pomoću visinomjera *Seca 217 (Seca Ltd.)* s preciznošću od 0,1 cm. Prilikom mjerenja su ispitanici bili bez obuće, u uspravnom opuštenom položaju te su u četiri točke (tjeme, lopatica, stražnjica i pete) dodirivali mjernu skalu, a položaj glave je bio u položaju Frankfurt horizontalne ravnine koja predstavlja zamišljenu liniju koja spaja donji rub lijeve orbite i tragus heliksa i lijevog uha u vodoravnom položaju u odnosu na podlogu (Lee i Nieman, 2013).

Mjerenje tjelesne mase izvršeno je pomoću analizatora sastava tijela koji radi na principu bioelektrične impedancije (BIA) u laganoj odjeći i bez obuće (*TANITA DC-430MA*, slika 8) s preciznošću 0,1 kg. BIA je postupak kojim se kroz ispitanika propušta neosjetljiva i ne štetna struja jakosti najviše do 800 mA (Štalić i sur., 2016). Osim tjelesne mase dobiveni su podaci o postotku i masi mišićnog i masnog tkiva, udjelu visceralnog masnog tkiva, koštanoj masi i masi ukupne vode u tijelu, bazalni metabolizam (BM) i ITM. Analizator je prilikom mjerenja podešen prema stupnju tjelesne aktivnosti ispitanika, uz korekciju za odjeću (oduzeta masa u iznosu od 1 kg).



Slika 8. Analizator sastava tijela *TANITA Inner Scan DC-430U* – dual frequency Total body composition analyzer (Festta d.o.o.) (vlastita fotografija)

Opseg struka, bokova, nadlaktice i zapešća je izmjereno pomoću savitljive, ne elastične mjerne trake s preciznošću od 0,1 cm. Naknadno se računski dobio omjer opsega struka i bokova (WHR) te odnos njihovog opsega struka i tjelesne visine (WHtR).

3.2.4. Genomičke metode

Na dan provođenja antropometrijskih mjerenja ispitanici su dostavili uzorak stolice iz koje je izolirana DNA te je njezinim sekvencioniranjem određen sastav crijevnne mikrobiote ispitanika.

3.2.3.1. Izolacija i mjerenje koncentracije DNA

Za izolaciju je korišten QIAamp® PowerFecal® DNA set kemikalija (kit) prema protokolu Quick-Start. Uzorci stolice koji su prethodno čuvani u zamrzivaču na -80 °C, otopljeni su na sobnoj temperaturi i homogenizirani prije daljnjih koraka obrade uzorka. Za izolaciju je korišteno 0,25 g uzorka stolice sukladno uputama proizvođača kit-a za izolaciju DNA.

Uređaj *BioSpec Nano-drop* spektrofotometar (Shimadzu Biotech) je korišten za određivanje koncentracije DNA te je prikazan na slici 9.



Slika 9. *BioSpec Nano-drop* spektrofotometar (Shimadzu Biotech)

3.2.3.2. Sekvenciranje 16S rRNA gena

Sekvenciranje DNA obavljeno je u Molecular Research Lab (MRDNA LAB), Teksas, SAD. Korištena je metoda sekvenciranja sparenih krajeva (*pair-end sequencing*) pomoću Illumina MiSeq uređaja s MiSeq v3 kitom za sekvenciranje. Korištene su početnice 341F/806R za umnažanje V3 i V4 regija gena koji kodira za 16S rRNA korištenjem lančane reakcije polimeraze (PCR) u 30 ciklusa. Nakon umnažanja fragmenta gena PCR produkti su provjereni na 2 %-om agaroznom gelu te su pročišćeni korištenjem kalibriranih Ampure XP kuglica. Pročišćeni PCR produkti su korišteni za izradu DNA knjižnica upotrebom Illumina TruSeq DNA library protokola te zatim sekvencirani Illumina MiSeq platformom.

3.2.3.3. Obrada podataka sekvenciranja i analiza mikrobiote

Sirovi podaci sekvenciranja fragmenta gena 16S rRNA preuzeti su s Illumina Basespace (<https://basespace.illumina.com>) platforme u obliku Fastq datoteka. Preuzete su dvije fastq datoteke pri čemu jedna odgovara očitanim sljedovima nukleotida u prednjem (engl. *forward*) načinu čitanja, dok druga u stražnjem načinu čitanja slijeda (engl. *reverse*). Nakon preuzimanja dokumenti su učitani u programski paket QIIME 2 (<https://qiime2.org/>) te su prednji i stražnji slijed nukleotida spojeni u cjelovitu sekvencu. Svi uzorci se nakon spajanja nalaze u jednom dokumentu te je potrebno svaki slijed dodijeliti odgovarajućem uzorku na osnovu očitano

slijeda nukleotida koji se nalazi na početku svake sekvence – tzv. barkoda. Sekvence kojima prvih 8 nukleotida nije u potpunosti odgovaralo jednom od korištenih barkodova su odbačene iz daljnjih analiza. Sekvence su prošle kontrolu kvalitete korištenjem DADA 2 programskog paketa koji je optimiziran za ispravljanje grešaka sekvenciranja Illumina platformom. Sljedovi svakog uzorka su klasterirani u operacijske taksonomske jedinice (OTU) s minimalnom pokrivenošću od 97 % i minimalnom identičnošću od 97 %, što odgovara definiciji OTU-a na taksonomskom nivou vrste. Reprezentativni slijed svakog klastera je poravnat s Greengenes 16S rRNA taksonomskom bazom korištenjem mafft algoritma čime je određena taksonomska identifikacija svakog OTU-a. Filogenetsko stablo je izrađeno korištenjem aproksimirane metode najveće vjerojatnosti (engl. *approximately-maximum-likelihood*) implementiranom u FastTree programu. Za određivanje različitosti između svakog para uzoraka (bakterijskih zajednica) korištena je UniFrac metrika. Mala UniFrac udaljenost karakterizira uzorke koji imaju sličan sastav bakterijskih zajednica i koje su evoluciono bliske. U upotrebi su dva tipa UniFrac metrika - težinska i netežinska. Težinska UniFrac metrika pri izračunu udaljenosti zajednica uzima u obzir prisutnost i zastupljenost pojedine taksonomske jedinice, dok netežinska uzima u obzir samo prisutnost. Za određivanje razlike u zastupljenosti pojedinih OTU-ova između uzoraka ili grupa uzoraka korištena je ANCOM metoda koja je razvijena kako bi uzela u obzir kompozicijska ograničenja koja predstavlja mikrobiota.

3.2.5. Statističke metode

Prilikom analize i obrade podataka korišteni su paketi MS Excel (Microsoft, Seattle, WA, SAD) te statistički program SPSS v.22 (SPSS Inc., Chicago, IL). Za opis karakteristika ispitanika primijenjene su standardne metode deskriptivne statistike (aritmetička sredina, medijan, standardna devijacija). Razlike u karakteristikama između skupina uspoređivane su nezavisnim Studentovim *t*-testom za kontinuirane podatke, odnosno *hi*-kvadrat testom za kategorijske vrijednosti. Svi dobiveni rezultati prikazuju se kao aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija za kontinuirane podatke, odnosno kao postotak za kategorijske varijable.

Za sve sprovedene testove razina značajnosti utvrđena je na razini $p < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu istraživano je postojanje povezanosti utjecaja stupnja tjelesne aktivnosti na sastav crijeвне mikrobiote u mlađoj populacijskoj skupini ispitanika, bez utvrđenih zdravstvenih problema, različitog stupnja uhranjenosti, a usto su ispitivane njihove prehrambene navike te zdravstveni status, koji bi također mogli utjecati na sastav crijeвне mikrobiote. Nadalje, istraživanjem su prikupljeni opći, antropometrijski, biokemijski, dijetetički podaci te genomički podaci koji su dobiveni iz uzorka stolice ispitanika sekvencioniranjem DNA.

Dobiveni rezultati su prikazani u obliku 10 slika i 5 tablica, a radi lakšeg razumijevanja podijeljeni su u dva dijela, u prvom u kojem su prikazani opći podaci (tablica 1), tablicom 2, slikama 10 - 13 prikazani su podaci o tjelesnoj aktivnosti dobiveni pomoću GPAQ upitnika, a koji su raspodijeljeni s obzirom na stupanj uhranjenosti ispitanika, nakon čega su tablicama 3-5 prikazani opći, antropometrijski i biokemijski podaci ispitanika s obzirom na stupanj uhranjenosti te s obzirom na provođenje ukupne prosječne tjelesne aktivnosti.

U drugom dijelu rezultata, slikama 14 - 17 prikazani su genomički podaci koji su dobiveni analizom crijeвне mikrobiote ispitanika (taksonomska raznolikost, alfa i beta raznolikost) te slikama 18 i 19 povezanost dvaju najzastupljenijih bakterijskih koljena crijeвне mikrobiote s tjelesnom aktivnošću, a s obzirom na stupanj uhranjenosti.

4.1. OPĆI, ANTROPOMETRIJSKI I BIOKEMIJSKI PODACI TE PODACI O TJELESNOJ AKTIVNOSTI

U istraživanju je sudjelovalo ukupno 40 ispitanika, od čega je bilo podjednako muškog i ženskog spola, po 20 ispitanika oba spola, u dobi od 18 do 35 godina. Prosjek godina svih ispitanika iznosio je $25,8 \pm 4,32$ godina. S obzirom na stupanj uhranjenosti, ispitanici su raspodijeljeni u tri skupine – pothranjeni, adekvatno uhranjeni i ispitanici s prekomjernom tjelesnom masom / pretili ispitanici (tablica 1). S obzirom na ITM 10 ispitanika (25 %) je bilo adekvatno uhranjeno, 17 ispitanika (42,5 %) je bilo pretilo, a 13 ispitanika (32,5 %) je bilo pothranjeno. Veći broj muškaraca (70,6 %) je bio u skupini pretilih ispitanika u odnosu na žene (29,4 %). Veći broj žena bio je u skupinama pothranjenih (61,5 %) i adekvatno uhranjenih (70 %) dok je broj u istim skupinama kod muškaraca bio znatno niži (pothranjeni 38,5 % i adekvatno uhranjeni 30 %). U ovom radu nastojala se povezati tjelesna aktivnost ispitanika s mikrobiotom crijeva.

Tablica 1. Usporedba dobi i spola između ispitanika s obzirom na stupanj uhranjenosti

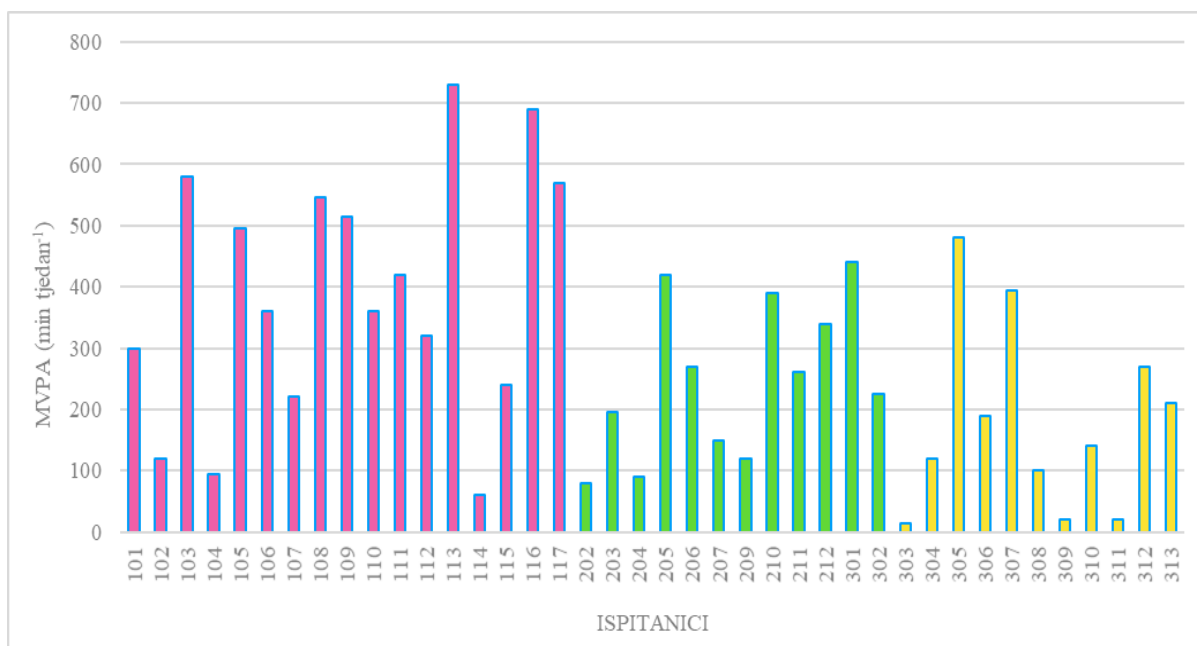
	Ukupno	Muškarci	Žene
Ispitanici (n=40)	40	20	20
Spol (%)		50,0	50,0
Dob (godine) (X ± SD)	$25,8 \pm 4,32$	$25,9 \pm 4,33$	$25,7 \pm 4,34$
Kategorije prema ITM (%)			
Adekvatno uhranjeni ispitanici (n=10)	25,0	30,0	70,0
Pretili ispitanici (n=17)	42,5	70,6	29,4
Pothranjeni ispitanici (n=13)	32,5	38,5	61,5

Tablica 2. Tjelesna aktivnost koju su ispitanici prijavili prilikom popunjavanja GPAQ upitnika (prikazano kao $\bar{x} \pm SD$) s obzirom a spol i indeks tjelesne mase (ITM)

	Ukupno	Spol		ITM				
		Muškarci	Žene	p	Aдекватna TM	Prekomjerna TM / pretilost	Pothranjenost	p
Ukupna tjelesna aktivnost								
GPAQ (MET- min tjedan ⁻¹)	6813,8 ± 5142,8	6645,3 ± 4863,7	6974,0 ± 5516,5	0,422	5820,0 ± 3079,5	99431,8 ± 5886,7	3868,0 ± 3558,4	0,620
GPAQ (min tjedan ⁻¹ – MVPA)	289,0 ± 189,50	315,75 ± 206,3	262,3 ± 172,2	0,197	231,5 ± 123,9	389,4 ± 203,2	201,9 ± 157,8	0,783
Jaka tjelesna aktivnost								
GPAQ (MET- min tjedan ⁻¹)	7664,44 ± 5805,63	7821,67 ± 5615,99	7538,67 ± 6146,27	0,375	5780 ± 3381,81	10058,57 ± 6342,23	4491,43 ± 4550,02	/
Umjerena tjelesna aktivnost								
GPAQ (MET- min tjedan ⁻¹)	5008 ± 2674,39	4628,57 ± 2373,29	5893,33 ± 3688,98	0,093	5880 ± 3062,72	6506,67 ± 439,24	2346,67 ± 1551,95	/
Sjedenje								
GPAQ (MET- sati tjedan ⁻¹)	31,8 ± 16,8	30,9 ± 19,5	32,7 ± 14,0	0,190	33,4 ± 15,6	34,0 ± 20,0	27,6 ± 13,1	0,038

* $p < 0,05$ smatra se statistički značajno

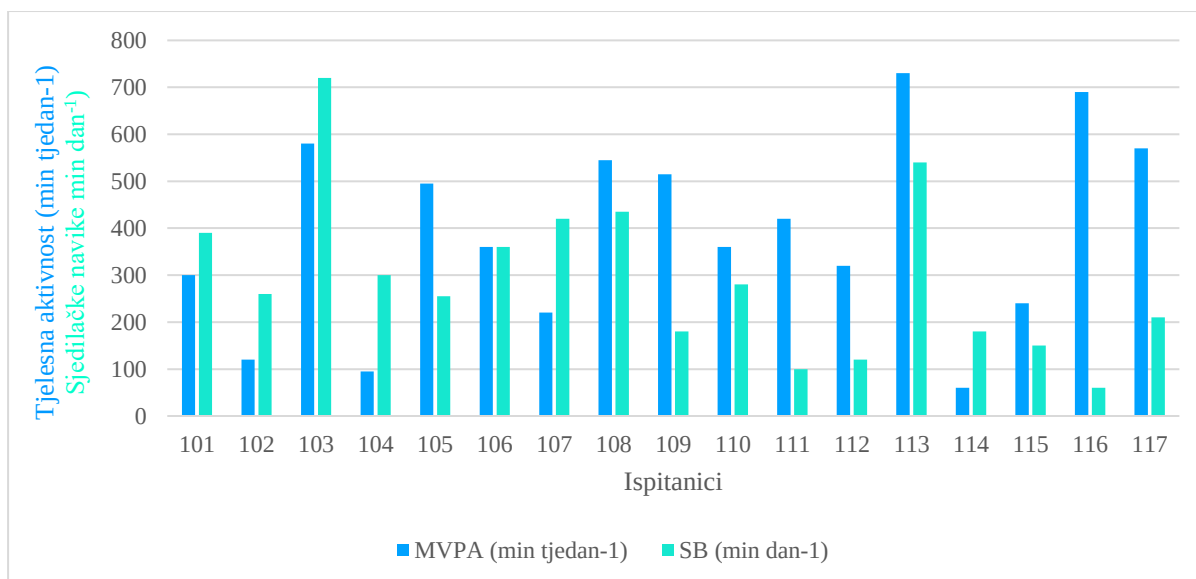
Promatrajući dobivene podatke GPAQ upitnikom, žene su nešto malo više tjelesno aktivne, a kada se pogleda razina tjelesne aktivnosti to je češće umjerena tjelesna aktivnost u usporedbi s muškarcima koji češće provode jaku tjelesnu aktivnost (iako za niti jednu od navedenih razlika nije utvrđena statistički značajna razlika), što nije u skladu s ranije objavljenim rezultatima na populaciji čeških odraslih osoba gdje muškarci provode više tjelesne aktivnosti u odnosu na žensku populaciju (Hamrik i sur., 2014). Jedina utvrđena značajna razlika je između ispitanika u vremenu koje utroše na sjedilačko ponašanje, a s obzirom na indeks tjelesne mase, gdje najmanje sjedilačkog ponašanja imaju ispitanici koji spadaju u kategoriju pothranjenih, dok najviše vremena na sjedenje utroše ispitanici iz skupine s povišenom tjelesnom masom i pretilošću (tablica 2).



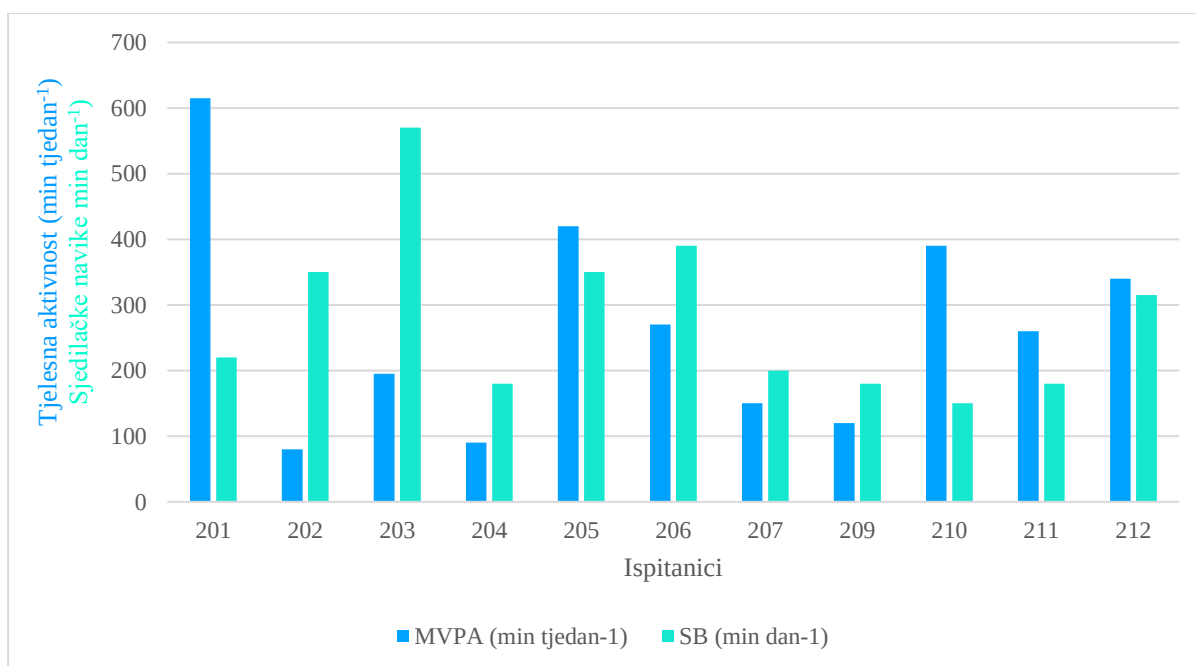
Slika 10. Razina tjelesne aktivnosti (MVPA) izražena u minutama tijekom prosječnog tjedna, prikazana s obzirom na šifru ispitanika (uzorci su šifrirani s obzirom na stupanj uhranjenosti; pod 100 se nalaze pretili, pod 200 adekvatno uhranjeni; pod 300 pothranjeni ispitanici)

Iz slike 10 može se iščitati kako tijekom prosječnog tjedna ispitanici povećane tjelesne mase/pretili ispitanici provode najviše minuta u nekom obliku tjelesne aktivnosti, što nije očekivani rezultat s obzirom na njihov sastav tijela, no ako se to poveže s rezultatima svih kategorija GPAQ upitnika (tablica 2) vidljivo je da ti isti ispitanici provode najviše sati tjedno u sjedilačkom načinu života, a da je intenzitet aktivnosti (i vrijeme provedeno u istoj) nerealno velik, što bi se moglo povezati s ranijim istraživanjima da se ispitanici, upravo zbog želje da se pokažu u boljem svjetlu te da rade sve za svoje zdravlje precjenjuju u kategorijama koje oni sami smatraju da povoljno utječu na vlastito zdravlje (Watkinson i sur., 2010).

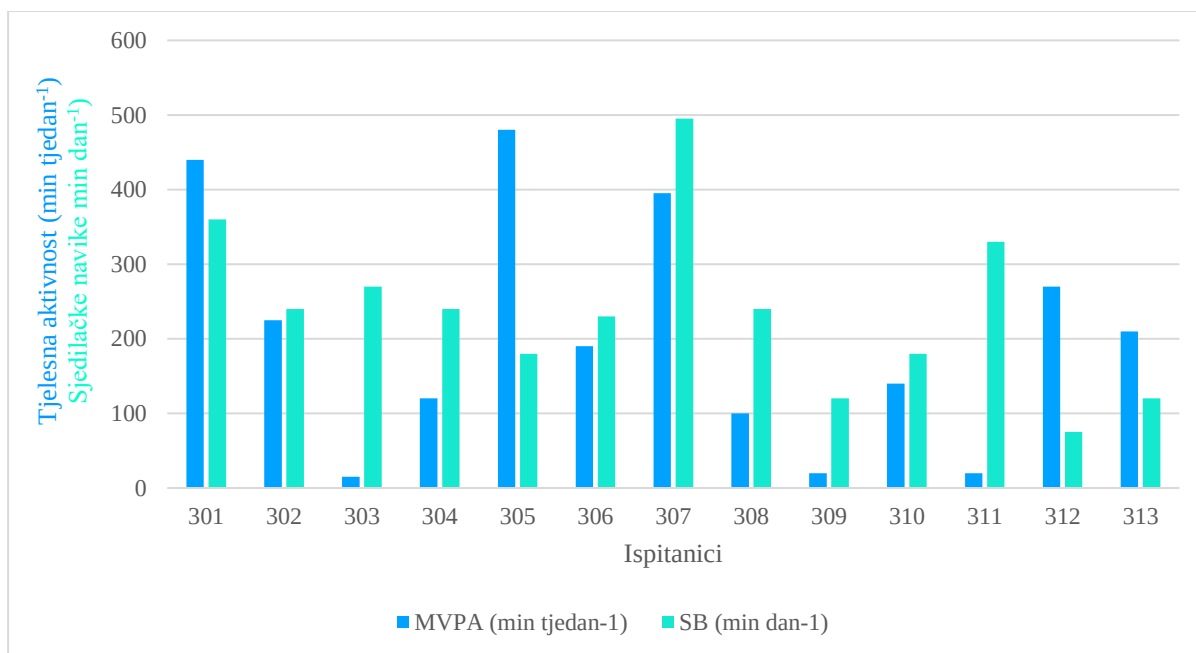
Sjedilačke navike, odnosno vrijeme koje ispitanici u ovom istraživanju provode sjedeći i odmarajući (slike 11 - 13) u skladu je rezultatima koji su dobiveni u češkoj populaciji u osoba slične životne dobi (18 - 39 godina) (Hamrik i sur., 2014). Vrijednosti SB (sjedilačke navike) dobivenoj u tom istraživanju nešto su bliži rezultatima populacije pretelih ispitanika iz ovog istraživanja u odnosu na preostale dvije skupine.



Slika 11. Rezultati GPAQ upitnika - razina tjelesne aktivnosti (MVPA) izražena u minutama tijekom prosječnog tjedna te sjedilačke navike (SB) izražene u minutama tijekom prosječnog dana prikazana s obzirom na šifru ispitanika – ispitanici s prekomjernom tjelesnom masom / pretili ispitanici



Slika 12. Rezultati GPAQ upitnika - razina tjelesne aktivnosti (MVPA) izražena u minutama tijekom prosječnog tjedna te sjedilačke navike (SB) izražene u minutama tijekom prosječnog dana prikazana s obzirom na šifru ispitanika – adekvatno uhranjeni ispitanici



Slika 13. Rezultati GPAQ upitnika - razina tjelesne aktivnosti (MVPA) izražena u minutama tijekom prosječnog tjedna te sjedilačke navike (SB) izražene u minutama tijekom prosječnog dana prikazana s obzirom na šifru ispitanika – pothranjeni ispitanici

Povišen krvni tlak, dijabetes tipa 2, dislipidemija te neke vrste karcinoma su kronične bolesti koje se vrlo često povezuju s prekomjernom tjelesnom masom (Lavie i sur., 2009). Ispitanicima koji su sudjelovali u istraživanju izmjeren je sistolički i dijastolički krvni tlak te su mjereni određeni biokemijski parametri (glukoza i kolesterol iz kapilarne krvi) kako bi se dobio uvid u zdravstveno stanje samog ispitanika i postojanje mogućih rizičnih faktora za razvoj kroničnih bolesti. Iz tablice 3 je vidljivo da skupina ispitanika u skupini s prekomjernom tjelesnom masom i pretilošću ima viši sistolički krvni tlak u odnosu na skupinu s adekvatnom tjelesnom masom te je pokazano da postoji statistički značajna razlika ($p < 0,001$) u vrijednostima sistoličkog krvnog tlaka u pretiloj skupini ispitanika. Ostali praćeni biokemijski parametri nisu se statistički značajno razlikovali u ispitivanim skupinama što je i očekivano s obzirom na to da se radi o zdravoj populaciji, mlađe životne dobi kod kojih se još ne očekuje visoki parametri arterijskog krvnog tlaka, GUK-a te kolesterola. Unatoč tome, može se vidjeti da je u skupinama koje provode više tjelesne aktivnosti nešto niži arterijski krvni tlak, kao i koncentracija glukoze u krvi, a što je u skladu sa spoznajama o blagotvornom učinku tjelesne aktivnosti na biokemijske parametre (Leite Risardi i sur., 2018; Medina i sur., 2018; Teh i sur., 2015).

Tablica 3. Biokemijski parametri ispitanika s obzirom na stupanj uhranjenosti i tjelesnu aktivnost

	Krvni tlak sistolički (mmHg)	Krvni tlak dijastolički (mmHg)	GUK[#] (mmol L⁻¹)	Kolesterol (mmol L⁻¹)
Svi ispitanici (n=40)	123,53 ± 15,53	78,23 ± 1,35	4,42 ± 0,14	4,82 ± 0,13
MET > 150 min tjedan⁻¹ (n=29)	123,33 ± 15,68	78,21 ± 8,79	4,45 ± 0,87	4,81 ± 0,80
MET < 150 min tjedan⁻¹ (n=11)	123,30 ± 16,1	77,81 ± 8,85	4,44 ± 0,82	4,83 ± 0,82
Aдекватно uhranjeni (n=10)	119,20 ± 11,25	75,80 ± 2,96	4,18 ± 0,25	4,68 ± 0,28
MET > 150 min tjedan⁻¹ (n=8)	116 ± 11,25	74,29 ± 9,91	4,13 ± 0,52	4,71 ± 1,05
MET < 150 min tjedan⁻¹ (n=2)	126,67 ± 8,39	79,33 ± 8,50	4,3 ± 1,44	4,62 ± 0,32
Pothranjeni ispitanici (n=13)	113,69 ± 12,61	76,23 ± 2,14	4,28 ± 0,17	4,81 ± 0,28
MET > 150 min tjedan⁻¹ (n=7)	119,71 ± 7,52	78,46 ± 4,79	4,11 ± 0,61	5,03 ± 1,09
MET < 150 min tjedan⁻¹ (n=6)	106,67 ± 14,28	79,67 ± 10,03	4,47 ± 0,65	4,57 ± 0,91
Pretili ispitanici (n=17)	133,59 ± 14,12	81,18 ± 2,08	4,67 ± 0,26	4,80 ± 0,17
MET > 150 min tjedan⁻¹ (n=14)	132,07 ± 11,37	80,14 ± 6,81	4,72 ± 1,12	4,76 ± 0,50
MET < 150 min tjedan⁻¹ (n=3)	140,67 ± 25,77	86 ± 15,62	4,47 ± 0,93	5,53 ± 0,35

[#]GUK – glukoza u krvi

Svi ispitanici uključeni u ovo istraživanje vodili su trodnevni dnevnik prehrane neposredno prije davanja uzorka stolice za analizu sastava crijevne mikrobiote, odnosno neposredno prije dolaska na inicijalno antropometrijsko mjerenje. Uz pomoć trodnevnog dnevnika prehrane dobio se uvid u prehrambene navike ispitanika, njihov unos energije, makronutrijenata i vlakana. Iz trodnevnog dnevnika prehrane izračunat je prosječan unos energije, makronutrijenata i vlakana (tablica 4) te su ispitanici raspodijeljeni s obzirom na stupanj uhranjenosti i količinu tjelesne aktivnosti. Iz tablice je vidljivo da nema značajne razlike u prosječnom dnevnom unosu energije, ugljikohidrata, masti, proteina i vlakana između ispitivanih skupina. Razlog tome može biti što se radi o mlađoj odrasloj populaciji među kojima su još i studenti te imaju sličan obrazac prehranbenog ponašanja (često konzumiranje hrane vani ili dostave hrane i sl.). U skupini ispitanika adekvatne tjelesne mase utvrđen je značajno

veći energetske unos te unos makronutrijenata, ali ne i vlakana u skupini koja je provodila manje od 2,5 h tjelesne aktivnosti tjedno, no kako se radi o malom broju ispitanika (sve 2) nije smisleno provoditi statističke analize, ali je dobar podatak i pokazatelj za daljnja istraživanja.

Tablica 4. Dijetetički podaci dobiveni analizom trodnevnog dnevnika prehrane kod ispitanika s obzirom na stupanj uhranjenosti i tjelesnu aktivnost ispitanika

	<i>Energija (kcal; $\bar{x} \pm SD$)</i>	<i>Ugljikohidrati (g dan⁻¹; $\bar{x} \pm SD$)</i>	<i>Proteini (g dan⁻¹; $\bar{x} \pm SD$)</i>	<i>Masti (g dan⁻¹; $\bar{x} \pm SD$)</i>	<i>Vlakna (g dan⁻¹; $\bar{x} \pm SD$)</i>
Svi ispitanici (n=40)	2447,44 ± 698,05	291,77 ± 142,04	95,71 ± 32,89	113,12 ± 36,06	23,79 ± 12,60
MET > 150 min tjedan⁻¹ (n=29)	2422,04 ± 688,19	291,40 ± 143,88	94,57 ± 32,51	111,69 ± 35,38	23,91 ± 12,75
MET < 150 min tjedan⁻¹ (n=11)	2445,85 ± 720,69	282,70 ± 137,64	94,16 ± 33,23	113,51 ± 37,49	22,45 ± 10,65
Adekvatno uhranjeni (n=10)	2511,87 ± 783,45	278,99 ± 100,33	96,61 ± 36,69	111,00 ± 34,45	20,28 ± 8,23
MET > 150 min tjedan⁻¹ (n=8)	2182,26 ± 625,48	234,66 ± 67,91	82,23 ± 29,86	101,48 ± 30,69	21,17 ± 8,93
MET < 150 min tjedan⁻¹ (n=2)	3280,98 ± 566,42	382,41 ± 92,43	130,16 ± 31,12	133,22 ± 38,19	18,22 ± 7,49
Pothranjeni ispitanici (n=13)	2319,19 ± 507,78	303,88 ± 190,65	87,32 ± 26,14	104,23 ± 27,59	26,87 ± 17,17
MET > 150 min tjedan⁻¹ (n=7)	2458,78 ± 299,75	297,16 ± 51,53	98,03 ± 25,40	99,97 ± 12,79	34,80 ± 19,15
MET < 150 min tjedan⁻¹ (n=6)	2156,34 ± 672,23	311,71 ± 289,67	74,83 ± 22,75	109,21 ± 39,69	17,62 ± 8,73
Pretili ispitanici (n=17)	2507,62 ± 793,27	290,03 ± 126,62	101,59 ± 35,68	121,15 ± 42,38	23,50 ± 10,62
MET > 150 min tjedan⁻¹ (n=14)	2631,41 ± 821,20	298,37 ± 131,85	105,66 ± 37,5	126,85 ± 43,08	24,83 ± 10,74
MET < 150 min tjedan⁻¹ (n=3)	1929,91 ± 207,14	251,12 ± 111,84	82,62 ± 19,72	94,57 ± 31,85	17,29 ± 9,01

Sastav tijela kod ispitanika mjerio se analizatorom TANITA koji radi na principu bioelektrične impedancije (tablica 5). Statistička analiza antropometrijskih mjerenja o ispitanicima koji su bili podijeljeni u tri skupine prema njihovom stupnju uhranjenosti (adekvatno uhranjeni, pothranjeni i pretili ispitanici) pokazala je da postoji statistička značajna razlika ($p < 0,05$) između promatranih skupina za sve ispitivane parametre sastava tijela, što se i očekivalo s obzirom na različite stupnjeve uhranjenosti. Unutar svake skupine, a s obzirom na raspodjelu prema vremenu provedenom u bavljenju tjelesnom aktivnosti (više ili manje od 2,5 sata tjedno) nije utvrđena statistički značajna razlika s obzirom na promatrane antropometrijske parametre (tablica 5).

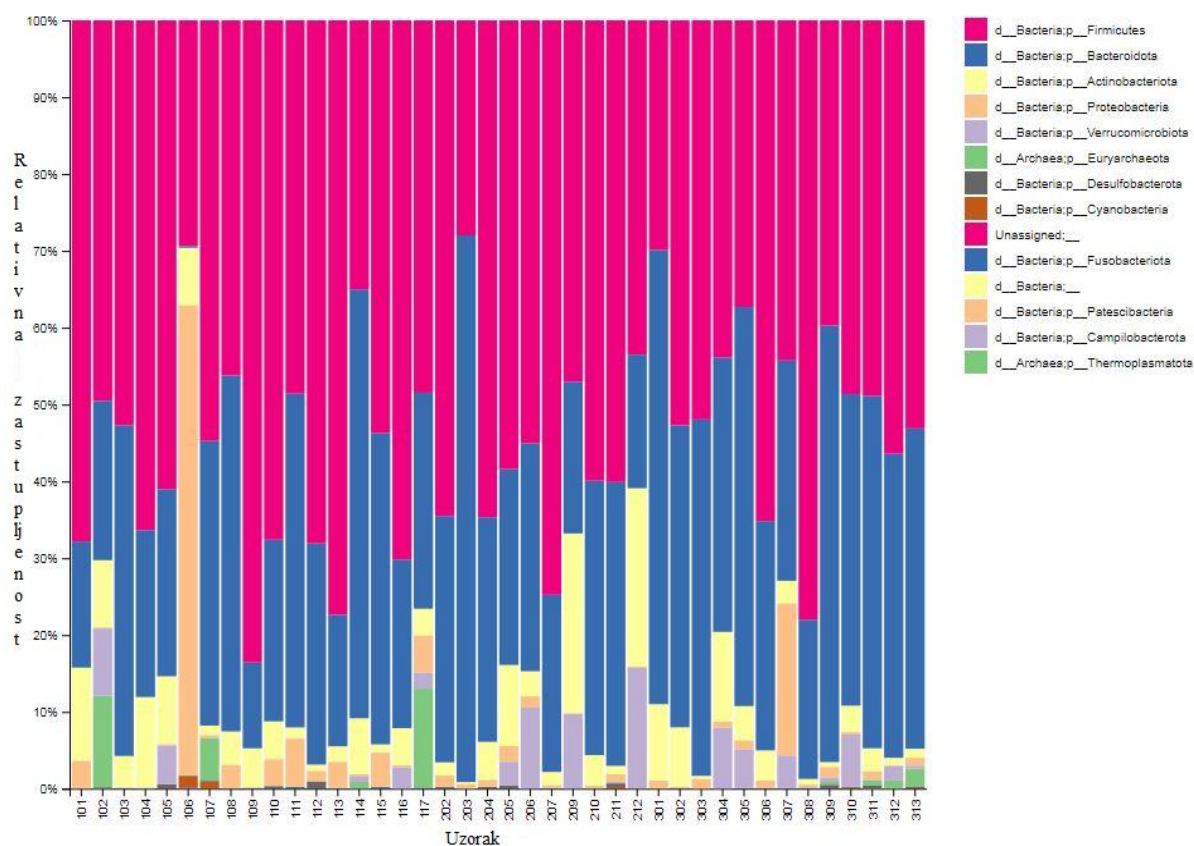
Tablica 5. Rezultati antropometrijskih mjerenja ispitanika te usporedba između skupina s obzirom na stupanj uhranjenosti i tjelesnu aktivnost (n=40)

	WHR	Tjelesna masa (kg)	Masno tkivo (kg)	Masno tkivo (%)	Masa mišića (kg)	FFM (kg)	Razina visceralnog tkiva
Svi ispitanici (n=40)	0,79 ± 0,09	76,42 ± 3,86	16,34 ± 1,55	20,24 ± 8,69	57,10 ± 2,67	60,08 ± 2,80	3,63 ± 0,52
MET > 150 min tjedan⁻¹ (n=29)	0,79 ± 0,09	76,29 ± 25,04	16,45 ± 10,03	20,39 ± 8,76	56,86 ± 18,12	59,84 ± 18,11	3,64 ± 3,4
MET < 150 min tjedan⁻¹ (n=11)	0,79 ± 0,09	76,93 ± 25,40	16,42 ± 9,61	20,31 ± 8,18	57,5 ± 17,76	60,51 ± 18,62	3,70 ± 3,41
Adekvatno uhranjeni (n=10)	0,75 ± 0,08	63,49 ± 2,45	12,36 ± 0,82	19,80 ± 5,01	48,56 ± 2,61	51,13 ± 2,75	1,40 ± 0,27
MET > 150 min tjedan⁻¹ (n=8)	0,75 ± 0,08	61,37 ± 5,10	13,01 ± 1,39	21,31 ± 2,53	45,91 ± 4,86	48,36 ± 5,13	1,29 ± 0,76
MET < 150 min tjedan⁻¹ (n=2)	0,76 ± 0,09	68,43 ± 11,78	10,83 ± 4,43	16,27 ± 8,19	54,73 ± 12,44	57,6 ± 13,05	1,67 ± 1,15
Pothranjeni ispitanici (n=13)	0,77 ± 0,08	53,89 ± 2,18	6,52 ± 0,69	12,55 ± 5,63	44,97 ± 2,39	47,37 ± 2,51	1,00 ± 0,00
MET > 150 min tjedan⁻¹ (n=7)	0,80 ± 0,10	55,81 ± 8,08	7,33 ± 1,96	13,7 ± 5,06	46,03 ± 9,19	48,49 ± 9,64	1,00 ± 0,00
MET < 150 min tjedan⁻¹ (n=6)	0,74 ± 0,04	51,65 ± 7,69	5,58 ± 2,86	11,22 ± 6,42	43,73 ± 8,56	46,07 ± 9,01	1,00 ± 0,00
Pretili ispitanici (n=17)	0,84 ± 0,09	101,25 ± 3,75	26,18 ± 1,55	26,38 ± 7,63	71,39 ± 3,75	75,07 ± 3,92	6,94 ± 0,62
MET > 150 min tjedan⁻¹ (n=14)	0,84 ± 0,08	101,81 ± 16,12	25,51 ± 6,47	25,51 ± 16,10	72,66 ± 16,10	76,4 ± 16,86	6,5 ± 1,91
MET < 150 min tjedan⁻¹ (n=3)	0,81 ± 0,13	98,63 ± 14,48	29,77 ± 5,51	30,43 ± 5,74	65,47 ± 12,63	68,87 ± 3,23	9 ± 4,58

* WHR – omjer struka i bokova; ITM - indeks tjelesne mase

4.2. PODACI DOBIVENI SEKVENCIONIRANJEM CRIJEVNE MIKROBIOTE

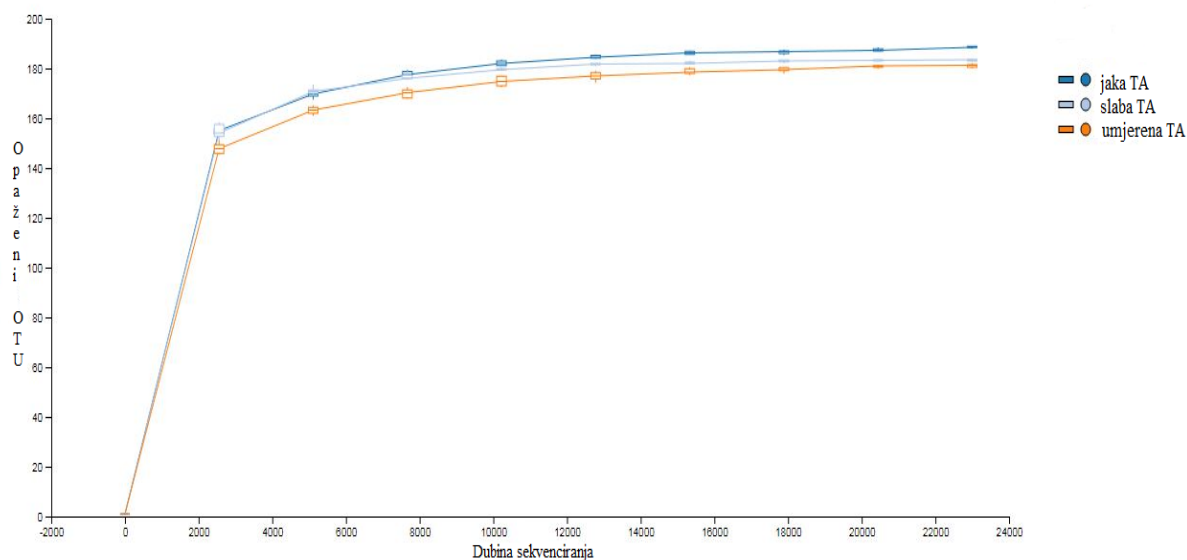
Crijevna mikrobiota se proučava već desetljećima, međutim velika raznolikost mikroorganizama u crijevima i nemogućnost standardnih tehnika uzgoja i izolacije da identificiraju sve prisutne mikroorganizme su ograničile njihovo proučavanje. S pojavom visokopropusnih tehnologija sekvenciranja DNA molekule i njihovim korištenjem za identifikaciju mikroorganizama na temelju očitanoj slijeda DNA dobio se uvid u čitavu širinu i bioraznolikosti organizama u crijevima (Sweeney i Morton, 2013). Koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* dominiraju u sastavu mikrobiote crijeva, dok su rjeđe prisutni članovi koljena *Proteobacteria*, *Actinobacteria* i *Verrucomicrobia* (Shin i sur., 2015). Na slici 14 je prikazan taksonomski sastav mikrobiote stupčastim dijagramima za svaki uzorak na odabranom taksonomskom nivou koljena, iz kojeg se može vidjeti kompleksnost i različitost sastava crijevnne mikrobiote svakog ispitanika. Taksonomska klasifikacija dobivena je poravnavanjem reprezentativne sekvence svake operacijske taksonomske jedinice (OTU) sa Silva 16S rRNA bazom podataka.



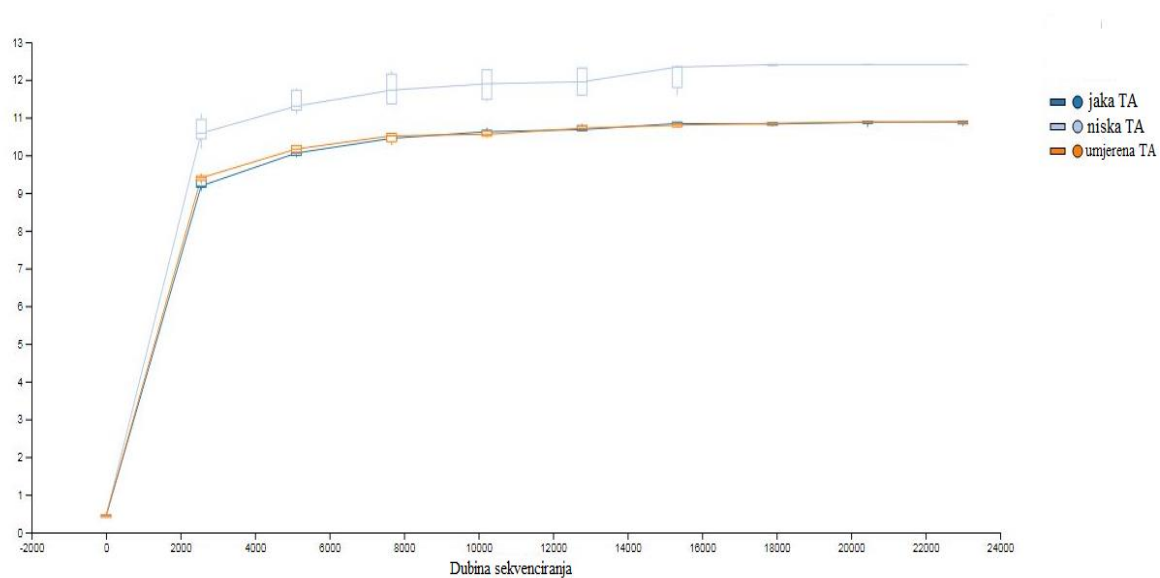
Slika 14. Taksonomska raznolikost crijevnne mikrobiote na razini koljena dobivena nakon

analize uzoraka stolice ispitanika (uzorci su šifrirani s obzirom na stupanj uhranjenosti; pod 100 se nalaze pretili, pod 200 adekvatno uhranjeni; pod 300 pothranjeni ispitanici)

Osim taksonomske analize promatrane su i mjere alfa i beta raznolikost. Raznolikost pojedinog uzorka, odnosno procijenjeni broj vrsta u svakom uzorku opisuju metrike korištene za računanje alfa raznolikost. Za određivanje raznolikosti vrsta unutar uzorka korišteno je više indeksa dok su u rezultatima prikazani indeksi *opaženi OTU* (eng. *observed_otu*) i filogenetske udaljenosti (eng. *Phylogenetic diversity*). Korišteni indeks *opaženi OTU* daje broj identificiranih bakterijskih vrsta u uzorku, neovisno o njihovoj zastupljenosti, dok indeks filogenetske udaljenosti daje filogenetsku povezanost opaženih bakterija u uzorku. Za vizualizaciju alfa raznolikosti koriste se regresijske krivulje koje su prikazane na slikama 15 i 16, gdje se na x-osi nalazi dubina sekvenciranja, a na y-osi metrika korištena za računanje alfa raznolikosti. Pretpostavka u ovom istraživanju bila je da pretili ispitanici imaju nižu tjelesnu aktivnost te da je to uzrok povišenom indeksu tjelesne mase i u konačnici razlike u raznolikosti crijevne mikrobiote. Analiza statističke značajnosti dobivenih indeksa alfa raznolikosti nije pokazala značajnu razliku između skupina definiranih razinom tjelesne aktivnosti ispitanika, što je vidljivo na slikama 15 i 16. Slika 15 prikazuje procijenjeni broj OTU-a za skupine definirane prema tjelesnoj aktivnosti, dok slika 16 prikazuje filogenetsku udaljenost unutar skupina. Broj bakterijskih vrsta identificiran u skupinama iznosi između 166 i 175. Indeks filogenetske udaljenosti pokazuje veću vrijednost u skupini s niskom tjelesnom aktivnošću što implicira da su bakterije identificirane u toj skupini taksonomski udaljenije, odnosno različitije, nego u druge dvije skupine. Iako je bitno napomenuti da je skupina ispitanika s niskom tjelesnom aktivnošću najmanja i sastoji se samo od dva ispitanika, što bi moglo utjecati na vrijednost indeksa.

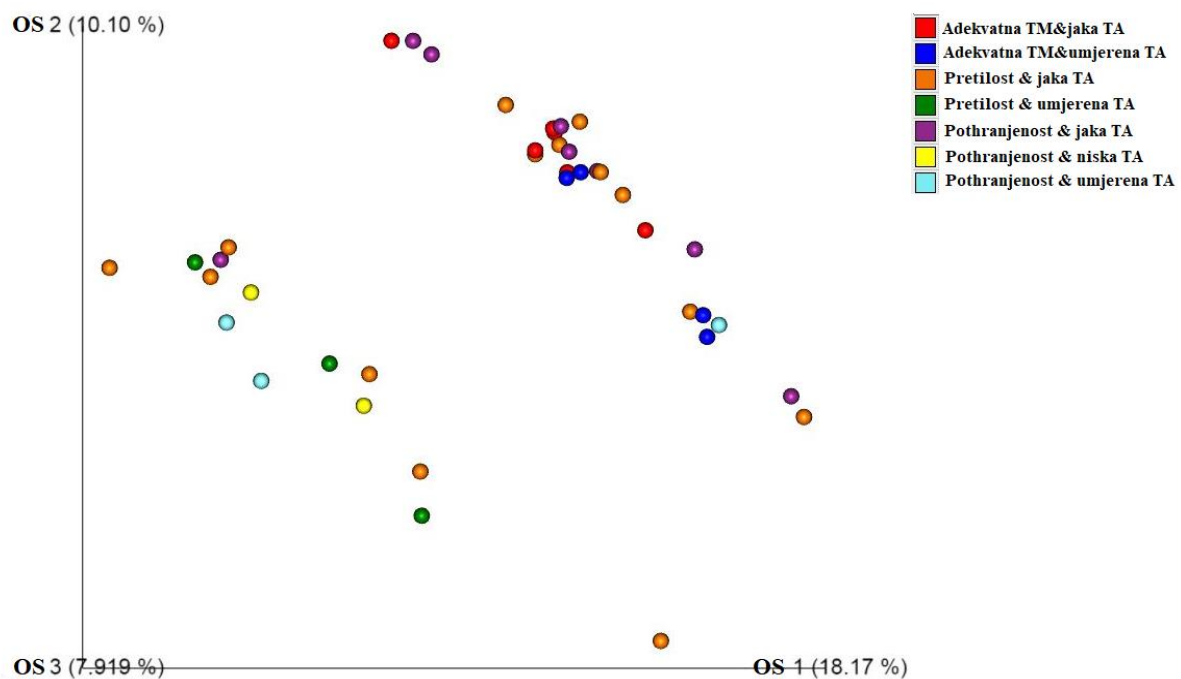


Slika 15. Refrakcijske krivulje alfa raznolikosti crijevne mikrobiote s obzirom na razinu tjelesne aktivnosti ispitanika - prikazuju procijenjeni broj OTU-a za skupine definirane prema tjelesnoj aktivnosti



Slika 16. Refrakcijske krivulje alfa raznolikosti crijevne mikrobiote s obzirom na razinu tjelesne aktivnosti ispitanika - prikazuju filogenetsku udaljenost unutar skupina

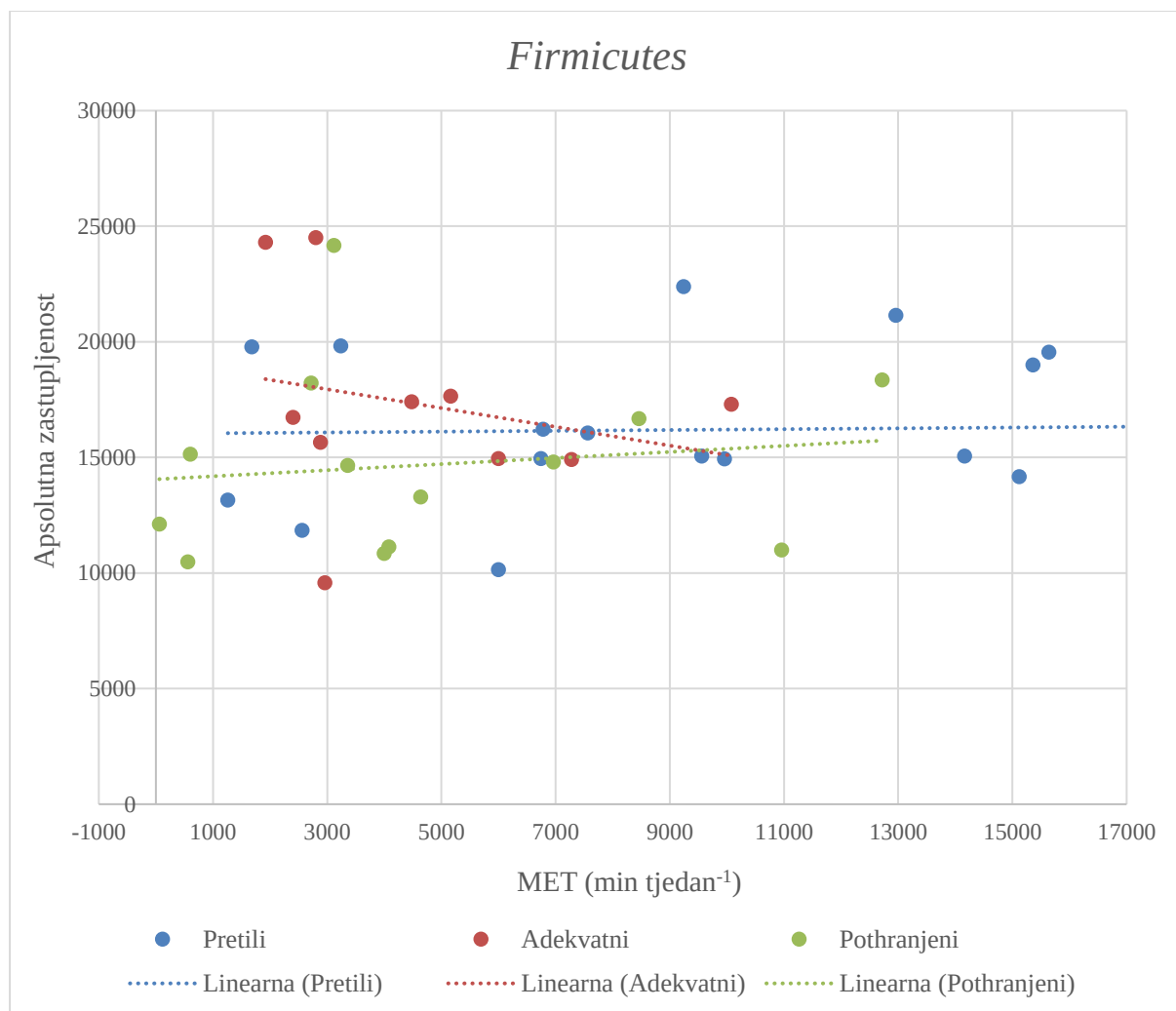
Analizom beta raznolikosti uzoraka, mjerena metrikama težinske i netežinske Unifrac udaljenosti, nije detektirano grupiranje uzoraka prema promatranim kategorijama. Na slici 17 prikazana analiza beta raznolikosti uzoraka mjerena netežinskom Unifrac metrikom, koja prikazuje sličnost uzoraka temeljenu na prisustvu pojedinih bakterijskih vrsta, rezultirala je grupiranju uzoraka u dvije grupe koje ne koreliraju s obzirom na stupanj uhranjenosti te tjelesnu aktivnost ispitanika uključenih u istraživanje.



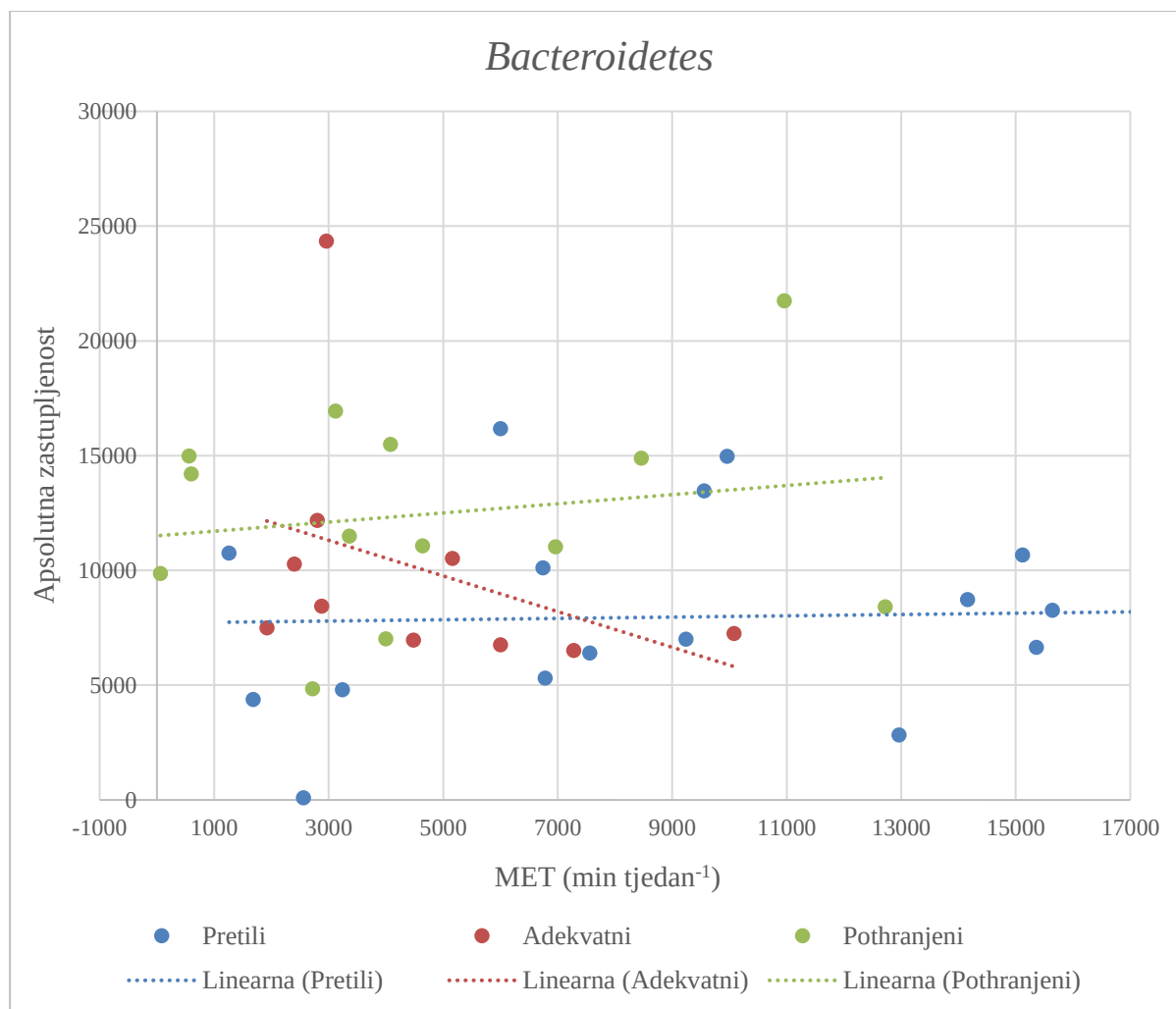
Slika 17. Beta raznolikost crijevne mikrobiote ispitanika s obzirom na stupanj uhranjenosti i tjelesnu aktivnost (TA) prikazana težinskom UniFrac metrikom

4.2.1. Povezanost sastava crijevne mikrobiote i razine tjelesne aktivnosti ispitanika

Kod ispitanika svih stupnjeva uhranjenosti najzastupljeniji su bili predstavnici koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, inače najčešći predstavnici humane crijevne mikrobiote. U ukupnoj populaciji ispitanika zastupljenost koljena *Firmicutes* je bila $54,66 \pm 13,55$ % dok je zastupljenost koljena *Bacteroidetes* bila $33,42 \pm 14,40$ %. Promatrano po skupinama stupnja uhranjenosti najveći udio koljena *Firmicutes* prisutan je u pretiloj subpopulaciji ($57,67 \pm 14,45$) dok je najmanja zastupljenost tog koljena u pothranjenoj subpopulaciji ($50,00 \pm 11,07$). Najmanja zastupljenost koljena *Bacteroidetes* je u pretiloj populaciji ($28,26 \pm 14,32$), a najveća u pothranjenoj ($41,24 \pm 11,07$). Povećani udio koljena *Firmicutes* i smanjeni udio koljena *Bacteroidetes* jedan je opaženih promjena crijevne mikrobiote pretilih osoba (Ley i sur., 2005), što je potvrđeno i u ovom radu. Utjecaj razine tjelesne aktivnosti nije utjecao na opažene zastupljenosti koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* unutar pretilih i pothranjenih subpopulacija te je kod njih udio oba koljena relativno konstantan neovisno o stupnju tjelesne aktivnosti ispitanika. Kod subpopulacije adekvatnog stupnja uhranjenosti primijećena je negativna korelacija između stupnja tjelesne aktivnosti i zastupljenosti koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes*. Smanjenje zastupljenosti koljena *Firmicutes* povećavanjem tjelesne aktivnosti ispitanika adekvatnog stupnja uhranjenosti u skladu je s rezultatima dobivenim u pilot-studiji koju su proveli Valeriani i suradnici (2020), dok je u suprotnosti sa studijom Lambert i sur. (2013) (slika 18), a jednako je kod iste populacije uočeno i u zastupljenost koljena *Bacteroidetes* (slika 19). Zanimljivo je za promotriti kako pretila skupina ispitanika ima viši udio bakterija iz koljena *Firmicutes* u odnosu na *Bacteroidetes* u usporedbi s populacijskom skupinom adekvatne tjelesne mase, a da u skupini osoba adekvatne tjelesne mase upravo zastupljenost bakterija iz koljena *Firmicutes* smanjuje povećanjem količine tjelesne aktivnosti (slika 18), ali se jednako tako smanjuje i zastupljenost bakterijskih vrsta iz koljena *Bacteroidetes* (slika 19), dok je suprotno uočeno u ostalim populacijskim skupinama gdje se bilježi porast. Za zaključiti je da utjecaj razine tjelesne aktivnosti ispitanika na sastav crijevne mikrobiote daje kontradiktorne rezultate te da su potrebna daljnja istraživanja kako bi se utjecaj tjelesne aktivnosti mogao jasno povezati sa sastavom crijevne mikrobiote.



Slika 18. Prikaz linearne povezanosti udjela bakterijskih vrsta iz koljena *Firmicutes* u odnosu na uobičajenu tjelesnu aktivnost ispitanika (s obzirom na stupanj uhranjenosti) izraženu kao MET (min tjedan⁻¹)



Slika 19. Prikaz linearne povezanosti udjela bakterijskih vrsta iz koljena *Bacteroidetes* u odnosu na uobičajenu tjelesnu aktivnost ispitanika (s obzirom na stupanj uhranjenosti) izraženu kao MET (min tjedan⁻¹)

5. ZAKLJUČCI

Na temelju prikupljenih i obrađenih podataka u ovom istraživanju, može se zaključiti sljedeće:

1. S obzirom na tjelesnu aktivnost procijenjenu GPAQ upitnikom može se zaključiti da nije utvrđena razlika između ispitanika, a uzimajući u obzir spol te stupanj uhranjenosti.
2. Očekivano je utvrđena razlika u promatranim antropometrijskim veličinama s obzirom na indeks tjelesne mase, ali nije utvrđena razlika u istim parametrima s obzirom na stupanj tjelesne aktivnosti koji su ispitanici provodili
3. Promatrani biokemijski parametri nisu se značajno razlikovali s obzirom na stupanj uhranjenosti i razinu provođenja tjelesne aktivnosti no može se uočiti povećani arterijski krvni tlak kod pretilih, kao i kod osoba koje provode manje od 2,5 h na tjedan tjelesne aktivnosti, jednaki trend uočava se i za koncentracije glukoze u krvi.
4. Prema dijetetičkim parametrima (ukupan unos energije, ugljikohidrata, proteina, masti i vlakana) dobivenim iz trodnevnog dnevnika prehrane nije utvrđena značajna razlika između promatranih skupina.
5. S obzirom na alfa- i beta- raznolikost nije utvrđeno grupiranje uzoraka koje koreliraju s obzirom na stupanj uhranjenosti, odnosno tjelesnu aktivnost ispitanika uključenih u istraživanje, odnosno zbog malog broja ispitanika u skupini niske tjelesne aktivnosti ne može se tvrditi da su bakterije identificirane u toj skupini različitiije, nego u druge dvije skupine na što impliciraju dobiveni rezultati.
6. Povezujući tjelesnu aktivnost i sastav mikrobiote ne može se donijeti konzistentan zaključak, no može se primijetiti trend smanjenja udjela *Firmicutes* i *Bacteroidetes* u skupini ispitanika adekvatne tjelesne mase s povećanjem tjelesne aktivnosti, dok je obrnuti trend zabilježen u skupinama ispitanika s povećanom tjelesnom masom i pretilošću te pothranjene skupine ispitanika.

Potrebna su daljnja istraživanja koja će uključivati već broj ispitanika iz svih skupina različitih stupnjeva uhranjenosti, kao i s različitim intenzitetima provođenja tjelesne aktivnosti kako bi se mogla utvrditi utjecaj tjelesne aktivnosti (s i bez kombinacije utjecaja stupnja uhranjenosti) na sastav crijevne mikrobiote zdrave populacije.

6. LITERATURA

Adak, A., Khan, M. R. (2019) An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell Mol Life Sci.* **76**(3), 473-493.

Antal, I., Jelić, M., Sila, S., Kolaček, S., Tambić Andrašević, A. (2019) Ljudska mikrobiota i mikrobiom. *Acta Med Croatica.* **73**(1), 3-11.

Armstrong, T., Bull, F. C. (2006) Development of the World Health Organization Global Physical Activity Questionnaire (GPAQ). *J Public Health.* **14**, 66–70.

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Tims, S. (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* **473**(7346), 174-80.

Aurora, R., Sanford, T. (2015) Host Microbiota Contributes to Health and Response to Disease. *Mo Med.* **112**(4), 317-322.

Babić, Z. (2018) Tjelesna aktivnost u borbi protiv pretilosti. *Medicus,* **27**, 87-94.

Bibbò, S., Ianiro, G., Giorgio, V., Scaldaferri, F., Masucci, L., Gasbarrini, A., Cammarota, G. (2016) The role of diet on gut microbiota composition. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* **20**(22), 4742–4749.

Bokan, M., Hauser, G. (2018) Debljina i mikrobiota. *Medicus.* **27**(1), 21-27.

Brooks, A. W., Priya, S., Blekhman, R., Bordenstein, S. R. (2018) Gut microbiota diversity across ethnicities in the United States. *PLos Biol.* **16**(12):e2006842. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006842>

Bull, F. C., Maslin, T. S., Armstrong, T. (2009) Global physical activity questionnaire (GPAQ): nine country reliability and validity study. *J Phys Act Health.* **6**, 790-804.

Cani, P. D., Moens de Hase, E., Van Hul, M. (2021) Gut Microbiota and Host Metabolism: From Proof of Concept to Therapeutic Intervention. *Microorganisms,* **9**(6),1302. doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061302>

- Caspersen, C. J., Powell, K. E., Christenson, G. M. (1985) Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep.* **100**(2), 126–131.
- Claesson, M., Jeffery, I., Conde, S., Power, S., O'Connor, E., Cusack, S., O'Toole, P. (2012) Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature.* **488**(7410), 178-184.
- Clarke, S. F., Murphy, E. F., O'Sullivan, O., Lucey, A. J., Humphreys, M., Hogan, A., Hayes, P., O'Reilly, M., Jeffery, I. B., Wood-Martin, R., Kerins, D. M., Quigley, E., Ross, R. P., O'Toole, P. W., Molloy, M. G., Falvey, E., Shanahan, F., Cotter, P. D. (2014) Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut.* **63**(12), 1913–1920.
- Cleland, C. L., Hunter, R. F., Kee, F., Cupples, M. E., Sallis, J. F., Tully, M. A. (2014) Validity of the Global Physical Activity Questionnaire (GPAQ) in assessing levels and change in moderate-vigorous physical activity and sedentary behaviour. *BMC Public Health.* **14**, 1255.
- Collado, M., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, E., Salminen, S. (2016) Human gut colonisation may be initiated *in utero* by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci Rep.* **6**, 23129.
- Conlon, M. A., Bird, A. R. (2015) The Impact of Diet and Lifestyle on Gut Microbiota and Human Health. *Nutrients.* **7**(1), 17-44.
- Coolinarika (2020) Recepti, <<http://www.coolinarika.com/recepti/>>. Pristupljeno 01. – 25.prosinca 2020.
- Cresci, G. A., Bawden, E. (2015) The Gut Microbiome: What We Do and Don't Know. *Nutr Clin Pract.* **30**(6), 734-746.
- de Clercq, N. C., Groen, A. K., Romijn, J. A., Nieuwdorp, M. (2016) Gut Microbiota in Obesity and Undernutrition. *Adv Nutr.* **7**(6), 1080-1089.
- DeGruttola, A., Low, D., Mizoguchi, A., Mizoguchi, E. (2016) Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models. *Inflamm Bowel Dis.* **22**(5), 1137-1150.

DiBaise, J. K., Zhang, H., Crowell, M. D., Krajmalnik-Brown, R., Decker, A., Rittmann, B. E. (2008) Gut Microbiota and Its Possible Relationship With Obesity. *Mayo Clin Proc.* **83**(4), 460-469.

Donaldson, G. P., Lee, S., Mazmanian, S. K. (2016) Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol.* **14**(1), 20-32.

Edwards, C., Parrett, A. (2002) Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *Br J Nutr* **88**(S1), S11-S18.

Gallè, F., Valeriani, F., Cattaruzza, M. S., Ubaldi, F., Romano Spica, V., Liguori, G., WDPP, Working Group on Doping Prevention Project, GSMS-SItI, Working Group on Movement Sciences for Health, Italian Society of Hygiene, Preventive Medicine and Public Health (2019) Exploring the association between physical activity and gut microbiota composition: a review of current evidence. *Ann Ig.* **31**(6), 582–589.

Gomes, A. C., Hoffmann, C., Mota, J. F. (2018) The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. *Gut Microbes.* **9**(4), 308–325.

Gonzalez, A., Clemente, J., Shade, A., Metcalf, J., Song, S., Prithiviraj, B., Knight, R. (2011) Our microbial selves: what ecology can teach us. *EMBO Rep.* **12**(8), 775-784.

Gordon, J., Dewey, K., Mills, D., Medzhitov, R. (2012) The Human Gut Microbiota and Undernutrition. *Sci Transl Med.* **4**(137), 137ps12.

Greblo Jurakić, Z., Jurakić, D. (2019) Motivi za sudjelovanje u tjelesnoj aktivnosti odraslih osoba u Hrvatskoj: populacijsko presječno istraživanje. *Medicus.* **28**(2 Tjelesna aktivnost), 135-141.

Guthold, R., Louazani, S. A., Riley, L. M. (2011) Physical activity in 22 African countries: results from the World Health Organization STEPwise approach to chronic disease risk factor surveillance. *Am J Prev Med.* **41**, 52–60.

Hagströmer, M., Oja, P., Sjöström, M. (2007) Physical activity and inactivity in an adult population assessed by accelerometry. *Med Sci Sports Exerc.* **39**(9), 1502–1508.

Hamrik, Z., Sigmundova, D., Kalman, M., Pavelka, J. Sigmund, E. (2014) Physical activity and sedentary behaviour in Czech adults: Results from the GPAQ study. *Eur J Sport Sci*, **14**(2), 193–198.

Hollister, E. B., Gao, C., Versalovic, J. (2014) Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology*, **146**(6), 1449–1458.

Hrvatska enciklopedija (2017) <<http://www.enciklopedija.hr/impresum.aspx>> Pristupljeno 15. svibnja 2021.

Hrvatski zavod za javno zdravstvo HZJZ (2018) Živjeti zdravo: tjelesna aktivnost. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo [online] < <https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/06/Brosura-SREDNJA-SKOLA.pdf>>. Pristupljeno 28. svibnja 2021.

Huurre, A., Kalliomäki, M., Rautava, S., Rinne, M., Salminen, S., Isolauri, E. (2008) Mode of delivery - effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology*. **93**(4), 236–240.

Iebba, V., Totino, V., Gagliardi, A., Santangelo, F., Cacciotti, F., Trancassini, M., Mancini, C., Cicerone, C., Corazziari, E., Pantanella, F., Schippa, S. (2016) Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. *New Microbiol.* **39**(1), 1–12.

Illiano, P., Brambilla, R., Parolini, C. (2020) The mutual interplay of gut microbiota, diet and human disease. *FEBS J.* **287**(5), 833–855.

Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Nageshwar Reddy, D. (2015) Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol.* **21**(29), 8787–8803.

John, G., Mullin, G. (2016) The Gut Microbiome and Obesity. *Curr Oncol Rep.* **18**(7), 45.

Kriss, M., Hazleton, K. Z., Nusbacher, N. M., Martin, C. G., Lozupone, C. A. (2018) Low diversity gut microbiota dysbiosis: drivers, functional implications and recovery. *Curr Opin Microbiol.* **44**, 34–40.

Kyu, H. H., Bachman, V. F., Alexander, L. T., Mumford, J. E., Afshin, A., Estep, K., Veerman, J. L., Delwiche, K., Iannarone, M. L., Moyer, M. L., Cercy, K., Vos, T., Murray, C. J.,

Forouzanfar, M. H. (2016) Physical activity and risk of breast cancer, colon cancer, diabetes, ischemic heart disease, and ischemic stroke events: systematic review and dose-response meta-analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *BMJ*. **354**, i3857.

Lambert, J. A., Kalra, A., Dodge, C. T., John, S., Sobel, J. D., Akins, R. A. (2013) Novel PCR-based methods enhance characterization of vaginal microbiota in a bacterial vaginosis patient before and after treatment. *App Environ Microbiol*. **79(13)**, 4181–4185.

Lavie, C. J., Milani, R. V., Ventura, H. O. (2009) Obesity and Cardiovascular Disease: Risk Factor, Paradox and Impact of Weight Loss. *J. Am. Coll. Cardiol*. **53(1)**, 1925-1932.

Lee, R. D., Nieman, D. C. (2013) Nutritional Assessment, 6. izd., McGraw-Hill, New York.

Lederberg, J., McCray, A. T. (2001) ‘Ome sweet ‘omics - a genealogical treasury of words. *Scientist*. **15(7)**, 8.

Leite Rissardi, G. G, Cipullo, J. P., Cipullo Moreira, G., Souza Ciorlia, L. A., Bernardi Cesarino, C., Tadeu Giollo Junior, T., Zanesco, A., Vilela-Martin, J. F. (2018) Prevalence of Physical Inactivity and its Effects on Blood Pressure and Metabolic Parameters in a Brazilian Urban Population. *Int. J. Cardiovasc. Sci*. **31(6)**, doi:<https://doi.org/10.5935/2359-4802.20180064>

Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., Gordon, J. I. (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102(31)**, 11070-5. doi: 10.1073/pnas.0504978102.

Li Y. (2014) Human Microbiota and Its Function. *Infectious Microecology*. [online] https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-43883-1_2. Pristupljeno 17. svibnja 2021.

Lutgendorff, F., Akkermans, L. M., Söderholm, J. D. (2008) The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastro-intestinal damage. *Curr Mol Med*. **8(4)**, 282–298.

Maleta, K. (2006) Undernutrition. *Malawi Med J*. **18(4)**, 189-205.

Marchesi, J. R., Ravel, J. (2015) The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*. **3**, 31.

- Matsumoto, M., Inoue, R., Tsukahara, T., Ushida, K., Chiji, H., Matsubara, N., Hara, H. (2008) Voluntary running exercise alters microbiota composition and increases n-butyrate concentration in the rat cecum. *Biosci Biotechnol Biochem.* **72**(2), 572–576.
- Medina, C., Janssen, I., Barquera, S., Bautista-Arredondo, S., González, M. E., González, C. (2018) Occupational and leisure time physical inactivity and the risk of type II diabetes and hypertension among Mexican adults: A prospective cohort study. *Sci Rep* **8**, 5399.
- Mihaljević, S., Reiner, K., Čačić, M. (2018) Pretilost i anestezija. *Medicus.* **27**(1), 77-79.
- Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turroni, F., Mahony, J., Belzer, C., Delgado Palacio, S., Arboleya Montes, S., Mancabelli, L., Lugli, G. A., Rodriguez, J. M., Bode, L., de Vos, W., Gueimonde, M., Margolles, A., van Sinderen, D., Ventura, M. (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), e00036-17.
- Moreno-Indias, I., Cardona, F., Tinahones, F. J., Queipo-Ortuño, M. I. (2014) Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Front. Microbiol.* **5**:190.
- Mörkl, S., Lackner, S., Müller, W., Gorkiewicz, G., Kashofer, K., Oberascher, A., Painold, A., Holl, A., Holzer, P., Meinitzer, A., Mangge, H., Holasek, S. (2017) Gut microbiota and body composition in anorexia nervosa inpatients in comparison to athletes, overweight, obese, and normal weight controls. *Int J Eat Disord.* **50**(12), 1421–1431.
- Musić Milanović, S., Bukal, D. (2018) Epidemiologija debljine - javnozdravstveni problem. *Medicus.* **27**(1), 7-13.
- Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., Pettersson, S. (2012) Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science.* **336**(6086), 1262–1267.
- Perić, M., Čipčić Paljetak, H., Matijašić, M., Verbanac, D. (2011) Debljina, mikrobiote i imunomodulacija. *Infektološki glasnik.* **31**(1), 49-58.

Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H. G., Tims, S., Zoetendal, E. G., de Vos, W. M. (2012) Long-term monitoring of the human intestinal microbiota composition. *Environ Microbiol.* 10.1111/1462-2920.12023.

Ramakrishna, B. S. (2013) Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism. *Gastroentero Hepatol.* **28**(S4), 9–17.

Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G., Gasbarrini, A., Mele, M. C. (2019) What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms.* **7**(1), 14.

Rodríguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R. P., Kober, O. I., Juge, N., Avershina, E., Rudi, K., Narbad, A., Jenmalm, M. C., Marchesi, J. R., Collado, M. C. (2015) The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis.* **26**, 26050.

Sartor, R. B. (2008) Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* **134**(2), 577–594.

Schwiertz, A. (2016) Microbiota of the Human Body: Implications in Health and Disease. Preface. *Adv Exp Med Biol.* **902**.

Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., Finlay, B. B. (2010) Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews.* **90**(3), 859-904.

Sender, R., Fuchs, S., Milo, R. (2016) Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* **14**(8): e1002533.

Shahar, R. T., Koren, O., Matarasso, S., Shochat, T., Magzal, F., Agmon, M. (2020) Attributes of Physical Activity and Gut Microbiome in Adults: A Systematic Review. *Int J Sports Med.* **41**(12), 801-814.

Shin, N. R., Whon, T. W., Bae, J. W. (2015) Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.* **33**(9), 496–503.

Singh, R. K., Chang, H. W., Yan, D., Lee, K. M., Ucmak, D., Wong, K., Abrouk, M., Farahnik, B., Nakamura, M., Zhu, T. H., Bhutani, T., Liao, W. (2017) Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J. Transl. Med.* **15**, 73.

Smith, M. I., Yatsunenko, T., Manary, M. J., Trehan, I., Mkakosya, R., Cheng, J., Kau, A. L., Rich, S. S., Concannon, P., Mychaleckyj, J. C., Liu, J., Houpt, E., Li, J. V., Holmes, E., Nicholson, J., Knights, D., Ursell, L. K., Knight, R., Gordon, J. I. (2013) Gut microbiomes of Malawian twin pairs discordant for kwashiorkor. *Science*. **339**(6119), 548–554.

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.

Stecher, B. (2015) The Roles of Inflammation, Nutrient Availability and the Commensal Microbiota in Enteric Pathogen Infection. *Microbiol Spect.* **3**(3), 10.1128/microbiolspec.MBP-0008-2014.

Strandwitz, P. (2018) Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Res.* **1693**(Pt B), 128-133.

Sweeney, T. E., Morton, J. M. (2013) The human gut microbiome: a review of the effect of obesity and surgically induced weight loss. *JAMA Surg.* **148**(6), 563-569. doi.org/10.1001/jamasurg.2013.5

Štalić, Z., Jirka Alebić, I. (2008) Dijetetičke metode i planiranje prehrane. *Medicus* **17**(1), 27-36.

Štalić, Z., Sorić, M., Mišigoj-Duraković, M. (2016) Sportska prehrana. Znanje, Zagreb.

Šušković, J., Kos, B. (2017) *Crijevna mikroflora, prehrana i zdravlje: Mikrobná ekologija gastrointestinalnog trakta*. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Teh, C. H., Chan, Y. Y., Lim, K. H., Kee, C. C., Lim, K. K., Yeo, P. S., Azahadi, O., Fadhli, Y., Tahir, A., Lee, H. L., Nazni, W. A. (2015) Association of physical activity with blood pressure and blood glucose among Malaysian adults: a population-based study. *BMC Public Health* **15**, 1205.

Thursby, E., Juge, N. (2017) Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J.* **474**(11), 1823-1836.

Tomova, A., Bukovsky, I., Rembert, E., Yonas, W., Alwarith, J., Barnard, N. D., Kahleova, H. (2019) The Effects of Vegetarian and Vegan Diets on Gut Microbiota. *Front Nutr.* **6**, 47.

Valeriani, F., Gallè, F., Cattaruzza, M. S., Antinozzi, M., Gianfranceschi, G., Postiglione, N., Romano Spica, V., Liguori, G. (2020) Are nutrition and physical activity associated with gut microbiota? A pilot study on a sample of healthy young adults. *Ann Ig.* **32**(5), 521–527.

Veer, B., Ghanekar, J., Dasila, P. (2018) Are We Physically Active? Assessment Using Global Physical Activity Questionnaire (GPAQ). *IJHSR.* **8**(4), 137-142.

WHO (2020) Obesity. WHO - World Health Organization. <https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1>. Pristupljeno 1. prosinca 2020.

Watkinson, C. , van Sluijs, E. M. F., Sutton, S., Hardeman, W., Corder, K., Griffin, S. J. (2010) Overestimation of physical activity level is associated with lower BMI: a cross-sectional analysis. *IJBNPA* **7**, 68-76.

Whisner, C. M., Maldonado, J., Dente, B. Krajmalnik-Brown, R., Bruening, M. (2018) Diet, physical activity and screen time but not body mass index are associated with the gut microbiome of a diverse cohort of college students living in university housing: a cross-sectional study. *BMC Microbiol.* **18**(10).

Wiley, N. C., Dinan, T. G., Ross, R. P., Stanton, C., Clarke, G., Cryan, J. F. (2017). The microbiota-gut-brain axis as a key regulator of neural function and the stress response: Implications for human and animal health. *J Anim Sci.* **95**(7), 3225–3246.

Wolf, K. J., Lorenz, R. G. (2012) Gut Microbiota and Obesity. *Curr Obes Rep* **1**, 1-8.

Zakon o potvrđivanju Konvencije o zaštiti ljudskih prava i dostojanstva ljudskog bića u pogledu primjene biologije i medicine: Konvencije o ljudskim pravima i biomedicini (i o dva dodatna protokola...) (2003) Narodne novine 13, Zagreb.

Zakon o provedbi Opće uredbe o zaštiti podataka (2018) Narodne novine 42, Zagreb.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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.

Valentina Bačić