

Utjecaj prehrane, stupnja uhranjenosti i životnih navika na disbiozu crijevne mikrobiote

Grilec, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:159:247451>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-04**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, ožujak 2019.

Ivona Grilec

988/N

**UTJECAJ PREHRANE, STUPNJA
UHRANJENOSTI I ŽIVOTNIH
NAVIKA NA DISBIOZU
CRIJEVNE MIKROBIOTE**

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 dr. sc. Ivane Rumora Samarin, doc. 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.

Dodatno, zahvaljujem se svim djelatnicima Kabineta za bioinformatiku koji su dali doprinos u izradi ovog rada.

Zahvaljujem se i svojim prijateljima koji su bili uz mene, sa svojim savjetima i podrškom, ne samo tijekom izrade diplomskog rada, nego i tijekom čitavog studiranja.

Posebnu i najveću zahvalu dugujem svojim roditeljima, suprugu i cijeloj obitelji koji su mi pružali beskonačno razumijevanje, strpljenje i ljubav te me ohrabrivali i poticali da ustrajem na svom životnom putu.

Hvala vam!

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

UTJECAJ PREHRANE, STUPNJA UHRANJENOSI I ŽIVOTNIH NAVIKA NA DISBIOZU CRIJEVNE MIKROBIOTE

Ivona Grilec, 988/N

Sažetak: Crijevna mikrobiota je kompleksna zajednica mikroorganizama čiji je sastav u pojedinca promijenljiv tijekom vremena, ali zadržava zajedničke karakteristike. Pod utjecajem određenih čimbenika, od kojih se u posljednje vrijeme ističe prehrana, može doći do narušene ravnoteže u sastavu crijevne mikrobiote odnosno disbioze. Disbioza crijevne mikrobiote povezuje se s različitim bolestima poput pretilosti, upalnih bolesti crijeva, sindroma iritabilnog crijeva, karcinoma debelog crijeva, kardiovaskularnih bolesti, metaboličkog sindroma, anoreksije, alergije i astme. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi postoji li zajednička poveznica između prehrane, antropometrijskih i biokemijskih parametara te životnih navika i disbioze crijevne mikrobiote, odnosno povećane zastupljenosti reda *Enterobacteriales* koja je utvrđena kod ispitanika (n=3) prilikom istraživanja utjecaja stupnja uhranjenosti sa sastavom crijevne mikrobiote mlađe populacije. S obzirom na nekonzistentnost dobivenih rezultata, nije pronađena zajednička poveznica u unosu makronutrijenata i prehrambenih vlakana, antropometrijskim i biokemijskim parametrima te životnim navikama koja bi mogla dovesti do očitovane disbioze crijevne mikrobiote.

Ključne riječi: crijevna mikrobiota, disbioza, prehrana, indeks tjelesne mase

Rad sadrži: 65 stranica, 23 slika, 6 tablica, 124 literaturnih navoda, 0 priloga

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. Janko Diminić
4. prof. dr. sc. Ines Panjkota Krbavčić (zamjena)

Datum obrane: 26. ožujka 2019

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

THE EFFECT OF DIET, BODY MASS INDEX AND LIFESTYLE ON INTESTINAL MICROBIOTA DYSBIOSIS

Ivona Grilec, 988/N

Abstract: Intestinal microbiota is a complex microbial community whose composition in the individual can be changed over time, but retains common characteristics. The composition of intestinal microbiota can be disrupted under the influence of certain factors, of which diet is hypothesized as a major factor. Intestinal microbiota dysbiosis is associated with various diseases such as obesity, inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome, colon cancer, cardiovascular diseases, metabolic syndrome, anorexia, allergies and asthma. The aim of this study was to determine whether there is a common link between diet, anthropometric parameters, biochemical parameters, life habits and dysbiosis, respectively increased representation of *Enterobacteriales* order found in subjects (n=3) during studying the influence of body mass index on the intestinal microbiota composition in the younger population. Considering the inconsistency of the obtained results no common link was found in the macronutrient and dietary fiber intake, anthropometric and biochemical parameters and life habits that could lead to manifested intestinal microbiota dysbiosis.

Keywords: intestinal microbiota, dysbiosis, diet, body mass index

Thesis contains: 65 pages, 23 figures, 6 tables, 124 references, 0 supplements

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, Assistant professor*

Reviewers:

1. PhD. *Jurica Žučko*, Assistant professor
2. PhD. *Ivana Rumora Samarin*, Assistant professor
3. PhD. *Janko Diminić*, Assistant professor
4. PhD. *Ines Panjkota Krbavčić*, Full professor (substitute)

Thesis defended: 26th March 2019

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. CRIJEVNA MIKROBIOTA.....	2
2.1.1. Bioraznolikost crijevne mikrobiote	3
2.1.2. Čimbenici koji utječu na sastav crijevne mikrobiote i njihove promjene s obzirom na starosnu dob ..	5
2.2. DISBIOZA CRIJEVNE MIKROBIOTE.....	8
2.2.1. Pretilost.....	9
2.2.2. Upalne bolesti crijeva.....	11
2.2.3. Sindrom iritabilnog crijeva.....	12
2.2.4. Kardiovaskularne bolesti	12
2.2.5. Karcinom debelog crijeva.....	13
2.3. MOGUĆNOSTI MANIPULACIJE CRIJEVNOM MIKROBIOTOM	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. ISPITANICI.....	16
3.2. METODE RADA	17
3.2.1. Dijetetička metoda – Trodnevni dnevnik prehrane.....	19
3.2.2. Antropometrijske metode	20
3.2.3. Genomičke metode.....	21
3.2.3.1. <i>Izolacija i mjerenje koncentracije DNA</i>	21
3.2.3.2. <i>Sekvenciranje 16S rRNA gena</i>	22
3.2.3.3. <i>Obrada podataka sekvenciranja i analiza mikrobiote</i>	22
3.2.4. Statističke metode.....	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. REZULTATI OPĆIH, ANTROPOMETRIJSKIH I BIOKEMIJSKIH KARAKTERISTIKA ISPITANIKA	25
4.2. REZULTATI SEKVENCIRANJA CRIJEVNE MIKROBIOTE ISPITANIKA	32
4.3. REZULTATI DOBIVENI OBRADOM DIJETETIČKIH PODATAKA ISPITANIKA	40
5. ZAKLJUČCI	52
6. LITERATURA	53

1. UVOD

Crijevna mikrobiota kompleksna je zajednica velikog broja mikroorganizama, točnije 10^{14} , koji koloniziraju gastrointestinalni trakt, a obuhvaća bakterije, arheje, viruse i eukariote. Iako je pod utjecajem brojnih čimbenika, kod zdravih pojedinaca sastav crijevne mikrobiote je relativno stabilan. Pritom su u crijevnoj mikrobioti zdravih pojedinaca najzastupljenija bakterijska koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* (Singh i sur., 2017). U posljednje vrijeme, od brojnih čimbenika koji mogu utjecati na sastav crijevne mikrobiote, znanstvenici najvažnijim modulatorom smatraju prehranu jer se pokazalo da i kratkoročne promjene u prehrani mogu dovesti do promjene u sastavu i funkciji crijevne mikrobiote (Sheflin i sur., 2017).

Narušena ravnoteža crijevne mikrobiote, odnosno promijenjeni bakterijski sastav crijevne mikrobiote naziva se još i disbioza, a povezuje se s patogenezom mnogih bolesti i infekcija (Thursby i Juge, 2017). U literaturi se disbioza najčešće spominje kod pretilosti, a očituje se kroz povećanje zastupljenosti Gram - pozitivnih bakterija iz koljena *Firmicutes*, odnosno smanjenje zastupljenosti Gram – negativnih bakterija iz koljena *Bacteroidetes* (Willson i Situ, 2017). Osim toga, disbioza crijevne mikrobiote povezuje se i s drugim bolestima kao što su karcinom debelog crijeva, upalne bolesti crijeva, sindrom iritabilnog crijeva, kardiovaskularne bolesti, metabolički sindrom i dijabetes tip 2 te anoreksija (Carding i sur., 2015; Morita i sur., 2015). Disbioza crijevne mikrobiote često se povezuje s povećanjem zastupljenosti bakterija iz koljena *Proteobacteria* koje inače čine samo mali dio adekvatne, uravnotežene crijevne mikrobiote u pojedinaca (Shin i sur., 2015). S obzirom na to da je prehrana čimbenik na koji možemo utjecati i koji istovremeno utječe na sastav i raznolikost crijevne mikrobiote, znanstvenicima je cilj utvrditi prehrambeni obrazac koji će imati pozitivan učinak na manipulaciju crijevne mikrobiote odnosno dugoročno utjecati na prevenciju određenih bolesti.

U novije vrijeme, brojna istraživanja bave se razlikom između sastava crijevne mikrobiote s obzirom na stupanj uhranjenosti i prehranu. Glavni cilj projekta Istraživanje ravnoteže mikrobioma debelog crijeva (MicroEquilibrium) bio je utvrditi postoje li razlike u prehrani i crijevnoj mikrobioti s obzirom na stupanj uhranjenosti. S obzirom na to da je prilikom određivanja sastava crijevne mikrobiote uočena disbioza crijevne mikrobiote u tri ispitanika, odnosno povećana zastupljenost reda *Enterobacteriales*, cilj ovoga rada bio je utvrditi postoji li zajednička poveznica između uočene disbioze crijevne mikrobiote i prehrane, odnosno antropometrijskih i biokemijskih parametara te životnih navika.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. CRIJEVNA MIKROBIOTA

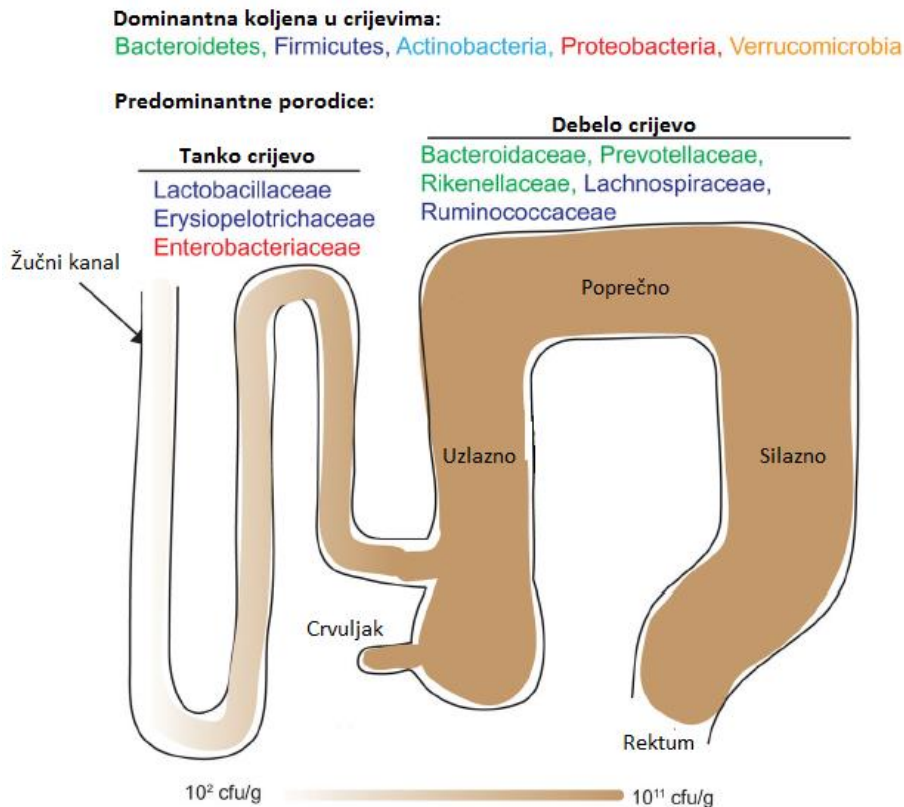
Mikrobiota je skup mikroorganizama koji uključuje bakterije, gljivice, viruse, eukariote i arheje koji žive na i u čovjeku (Walker i sur., 2017). Mikrobne zajednice tako obitavaju na koži, u ustima, u vaginalnom području te u crijevima i razlikuju se po količini i vrsti mikroorganizama (Lloyd-Price i sur., 2016), a najveći broj mikroorganizama u čovjeku – do 100 bilijuna, nalazi se u crijevima (Bäckhed i sur., 2005). Najzastupljenija bakterijska koljena (lat. phyla) u crijevnoj mikrobioti odraslog, zdravog čovjeka su *Firmicutes*, *Bacteroidetes* i *Actinobacteria*, dok su u manjem broju prisutne bakterije iz koljena *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Cyanobacteria* i *Verrucomicrobia* (Qin i sur., 2010; D'Argenio i Salvatore, 2015).

Kolonizacija gastrointestinalnog trakta mikroorganizmima, koja prema novim spoznajama započinje već *in utero* (Collado i sur., 2016), je važan proces u našem životnom ciklusu s obzirom da crijevna mikrobiota ima golemi utjecaj na zdravlje čovjeka (Rodríguez i sur., 2015). Tijekom prve tri godine života uspostavlja se crijevna mikrobiota koja u smislu sastava i raznolikosti nalikuje onoj u odrasloj dobi i relativno je stabilna (Hollister i sur., 2014), no pritom valja naglasiti da nismo u potpunosti jednaki jer svaki pojedinac posjeduje crijevnu mikrobiotu specifičnog sastava (Graf i sur., 2015).

Važnost crijevne mikrobiote očituje se kroz njene brojne funkcije. Do danas je otkriveno da crijevna mikrobiota sudjeluje u fermentaciji neprobavljivih sastojaka hrane poput netopljivih vlakana, proizvodnji kratkolančanih masnih kiselina, sintezi vitamina (osobito vitamina B₉, B₁₂ i vitamina K) i aminokiselina, metabolizmu prehrambenih toksina i karcinogenih tvari, pretvorbi kolesterola i žučnih kiselina te sazrijevanju imunološkog sustava (Gérard, 2016; Willson i Situ, 2017). Još jedna važna uloga crijevne mikrobiote jest zaštita od kolonizacije egzogenim patogenima, odnosno otpornost na kolonizaciju i zaštita od rasta autohtonih patobionata (Kamada i sur., 2013). Međutim, isto tako crijevna mikrobiota može imati ulogu u osiguravanju hranjivih tvari crijevnim patogenima ili ih dodatno aktivirati i na taj način pogoršati bolest (Rolhion i Chassaing, 2016).

2.1.1. Bioraznolikost crijevne mikrobiote

Crijevna mikrobiota je složeni i dinamični ekosustav koji se sastoji od otprilike 10^{14} bakterija i čini otprilike 1 kg ukupne tjelesne mase čovjeka (Gérard, 2016). Cijeli probavni trakt koloniziran je metabolički aktivnim mikroorganizmima, ali u različitim koncentracijama, ovisno o okolini u kojoj se mikroorganizmi nalaze (Willson i Situ, 2017). Sastav i koncentracija dominantnih koljena u donjem dijelu probavnog trakta prikazani su na slici 1.

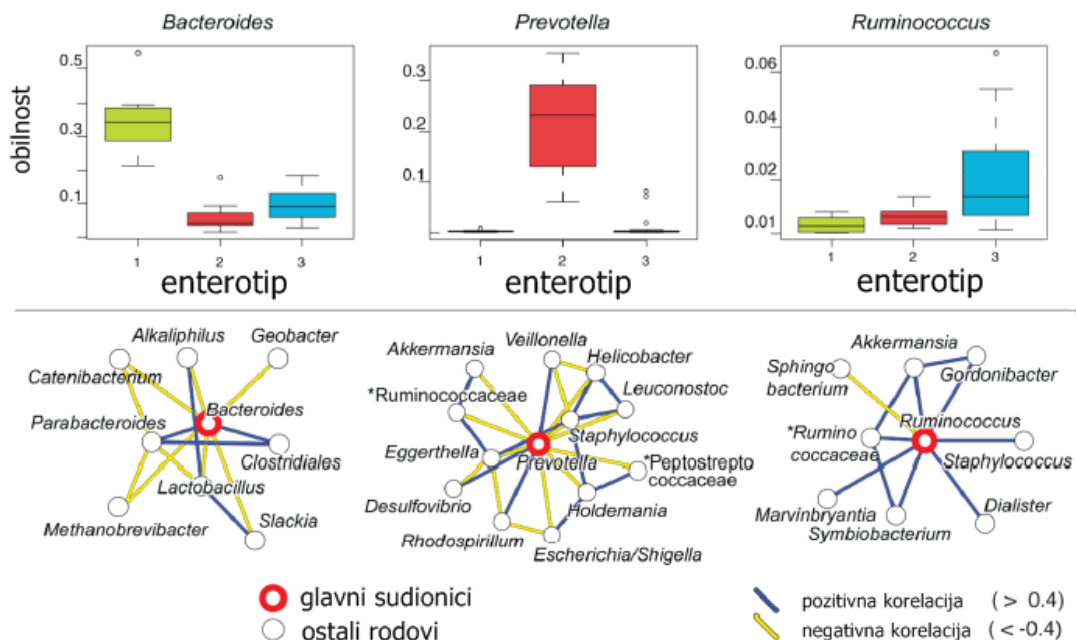


Slika 1. Dominantna koljena i koncentracije bakterija (cfug^{-1}) u donjem dijelu probavnog trakta (prema Donaldson i sur., 2016).

U odrasle, zdrave osobe crijevna mikrobiota se sastoji od šest ili sedam različitih bakterijskih koljena, od kojih dominiraju *Firmicutes* (Gram - pozitivne bakterije) i *Bacteroidetes* (Gram - negativne bakterije), dok su u značajno manjim koncentracijama prisutna koljena *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* (Eckburg i sur., 2005; Voreades i sur., 2014). Čimbenici koji utječu na prisutnost i koncentraciju određenih bakterija u probavnom traktu su pH koji se povećava od proksimalnog prema distalnom dijelu crijeva, koncentracija kisika koja se smanjuje od proksimalnog prema distalnom dijelu crijeva i dostupnost hranjivih tvari (Meijnikman i sur., 2018). Količina i raznolikost mikrobioloških vrsta povećavaju se longitudinalno od želuca do debelog crijeva pa je samim time u debelom

crijevu najgušća i metabolički aktivna zajednica (Rooks i Garrett, 2016). Tanko crijevo je obično mjesto visoke razine kiselina, kisika, antimikrobnih lijekova i kratkog vremena transporta što ograničava rast bakterija i preživljavaju samo brzo rastući, fakultativni anaerobi, dok je debelo crijevo mjesto gdje dominiraju anaerobi koji mogu iskoristiti složene ugljikohidrate koji nisu probavljeni u tankom crijevu (Donaldson i sur., 2016). U tankom crijevu prevladavaju *Lactobacillaceae*, a u debelom crijevu *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae* i *Rikenellaceae* (Gu i sur., 2013). U debelom crijevu su pored komenzalnih bakterija, u manjem broju (0,1 % ili manje) prisutne i patogene bakterije kao što su *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli* i *Bacteroides fragilis* (The Human Microbiome Project Consortium, 2012).

Arumugam i sur. (2011) predložili su podjelu ljudi u tri klastera, odnosno enterotipa (slika 2) s obzirom na dominantne rodove koji su prisutni u njihovoj crijevnoj mikrobioti, a neovisno o indeksu tjelesne mase, dobi, spolu i geografskom podrijetlu. U svakom klasteru pronađena je vrsta koja je bila dominantna (*Bacteroides*, *Prevotella*, odnosno *Ruminococcus*). Međutim, Xu i Knight (2015) ističu kako ovakav model ima slabu statističku podlogu i nije repliciran u kasnijim studijama.



Slika 2. Filogenetske razlike između 3 osnovna enterotipa (prema Arumugam i sur., 2011).

Važno je napomenuti da unatoč spomenutim sličnostima koje postoje u sastavu crijevne mikrobiote u zdravih, odraslih osoba, svaki pojedinac ima jedinstvenu crijevnu mikrobiotu čiji sastav ovisi o brojnim čimbenicima (Meijnikman i sur., 2018).

2.1.2. Čimbenici koji utječu na sastav crijevne mikrobiote i njihove promjene s obzirom na starosnu dob

Brojni čimbenici utječu na sastav crijevne mikrobiote tijekom cijelog životnog ciklusa čovjeka, pa između ostalog i dob (tablica 1).

Tablica 1. Sastav crijevne mikrobiote s obzirom na dob i čimbenici koji utječu na promjene (prilagođeno prema D'Argenio i Salvatore, 2015).

	Sastav crijevne mikrobiote na razini koljena (od najvećeg udjela prema najmanjem udjelu)	Čimbenici koji utječu na promjenu sastava crijevne mikrobiote
Djeca (do 3. godine)	<i>Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Prirodni porod ili carski rez - Gestacijska dob - Hospitalizacija - Majčino mlijeko ili adaptirane formule - Dob uvođenja krute hrane - Malnutricija - Antibiotici
Odrasli	<i>Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Prehrana - Hormonalni ciklus - Putovanje - Antibiotici i drugi lijekovi - Bolest
Starije osobe (> 70 godina)	<i>Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Promjene životnih navika - Promjene u prehrani - Povećana mogućnost za pojavu infekcija i inflamatornih bolesti - Korištenje većeg broja lijekova

Iako se prvobitno smatralo da je dijete sterilno prije rođenja, novija istraživanja pokazuju prisutnost oskudne crijevne mikrobiote već *in utero*. U posteljici i plodnoj vodi dominantna koljena su *Proteobacteria* (osobito rodovi *Enterobacter* i *Escherichia/Shigella*) i *Actinobacteria* (rod *Propionibacterium*). Ti isti rodovi su u manjim količinama prisutni i u mekoniju (prva stolica novorođenčeta), za razliku od roda *Staphylococcus* koji je u mekoniju prisutan u većem udjelu (Collado i sur., 2016).

Nakon rođenja, crijevna mikrobiota novorođenčeta se vrlo brzo mijenja, a čimbenici koji utječu na kolonizaciju mikroorganizama uključuju gestacijsku dob, način porođaja (prirodnim putem ili carskim rezom), prehranu (majčino mlijeko ili adaptirane formule) i upotrebu antibiotika (Rodríguez i sur., 2015). Crijevna mikrobiota novorođenčadi rođenih prirodnim putem sadrži bakterije iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium spp.* te više nalikuje sastavu vaginalne mikrobiote majke, dok novorođenčad rođena carskim rezom ima crijevnu mikrobiotu koja više nalikuje majčinoj kožnoj mikrobioti, a uključuje bakterije rodova *Propionibacterium* i *Staphylococcus* (Dominguez-Bello i sur., 2010). Drugi važan čimbenik koji određuje sastav crijevne mikrobiote je način hranjenja. Majčino mlijeko pozitivno utječe na sastav crijevne mikrobiote jer osim hranjivih tvari sadrži i antitijela te razne komenzalne bakterije. U usporedbi s novorođenčadi koja su hranjena adaptiranim formulama, novorođenčad hranjena majčinim mlijekom ima crijevnu mikrobiotu kojom dominiraju bakterije roda *Bifidobacterium*, a u manjoj količini prisutne su bakterije roda *Atopobium* (Xu i Knight, 2015). Smanjena raznolikost, viša koncentracija potencijalno patogenih bakterija i manje količine *Bifidobacterium* i *Bacteroides* karakteristike su crijevne mikrobiote u novorođenčadi koja je rođena prijevremeno u odnosu na one koji su rođeni u terminu (Barrett i sur., 2013). Također, upotreba antibiotika kod majke prije, tijekom ili nakon poroda narušava sastav crijevne mikrobiote (smanjena prisutnost rodova *Lactobacilli* i *Bifidobacteria*) te je povezana sa smanjenom bakterijskom raznolikošću (Mueller i sur., 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 života brojni čimbenici utječu na sastav crijevne mikrobiote (tablica 1), a najznačajniji od njih je prehrana koja može utjecati na sastav, bioraznolikost i bogatstvo crijevne mikrobiote (Jandhyala i sur., 2015).

Wu i sur. (2011) u svom istraživanju na zapadnjačkoj populaciji pokazali su da prehrana utječe na sastav crijevne mikrobiote. U ljudi koji su konzumirali prehranu bogatu ugljikohidratima, odnosno bogatu vlaknima prevladavale su bakterije roda *Prevotella*. S druge strane u ljudi koji

su bili isključivo na „zapadnjačkoj prehrani“, koja se sastoji od visokog udjela masti i proteina, prevladavale su bakterije roda *Bacteroides*. Istraživanje koje je provedeno na populacijama Afričke i Europske djece također je pokazalo statistički značajne razlike u sastavu crijevne mikrobiote s obzirom na prehranu. Afrička djeca, čija je prehrana bogata vlaknima, imala su povećani udio koljena *Bacteroidetes*, i to obilje bakterija iz roda *Prevotella* i *Xylanibacter* te smanjeni udio bakterija iz koljena *Firmicutes*, dok su djeca iz Europe, čija je prehrana siromašna vlaknima, imala veći udio bakterija iz koljena *Firmicutes*, a manji udio bakterija iz koljena *Bacteroidetes* (De Filippo i sur., 2010). Utjecaj prehrane bogate proteinima na crijevnu mikrobiotu nije još dovoljno istražen (Sheflin i sur., 2017), međutim istraživanje na pretilim muškarcima pokazalo je kako prehrana koja je bogata proteinima, a siromašna ugljikohidratima rezultira smanjenjem bakterija koje proizvode butirate iz skupine *Roseburia/Eubacterium rectale* i povećanjem masnih kiselina razgranatog lanca (izovalerat i izobutirat) (Russell i sur., 2011).

Kratkoročnu, ali i dugoročnu ravnotežu crijevne mikrobiote mogu narušiti i antibiotici, čije korištenje smanjuje raznolikost i bogatstvo mikroorganizama (Thursby i Juge, 2017). U preglednom radu Meijnikman i sur. (2018) ističu kako su istraživanja pokazala da oralna konzumacija antibiotika dovodi do porasta bakterija iz koljena *Firmicutes*, a da se porast istih povezuje s pojavom pretilosti i dijabetesa tip 2. Osim toga, antibiotici posebno pogoduju rastu bakterije *Clostridium difficile* koja proizvodi toksine i može uzrokovati dijareju (Salazar i sur., 2016). U starijih osoba, upotreba antibiotika dovodi do redukcije *Bifidobacterium* i *Faecalibacterium prausnitzii* (Kumar i sur., 2016).

Istraživanja koja su provedena na majkama i kćerima te blizancima potvrđuju da postoji sličnost u sastavu crijevne mikrobiote, no uloga genetike još je uvijek nejasna i smatra se da sastav crijevne mikrobiote prvenstveno određuju okolišni čimbenici (Lozupone i sur., 2012).

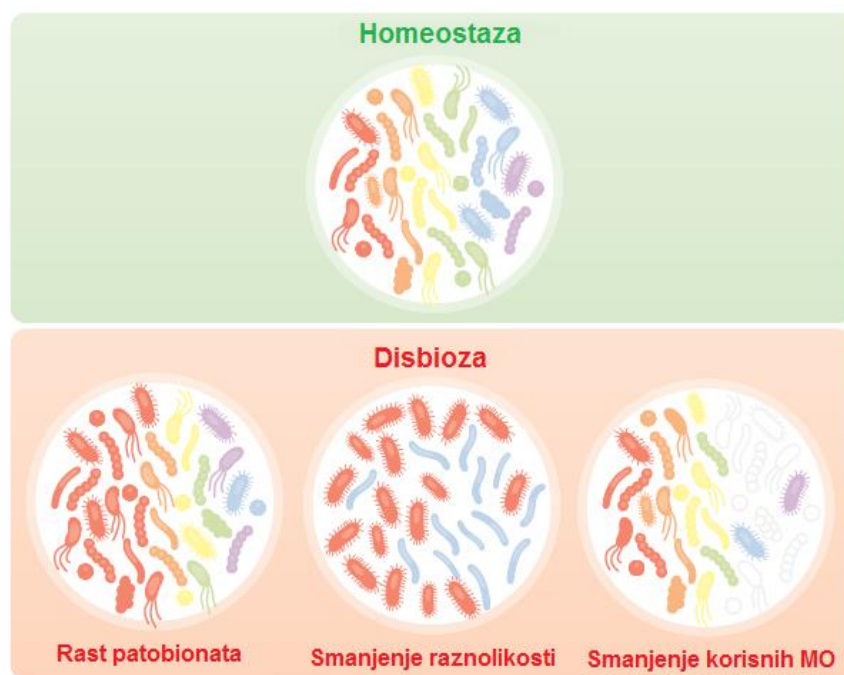
Još uvijek se ne zna puno o utjecaju tjelesne aktivnosti na sastav crijevne mikrobiote. U istraživanju koje su proveli Allen i sur. (2018) na mršavim i pretilim ispitanicama došlo je do promjena u sastavu crijevne mikrobiote i sadržaju kratkolančanih masnih kiselina tijekom vježbanja tri puta tjedno u vremenskom trajanju od šest tjedana. U pretilih ispitanica, pod utjecajem vježbanja, došlo je do povećanja *Bacteroides* i *Collinsella* te smanjenja *Faecalibacterium*. S druge strane u mršavih ispitanica došlo je do smanjenja *Bacteroides* i povećanja *Faecalibacterium* i *Lachnospira*. U mršavih ispitanica je također zapaženo povećanje koncentracije kratkolančanih masnih kiselina, dok u pretilih ispitanica nije došlo do promjena. Nakon što su se ispitanice vratile sjedilačkom načinu života, sastav crijevne

mikrobiote se vratio u onaj početni. Zaključeno je da treba provesti više istraživanja na ovu temu jer su rezultati nedosljedni i razlikuju se ovisno o frekvenciji, intenzitetu i trajanju tjelesne aktivnosti (Karl i sur., 2018).

S obzirom na promjene koje se događaju tijekom starenja (promjene životnih i prehrambenih navika, smanjenje mobilnosti, imunološke snage i intestinalne funkcije, promjene u morfologiji i fiziologiji gutanja, rekurentne infekcije, hospitalizacije i upotrebe lijekova) dolazi i do promjena u crijevnoj mikrobioti (Nagpal i sur., 2018). Crijevna mikrobiota u osoba starije životne dobi razlikuje se od one u odrasloj dobi, a karakterizira ju smanjenje raznolikosti, promjene dominantnih vrsta, smanjenje korisnih mikroorganizama, povećanje fakultativnih anaerobnih bakterija i smanjenje dostupnosti kratkolančanih masnih kiselina (Salazar i sur., 2014).

2.2. DISBIOZA CRIJEVNE MIKROBIOTE

Disbioza je pojam koji se odnosi na narušenu ravnotežu crijevne mikrobiote (Shin i sur., 2015), a povezuje se s patogeneozom mnogih upalnih bolesti i infekcija (Thursby i Juge, 2017). U novije vrijeme u literaturi se najčešće spominje disbioza crijevne mikrobiote kod pretilosti, koja se smatra upalnim stanjem zbog povezanosti s mnogim ključnim upalnim markerima (Cox i sur., 2015). Promjene crijevne mikrobiote osim s pretilošću mogu biti povezane i s upalnim bolestima crijeva, sindromom iritabilnog crijeva, karcinomom debelog crijeva, kardiovaskularnim bolestima, metaboličkim sindromom, alergijama i astmom, a mehanizmi koji dovode do razvoja navedenih bolesti uključuju uzajamni odnos crijevne mikrobiote, njenih metaboličkih produkata i imunološkog sustava domaćina (Carding i sur., 2015). Promjene koje se događaju u sastavu crijevne mikrobiote su smanjenje korisnih mikroorganizama (MO), rast patobionata odnosno potencijalno štetnih mikroorganizama i smanjenje mikrobiološke raznolikosti (slika 3). Te promjene nisu međusobno isključive, odnosno mogu se pojaviti i istovremeno (Petersen i Round, 2014).



Slika 3. Homeostaza i promjene tijekom disbioze crijevne mikrobiote (prilagođeno prema Petersen i Round, 2014).

Crijevni patogeni su dio bakterijskih porodica *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Yersinia spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*), *Vibrionaceae* (*Vibrio cholerae*) i *Campylobacteriaceae* (*Campylobacter spp.*) koje pripadaju koljenu *Proteobacteria* i predstavljaju samo manji dio normalne crijevne mikrobiote (bilo da se radi o komenzalnim bakterijama iz ovog koljena ili patogenima) (Stecher, 2015). Brojne studije potvrđuju da porast *Proteobacteria* u crijevima označava disbiozu ili nestabilnost mikrobne zajednice u crijevima (Shin i sur., 2015).

Znanstvenici ističu da postoji veza između crijevne mikrobiote i bolesti, no još uvijek je za većinu bolesti nejasno jesu li promjene u sastavu crijevne mikrobiote uzrok ili posljedica bolesti (Scott i sur., 2015).

2.2.1. Pretilost

Pretilost je jedna od vodećih javnozdravstvenih problema današnjice, a nastaje kao posljedica neravnoteže između energetske unosa i energetske potrošnje (Sandholt i sur., 2012). Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organization*, WHO) prekomjerna tjelesna masa i pretilost karakterizirane su prekomjernim nakupljanjem masnog tkiva koje predstavlja rizik za zdravlje, a definiraju se pomoću Indeksa tjelesne mase (ITM). Prekomjerna tjelesna masa, prema WHO, podrazumijeva ITM u rasponu od $25,0 \text{ kgm}^{-2}$ do $29,9 \text{ kgm}^{-2}$ dok

pretilost podrazumijeva ITM $> 30,0 \text{ kgm}^{-2}$ i može se dodatno podijeliti u tri stupnja. Pretilost prvog stupnja podrazumijeva ITM od $30,0 \text{ kgm}^{-2}$ do $34,9 \text{ kgm}^{-2}$, pretilost drugog stupnja podrazumijeva ITM od $35,0 \text{ kgm}^{-2}$ do $39,9 \text{ kgm}^{-2}$, a pretilost trećeg stupnja podrazumijeva ITM $> 40,0 \text{ kgm}^{-2}$ (WHO, 2018).

Crijevna mikrobiota pretilih pojedinaca razlikuje se po svom sastavu i raznolikosti od crijevne mikrobiote adekvatno uhranjenih pojedinaca (Le Chatelier i sur., 2013). Neke dosadašnje studije utvrdile su da se disbioza u pretilih miševa i ljudi očituje kroz promjene u omjeru dviju dominantnih koljena, odnosno povećanje koljena *Firmicutes* i smanjenje koljena *Bacteroidetes* (Willson i Situ, 2017). S druge strane, istraživanje Schwartz i sur. (2010) pokazalo je kontradiktorne rezultate u promjeni omjera *Firmicutes* i *Bacteroidetes* u osoba s prekomjernom tjelesnom masom i pretilošću, i to u korist koljena *Bacteroidetes* tako da su rezultati istraživanja na ovu temu još uvijek neujednačeni. Pretili osobe pokazuju i značajno smanjenje kratkolančanih masnih kiselina (engl. *Short-Chain Fatty Acids*, SCFA) u usporedbi s osobama adekvatne tjelesne mase što može biti posljedica promijenjenog sastava i povećane apsorpcije SCFA. Zapravo smatra se da smanjena razina SCFA doprinosi pretilosti jer SCFA inhibira akumulaciju masti u masnom tkivu (Tilg i Moschen, 2014; DeGruttola i sur., 2016).

Turnbaugh i sur. (2006) u svom su istraživanju na miševima pokazali da kolonizacija „*germ free*“ (GF) miševa s obesogenom crijevnom mikrobiotom dovodi do povećanja ukupnog masnog tkiva u tijelu u usporedbi s GF miševima koji su kolonizirani adekvatnom mikrobiotom što ukazuje na činjenicu da obesogena crijevna mikrobiota ima veći kapacitet za skladištenje energije. Nadalje, GF miševi hranjeni prehranom bogatom ugljikohidratima i mastima imali su bolju osjetljivost na inzulin i toleranciju glukoze u usporedbi s konvencionalnim miševima koji su hranjeni istom prehranom što dovodi do zaključka da su GF miševi otporni na pretilost izazvanu „zapadnjačkom“ prehranom (Rabot i sur., 2010).

Ley i sur. (2006) proučavali su sastav crijevne mikrobiote pretilih osoba prije i nakon provođenja nisko - kalorijske prehrane. Pretili ispitanici imali su veći udio *Firmicutes* naprema *Bacteroidetes* u usporedbi s ispitanicima adekvatne tjelesne mase, međutim nakon 52 tjedna tijekom kojih su bili na prehrani s malim udjelom masti i ugljikohidrata uočene su promjene u sastavu dominantnih koljena i one su bile slične sastavu crijevne mikrobiote u adekvatno uhranjenih ispitanika. Ovakvi rezultati upućuju da gubitak tjelesne mase rezultira promjenama u sastavu crijevne mikrobiote (López-Cepero i Palacios, 2015).

2.2.2. Upalne bolesti crijeva

Kvalitativne i kvantitativne promjene u sastavu crijevne mikrobiote uočene su u bolesnika s upalnim bolestima crijeva. Osim promjena sastava crijevne mikrobiote u patogenezu upalnih bolesti crijeva uključena je i interakcija drugih čimbenika poput stresa, prehrane, genetike domaćina i imunološkog sustava (Strober i sur., 2007).

Upalne bolesti crijeva uključuju ulcerozni kolitis i Crohnovu bolest, kronične poremećaje nepoznatog uzroka (Martinez-Medina i sur., 2014). U pacijenata s upalnim bolestima crijeva uočena je manja stabilnost i raznolikost sastava crijevne mikrobiote u odnosu na zdrave pojedince. Promjene u sastavu crijevne mikrobiote obuhvaćaju smanjenje dominantnih komenzalnih bakterija iz koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* te značajno povećanje bakterija iz koljena *Proteobacteria* i *Actinobacteria* (Yang i Jobin, 2014).

Smanjenje bakterija iz koljena *Firmicutes*, osobito *Faecalibacterium prausnitzii* koja je jedna od glavnih proizvođača butirata u crijevu, karakteristika je disbioze u pacijenata s Crohnovom bolešću (Fujimoto i sur., 2013). Butirat je kratkolančana masna kiselina koja predstavlja važan izvor energije za epitelne stanice i važan je u zaštiti epitelne crijevne barijere od potencijalnih patogena. Osim smanjene proizvodnje butirata, neke su studije pokazale i povećanje broja sulfat reducirajućih bakterija i na taj način blokiraju korištenje butirata (Sokol i sur., 2008) i to se smatra jednim od potencijalnih mehanizama kojim disbioza sudjeluje u patogenezi upalnih bolesti crijeva jer time dolazi do smanjene ekspresije u epitelnim čvrstim vezama proteina i do povećane propusnosti epitelnih stanica kolona. Posljedica toga jest povećana bakterijska translokacija kroz crijevne epitelne stanice i laminu propriju (DeGruttola i sur., 2016).

Druga karakteristika disbioze jest povećanje *Enterobacteriaceae* i to *Escherichia coli*, odnosno na razini podvrste adherentno invazivne *Escherichia coli* (AIEC) kod pacijenata s Crohnovom bolešću (Baumgart i sur., 2007). U istraživanju na miševima koji nisu imali flagelinskog receptora TLR5 kolonizacija AIEC tijekom stjecanja mikrobiote dovela je do kroničnog kolitisa (Carvalho i sur., 2012). To upućuje da kolonizacija AIEC, a moguće i drugih patobionata, može isto tako biti jedan od mehanizama koji mijenja sastav crijevne mikrobiote na način da povećava proupalni potencijal i dovodi do kroničnih bolesti (Rolhion i Chassaing, 2016).

Jedno je sigurno, postoji poveznica između disbioze crijevne mikrobiote i upalnih bolesti crijeva, međutim još uvijek se ne zna je li disbioza sastava crijevne mikrobiote posljedica ili uzrok ovih bolesti (Martinez-Medina i sur., 2014).

2.2.3. Sindrom iritabilnog crijeva

Sindrom iritabilnog crijeva (engl. *Irritable bowel syndrome*, IBS) je funkcionalni poremećaj gastrointestinalnog sustava čiji su simptomi bolovi u trbuhu, nadutost i promjene u pražnjenju stolice u obliku zatvora, dijareje ili njihove kombinacije (Power i sur., 2014).

U ispitanika s IBS – predominantnom dijarejom uočeno je značajno povećanje nerazvrstanih *Enterobacteriaceae* i značajno smanjenje bakterija roda *Faecalibacterium* u odnosu na zdrave ispitanike, a osim toga pronađene su i neke vrste koje su u zdravih ispitanika bile ispod granice detekcije (Carroll i sur., 2012). Ringel i Ringel-Kulka (2015) ističu u svom radu da općenito većina pacijenata s IBS ima povećanu količinu *Firmicutes* i smanjenu količinu *Bacteroidetes* te povećanu količinu patogenih bakterija, a unutar koljena *Firmicutes*, količina pojedinih bakterija kao što su *Lactobacillus spp.* i *Bifidobacterium spp.* variraju kod ovih pacijenata.

Iako neka istraživanja pokazuju da postoje razlike u crijevnoj mikrobioti između pacijenata s IBS i zdravih ispitanika, potrebno je provesti još istraživanja na ovu temu i utvrditi je li disbioza u sastavu crijevne mikrobiote uzrok ili posljedica ove bolesti (Power i sur., 2014).

2.2.4. Kardiovaskularne bolesti

Kako s prethodno navedenim bolestima, disbioza crijevne mikrobiote povezuje se i s kardiovaskularnim bolestima. Predloženi mehanizam kojim bakterije crijevne mikrobiote utječu na pojavu ovih bolesti jest pretvorba prehrambenog kolina u trimetilamin-N-oksidi (TMAO) u jetri, a zatim u trimetilamin, koji onda djeluje kao proaterogeni spoj (Zhang i sur., 2015). Međutim, istraživanje Yin i sur. (2015) pokazalo je da kontrolna skupina ispitanika, s i bez ateroskleroznih plakova u karotidnim arterijama, nema značajnih razlika u crijevnoj mikrobioti te da imaju sličnu razinu TMAO. S druge strane, ispitanici s moždanim udarom i prolaznim ishemijskim napadom imali su smanjenu razinu TMAO te su imali više oportunističkih patogena kao što su *Enterobacter*, *Megasphaera*, *Oscillibacter* i *Desulfovibrio*, a manje komenzalnih rodova kao što su *Bacteroides*, *Prevotella* i *Faecalibacterium*.

U pacijenata s kroničnim zatajenjem srca uočena je povećana koncentracija adherentnih bakterija u odnosu na zdrave ispitanike što je slično kao kod pacijenata koji boluju od upalnih bolesti crijeva (Sandek i sur., 2007).

2.2.5. Karcinom debelog crijeva

Crijevna mikrobiota može pojačati ili ublažiti karcinogenezu, ali isto tako ne mora nužno utjecati na nju pa se stoga taj odnos smatra kompleksnim (Garrett, 2015). U mnogim istraživanjima se disbioza crijevne mikrobiote najčešće povezuje s karcinomom debelog crijeva.

Svjetski centar za istraživanje raka (engl. *World Cancer Research Fund International*, WCRF) naglašava da je karcinom debelog crijeva treća najčešća vrsta karcinoma u svijetu i drugi vodeći uzročnik smrtnosti od karcinoma, a neki od čimbenika koji povećavaju rizik njegove pojavnosti su nedovoljna konzumacija prehrambenih vlakana, konzumacija procesiranog mesa, konzumacija crvenog mesa, konzumacija alkohola, pretilost i nedovoljna tjelesna aktivnost (WCRF, 2018).

Brojne studije pokazale su da se promjene u bogatstvu, raznolikosti i stabilnosti crijevne mikrobiote, koje se odnose na disbiozu, često povezuju s karcinomom debelog crijeva, odnosno sa samom karcinogenezom (Yang i Jobin, 2014). Mikrobiota utječe na karcinogenezu kroz oslobađanje karcinogenih molekula (genotoksina) i kroz proizvodnju metabolita koji potiču rast tumora (Schwabe i Jobin, 2013).

Dosadašnja istraživanja utvrdila su da se disbioza kod karcinoma debelog crijeva očituje kroz smanjenje *Proteobacteria*, *Bifidobacteria* i *Prevotella* te smanjenu produkciju SCFA, dok se s druge strane povećava udio *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Enterobacteriaceae* i *Fusobacteria* (Schulz i sur., 2014; DeGruttola i sur., 2016). Nadalje, istraživanja su pokazala da su i dvije specifične bakterijske vrste, *Akkermansia muciniphila* i *Fusobacterium nucleatum*, koje su povezane s jakim upalnim odgovorima povećane u tkivima kod karcinoma debelog crijeva (Castellarin i sur., 2012; DeGruttola i sur., 2016).

Osim navedenih bakterija, smatra se da i neki sojevi *Escherichia coli*, koji proizvode kolibaktin, imaju ulogu u patogenezi ove bolesti što potvrđuje nekoliko istraživanja na miševima (Arthur i sur., 2012; Bonnet i sur., 2014; Cougnoux i sur., 2014; Yang i Jobin, 2014). Istraživanje Arthura i sur. (2012) pokazalo je da monokolonizacija s *E. coli* NC101 koja proizvodi kolibaktin dovodi do upale i potiče mucinozni adenokarcinom debelog crijeva u miševima koji su tretirani azoksimetanom i deficitarni interleukinom 10 (IL 10 (-/-)), dok je kolonizacija istih miševa s *Enterococcus faecalis* OG1RF dovela do upale, ali ne i karcinoma debelog crijeva što upućuje da kolibaktin ima ulogu u patogenezi ove bolesti.

2.3. MOGUĆNOSTI MANIPULACIJE CRIJEVNOM MIKROBIOTOM

U prethodnom poglavlju istaknuto je kako se sastav crijevne mikrobiote razlikuje u zdravlju i različitim bolestima, a u ovom će biti istaknuto nekoliko mogućnosti putem kojih možemo manipulirati crijevnom mikrobiotom i poboljšati ljudsko zdravlje, a to su probiotici, prebiotici te fekalna transplantacija (Scott i sur., 2015).

Probiotici se definiraju kao živi mikroorganizmi koji povoljno utječu na zdravlje domaćina, ako se konzumiraju u adekvatnim količinama (FAO/WHO, 2002). Povoljne učinke na domaćina ostvaruju kroz četiri moguća mehanizma i to kroz interferenciju s potencijalnim patogenima, poboljšanu funkciju epitelne barijere, imunomodulaciju te proizvodnju neurotransmitera (Sánchez i sur., 2017). Mnoga istraživanja pokazuju da specifični probiotički sojevi ili njihova kombinacija mogu biti korisni kod raznih bolesti i to izravnim učinkom probiotičke bakterije ili neizravnim koji uključuje interakciju probiotičke bakterije s crijevnom mikrobiotom (Scott i sur., 2015). Wang i sur. (2015) su u svom istraživanju na miševima koji su hranjeni visoko masnom prehranom pokazali da tri probiotička soja (*Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* i *Bifidobacterium animalis*), kada su uzimani pojedinačno, ometaju debljanje i značajno poboljšavaju homeostazu glukoza-inzulin. Probiotička bakterija, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 35624, koristi se za ublažavanje simptoma kod sindroma iritabilnog crijeva, a znanstvenici su nedavno identificirali genski skup koji kodira za sintezu egzopolisaharida, važnog za protuupalno djelovanje (Altmann i sur., 2016; Giron i Quigley, 2018). Rezultati istraživanja na zdravim pojedincima također su pokazali da uzimanje probiotičkih bakterija, *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 i *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 uzrokuju promjene u sastavu crijevne mikrobiote (Plaza-Díaz i sur., 2015).

Prebiotici su neprobavljivi polisaharidi koji stimuliraju rast bakterija odnosno služe kao hrana probioticima (Parekh i sur., 2015). Iako je najviše studija provedeno *in vitro* i na životinjama s upalnim bolestima crijeva, u jednoj studiji na 10 pacijenata koji su primali 15 g frukto-oligosaharida došlo je do povećanja mukoznih *Bifidobacteria* te smanjenja indeksa aktivnosti bolesti (Lindsay i sur., 2006; Guandalini i sur., 2015). Istraživanje Benjamin i sur. (2011) pokazalo je suprotne rezultate, odnosno da frukto-oligosaharidi ne povećavaju *Bifidobacteria* i *Faecalibacterium prausnitzii* u pacijenata s aktivnom Crohnovom bolešću jer nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu. U istraživanju iz 2009. godine provedenom na 44 pacijenata sa sindromom iritabilnog crijeva uočeno je da galakto-oligosaharidi, u primjeni od 3,5 g i 7 g, značajno povećavaju *Bifidobacteria* u uzorcima fekalnih

stanica, a osim toga niža doza rezultirala je značajnim poboljšanjem simptoma sindroma iritabilnog crijeva, dok je veća doza povećala nadutost (Silk i sur., 2009). Istraživanja o utjecaju prebiotika na sastav crijevne mikrobiote kod prekomjerne tjelesne mase i pretilosti pokazuju također različite rezultate, u nekim je istraživanjima došlo do smanjenja tjelesne mase, a u nekima nije zabilježen nikakav utjecaj, ističu Seganfredo i sur. (2017) u svom preglednom radu.

U novije doba počela se koristiti transplantacija fekalne mikrobiote kao metoda za postizanje “adekvatne“ crijevne mikrobiote. Transplantacija fekalne mikrobiote sastoji se od infuzije tekućeg filtrata stolice zdravog donora u crijevo primatelja, a s ciljem liječenja bolesti koje su povezane s promjenama u crijevnoj mikrobioti (Cammarota i sur., 2017). Dva najčešća stanja kod kojih se primjenjuje transplantacija fekalne mikrobiote su dijareja povezana s antibioticima i dijareja povezana s *Clostridium difficile* (Scott i sur., 2015). Nakon transplantacije fekalne mikrobiote u pacijenata s infekcijom *Clostridium difficile* dolazi do kompeticije za hranjive tvari, stvaranje nepovoljne sredine za rast *C. difficile*, proizvodnje antimikrobnih tvari koje inhibiraju njen rast, povećanja proizvodnje sekundarnih žučnih kiselina i obnove mikrobne raznolikosti. Također, dolazi do obnove *Firmicutes* i *Bacteroidetes* te smanjenja *Proteobacteria* (Shahinas i sur., 2012; Kelly i sur., 2015). Rezultati o uporabi transplantacije fekalne mikrobiote kod drugih bolesti poput metaboličkog sindroma, sindroma iritabilnog crijeva i ulceroznog kolitisa još su uvijek neujednačeni (Cammarota i sur., 2017). Transplantacija fekalne mikrobiote može biti sigurna i dobro podnošljiva, ali isto tako s obzirom na njenu kompleksnost može uzrokovati neke kratkotrajne simptome ili potencijalne dugoročne učinke. Kratkotrajni simptomi su ograničavajući i mogu se pojaviti kroz prva tri dana nakon transplantacije, a uključuju nelagodu u trbuhu, dijareju, zatvor, nadutost, povraćanje i povišenu temperaturu. S druge strane, malo je podataka o dugoročnim posljedicama koje mogu uključiti prijenos nepoznatih infektivnih agenasa koji će uzrokovati bolest nekoliko godina kasnije i indukciju kroničnih bolesti s obzirom na promjene uzrokovane u crijevnoj mikrobioti (Choi i Cho, 2016). Manipulacija crijevnom mikrobiotom pomoću probiotika, prebiotika i fekalne transplantacije jest potencijalni način za prevenciju i liječenje bolesti, no još uvijek je potrebno provesti mnogo dodatnih i dugotrajnijih istraživanja (Scott i sur., 2015).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

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

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

Glavni cilj istraživanja u ovom Projektu bio je utvrditi razlike u sastavu crijevne mikrobiote s obzirom na stupanj uhranjenosti.

3.1. ISPITANICI

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

Kriteriji za uključivanje ispitanika u istraživanje bili su:

- oba spola
- ITM < 20 kgm⁻², 20-22 kgm⁻²; > 27 kgm⁻²
- Dob od 18 do 35 godina
- zdravi ispitanici (bez poznatih kroničnih oboljenja).

S druge strane, kriterij za isključivanje ispitanika bio je uzimanje antibiotika tijekom posljednja tri mjeseca.

Ispitanici su se u istraživanje uključivali na dragovoljnoj osnovi i neposredno prije uključivanja svaki je ispitanik detaljno upoznat s ciljevima istraživanja i metodologijom koja će se koristiti, a nakon čega je potpisao informativni pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Također, svaki

ispitanik bio je upoznat sa činjenicom da u bilo kojem trenutku može odustati od daljnjeg sudjelovanja u istraživanju.

Ukupno je za sudjelovanje u Projektu bilo prijavljeno 136 ispitanika od kojih je 56 bilo prikladno s obzirom na ranije navedene kriterije za uključivanje, a 40 ispitanika se odazvalo na mjerenje i ispunilo sve potrebne upitnike. U istraživanju su sudjelovali ispitanici oba spola, 20 žena i 20 muškaraca. S obzirom na indeks tjelesne mase, u istraživanje se uključilo 13 pothranjenih ispitanika, 10 ispitanika adekvatne tjelesne mase i 17 ispitanika s prekomjernom tjelesnom masom ili pretilošću. Naknadno, po provedenoj genomičkoj analizi prikupljenih podataka o sastavu crijevne mikrobiote tri uzorka odstupala su od prosječnog sastava crijevne mikrobiote ispitivane populacije. Uočenoj disbiozi htjelo se dodatno potražiti uzrok među promatranim parametrima, osobito prehrambenim, te su spomenuta tri ispitanika uzeta u detaljniju obradu u tom smislu.

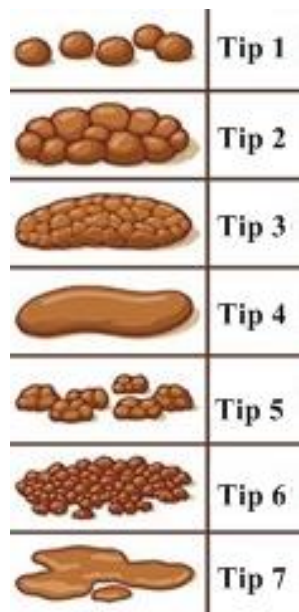
3.2. METODE RADA

U ovom istraživanju korištene metode bile su dijetetičke (trodnevni dnevnik prehrane), antropometrijske, genomičke i statističke. Podaci o zdravstvenom stanju ispitanika te životnim navikama (vrsta prehrane, broj obroka, uzimanje lijekova i dodataka prehrani, konzumacija alkohola, kave i cigareta, tjelesna aktivnost i dr.) prikupljeni su zdravstvenim kartonom i općim upitnikom, a od svakog ispitanika prikupljen je i uzorak stolice te su zamoljeni da pomoću Bristolske ljestvice stolice (engl. *Bristol stool scale*) procjene konzistenciju svoje stolice. Bristolska ljestvica stolice je skala od sedam tipova stolice koje se razlikuju s obzirom na veličinu i konzistenciju što ukazuje na stanje naše probave (slika 4).

Ispitanicima su iz uzoraka kapilarne krvi određeni kolesterol i glukoza uređajem *Accutrend® Plus System (Roche Diagnostic USA)* (slika 5) te im je izmjeren krvni tlak uređajem *OMRON M6 Comfort* (slika 6).

Dijetetičkom metodom (trodnevni dnevnik prehrane) prikupljali su se i analizirali podaci o ukupnom unosu energije te makro- i mikronutrijenata u ispitanika.

Sastav i veličina tijela utvrđeni su antropometrijskim metodama, a uzorci stolice korišteni su za izolaciju deoksiribonukleinske kiseline (engl. *Deoxyribonucleic acid, DNA*) te analizu mikrobioma ispitanika genomičkim metodama.



Slika 4. Bristolska ljestvica stolice (engl. *Bristol stool scale*) (prema Lewis i Heaton, 1997).



Slika 5. Uređaj za mjerenje glukoze i kolesterola iz kapilarne krvi *Accutrend® Plus System* (proizvođača *Roche Diagnostic SAD*).



Slika 6. Tlakomjer *OMRON M6 Comfort*.

3.2.1. Dijetetička metoda – Trodnevni dnevnik prehrane

Korištena dijetetička metoda u ovom istraživanju bila je trodnevni dnevnik prehrane, metoda bilježenja unosa hrane u sadašnjosti čije su glavne prednosti što daje detaljne informacije o konzumiranoj hrani i piću, ne oslanja se na pamćenje i pogodna je za procjenu uobičajenog unosa. S druge strane, metoda zahtijeva puno vremena i truda od strane ispitanika i istraživača što može dovesti do promjena u prehranbenim navikama (Štalić i Jirka Alebić, 2008).

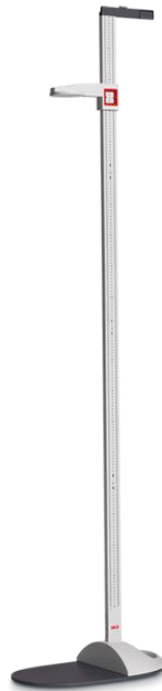
Ispitanici su dobili detaljne upute o vođenju dnevnika prehrane prilikom uključivanja u istraživanje, a trebali su ga voditi tijekom tri uzastopna dana, prije davanja uzoraka stolice i provođenja antropometrijskih mjerenja, kako bi se mogao povezati sastav crijevne mikrobiote s kakvoćom prehrane ispitanika. Količinu konzumirane hrane i pića određivali su vaganjem i/ili procjenom pomoću kuhinjskog posuđa (npr. žlica, čajna žličica, šalica, čaša, tanjur, zdjelica), a za zapakiranu hranu koristili su podatke navedene na deklaraciji. Za analizu složenih jela u dnevnicima korišteni su recepti ispitanika, osim u slučaju izostanka istih kada su kao zamjena korištene standardne recepture (Coolinarika, 2018).

Podaci prikupljeni dnevnicima prehrane obrađivani su pomoću hrvatskih nacionalnih prehranbenih tablica (Kaić-Rak, 1990), no zbog manjkavosti namirnica one su nadopunjavane pomoću podataka s deklaracija konzumiranih prehranbenih proizvoda.

3.2.2. Antropometrijske metode

Antropometrija je istraživačka metoda antropologije, a koristi se s ciljem utvrđivanja dimenzija ljudskog tijela i njihovog prosuđivanja (Hrvatska enciklopedija, 2017). Za potrebe ovog istraživanja 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).

Za mjerenje tjelesne visine korišten je *Seca 217 (Seca Ltd.)* (slika 7) visinomjer s preciznošću od 0,1 cm. Prilikom mjerenja su ispitanici stajali u uspravnom položaju, opušteni i bez obuće te su u četiri točke dodirivali mjernu skalu (tjeme, lopatice, stražnjica i pete). Prilikom mjerenja položaj glave je bio u Frankfurt horizontalnoj ravnini što znači da je zamišljena linija koja spaja donji rub lijeve orbite i tragus heliksa i lijevog uha bila u vodoravnom položaju u odnosu na podlogu (Lee i Nieman, 2013).



Slika 7. Visinomjer *Seca 217* (proizvođač *Seca Ltd.*, izvor: https://www.seca.com/en_bb/products/all-products/product-details/seca217.html).

Za mjerenje tjelesne mase korištena su dva analizatora sastava tijela (*OMRON BF-511* i *TANITA DC-430MA*) koji rade na principu bioelektrične impedancije (BIA) s preciznošću 0,1 kg. Ispitanici su za vrijeme mjerenja bili u laganoj odjeći i bez obuće. Analizatori sastava tijela koji rade na principu BIA podrazumijevaju propuštanje neosjetljive i za organizam ne štetne

struje jakosti najviše do 800 mA (Štalić i sur., 2016). Analizator *TANITA DC-430MA* (slika 8) podešen je prema stupnju tjelesne aktivnosti ispitanika, uz korekciju za odjeću (oduzeta masa u iznosu od 1 kg), a osim tjelesne mase ovim analizatorom prikupljeni su podaci o masi i postotku masnog tkiva, masi mišića i nemasnoj masi tijela, masi ukupne vode u tijelu, koštanoj masi, ITM i razini visceralnog tkiva.



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

Opseg struka, bokova, nadlaktice i zapešća izmjeren je savitljivom, ne elastičnom mjernom trakom s preciznošću od 0,1 cm. Pomoću dobivenih podataka naknadno je računski izračunat omjer opsega struka i bokova (WHR).

3.2.3. Genomičke metode

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 čuvani su u zamrzivaču na -80°C, a neposredno prije izolacije i

mjerenja koncentracije DNA na sobnoj temperaturi je otopljeno i homogenizirano 0,25 g uzoraka stolice prema uputama proizvođača kit-a za izolaciju DNA.

Koncentracija DNA određena je uređajem *BioSpec Nano-drop* spektrofotometrom (Shimadzu Biotech) prikazanom na slici 9.



Slika 9. *BioSpec Nano-drop* spektrofotometar (proizvođač Shimadzu Biotech, izvor: <https://www.ssi.shimadzu.com/sites/ssi.shimadzu.com/files/Products/literature/Spectroscopy/C101-E112D.pdf>).

3.2.3.2. *Sekvenciranje 16S rRNA gena*

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

3.2.3.3. *Obrada podataka sekvenciranja i analiza mikrobiote*

Sirovi podaci sekvenciranja fragmenta gena 16S rRNA su preuzeti u obliku Fastq datoteka s Illumina Basespace (<https://basespace.illumina.com>) platforme. Jedna preuzeta fastq datoteka

odgovara očitanim sljedovima nukleotida u prednjem (engl. forward) načinu čitanja, a druga u stražnjem načinu čitanja slijeda (engl. reverse). Datoteke su nakon preuzimanja učitane u programski paket QIIME 2 (<https://qiime2.org/>) te su prednji i stražnji slijed nukleotida spojeni u cjelovitu sekvencu. Nakon spajanja svi uzorci se nalaze u jednom dokumentu i potrebno je svaki slijed dodijeliti odgovarajućem uzorku na osnovu očitanoj slijeda nukleotida koji se nalazi na početku svake sekvence – tzv. barkoda. Iz daljnjih analiza su odbačene sekvence kojima prvih 8 nukleotida nije u potpunosti odgovaralo jednom od korištenih barkodova. Korišten je DADA 2 programski paket koji je optimiziran za ispravljanje grešaka sekvenciranja Illumina platformom za kontrolu kvalitete sekvenca. Sljedovi svakog uzorka klasterirani su 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, a za to je korišten mafft algoritam čime je određena taksonomska identifikacija svakog OTU-a. U FastTree programu izrađeno je filogenetsko stablo korištenjem aproksimirane metode najveće vjerojatnosti (engl. approximately-maximum-likelihood). UniFrac metrikom određena je različitost između svakog para uzoraka (bakterijskih zajednica). Uzorci koji imaju sličan sastav bakterijskih zajednica i koje su evolucijski bliske karakterizira mala UniFrac udaljenost. Dva tipa UniFrac metrike su u upotrebi – težinska i netežinska. Težinska UniFrac metrika u obzir uzima prisutnost i zastupljenost pojedine taksonomske jedinice pri izračunu udaljenosti zajednica, a s druge strane netežinska u obzir uzima samo prisutnost. ANCOM metoda, razvijena zbog kompozicijskih ograničenja koja predstavlja mikrobiota, je korištena za određivanje razlike u zastupljenosti pojedinih OTU-ova između uzoraka ili grupa uzoraka.

3.2.4. Statističke metode

Za statističku analizu i obradu podataka korišteni su paketi MS Excel (Microsoft, Seattle, WA, USA) te statistički program SPSS v.22 (SPSS Inc., Chicago, IL). Standardne metode deskriptivne statistike (aritmetička sredina, standardna devijacija, medijan) korištene su za opisivanje karakteristika ispitanika.

Normalnost distribucije ispitana je Shapiro-Wilk testom. Razlike u karakteristikama između skupina uspoređivane su nezavisnim ANOVA testom za parametrijske i Kruskal-Wallis testom za neparametrijske podatke. Za provedene testove utvrđena je razina značajnosti na razini $p < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu istraživane su prehrambene navike, stil života i zdravstveno stanje koji bi potencijalno mogli utjecati na pojavu disbioze crijevne mikrobiote, odnosno na prekomjernu kolonizaciju *Escherichia coli* u stolici triju ispitanika, koja je utvrđena tijekom ispitivanja sastava crijevne mikrobiote mlađe, naizgled zdrave populacije u kojoj je jedan od glavnih ciljeva bio utvrditi povezanost stupnja uhranjenosti sa sastavom crijevne mikrobiote. Tijekom istraživanja prikupljeni su genomički podaci dobiveni sekvenciranjem DNA iz prikupljenih uzoraka stolice ispitanika te opći, biokemijski, antropometrijski i dijetetički podaci. Provedena je usporedba navedenih parametara između ispitanika kod kojih je uočena disbioza i skupine ispitanika kojoj pripadaju s obzirom na stupanj uhranjenosti. Analizirajući dobivene rezultate traženi su mogući zajednički čimbenici za preveliku kolonizaciju *Escherichia coli* u promatranim ispitanicima u kojih je utvrđena disbioza. Također, provedena je statistička analiza biokemijskih, antropometrijskih i dijetetičkih parametara između skupina s obzirom na stupanj uhranjenosti. Prilikom usporedbe dobivenih rezultata s preporukama korištene su američke DRI (*Dietary Reference Intakes*) preporuke (IOM, 2001; IOM, 2002/2005; IOM, 2004; IOM, 2011). Dobiveni rezultati podijeljeni su u tri dijela i prikazani u ovom poglavlju rada u obliku pet tablica i 14 slika.

U prvom dijelu rezultata, tablicama od 2 do 4, prikazani su antropometrijski i biokemijski podaci ispitanika te životne navike i učestalost stolice.

Drugi dio rezultata odnosi se na genomičke podatke koji su dobiveni sekvenciranjem DNA iz prikupljenih uzoraka stolice, a prikazan je na slikama od 10 do 15.

Treći dio rezultata odnosi se na rezultate dobivene obradom dijetetičkih podataka koji su prikazani tablicama 5 i 6 te slikama od 16 do 23.

4.1. REZULTATI OPĆIH, ANTROPOMETRIJSKIH I BIOKEMIJSKIH KARAKTERISTIKA ISPITANIKA

Ukupan broj ispitanika koji su sudjelovali u istraživanju provedenom u sklopu Projekta bio je 40, a njihova prosječna dob bila je $27,75 \pm 0,66$ godina (tablica 2). Prilikom obrade rezultata genomičkog dijela istraživanja izdvojena su tri ispitanika, 307, 106 i 117 (što je 7,5 % ispitivane populacije), kod kojih je uočena disbioza crijevne mikrobiote, tj. povećana koncentracija reda *Enterobacteriales*, u odnosu na populaciju. Disbioza u navedenih ispitanika se u ovom radu nastojala povezati s prehrambenim i životnim navikama, te antropometrijskim i biokemijskim karakteristikama pomoću detaljnije analize prikupljenih podataka.

Ispitanici kod kojih je uočena disbioza ženskog su spola i različite dobi što je prikazano u tablici 2. Dva ispitanika pripadaju skupini pretilih (ispitanik 106 – ITM=32,86 kgm⁻²; ispitanik 117 – ITM=27,6 kgm⁻²), dok jedan pripada skupini pothranjenih ispitanika (ispitanik 307 – ITM=18,26 kgm⁻²). Samim time što se navedeni ispitanici nalaze u pothranjenoj odnosno pretiloj skupini, obzirom na stupanj uhranjenosti, izloženi su riziku od disbioze crijevne mikrobiote (Alou i sur., 2016; Willson i Situ, 2017).

Statistička analiza prikupljenih podataka o ispitanicima, podijeljenih u tri skupine prema njihovom stupnju uhranjenosti (adekvatno uhranjeni, pothranjeni i pretili ispitanici) pokazala je da se ispitanici između skupina nisu statistički značajno razlikovali po dobi ($p=0,131$), spolu ($p=0,077$) i tjelesnoj visini ($p=0,053$), dok se utvrdilo postojanje značajne razlike između skupina s obzirom na tjelesnu masu, opseg struka i bokova te WHR, što se i očekivalo s obzirom na različite stupnjeve uhranjenosti. Ispitaniku 106 izmjeren je opseg struka od 90 cm što s obzirom na spol ispitanika prema literaturi znači da ima visoki rizik za razvoj kroničnih oboljenja (WHO, 2011), a ispitaniku 117 izmjeren je opseg struka 86 cm što znači da ima povećani rizik za razvoj kroničnih oboljenja. Isto vrijedi za cijelu njihovu skupinu čija je prosječna vrijednost opsega struka $95,92 \pm 2,96$ cm. Žene adekvatne tjelesne mase koje imaju opseg struka <88 cm, odnosno muškarci s opsegom struka <102 cm nemaju rizik razvoja kroničnih oboljenja s obzirom na antropometrijske parametre (WHO, 2011). Ispitanik 307 nije u povećanom riziku za razvoj kroničnih oboljenja obzirom na opseg struka (64,6 cm).

Za mjerenje sastava tijela ispitanika korišten je TANITA analizator sastava tijela koji radi na principu bioelektrične impedancije. Obzirom da se nalaze unutar iste skupine po stupnju uhranjenosti, ispitanici 106 i 117 imaju sličnije antropometrijske parametre u usporedbi s antropometrijskim parametrima ispitanika 307, izuzev visine (tablica 2). Iz dobivenih rezultata

može se vidjeti da ispitanik 307 prema parametrima dobivenim mjerenjem analizatorom ne odskoče puno od prosjeka ispitanika pothranjene skupine. Najveće odstupanje ispitanika 307 od njegove skupine uočeno je u postotku masnog tkiva, kojeg ima 32,27 % više u odnosu na prosječnu vrijednost pothranjene skupine, odnosno 16,6 % ukupne tjelesne mase otpada na masno tkivo, što se s obzirom na dob i spol ispitanika smatra niskim udjelom masnog tkiva (<21 % je nisko) (Gallagher i sur., 2000). Ispitanici 106 i 117 prema ovim parametrima imaju nešto veća odstupanja od prosjeka svoje, pretile, skupine ispitanika. Najveće odstupanje ispitanika 106 bilo je također u postotku masnog tkiva (37,6 %), kojeg ima više u odnosu na prosječnu vrijednost pretile skupine ispitanika, iznosi 36,3 % ukupne tjelesne mase, što se s obzirom na dob i spol smatra prekomjernim udjelom masnog tkiva (prekomjernim se za žene smatra 34 - 39,9 %) (Gallagher i sur., 2000). Ispitanik 117 najveće odstupanje u odnosu na prosjek pretile skupine ima u razini visceralnog masnog tkiva, kojeg ima 42,36 % manje u odnosu na skupinu. Jednako tako, odstupa 33,43 % od svoje skupine s obzirom na postotak masnog tkiva kojeg ima više u odnosu na prosjek pretile skupine, tj. 35,2 % ukupne tjelesne mase otpada na masno tkivo što se također smatra prekomjernim (Gallagher i sur., 2000).

Promatrajući tjelesnu procjenu, prema TANITA analizatoru, ispitanik 307 je ocijenjen fizičkom procjenom kao mršav i mišićav (engl. *thin and muscular*) što znači da ima manje masnog tkiva u odnosu na preporuke i adekvatnu mišićnu masu. Ispitanik 106 je ocijenjen fizičkom procjenom kao jako građen (engl. *solidly built*) što znači da ima istovremeno visok postotak masnog tkiva i visoku mišićnu masu, a ispitanik 117 je ocijenjen fizičkom procjenom kao pretio (engl. *obese*) što znači da ima visok postotak masnog tkiva i umjerenu razinu mišićnog tkiva.

Udio količine vode u ukupnoj tjelesnoj masi varira tijekom dana, odnosno noći, a isto tako čimbenici poput obilnih obroka, konzumacije alkohola, menstruacije, bolesti, tjelesne aktivnosti i kupanja mogu utjecati na promjenu ukupne vode u tijelu. Kod zdravih odraslih žena udio količine vode u ukupnoj tjelesnoj masi trebao bi se kretati od 45 % do 60 %, a kod muškaraca od 50 % do 65 %. U sva tri ispitanika, ženskog spola, uočen je adekvatni udio količine vode u ukupnoj tjelesnoj masi (ispitanik 307 = 56 %; ispitanik 106 = 45 %; ispitanik 117 = 47 %).

Od ostalih parametara, TANITA analizatorom procijenjeno je još i visceralno masno tkivo te koštana masa. TANITA analizator procjenjuje visceralno masno tkivo u rasponu od 1 do 59. Pritom se raspon od 1 do 12 smatra adekvatnom razinom visceralnog masnog tkiva, a raspon od 13 do 59 smatra se prekomjernim visceralnim masnim tkivom. Sva tri ispitanika nalazila su se unutar adekvatnog raspona visceralnog masnog tkiva. Procijenjena koštana masa je

statistički dobivena vrijednost s obzirom na korelaciju s nemasnom tjelesnom masom. Prosječna procijenjena koštana masa za osobe koje imaju manje od 50 kg iznosi 1,95 kg, a kod ispitanika 307 (tjelesna masa = 48,5 kg) iznosila je 2,1 kg. Prosječna procijenjena koštana masa za osobe koje imaju 50 - 75 kg iznosi 2,40 kg, a za osobe koje imaju 75 kg i više iznosi 2,95 kg. Kod ispitanika 106 (tjelesna masa = 88,8 kg) vrijednost koštane mase bila je 2,7 kg, a kod ispitanika 117 (tjelesna masa = 77,3 kg) bila je 2,5 kg.

Provođenjem statističke analize između skupina obzirom na stupanj uhranjenosti dobivena je očekivana statistički značajna razlika ($p < 0,001$) za sve parametre mjerene TANITA analizatorom što je detaljno prikazano u tablici 2. Istovremeno je ispitanicima sastav tijela analiziran i OMRON analizatorom i pritom su dobiveni slični, ali nešto drugačiji rezultati, a ta se razlika objašnjava različitim dizajnom uređaja. Dok je OMRON analizator oktapolaran (četiri elektrode pod rukama i četiri pod nogama), TANITA analizator sastava tijela je kvadripolaran (elektrode s smještene samo pod nogama). Osim toga, svaki uređaj ima svoje prateće tablice za masno tkivo pa je drugačija i interpretacija tablica s dobivenim rezultatima ovisno o korištenom uređaju.

Tablica 2. Rezultati antropometrijskih mjerenja ispitanika s disbiozom (n=3) te usporedba dobi, spola i antropometrijskih parametara između skupina s obzirom na stupanj uhranjenosti (n=40).

	Dob (godine)	Spol (% žena)	Tjelesna visina (cm)	Opseg struka (cm)	Opseg bokova (cm)	WHR [#]	Tjelesna masa (kg)	Masno tkivo (kg)	Masno tkivo (%)	Masa mišića (kg)	FFM (kg)	TBW (%)	Koštana masa (kg)	Razina visceralnog tkiva	ITM ^c (kgm ⁻²)
Svi ispitanici (n=40)	27,75 ± 0,66 ^d	50	176,88 ± 11,72 ^e	80,90 ± 2,52 ^d	101,57 ± 2,03 ^d	0,79 ± 0,09 ^e	76,42 ± 3,86 ^d	16,34 ± 1,55 ^d	20,24 ± 8,69 ^e	57,10 ± 2,67 ^d	60,08 ± 2,80 ^d	41,58 ± 1,94 ^d	2,99 ± 0,13 ^d	3,63 ± 0,52 ^d	24,09 ± 6,11 ^e
Adekvatno uhranjeni ispitanici (n=10)	24 ± 0,75 ^d	70	171,67 ± 9,65 ^e	72,28 ± 2,26 ^d	96,15 ± 1,87 ^d	0,75 ± 0,08 ^e	63,49 ± 2,45	12,36 ± 0,82 ^d	19,80 ± 5,01 ^e	48,56 ± 2,61 ^d	51,13 ± 2,75 ^d	35,78 ± 1,84 ^d	2,57 ± 0,13 ^d	1,40 ± 0,27 ^d	21,50 ± 0,94 ^e
Pothranjeni ispitanici (n=13)	24,92 ± 0,80 ^d	61,54	174,31 ± 10,46 ^e	67,88 ± 1,89 ^d	88,55 ± 1,77 ^d	0,77 ± 0,08 ^e	53,89 ± 2,18 ^d	6,52 ± 0,69 ^d	12,55 ± 5,63 ^e	44,97 ± 2,39 ^d	47,37 ± 2,51 ^d	32,48 ± 1,72 ^d	2,4 ± 0,12 ^d	1,00 ± 0,00 ^d	17,65 ± 1,01 ^e
Ispitanik 307	28	Ž	163,2	64,6	91	0,71	48,5	8,1	16,6	38,3	40,4	28,8	2,1	1	18,2
OPPoS^a (%)	+12,36		-6,37	-4,83	+2,77	-7,79	-10	+24,23	+32,27	-14,83	-14,71	-11,33	-12,5	0	+3,12
Pretili ispitanici (n=17)	27,41 ± 1,31 ^d	29,41	181,91 ± 12,29 ^e	95,92 ± 2,96 ^d	114,71 ± 1,14 ^d	0,84 ± 0,09 ^e	101,25 ± 3,75 ^d	26,18 ± 1,55 ^d	26,38 ± 7,63 ^e	71,39 ± 3,75 ^d	75,07 ± 3,92 ^d	51,95 ± 2,71 ^d	3,68 ± 0,18 ^d	6,94 ± 0,62 ^d	30,54 ± 2,76 ^e
Ispitanik 106	24	Ž	159,9	90	111,6	0,81	88,8	30,8	36,3	50,4	53,1	37,3	2,7	6	32,8
OPPrS^b (%)	-12,44		-12,10	-6,17	-2,71	-3,57	-12,30	+17,65	+37,60	-29,40	-29,27	-28,20	-26,63	-13,54	+7,4
Ispitanik 117	23	Ž	167,5	86	109	0,79	77,3	27,2	35,2	47,6	50,1	36,4	2,5	4	27,6
OPPrS^b (%)	-16,09		-7,92	-10,34	-4,98	-5,95	-23,65	+3,90	+33,43	-33,32	-33,26	-29,93	-32,07	-42,36	-9,96
p*	0,131	0,077	0,053	<0,001	<0,001	0,032	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

*p<0,05 (razlika između skupina s obzirom na stupanj uhranjenosti; nezavisni ANOVA test za parametrijske i Kruskal-Wallis test za neparametrijske podatke); [#]WHR – omjer struka i bokova ^aOPPoS – odstupanje od prosjeka pothranjene skupine; ^bOPPrS – odstupanje od prosjeka pretila skupine; ^cITM - indeks tjelesne mase; ^dx ± SE - standardna greška; ^ex ± SD - standardna devijacija

Kod ispitanika koji su bili uključeni u istraživanje mjereni su određeni biokemijski parametri (glukoza i kolesterol iz kapilarne krvi) te je izmjeren sistolički i dijastolički krvni tlak, kako bi se dobio uvid u postojanje mogućih rizičnih čimbenika za razvoj kroničnih bolesti, odnosno za postojanje disbioze u izdvojenih ispitanika. Iz tablice 3. vidljivo je da ispitanici 307 i 106 imaju povišeni kolesterol iz kapilarne krvi ($5,74 \text{ mmolL}^{-1}$; $5,06 \text{ mmolL}^{-1}$), dok je preporučena vrijednost ukupnog kolesterola manje od $5,0 \text{ mmolL}^{-1}$ (EAS, 1992; Gottschling i sur., 1995). Također, ispitanik 106 je istovremeno imao i povećanu razinu glukoze u krvi prilikom mjerenja u iznosu od $7,6 \text{ mmolL}^{-1}$, a referentne vrijednosti kreću se između $4,4 - 6,4 \text{ mmolL}^{-1}$ (Stedman`s, 2006). Kod ispitanika 117 vrijednosti su bile u skladu s preporukama. Sistolički i dijastolički krvni tlak kod ispitanika 307, 106 i 117 bili su u skladu s optimalnim vrijednostima krvnog tlaka ($115/81 \text{ mmHg}$; $121/78 \text{ mmHg}$; $110/76 \text{ mmHg}$; adekvatnim krvnim tlakom smatra se vrijednost $120/80 \text{ mmHg}$) (Williams i sur., 2018). U odnosu na prosjek pothranjene skupine, ispitanik 307 imao je povišenu vrijednost kolesterola ($19,33 \%$), dok su druge vrijednosti bile slične prosjeku pothranjene skupine. Ispitanik 106 također je imao povišenu vrijednost kolesterola ($5,42 \%$) u odnosu na prosječnu vrijednost pretila skupine. Vrijednosti sistoličkog krvnog tlaka bile su adekvatne kod ispitanika 106 i 117, dok je pretila skupina u prosjeku imala povišeni sistolički krvni tlak ($133,59 \pm 14,12 \text{ mmHg}$). Povišeni krvni tlak u pretiloj skupini ispitanika bio je ujedno jedina statistički značajna razlika s obzirom na pothranjenu skupinu ispitanika ($p < 0,001$), odnosno adekvatno uhranjenu skupinu ispitanika ($p < 0,030$). Ostali biokemijski parametri nisu se statistički značajno razlikovali između skupina s obzirom na stupanj uhranjenosti.

Tablica 3. Biokemijski parametri ispitanika s disbiozom te usporedba biokemijskih parametara s obzirom na stupanj uhranjenosti.

	Krvni tlak sistolički (mmHg)	Krvni tlak dijastolički (mmHg)	GUK [#] (mmolL ⁻¹)	Kolesterol (mmolL ⁻¹)
Svi ispitanici (n=40)	123,53 ± 15,53 ^e	78,23 ± 1,35 ^d	4,42 ± 0,14 ^d	4,82 ± 0,13 ^d
Adekvatno uhranjeni ispitanici (n=10)	119,20 ± 11,25 ^e	75,80 ± 2,96 ^d	4,18 ± 0,25 ^d	4,68 ± 0,28 ^d
Pothranjeni ispitanici (n=13)	113,69 ± 12,61 ^e	76,23 ± 2,14 ^d	4,28 ± 0,17 ^d	4,81 ± 0,28 ^d
Ispitanik 307	115	81	3,8	5,74
Pretili ispitanici (n=17)	133,59 ± 14,12 ^e	81,18 ± 2,08 ^d	4,67 ± 0,26 ^d	4,80 ± 0,17 ^d
Ispitanik 106	121	78	7,6	5,06
Ispitanik 117	110	76	4,31	4,75
p*	0,001	0,561	0,401	0,335

* $p < 0,05$ (razlika između skupina s obzirom na stupanj uhranjenosti; nezavisni ANOVA test za parametrijske i Kruskal-Wallis test za neparametrijske podatke); [#]GUK – glukoza u krvi; ^d $x \pm SE$ - standardna greška; ^e $x \pm SD$ - standardna devijacija

Dodatno, ispitanici su se trebali izjasniti o životnim navikama kao što su konzumacija duhanskih proizvoda i alkohola te bavljenje tjelesnom aktivnošću, što je prikazano u tablici 4. Promatrajući cjelokupnu ispitivanu populaciju ispitanici se nisu značajno razlikovali, osim u konzumaciji alkohola gdje ispitanici adekvatne skupine konzumiraju značajno manje alkoholnih pića od ispitanika pretili i pothranjene skupine. Ispitanici 307 i 117 navode da konzumiraju alkoholna pića i to na tjednoj razini (307=četiri pića; 117=sedam pića; pri čemu se jednim alkoholnim pićem smatra 1,5 dcl vina ili 330 ml piva ili jedna čašica žestokog pića), dok ispitanik 106 navodi da je to rijetko i prigodno (jedno piće u tri mjeseca). Duhanske proizvode konzumira samo ispitanik 117 (do deset cigareta dnevno), dok ispitanici 307 i 106 ne konzumiraju duhanske proizvode. Tjelesnom aktivnošću bave se ispitanici 307 i 117 i oba ispitanika navode da je to u prosjeku tri sata tjedno (kombinacija tjelesne aktivnosti intenzivnog i umjerenog intenziteta). S druge strane, ispitanik 106 ne bavi se nikakvom tjelesnom aktivnošću. Literatura ističe da životne navike kao što su konzumacija duhanskih proizvoda i

alkohola te nedostatak tjelesne aktivnosti utječu na promjene u sastavu crijevne mikrobiote (Conlon i Bird, 2015; Engen i sur., 2015; Allen i sur., 2018), no teško ih je dovesti u vezu s disbiozom kod tri navedena ispitanika s obzirom da su njihovi odgovori neujednačeni, a slična istraživanja ne postoje. Još jedan čimbenik koji može utjecati na promjenu sastava crijevne mikrobiote, a koji se ističe u literaturi jest stres (Conlon i Bird, 2015). Stres bi također trebalo uzeti u obzir kao potencijalni mogući čimbenik disbioze jer se istraživanje provodilo među studentskom populacijom i to za vrijeme trajanja ispitnih rokova. Iako su ispitanici s disbiozom imali neujednačene odgovore o životnim navikama, valja imati na umu da određene životne navike, uz prehrambene, mogu pridonijeti promjeni u sastavu crijevne mikrobiote i da se taj utjecaj može razlikovati među pojedincima s obzirom da svatko od nas posjeduje unikatnu, vlastitu crijevnu mikrobiotu.

Tablica 4. Usporedba životnih navika i učestalosti stolice kod ispitanika s disbiozom.

Parametar	Ispitanik 307	Ispitanik 106	Ispitanik 117
Konsumacija alkohola	DA	DA	DA
Duhanski proizvodi	NE	NE	DA
Tjelesna aktivnost	DA	NE	DA
Opstipacija	NE	NE	NE
Učestalost stolice	Svakodnevno	1-3 puta na dan	1-3 puta na dan

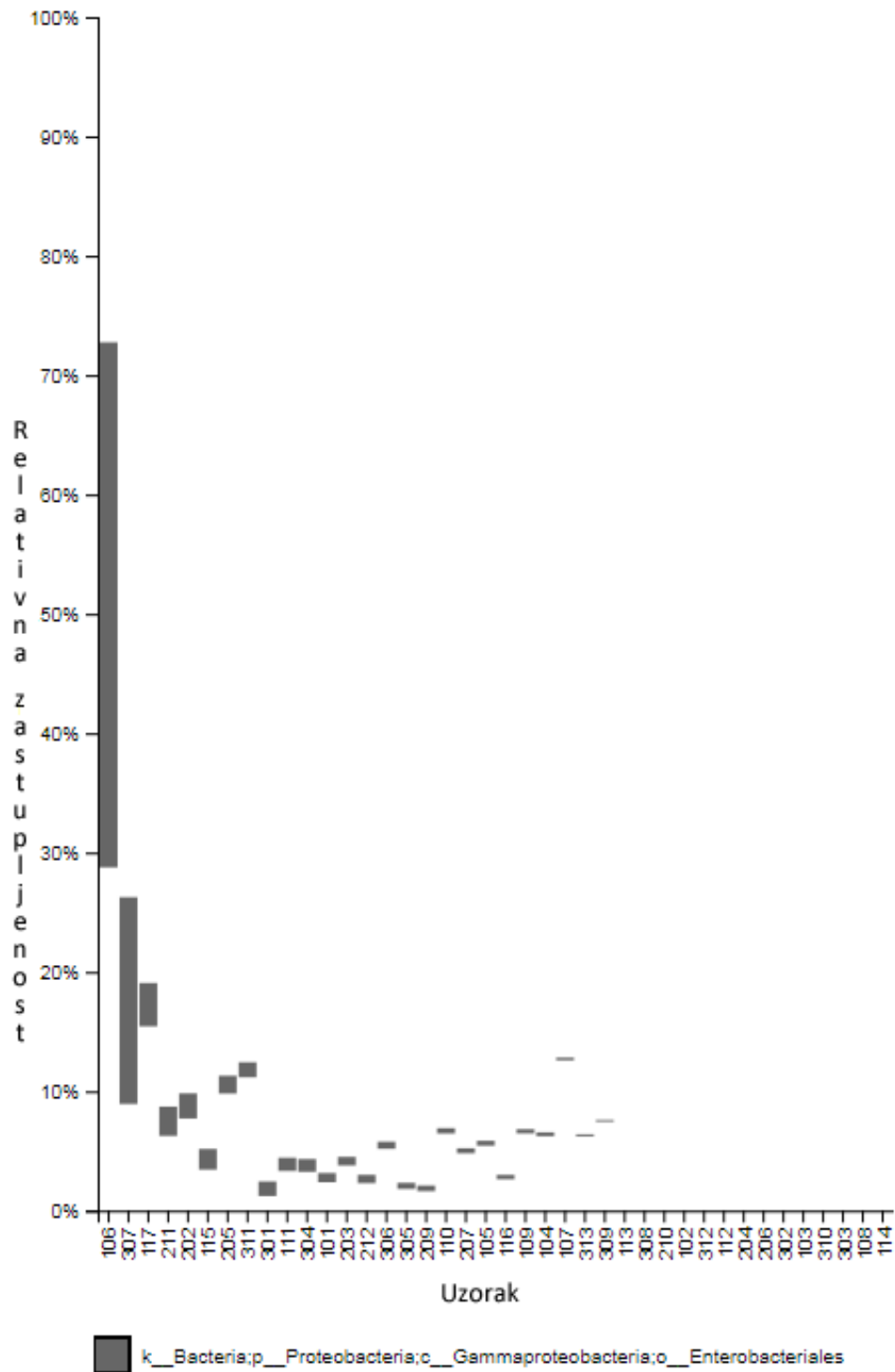
Ispitanici su se također trebali izjasniti o učestalosti stolice i pojavi opstipacije kako bi se dobio uvid u stanje probave (tablica 4). Nijedan od triju ispitanika s disbiozom nema opstipaciju te svi imaju redovitu stolicu, koja je nešto češća u pretilih ispitanika (svakodnevno, jedan do tri puta na dan), naspram pothranjenog ispitanika (svakodnevno, jednom). Također, ispitanici su trebali dati subjektivnu procjenu kakav je tip odnosno konzistencija njihove stolice. Procjena je napravljena s obzirom na Bristolsku ljestvicu stolice koja se kreće u rasponu od tip1 do tip 7 i ti su se odgovori razlikovali kod ispitanika (307=tip3; 106=tip5; 117=tip4). Pritom se optimalnim smatra tip4 stolice. Tip1 označava tvrdi, suhi oblik stolice, nalik na orašaste plodove, dok s druge strane tip7 označava vodenu stolicu.

4.2. REZULTATI SEKVENCIRANJA CRIJEVNE MIKROBIOTE ISPITANIKA

Crijevna mikrobiota postala je predmet brojnih istraživanja u posljednjih nekoliko godina. Znanstvenici sve više pažnje usmjeravaju na promjene u sastavu crijevne mikrobiote s obzirom na promjene u prehranbenim navikama, na zdravstveni status, indeks tjelesne mase te životne navike i okolišne čimbenike.

Ispitanici su u ovom istraživanju bili grupirani ovisno o stupnju uhranjenosti jer je jedan od ciljeva cijelog projekta bio utvrditi postoje li razlike u sastavu i raznolikosti crijevne mikrobiote s obzirom na indeks tjelesne mase i prehranu. U dosadašnjoj literaturi se indeks tjelesne mase i prehranske navike povezuju s promjenama u raznolikosti i sastavu crijevne mikrobiote. Disbioza crijevne mikrobiote pojavljuje se kod pretilosti, pothranjenosti i poremećaja u prehrani (kao što je npr. *anorexia nervosa*) (Willson i Situ, 2017; Alou i sur., 2016; Morita i sur., 2015).

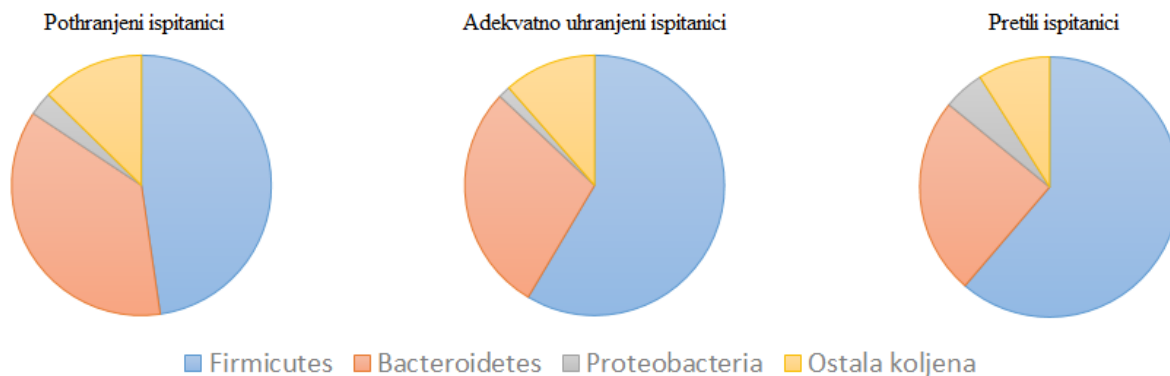
Analiza genomičkih podataka provedena je uz pomoć QIIME2 programskog paketa. Najprije je određena taksonomska raznolikost mikrobiote odnosno prisutnost bakterija u svakom uzorku. Taksonomska klasifikacija napravljena je do razine vrste, a dobivena je poravnavanjem reprezentativne sekvence svake operacijske taksonomske jedinice (OTU) s Greengenes 16S rRNA bazom podataka. Slovo „k“ na slikama označava domenu, „p“ koljeno (phylum), „c“ razred (classis), „o“ red (ordo), „f“ porodicu (familia), „g“ rod (genus), a slovo „s“ vrstu (species). Stupčasti dijagram na slici 10. prikazuje razlike između ispitanika s obzirom na zastupljenost reda *Enterobacteriales* (razred *Gammaproteobacteria*, koljeno *Proteobacteria*) u sastavu crijevne mikrobiote za svaki uzorak. Na temelju tih razlika došlo je do izdvajanja tri ispitanika zato što s obzirom na preostale ispitanike imaju povećanu zastupljenost bakterija reda *Enterobacteriales*. Zbog povećane zastupljenosti ovih bakterija uočena je disbioza odnosno narušena ravnoteža crijevne mikrobiote u ispitanika 106, 117 i 307 u odnosu na prosjek populacije jer bi bakterije koje pripadaju redu *Enterobacteriales* trebale predstavljati samo manji udio adekvatne crijevne mikrobiote (Stecher, 2015).



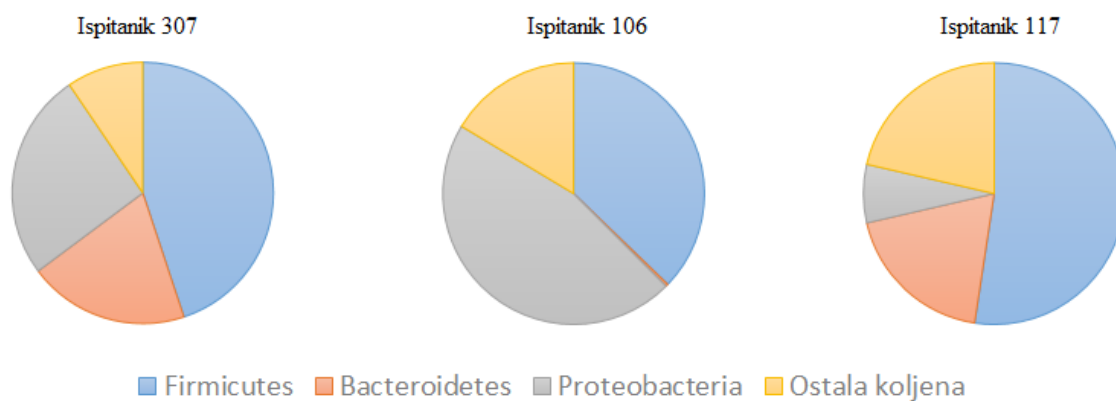
Slika 10. Zastupljenost reda *Enterobacteriales* u svakom uzorku dobivena analizom stolice ispitanika (oznaka uzoraka reda veličine 100 označava pretile, 200 adekvatno uhranjene, a 300 pothranjene ispitanike).

Slika 11. prikazuje zastupljenost pojedinih koljena u crijevnoj mikrobioti ispitanika s obzirom na stupanj uhranjenosti te potvrđuje da kod većine ispitanika prevladavaju koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, dok su preostala koljena poput *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria* i *Fusobacteria* zastupljena u manjim količinama što potvrđuje i literatura (Voreades i sur., 2014). Također, vidljivo je i da se skupine međusobno razlikuju u odnosima između najzastupljenijih koljena s obzirom na stupanj uhranjenosti. Pretili ispitanici imaju veći udio koljena *Firmicutes* (61,3 %) u odnosu na adekvatno uhranjenu (58,6 %) i pothranjenu skupinu ispitanika (47,7 %). S druge strane, pothranjeni ispitanici imaju veći udio koljena *Bacteroidetes* (36,6 %) u odnosu na adekvatno uhranjenu (28,4 %) i pretilu skupinu (24,6 %). Na slici 12. detaljno su prikazani udjeli određenih bakterijskih koljena u ispitanika 106, 117 i 307. Rezultati su pokazali da u ispitanika 106 dominira koljeno *Proteobacteria*, a njihov udio u ukupnoj crijevnoj mikrobioti je iznosio 46,1 %, dok je udio koljena *Firmicutes* iznosio 37,2 %, a udio koljena *Bacteroidetes* 0,3 %. Kod ispitanika 307 ukupan udio *Proteobacteria* iznosio je 25,7 %, a najzastupljenije koljeno bilo je *Firmicutes* (44,9 %), nakon kojeg slijedi koljeno *Bacteroidetes* (19,9 %). Ispitanik 117 imao je najmanji udio koljena *Proteobacteria* od tri navedena ispitanika (7,2 %), a najzastupljenije koljeno bilo je *Firmicutes* (52,4 %), pa *Bacteroidetes* (19 %). Shin i sur. (2015) ističu da je povećanje koljena *Proteobacteria* u crijevnoj mikrobioti marker nestabilnosti odnosno disbioze te potencijalni dijagnostički kriterij za metaboličke poremećaje i intestinalnu upalu. Osim povećanog udjela koljena *Proteobacteria* u pretilih osoba i miševa (Shin i sur., 2015), znanstvenici su povećani udio *Proteobacteria* pronašli i u pothranjenoj djeci Bangladeša i Malavija uz smanjenu raznolikost vrsta, u odnosu na adekvatno uhranjenu djecu (Subramanian i sur., 2014; Smith i sur., 2013).

Promatranjem dobivenih omjera koljena *Firmicutes/Bacteroidetes* kod navedenih ispitanika vidi se da taj omjer raste s porastom indeksa tjelesne mase i najveći je kod ispitanika 106 (omjer $F/B=106,4$; $ITM=32,8 \text{ kgm}^{-2}$), zatim slijedi ispitanik 117 (omjer $F/B=2,8$; $ITM=27,6 \text{ kgm}^{-2}$) i na kraju ispitanik 307 (omjer $F/B=2,3$; $ITM=18,2 \text{ kgm}^{-2}$). Generalno, promatrajući skupine različitog stupnja uhranjenosti pokazalo se da pretila skupina ima najveći omjer (prosječna vrijednost = 2,76) *Firmicutes/Bacteroidetes* nakon čega slijedi adekvatna skupina (prosječna vrijednost = 2,06), a najmanji omjer je u pothranjenoj skupini ispitanika (prosječna vrijednost = 1,30). Koliada i sur. (2017) dobili su slične rezultate na Ukrajinskoj populaciji, rezultati navedenog istraživanja ukazuju da omjer koljena *Firmicutes/Bacteroidetes* korelira u ovisnosti o indeksu tjelesne mase te da je veći u pretilih, odraslih osoba.



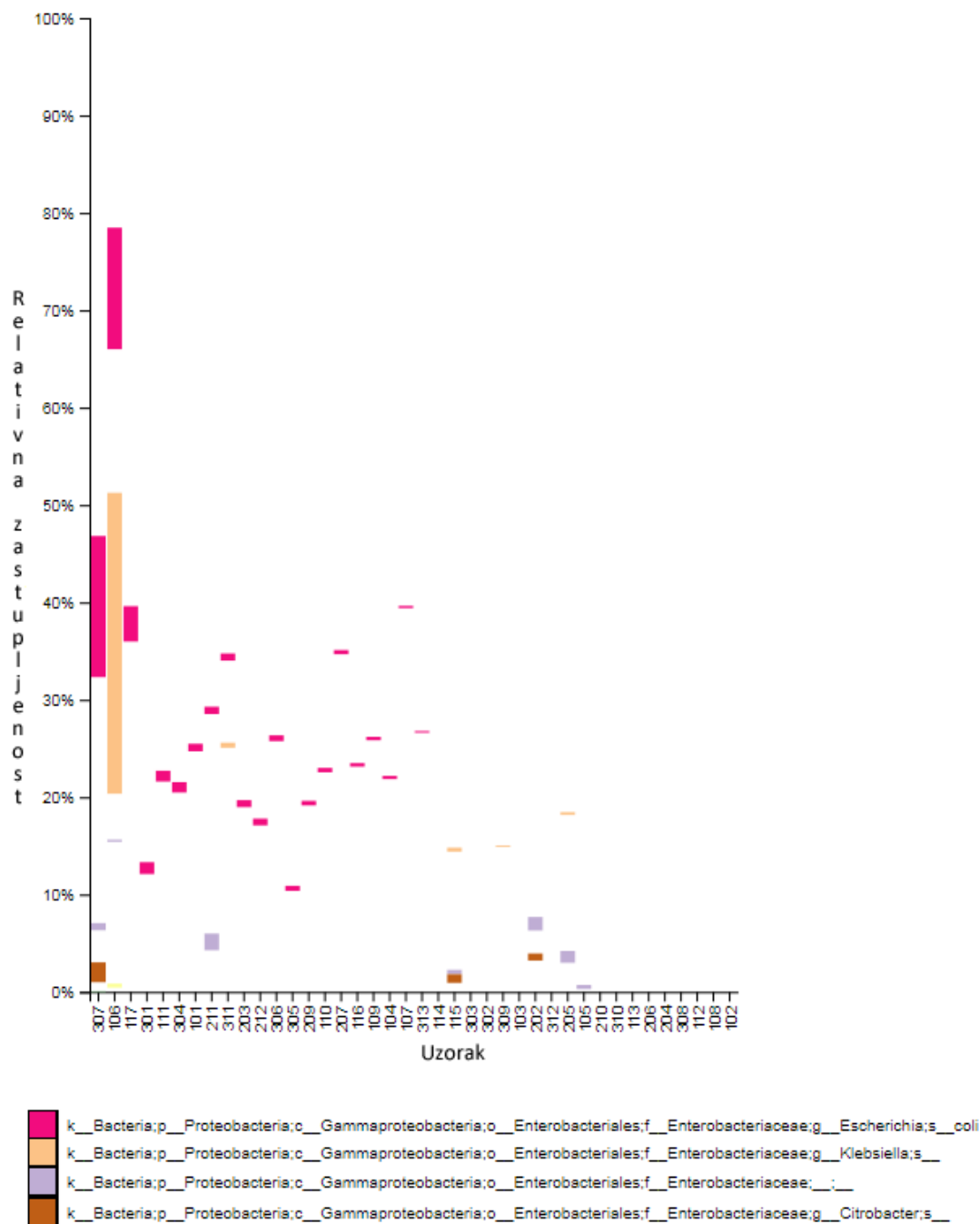
Slika 11. Udio *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* i ostalih koljena kod ispitanika s obzirom na stupanj uhranjenosti.



Slika 12. Udio *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* i ostalih koljena kod ispitanika 106, 117 i 307.

Ako promatramo koljeno *Proteobacteria*, red *Enterobacteriales*, porodica *Enterobacteriaceae*, tri ispitanika imaju povećani udio vrste *Escherichia coli* u odnosu na ostale ispitanike (slika 13). Ispitanik 307 ima najveću zastupljenost *Escherichia coli* (14,56 %), zatim slijedi ispitanik 106 (12,68 %) i na kraju ispitanik 117 (3,63 %). U pravilu, u debelom crijevu zastupljenost patogenih bakterija, među kojima je *Escherichia coli*, je vrlo mala, 0,1 % ili manje (The Human Microbiome Project Consortium, 2012). Do infekcije rodom *Escherichia* koja je inače normalno prisutna u ljudskim crijevima i stolici, može doći zbog nepravilnog pranja ruku prilikom izravnog dodira s zaraženom osobom, prilikom konzumacije kontaminirane hrane odnosno vode te za vrijeme putovanja, u zemljama trećeg svijeta, zbog lošijih higijenskih uvjeta (Mayo Clinic, 2018).

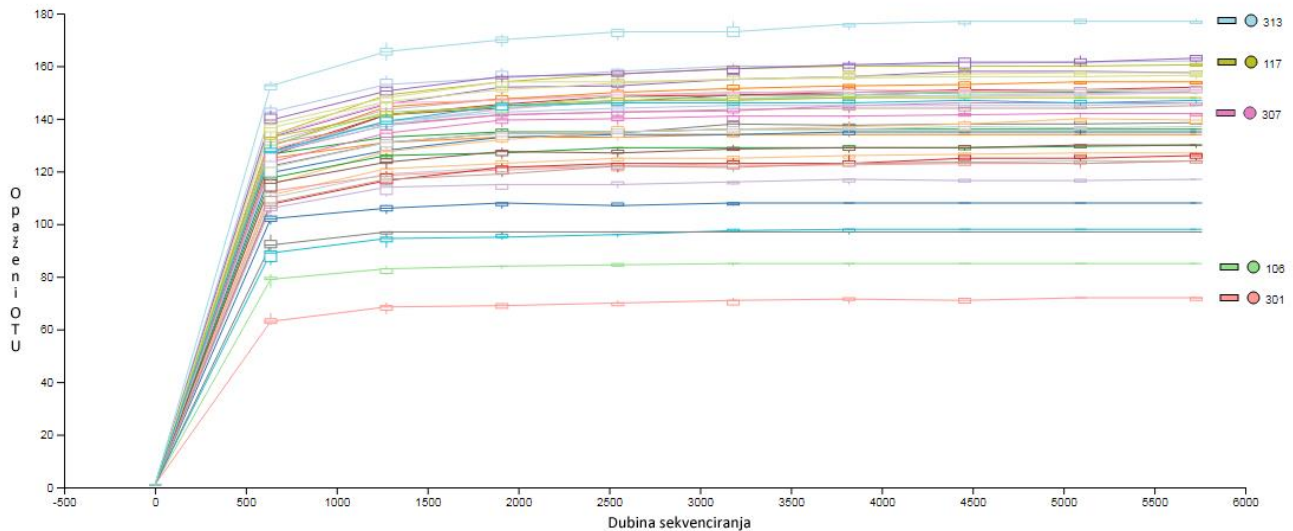
Na slici 13. također se vidi da ispitanik 106 od mogućih rodova koji pripadaju redu *Enterobacteriales* najviše ima zastupljen rod *Klebsiella* (30,90 %).



Slika 13. Povećani udio *Escherichia coli* kod ispitanika 307, 106 i 117 u odnosu na preostale ispitanike (n=37).

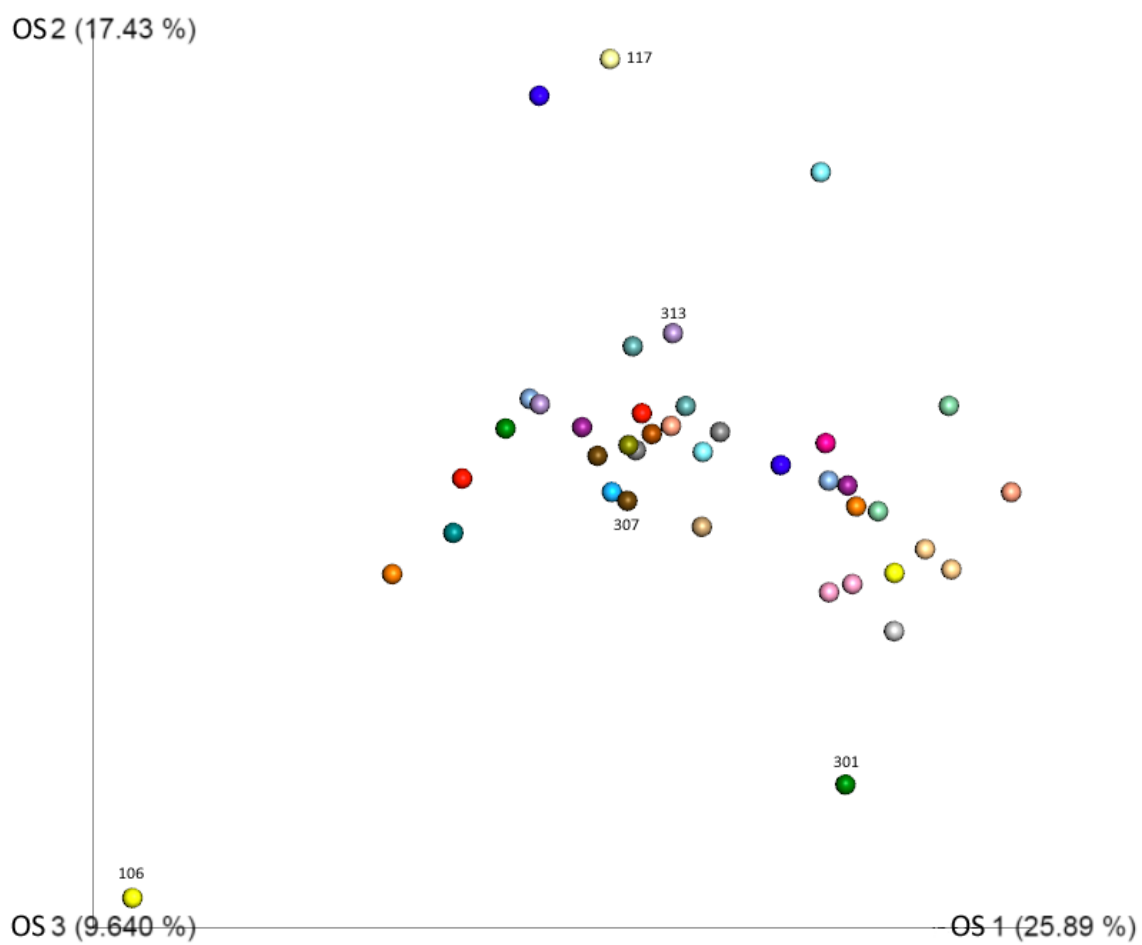
Prilikom analize crijevne mikrobiote, još su promatrane alfa i beta raznolikost. Alfa raznolikost predstavlja raznolikost pojedinog uzorka, odnosno opisuje bogatstvo vrste u pojedinom uzorku. Vizualizacija dobivenih rezultata alfa raznolikosti prikazana je na slici 14. gdje se na x-osi nalazi dubina sekvenciranja, a na y-osi broj opaženih (određenih) OTU-ova. Pretpostavka u ovom istraživanju bila je da pretili ispitanici imaju lošije prehrambene navike u odnosu na preostale skupine (veći unos energije, masti i slatkiša) te da je to razlog povišenog indeksa tjelesne mase i u konačnici razlike u raznolikosti crijevne mikrobiote. Iz rarefakcijskih krivulja svakog pojedinačnog uzorka može se očitati da je najveća alfa raznolikost prisutna kod ispitanika 313 (pothranjena skupina), a najmanja kod ispitanika 301 (pothranjena skupina). Od ispitanika kod kojih je utvrđeni povećani udio *Escherichia coli* najveće bogatstvo uzorka ima ispitanik 117 (pretila skupina) koji ujedno unosi najviše prehrambenih vlakana (u prosjeku 38,29 g/dan), zatim slijedi ispitanik 307 (pothranjena skupina; unos vlakana=26,63 g/dan) i na kraju 106 (pretila skupina; unos vlakana=20,37 g/dan) što upućuje na nepostojanje povezanosti između manje raznolikosti vrsta i višeg indeksa tjelesne mase, nego bi se uzrok trebao tražiti u prehrambenim navikama (kao što je to npr. navedeni unos vlakana). Da je veći unos prehrambenih vlakana povezan s većom raznolikošću vrsta, rezultati su De Filippo i sur. (2010) kada su uspoređivali prehranu i crijevnu mikrobiotu europske i afričke djece.

Zaključno, indeks tjelesne mase ne bi trebao biti razlog veće odnosno manje raznolikosti crijevne mikrobiote s obzirom na dobivene rezultate. S druge strane, takvi rezultati nisu u skladu s rezultatima studije Verdum i sur. (2013) gdje je uočena smanjena alfa raznolikost kod pretilih ispitanika u odnosu na ispitanike adekvatne tjelesne mase.



Slika 14. Rarefakcijske krivulje svakog pojedinačnog uzorka stolice s naglaskom na ispitanike 117, 106 i 307.

Osim alfa raznolikosti određena je i beta raznolikost koja daje mjeru različitosti uzoraka, a prikazuje se točkama u 3D prostoru. Za usporedbu crijevne mikrobiote između svih uzoraka korištena je PCoA metoda (Principal Coordinates Analysis), koja uzorke smješta u trodimenzionalni okvir na temelju udaljenosti koja je određena UniFrac metrikom. UniFrac metrika može biti težinska odnosno kvantitativna (obuhvaća prisutnost i zastupljenost taksonomskih grupa) ili netežinska (uzima u obzir samo prisutnost ili odsutnost taksonomskih grupa). Uzimajući u obzir rezultate beta raznolikosti dobivene težinskom UniFrac metrikom na slici 15. nije moguće povezati ispitanike 106, 117 i 307, kod kojih je uočena disbioza, jer nije došlo do očekivanog formiranja klastera uzoraka zbog prevelike raznolikosti u sastavu crijevne mikrobiote ispitanika. Također, promatrani uzorci ispitanika nisu omogućili razdvajanje ni na temelju indeksa tjelesne mase ispitanika.



Slika 15. Beta raznolikost crijevne mikrobiote ispitanika prikazana težinskom UniFrac metrikom.

4.3. REZULTATI DOBIVENI OBRADOM DIJETETIČKIH PODATAKA ISPITANIKA

Prehrana je jedan od čimbenika na koji možemo utjecati, a koji istovremeno značajno utječe na sastav i raznolikost crijevne mikrobiote. Činjenica koja ide tome u prilog je da se crijevna mikrobiota razlikuje ovisno o prehrani već u novorođenčadi koji su hranjeni dojenačkim formulama u odnosu na one hranjene majčinim mlijekom (Xu i Knight, 2015). Brojne studije istraživale su povezanost između pojedinih makronutrijenata i crijevne mikrobiote i pokazale da svaki pojedini makronutrijent (proteini, masti, ugljikohidrati) utječe specifično na crijevnu mikrobiotu (Alou i sur., 2016; Singh i sur., 2017).

Ovim istraživanjem nastojalo se utvrditi postoji li poveznica između prehrambenih navika i disbioze crijevne mikrobiote koja se očitovala kod triju ispitanika i hrane li se oni znatno drugačije u odnosu na skupinu kojoj pripadaju s obzirom na stupanj uhranjenosti. Također, u sklopu Projekta analizirale su se prehrambene navike svih ispitanika koje su se nastojale povezati sa sastavom crijevne mikrobiote ovisno o stupnju uhranjenosti.

Na početku istraživanja ispitanici su detaljno upućeni u pisanom obliku kako pravilno voditi trodnevni dnevnik prehrane te su dobili obrasce za popunjavanje istih. Trodnevni dnevnik prehrane vodili su kako bi se dobio uvid u njihovu prehranu, unos energije, makronutrijenta, prehrambenih vlakana te mikronutrijenata. Nakon obrade dobivenih podataka uz pomoć tablice o kemijskom sastavu hrane (Kaić-Rak i Antonić, 1990) izračunat je prosjek dnevnog energetskeg unosa, unosa makronutrijenata (ugljikohidrata, masti, proteina) i prehrambenih vlakana za pojedinu skupinu te su izdvojeni podaci ispitanika s disbiozom. Također, izračunato je odstupanje prosječnih vrijednosti energije, makronutrijenata i prehrambenih vlakana, dobivenih analizom trodnevnog dnevnika prehrane, kod ispitanika s disbiozom od prosjeka njihove skupine. Sve dobivene vrijednosti detaljno su prikazane u tablici 5. Najveće odstupanje od pretila skupine imao je ispitanik 117 u prosječnom unosu prehrambenih vlakana, koji ih unosi 62,94 % više od prosjeka svoje, pretila skupine. Od preostalih rezultata treba istaknuti da ispitanik 307 unosi 36,73 % više proteina u odnosu na prosjek svoje, pothranjene skupine te općenito unosi više proteina u odnosu na prosjek svih ispitivanih skupina. Između tri ispitivane skupine, s obzirom na stupanj uhranjenosti, nije bilo statistički značajne razlike u unosu energije, makronutrijenata i vlakana.

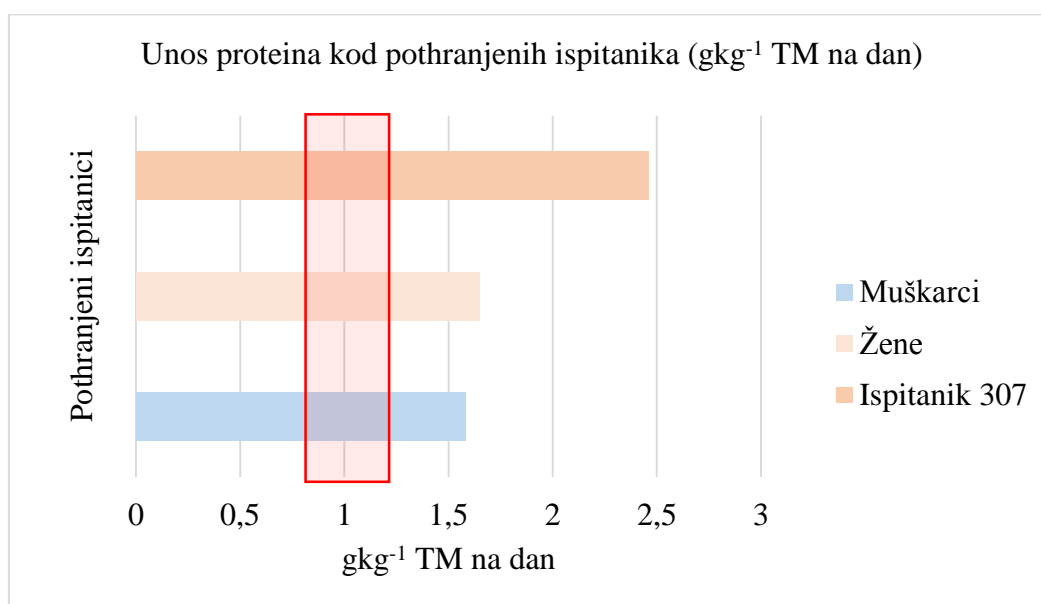
Tablica 5. Dijetetički podaci dobiveni analizom trodnevnog dnevnika prehrane kod ispitanika s obzirom na stupanj uhranjenosti te ispitanika 106, 117 i 307.

	Energija (kcal)	Ugljikohidrati (g/dan)	Masti (g/dan)	Proteini (g/dan)	Vlakna (g/dan)
Svi ispitanici (n=40)	2450,66	262,96	112,16	95,71	23,79
Adekvatno uhranjeni (n=10)	2511,87	278,99	111,00	96,61	20,28
Pothranjeni ispitanici (n=13)	2324,15	259,56	102,77	87,32	26,86
Ispitanik 307	2116,04	256,59	78,66	119,39	26,63
OPPoS^a (%)	-8,95	-1,14	-23,46	+36,73	-0,86
Pretili ispitanici (n=17)	2511,41	256,14	120,03	101,59	23,50
Ispitanik 106	2350,75	245,94	105,96	78,86	20,37
OPPrS^b (%)	-6,4	-3,98	-11,72	-22,37	-13,32
Ispitanik 117	2637,16	312,96	99,60	90,03	38,29
OPPrS^b (%)	+5,01	+22,18	-17,02	-11,38	+62,94
p*	0,740	0,829	0,555	0,509	0,471

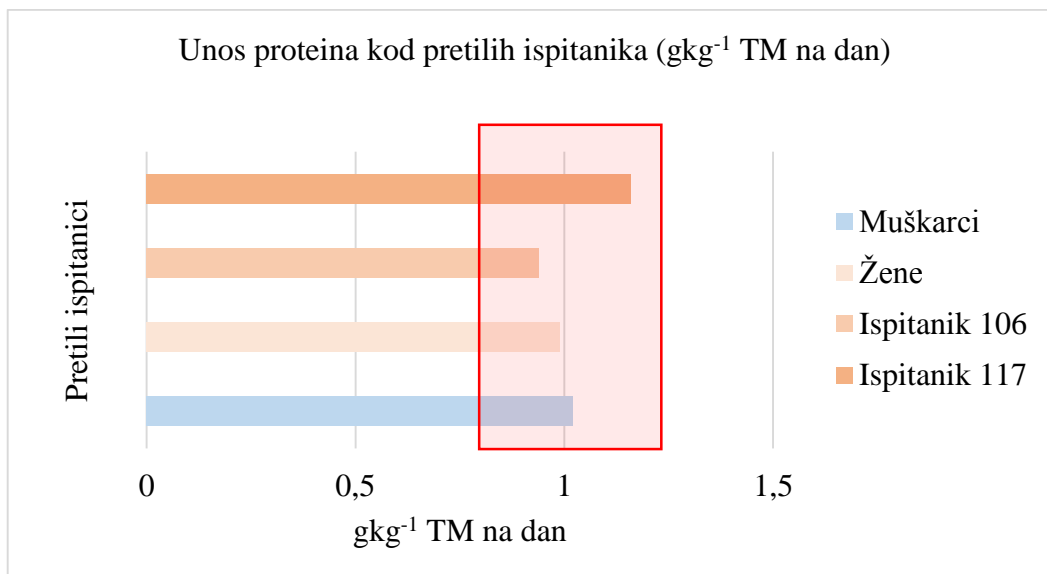
* $p < 0,05$ (razlika između skupina s obzirom na stupanj uhranjenosti); ^aOPPoS – odstupanje od prosjeka pothranjene skupine; ^bOPPrS – odstupanje od prosjeka pretila skupine.

Slike 16. – 23. prikazuju analizu prosječnog unosa makronutrijenata (proteini su izraženi u gkg^{-1} TM na dan, masti i ugljikohidrati kao % dnevnog energetskeg unosa, a vlakna u g/dan) u odnosu na DRI preporuke (IOM, 2002/2005). Pothranjene žene i muškarci unose više proteina od preporuka koje se za zdrave odrasle osobe kreću od 0,8 do 1,2 gkg^{-1} TM na dan (IOM, 2002/2005; Šatalić i sur., 2016), dok pretili muškarci i žene proteine unose u skladu s preporukama. Statističkom analizom utvrđena je značajna razlika za unos proteina (gkg^{-1} TM na dan) između pothranjenih i pretilih žena ($p=0,003$), odnosno između pothranjenih i pretilih muškaraca ($p=0,035$). Ispitanici 117 (unos proteina = 1,16 gkg^{-1} TM na dan) i 106 (unos proteina = 0,94 gkg^{-1} TM na dan) nisu se bitno razlikovali po unosu proteina u odnosu na prosjek žena iz pretila skupine (unos proteina = 0,99 gkg^{-1} TM na dan), dok se ispitanik 307 (unos proteina = 2,46 gkg^{-1} TM na dan) razlikovao po unosu proteina u odnosu na prosjek pothranjenih žena (unos proteina = 1,65 gkg^{-1} TM na dan). Ispitanik 307 unosi najviše proteina (gkg^{-1} TM) od svih ispitanika ženskog spola koji su pristupili istraživanju i pritom prevladava unos proteina životinjskog podrijetla. Pregledni rad Singh i sur. (2017) ističe kakav je utjecaj

proteina, ovisno o njihovom podrijetlu, na sastav crijevne mikrobiote i zdravlje općenito. Proteini biljnog podrijetla, točnije proteini graška, dovode do povećanja *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* te smanjenja *Bacteroides* i *Clostridium perfringens*, što posljedično dovodi do povećane proizvodnje kratkolančanih masnih kiselina, odnosno poboljšane crijevne barijere i smanjene mogućnosti za upalu. S druge strane, proteini životinjskog podrijetla dovode do povećanja *Bacteroides*, *Alistipes*, *Bilophila* i *Ruminococcus*, a smanjenja *Bifidobacterium*, što za posljedicu ima smanjenu proizvodnju kratkolančanih masnih kiselina i povećanu proizvodnju trimetilamin N-oksida, proaterogenog spoja koji povećava rizik za kardiovaskularne bolesti (Singh i sur., 2017). Također, velika prospektivna studija (n=67 581) utvrdila je da visoki ukupni unos proteina, osobito životinjskog podrijetla, povećava rizik od razvoja upalnih bolesti crijeva (Jantchou i sur., 2010). Kod ispitanika 307, osim povećane zastupljenosti *Escherichia coli*, primijećeno je i smanjenje zastupljenosti *Roseburia* u odnosu na prosjek pothranjene skupine. Navedeno je u skladu s rezultatima istraživanja koje je pokazalo da pretili muškarci stavljeni na redukciju dijetu s visokim unosom proteina i nižim unosom ugljikohidrata imaju smanjenu zastupljenost *Roseburia* i *Eubacterium rectale* te smanjeni udio butirata u stolici (Russell i sur., 2011).

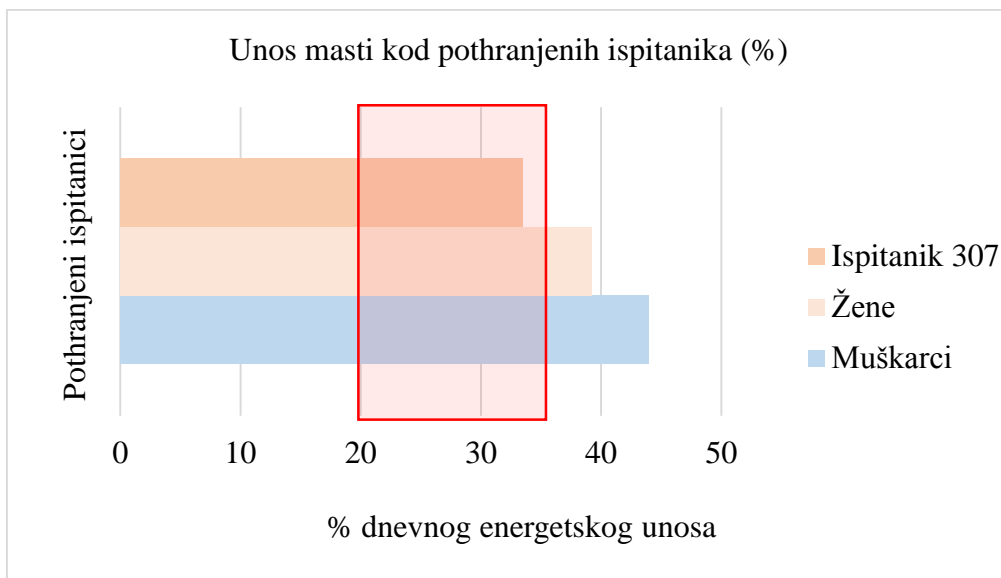


Slika 16. Prosječan dnevni unos proteina pothranjenih ispitanika s obzirom na spol te prosječan unos ispitanika 307 (*crveno = preporuka $0,8 - 1,2 \text{ gkg}^{-1}$ TM na dan).

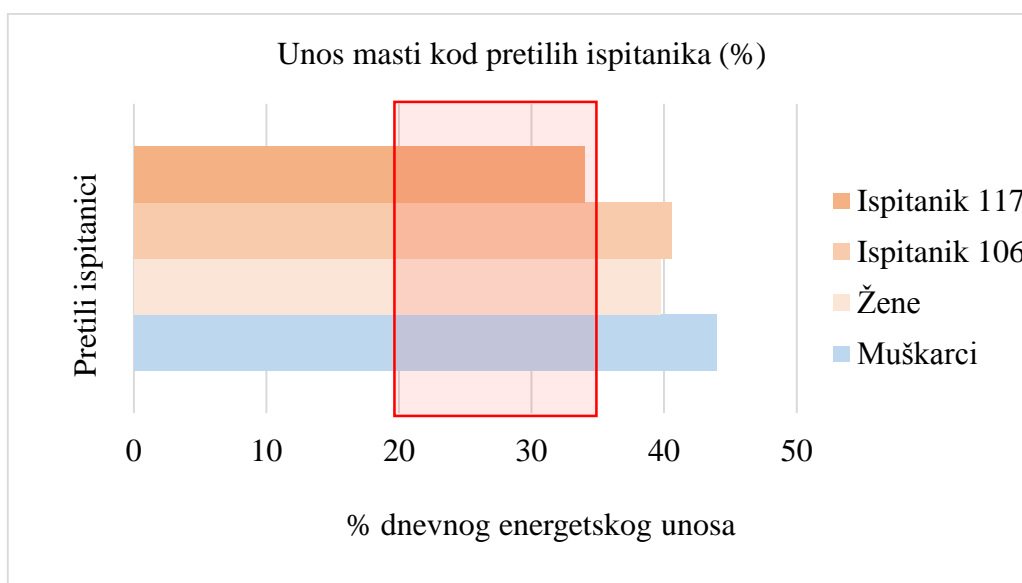


Slika 17. Prosječan dnevni unos proteina pretilih ispitanika s obzirom na spol te prosječan unos ispitanika 106 i 117 (*crveno = preporuka 0,8 - 1,2 gkg⁻¹ TM na dan).

Pothranjene žene i muškarci, kao i pretile žene i muškarci, unose više masti u ukupnom dnevnom energetsom unosu u odnosu na preporuke (20 – 35 % ukupnog dnevnog energetskeg unosa). Statistička analiza nije pokazala značajnu razliku u ukupnom unosu masti (% ukupnog dnevnog energetskeg unosa) između pothranjenih i pretilih žena ($p=0,856$), odnosno pothranjenih i pretilih muškaraca ($p=0,628$). Promatrajući ispitanike s disbiozom, ispitanik 307 (unos masti = 33,46 %) i 117 (unos masti = 33,99 %) imaju unos masti u skladu s preporukama, međutim blizu su gornjoj preporučenoj granici unosa, dok ispitanik 106 ima ukupan unos masti veći u odnosu na preporuke (unos masti = 40,57 %). Zbog visokog prosječnog unosa masti u svih ispitanika koji su sudjelovali u istraživanju (prosjeak unosa masti svih ispitanika = 41,39 %) nije bilo moguće pronaći zajedničku poveznicu u unosu masti i povećane zastupljenosti *Escherichia coli* koja se pojavila u ispitanika 106, 117 i 307. Jedno je sigurno, tipična zapadnjačka prehrana koja je bogata zasićenim mastima i trans mastima, a siromašna jednostruko- i višestruko - nezasićenim masnim kiselinama predstavlja problem jer povećava rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti, te povećanog ukupnog i LDL kolesterola, a istovremeno se povezuje i s disbiozom crijevne mikrobiote (Singh i sur., 2017).



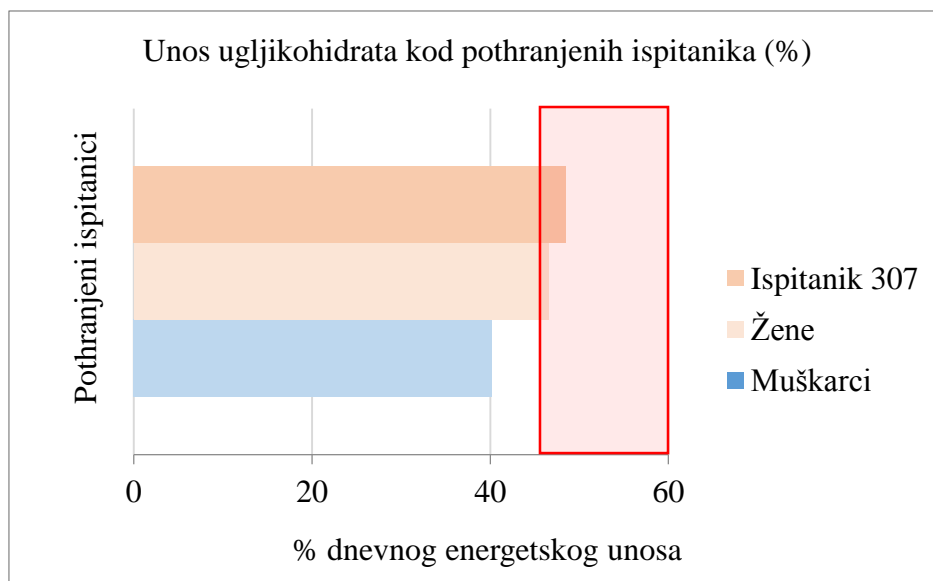
Slika 18. Prosječan dnevni unos masti pothranjenih ispitanika s obzirom na spol te prosječan unos ispitanika 307 (*crveno = preporuka 20 – 35 % u ukupnom dnevnom energetskeg unosa).



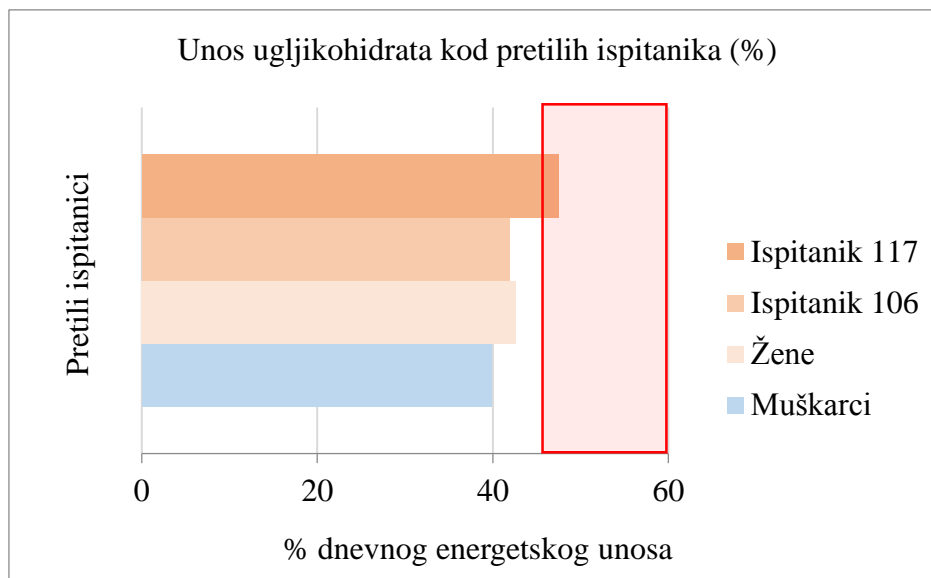
Slika 19. Prosječan dnevni unos masti pretilih ispitanika s obzirom na spol te prosječan unos ispitanika 106 i 117 (*crveno = preporuka 20 – 35 % u ukupnom dnevnom energetskeg unosa).

Kada promatramo analizu dnevnog unosa ugljikohidrata, vidi se da pothranjeni muškarci, odnosno pretile žene i muškarci ne unose ugljikohidrate u skladu s preporukama već manje, dok pothranjene žene ugljikohidrate unose u skladu s preporukama, međutim na donjoj granici unosa. Statistička analiza nije pokazala značajnu razliku u ukupnom unosu ugljikohidrata (%)

ukupnog dnevnog energetskeg unosa) između pothranjenih i pretilih žena ($p=0,324$), odnosno pothranjenih i pretilih muškaraca ($p=0,930$). Ispitanik 106 (unos ugljikohidrata = 41,85 %) također unosi manje ugljikohidrata u ukupnom dnevnom energetskeg unosu u odnosu na preporuke, dok ispitanici 117 (unos ugljikohidrata = 47,47 %) i 307 (unos ugljikohidrata = 48,5 %) unose ugljikohidrate u skladu s preporukom, međutim na donjoj su granici unosa. Zbog nižeg prosječnog unosa ugljikohidrata u svih ispitanika u odnosu na preporuke (prosjeak unosa ugljikohidrata svih ispitanika = 42,71 %) nije bilo moguće pronaći zajedničku poveznicu unosa ugljikohidrata i disbioze odnosno povećane zastupljenosti *Escherichia coli* koja se pojavila u ispitanika 106, 117 i 307. U preglednom radu Singh i sur. (2017) spominju da umjetni zaslađivači mogu dovesti do disbioze. Primjerice, zabilježeno je da su miševi hranjeni saharinom imali povećanu zastupljenost *Bacteroides* i smanjenu zastupljenost *Lactobacillus reuteri* (Suez i sur., 2014). Ispitanici u ovom istraživanju nisu naveli korištenje umjetnih sladila u dnevnicima prehrane, jedino je ispitanik 307 naveo da koristi ksilitol, šećerni alkohol.



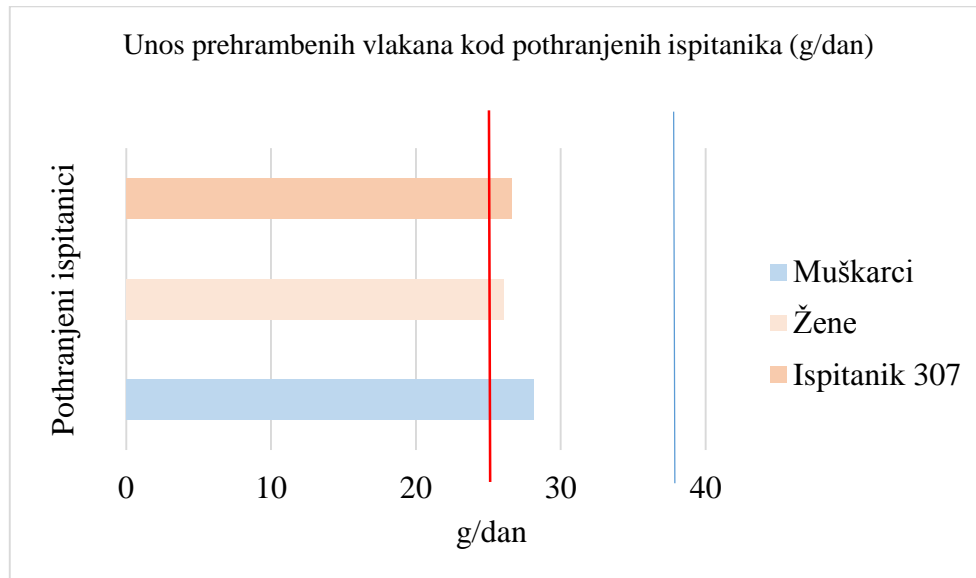
Slika 20. Prosječan dnevni unos ugljikohidrata pothranjenih ispitanika s obzirom na spol te prosječan unos ispitanika 307 (*crveno = preporuka 45 – 60 % u ukupnom dnevnom energetskeg unosu).



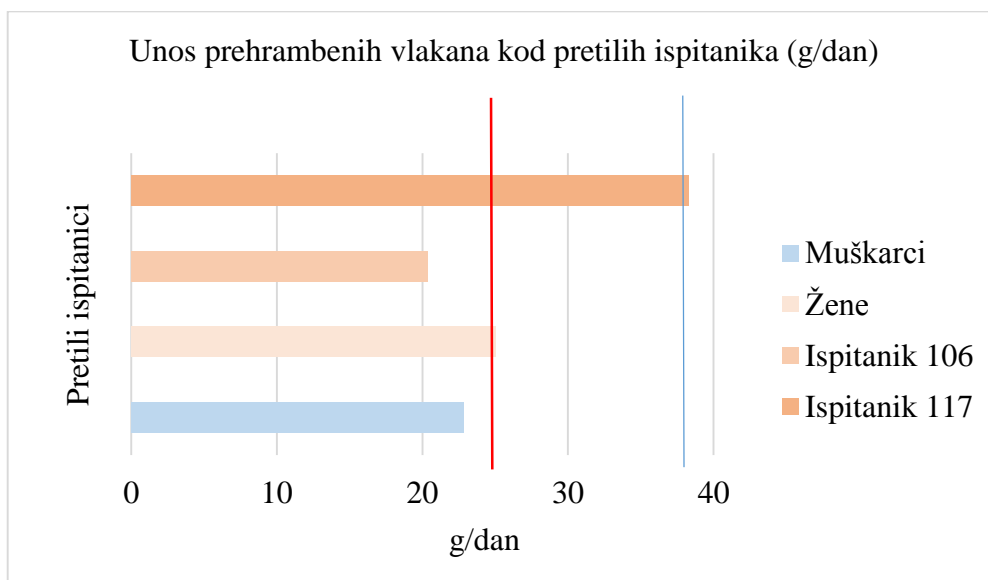
Slika 21. Prosječan dnevni unos ugljikohidrata pretilih ispitanika s obzirom na spol te prosječan unos ispitanika 106 i 117 (*crveno = preporuka 45 – 60 % u ukupnom dnevnom energetskeg unosu).

Prehrana koja je bogata prehrambenim vlaknima povezuje se s većom raznolikošću sastava crijevne mikrobiote, a također i s povećanjem zastupljenosti *Bifidobacteria* i *Lactobacilli*, odnosno *Ruminococcus*, *Eubacterium rectale* i *Roseburia* (Singh i sur., 2017). Analizirajući unos prehrambenih vlakana vidljivo je da nema statistički značajne razlike između pothranjenih i pretilih žena ($p=0,885$), odnosno pothranjenih i pretilih muškaraca ($p=0,539$). Prosječna vrijednost unosa vlakana u žena, pothranjenih i pretilih, u skladu je s preporukama, dok to nije slučaj u muškaraca koji u obje skupine (pothranjeni, pretili) unose manje vlakana u odnosu na preporuke. Ispitanik 307 ima unos prehrambenih vlakana u skladu s preporukama i istovremeno ima statistički značajno manju zastupljenost *Roseburia* (0,3 %) u odnosu na svoju, pothranjenu skupinu (4,0 %), dok nema statistički značajnu razliku za zastupljenost *Ruminococcus* (3,3 %) u odnosu na svoju, pothranjenu skupinu (2,5 %). Ispitnik 117 ima znatno veći unos prehrambenih vlakana (38,29 g/dan) u odnosu na preporuke (25 g/dan) i žene iz svoje, pretila skupine (25,05 g/dan), te istovremeno nema statistički značajnu razliku u zastupljenosti *Ruminococcus* (2,5 %) i *Roseburia* (4,7 %) u odnosu na svoju, pretilu skupinu (2,5 %; 4,0 %). Ispitanik 106 unosi manje prehrambenih vlakana (20,37 g/dan) u odnosu na preporuke (25 g/dan) i u njegovoj crijevnoj mikrobioti uočena je manja zastupljenost *Ruminococcus* (0,1 %) i *Roseburia* (0,3 %), koje su se statistički značajno razlikovale u odnosu na prosjek njegove, pretila skupine (2,5 %; 4,0 %). S obzirom na nekonzistentnost dobivenih rezultata, ni s obzirom

na unos prehrabnenih vlakana nije pronađena zajednička poveznica koja bi kod navedenih ispitanika uzrokovala povećanje vrste *Escherichia coli*.



Slika 22. Prosječan dnevni unos prehrabnenih vlakana pothranjenih ispitanika s obzirom na spol te prosječan unos ispitanika 307 (*crveno = preporuka za žene 25 g/dan; plavo = preporuka za muškarce 38 g/dan).



Slika 23. Prosječan dnevni unos prehrabnenih vlakana pretilih ispitanika s obzirom na spol te prosječan unos ispitanika 106 i 117 (*crveno = preporuka za žene 25 g/dan; plavo = preporuka za muškarce 38 g/dan).

Osim makronutrijenata, pomoću trodnevnog dnevnika prehrane izračunat je i prosječni unos mikronutrijenata za svaku skupinu s obzirom na stupanj uhranjenosti. Ti su podaci, zajedno s podacima o mikronutrijentima za ispitanike u kojih je uočena povećana zastupljenost *Escherichia coli* i njihovo odstupanja od preporuka, prikazani u tablici 6. U ispitanika 307 primijećen je manji unos vitamina A, kalija, cinka, vitamina B₆, niacina, kalcija, željeza, vitamina B₂, bakra i B₁ u odnosu na preporuke. S druge strane, magnezij, fosfor, vitamin C i natrij, ispitanik 307 unosi više od preporuka. Ako usporedimo unos mikronutrijenata i dozvoljeni najveći unos (engl. Tolerable Upper Intake Level, UL), koji označava maksimalni dnevni unos koji vjerojatno neće izazvati štetne učinke na zdravlje, jedino je unos magnezija veći od dozvoljenog najvećeg unosa koji iznosi 350 mg. Ostale vrijednosti čiji je unos veći od preporuka ne prelaze dozvoljeni najveći unos kod ispitanika 307. Ispitanik 106 imao je manji unos cinka, magnezija, kalcija, vitamina A, kalija, vitamina B₆, željeza i vitamina B₁ u odnosu na preporuke. Suprotno, unos natrija, fosfora, vitamina C, bakra, niacina i vitamina B₂ je bio veći u odnosu na preporuke. Usporedivši navedeno s dozvoljenim najvećim unosom mikronutrijenata jedino unos natrija prelazi granicu koja iznosi 2300 mg kod ispitanika 106. Pritom nije definiran dozvoljeni najveći unos za unos vitamina B₂. U ispitanika 117 zamijećen je niži unos kalija, željeza, kalcija i vitamina A u odnosu na preporuke, dok je unos vitamina B₆, vitamina C, magnezija, fosfora, natrija, niacina, bakra, vitamina B₂, vitamina B₁ i cinka bio veći u odnosu na preporuke. Vitamini B₁ i B₂ nemaju definiran dozvoljeni najveći unos, a od ostalih mikronutrijenata jedino unos magnezija i natrija prelaze dozvoljeni najveći unos. Ono što je zajedničko navedenim ispitanicima jest da 106 i 117 imaju veći unos natrija od preporučenog, te 307 i 117 veći unos magnezija od preporučenog. Također, kod sva tri ispitanika očituje se nedovoljan unos vitamina A, kalcija, željeza i kalija u odnosu na preporuke. Promatrajući skupine s obzirom na stupanj uhranjenosti, jedina statistički značajna razlika bila je u unosu natrija. Unos ostalih mikronutrijenata nije se statistički značajno razlikovao među skupinama ovisno o stupnju uhranjenosti.

Dosadašnja literatura prvenstveno se fokusira na utjecaj makronutrijenata na sastav crijevne mikrobiote i malo je dostupnih podataka o mikronutrijentima, odnosno njihovom nedostatku u prehrani i utjecaju na crijevnu mikrobiotu. U odnosu na makronutrijente ne osiguravaju nam energiju, međutim mikronutrijenti su važni za metabolizam energije, stanični rast i diferencijaciju, rad naših organa te imunološku funkciju (Biesalski, 2016). Zanimljivi su rezultati istraživanja, koje su proveli Hibberd i sur. (2017), a koji su pokazali da je prehrana lišena vitamina A podržala rast *Bacteroides vulgatus* u gnotobiotskih miševa koji su bili

kolonizirani ljudskom mikrobiotom. Literatura također ističe da je suplementacija cinkom u životinjskim modelima povećala zastupljenost Gram – negativnih fakultativnih anaerobnih bakterijskih grupa, koncentraciju kratkolančanih masnih kiselina u kolonu i ukupnu raznolikost vrsta, a osim toga da je u ljudi jedan od simptoma nedostatka cinka i dijareja (Biesalski, 2016). Nedostatak pojedinih mikronutrijenata mogao bi biti povezan s disbiozom, međutim da se to potvrdi potrebno je provesti još istraživanja na većem broju ispitanika i tijekom duljeg vremenskog perioda.

Tablica 6. Unos mikronutrijenata u ispitanika s obzirom na stupanj uhranjenosti i odstupanje od preporuka u ispitanika 307, 106 i 117.

	RE (µg)	B1 (mg)	B2 (mg)	Niacin (mg)	B6 (mg)	C (mg)	Ca (mg)	Mg (mg)	P (mg)	Fe (mg)	Zn (mg)	Cu (mg)	Na (mg)	K (mg)
Preporuka	900	1,1	1,1	14	1,3	75	1000	310	700	18	8	0,9	1500	4700
Svi ispitanici (n=40)	747,2	2,29	2,52	21,41	2,63	153,15	816,88	236,26	1384,7	15,19	5,71	1,92	3078,04	3031,54
Adekvatno uhranjeni ispitanici (n=10)	662,32	1,45	1,83	19,01	1,6	171,28	982,11	214,48	1339,97	12,39	5,29	0,98	2624,66	2834,97
Pothranjeni ispitanici (n=13)	889,2	1,63	1,68	19,8	2,04	169,65	714,39	259,5	1288,67	13,5	4,86	1,2	2442,54	3056,06
Ispitanik 307	347,68	1,02	0,95	10,55	0,95	108,6	800,59	507,89	1128,34	15,08	5,11	0,79	1839,23	2576,14
OoP^a (%)	-61,37	-7,27	-13,64	-24,64	-26,92	+44,8	-19,94	+63,84	+61,19	-16,23	-36,12	-12,22	+22,62	-45,19
Pretili ispitanici (n=17)	688,54	3,29	3,57	24,07	3,67	129,87	798,06	231,31	1484,45	18,14	6,62	3,03	3830,71	3128,41
Ispitanik 106	526,89	1,09	1,17	17,98	1,04	104,57	529,49	141,74	1524,68	14,97	3,17	1,21	5047,47	2796,28
OoP^a (%)	-41,46	-0,91	+6,36	+28,43	-20	+39,43	-47,05	-54,28	+117,81	-16,83	-60,37	+34,44	+236,50	-40,5
Ispitanik 117	826,39	1,45	1,6	29,61	5,14	239,46	910,75	839,36	1719,02	15,97	10,6	1,84	3330,0	3712,69
OoP^a (%)	-8,18	+31,82	+45,45	+111,5	+295,38	+219,28	-8,92	+170,76	+145,57	-11,28	+32,5	+104,44	+122	-21,01
p*	0,460	0,549	0,935	0,608	0,348	0,373	0,141	0,471	0,480	0,311	0,531	0,507	0,050	0,772

* $p < 0,05$ (razlika između skupina s obzirom na stupanj uhranjenosti; nezavisni ANOVA test za parametrijske i Kruskal-Wallis test za neparametrijske podatke); ^aOoP – Odstupanje od preporuka

Crijevna mikrobiota svakog pojedinca je jedinstvena i na nju utječu brojni čimbenici tijekom cijelog života. U ovom istraživanju koje se temeljilo na 40 ispitanika izdvojila su se tri kod kojih je uočena disbioza odnosno povećana zastupljenost *Escherichia coli*. Iz dobivenih rezultata nije bilo moguće pronaći zajedničku poveznicu u prehrani i uočenoj disbiozi. Također, zbog jedinstvenosti crijevne mikrobiote, ali i njene kompleksnosti, teško je odrediti je li uočena disbioza u ispitanika 307, 106 i 117 posljedica jednog čimbenika ili sinergije više njih. Osim toga, važno je istaknuti nedostatak samog istraživanja, a to je mali broj ispitanika (n=3) kojim se nastojala odrediti povezanost između prehrane i disbioze crijevne mikrobiote. U budućnosti bi cjelokupno istraživanje trebalo provesti na znatno većem broju ispitanika i dugoročno pratiti rezultate. Ono što je također moglo utjecati na dobivene rezultate je i istinitost podataka koji su prikupljeni pomoću upitnika i trodnevnog dnevnika prehrane. Poznato je da je mogući nedostatak same metode dnevnika prehrane promjena prehrambenih navika kako bi si ispitanici olakšali vođenje dnevnika ili ostavili bolji dojam, pa je i to potrebno uzeti u obzir kao moguću pogrešku prilikom interpretacije rezultata.

5. ZAKLJUČCI

U tri ispitanika, 307, 106 i 117, koji su među ostalima sudjelovali u istraživanju koje je za cilj imalo utvrditi povezanost stupnja uhranjenosti sa sastavom crijevne mikrobiote, utvrđena je disbioza crijevne mikrobiote, tj. povećana zastupljenost reda *Enterobacteriales*, u odnosu na preostale ispitanike promatrane populacijske skupine. Glavni cilj istraživanje bio je pronaći zajedničku poveznicu u prehrani zbog koje se kod troje navedenih ispitanika očitovala disbioza. Na temelju provedenog istraživanja i analize rezultata doneseni su sljedeći zaključci:

1. S obzirom na nekonzistentnost rezultata prilikom analize nije pronađena zajednička poveznica kod tri navedena ispitanika s obzirom na promatrane parametre: prehrambene (unos makronutrijenata i prehrambenih vlakana), antropometrijske te biokemijske, odnosno u životnim navikama, koja bi mogla dovesti do utvrđene disbioze crijevne mikrobiote.
2. Biokemijski parametri koji bi potencijalno mogli rezultirati disbiozom crijevne mikrobiote su povišeni kolesterol iz kapilarne krvi kod ispitanika 307 (promatrano u odnosu na prosjek njegove, pothranjene skupine), istovremeno povišeni kolesterol iz kapilarne krvi i povišena razina glukoze u krvi kod ispitanika 106 (promatrano u odnosu na prosjek njegove, pretile skupine). Kod ispitanika 117 vrijednosti biokemijskih parametara su bile u skladu s preporukama pa navedeni parametri nisu mogli pridonijeti disbiozi crijevne mikrobiote kod ovog ispitanika.
3. Ispitanici 106 i 117 nemaju različite prehrambene navike u odnosu na svoju, pretilu skupinu koje bi potencijalno mogli utjecati na pojavu disbioze, no ispitanik 307 značajno odstupa od svoje, pothranjene skupine s obzirom na veliki unos proteina (gkg^{-1} TM na dan) te bi u tome potencijalno mogli tražit razlog utvrđene disbioze crijevne mikrobiote.
4. Promatrajući unos mikronutrijenata u navedenih ispitanika 106 i 117 imaju veći unos natrija od preporučenog, a 307 i 117 veći unos magnezija od preporučenog. Ono što je zajedničko kod sva tri ispitanika i može biti jedan od potencijalnih čimbenika za pojavu disbioze je nedovoljan unos vitamina A, kalcija, željeza i kalija u odnosu na preporuke.
5. Crijevna mikrobiota svakog pojedinca je jedinstvena i kompleksna pa je teško odrediti je li disbioza posljedica jednog čimbenika ili sinergije više njih.
6. S obzirom na mali broj ispitanika ($n=3$) u budućnosti bi slična istraživanja trebalo temeljiti na većoj populaciji i tijekom duljeg vremenskog perioda.

6. LITERATURA

Allen, J. M., Mailing, L. J., Niemi, G. M., Moore, R., Cook, M. D., White, B. A., Holscher, H. D., Woods, J. A. (2018) Exercise Alters Gut Microbiota Composition and Function in Lean and Obese Humans. *Med. Sci. Sport. Exer.* **50(4)**, 747-757.

Alou, M. T., Lagier, J. C., Raoult, D. (2016) Diet influence on the gut microbiota and dysbiosis related to nutritional disorders. *Human Microbiome Journal* **1**, 3-11.

Altmann, F., Kosma, P., O'Callaghan, A., Leahy, S., Bottacini, F., Molloy, E., Plattner, S., Schiavi, E., Gleinser, M., Groeger, D., Grant, R., Rodriguez Perez, N., Healy, S., Svehla, E., Windwarder, M., Hofinger, A., O'Connell Motherway, M., Akdis, C. A., Xu, J., Roper, J., van Sinderen, D., O'Mahony, L. (2016) Genome Analysis and Characterisation of the Exopolysaccharide Produced by *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 35624. *PLoS One* **11**, e0162983.

Arthur, J. C., Perez-Chanona, E., Mühlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J. M., Fan, T. J., Campbell, B. J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A. B., Rhodes, J. M., Stintzi, A., Simpson, K. W., Hansen, J. J., Keku, T. O., Fodor, A. A., Jobin, C. (2012) Intestinal Inflammation Targets Cancer-Inducing Activity of the Microbiota. *Science* **338**, 120-123.

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J. M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H. B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E. G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W. M., Brunak, S., Doré, J., MetaHIT Consortium, Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., Bork, P. (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473(7346)**, 174–180.

Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., Gordon, J. I. (2005) Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science* **307**, 1915-1920.

Barrett, E., Kerr, C., Murphy, K., O'Sullivan, O., Ryan, C. A., Dempsey, E. M., Murphy, B. P., O'Toole, P. W., Cotter, P. D., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., Stanton, C. (2013) The individual – specific and diverse nature of the preterm infant microbiota. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* **98**, F334-F340.

- Baumgart, M., Dogan, B., Rishniw, M., Weitzman, G., Bosworth, B., Yantiss, R., Orsi, R. H., Wiedmann, M., McDonough, P., Kim, S. G., Berg, D., Schukken, Y., Scherl, E., Simpson, K. W. (2007) Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of *Clostridiales* in Crohn`s disease involving the ileum. *ISME J.* **1**, 403-418.
- Benjamin, J. L., Hedin, C. R. H., Koutsoumpas, A., Ng, S. C., McCarthy, N. E., Hart, A. L., Kamm, M. A., Sanderson, J. D., Knight, S. C., Forbes, A., Stagg, A. J., Whelan, K., Lindsay, J. O. (2011) Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of fructo-oligosaccharides in active Crohn`s disease. *Gut* **60**, 923-929.
- Biesalski, H. K. (2016) Nutrition meets the microbiome: micronutrients and the microbiota. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1372**, 53-64.
- Bonnet, M., Buc, E., Sauvanet, P., Darcha, C., Dubois, D., Pereira, B., Déchelotte, P., Bonnet, R., Pozet, D., Darfeuille-Michaud, A. (2014) Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. *Clin. Cancer Res.* **20**, 859-867.
- Cammarota, G., Ianiro, G., Tilg, H., Rajilić-Stojanović, M., Kump, P., Satokari, R., Sokol, H., Arkkila, P., Pintus, C., Hart, A., Segal, J., Aloï, M., Masucci, L., Molinaro, A., Scaldaferrì, F., Gasbarrini, G., Lopez-Sanroman, A., Link, A., de Groot, P., de Vos, W. M., Högenauer, C., Malfertheiner, P., Mattila, E., Milosavljević, T., Nieuwdorp, M., Sanguinetti, M., Simren, M., Gasbarrini, A., The European FMT Working Group. (2017) European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut* **66**, 569-580.
- Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D. T., Corfe, B. M., Owen, L. J. (2015) Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb. Ecol. Health D.* **26**, 26191. doi: 10.3402/mehd.v26.26191
- Carroll, I. M., Ringel-Kulka, T., Siddle, J. P., Ringel, Y. (2012) Alterations in composition and diversity of the intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroent. Motil.* **24**, 521-530.
- Carvalho, F. A., Koren, O., Goodrich, J. K., Johansson, M. E. V., Nalbantoglu, I., Aitken, J. D., Su, Y., Chassaing, B., Walters, W. A., González, A., Clemente, J. C., Cullender, T. C., Barnich, N., Darfeuille-Michaud, A., Vijay-Kumar, M., Knight, R., Ley, R. E., Gewirtz, A. T. (2012) Transient Inability to Manage *Proteobacteria* Promotes ic Gut Inflammation in TLR5-Deficient Mice. *Cell Host Microbe* **12**, 139-152.

Castellarin, M., Warren, R. L., Freeman, J. D., Dreolini, L., Krzywinski, M., Strauss, J., Barnes, R., Watson, P., Allen-Vercoe, E., Moore, R. A., Holt, R. A. (2012) *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res.* **22**, 299-306.

Choi, H. H., Cho, Y. S. (2016) Fecal microbiota transplantation: Current applications, effectiveness, and future perspectives. *Clin. Endosc.* **49**, 257-265.

Collado, M. C., 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 [online] <<https://www.nature.com/articles/srep23129>>. Pristupljeno 6. studenoga 2018.

Conlon, M. A., Bird, A. R. (2015) The Impact of Diet and Lifestyle on Gut Microbiota and Human Health. *Nutrients* **7**, 17-44.

Coolinarika (2018) Recepti, <<http://www.coolinarika.com/recepti/>>. Pristupljeno 01. – 25. travnja 2018.

Cougnoux, A., Dalmasso, G., Martinez, R., Buc, E., Delmas, J., Gibold, L., Sauvanet, P., Darcha, C., Déchelotte, P., Bonnet, M., Pezet, D., Wodrich, H., Darfeuille-Michaud, A., Bonnet, R. (2014) Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut* **63**, 1932-1942.

Cox, A. J., Nicholas, P. W., Allan, W. C. (2015) Obesity, inflammation, and the gut microbiota. *Lancet Diabetes Endo.* **3**, 207-215.

D'Argenio V., Salvatore, F. (2015) The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clin. Chim. Acta.* **451**, 97-102.

De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., Lionetti, P. (2010) Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 14691-14696.

DeGruttola, A. K., 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.

Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., Knight, R. (2010) Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 11971-11975.

- Donaldson, G. P., Lee, S. M., Mazmanian, S. K. (2016) Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**(1), 20-32.
- EAS (1992) Prevention of coronary heart disease: scientific background and new clinical guidelines. *Nutr. Metab. Cardiovas.* **2**, 113-156.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., Relman, D. A. (2005) Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* **308**(5728), 1635-1638.
- Engen, P. A., Green, S. J., Voigt, R. M., Forsyth, C. B., Keshavarzian, A. (2015) The gastrointestinal microbiome: alcohol effects on the composition of intestinal microbiota. *Alcohol Res. Curr. Rev.* **37**(2), 223-236.
- FAO/WHO (2002) Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. FAO – Food and Agriculture Organization, WHO – World Health Organization, [online] <https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf>. Pristupljeno 20. studenoga 2018.
- Fujimoto, T., Imaeda, H., Takahashi, K., Kasumi, E., Bamba, S., Fujiyama, Y., Andoh, A. (2013) Decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota of Crohn's disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **28**, 613-619.
- Gallagher, D., Heymsfield, S. B., Heo, M., Jebb, S. A., Murgatroyd, P. R., Sakamoto, Y. (2000) Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. *Am. J. Clin. Nutr.* **72**, 694-701.
- Garrett, W. S. (2015) Cancer and the microbiota. *Science* **348**, 80-86.
- Gérard, P. (2016) Gut microbiota and obesity. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 147-162.
- Giron, F., Quigle, E. M. M. (2018) Pharmabiotic Manipulation of the Microbiota in Gastrointestinal Disorders: A Clinical Perspective. *J. Neurogastroenterol.* **24**, 355-366.
- Gottschling, H. D., Reuter, W., Ronquist, G., Steinmetz, A., Hattemer A. (1995) Multicentre evaluation of a non-wipe system for the rapid determination of total cholesterol in capillary blood, Accutrend Cholesterol on Accutrend GC. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **33**, 373-381.

Graf, D., Di Cagno, R., Fåk, F., Flint, H. J., Nyman, M., Saarela, M., Watzl, B. (2015) Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. *Microb. Ecol. Health D.* **26**, 26164. doi: 10.3402/mehd.v26.26164

Gu, S., Chen, D., Zhang, J. N., Lv, X., Wang, K., Duan, L. P., Nie, Y., Wu, X. L. (2013) Bacterial Community Mapping of the Mouse Gastrointestinal Tract. *PLoS One* **8(10)**, e74957. doi: 10.1371/journal.pone.0074957

Guandalini, S., Cernat, E., Moscoso, D. (2015) Prebiotics and probiotics in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in children. *Benef. Microbes* **6**, 209-217.

Hibberd, M. C., Wu, M., Rodionov, D. A., Li, X., Cheng, J., Griffin, N. W., Barratt, M. J., Giannone, R. J., Hettich, R. L., Osterman, A. L., Gordon, J. I. (2017) The effects of micronutrient deficiencies on bacterial species from the human gut microbiota. *Sci. Transl. Med.* **9**, eaal4069. doi: 10.1126/scitranslmed.aal4069

Hollister, E. B., Gao, C., Versalovic, J. (2014) Compositional and Functional Features of the Gastrointestinal Microbiome and Their Effects on Human Health. *Gastroenterology* **146**, 1449-1458.

Hrvatska enciklopedija (2017) <<http://www.enciklopedija.hr/impresum.aspx>> Pristupljeno 18. travnja 2018.

IOM (2001) Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. IOM – Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. National Academy Press, Washington, D.C.

IOM (2002/2005) Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids. IOM – Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. National Academy Press, Washington, D.C.

IOM (2004) Dietary intakes for water, potassium, sodium, chloride, and sulfate. IOM – Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. National Academy Press, Washington, D.C.

IOM (2011) Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. IOM – Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. National Academy Press, Washington, D.C.

Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Reddy, D. N. (2015) Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroentero.* **21**, 8836-8847.

Jantchou, P., Morois, S., Clavel – Chapelon, F., Boutron – Ruault, M. C., Carbonnel, F. (2010) Animal Protein Intake and Risk of Inflammatory Bowel Disease: The E3N Prospective Study. *Am. J. Gastroenterol.* **105**, 2195-2201.

Kaić-Rak, A., Antonić, K. (1990) Tablice o sastavu namirnica i pića. Zavod za zaštitu zdravlja SR Hrvatske, Zagreb.

Kamada, N., Chen, G. Y., Inohara, N., Nunez, G. (2013) Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat. Immunol.* **14**, 685-690.

Karl, J. P., Hatch, A. M., Arcidiacono, S. M., Pearce, S. C., Pantoja-Feliciano, I. G., Doherty, L. A., Soares, J. W. (2018) Effects of Psychological, Environmental and Physical Stressors on the Gut Microbiota. *Front. Microbiol.* **9**, [online] <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02013/full>>. Pristupljeno 8. studenoga 2018.

Kelly, C. R., Kahn, S., Kashyap, P., Laine, L., Rubin, D., Atreja, A., Moore, T., Wu, G. (2015) Update on Fecal Microbiota Transplantation 2015: Indications, Methodologies, Mechanisms, and Outlook. *Gastroenterology* **149**, 223-237.

Koliada, A., Syzenko, G., Moseiko, V., Budovska, L., Puchkov, K., Perederiy, V., Gavalko, Y., Dorofeyev, A., Romanenko, M., Tkach, S., Sineok, L., Lushchak, O., Vaiserman, A. (2017) Association between body mass index and *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio in an adult Ukrainian population. *BMC. Microbiol.* **17**, article number 120.

Kumar, M., Babaei, P., Ji, B., Nielsen, J. (2016) Human gut microbiota and healthy aging: Recent developments and future prospective. *J. Nutr. Healthy Aging* **4**, 3-16.

Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J. M., Kennedy, S., Leonard, P., Li, J., Burgdorf, K., Grarup, N., Jørgensen, T., Brandslund, I., Bjørn Nielsen, H., Juncker, A. S., Bertalan, M., Levenez, F., Pons, N., Rasmussen, S., Sunagawa, S., Tap, J., Tims, S., Zoetendal, E. G., Brunak, S., Clément, K., Doré, J., Kleerebezem, M., Kristiansen, K., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., de Vos, W. M., Zucker, J. D., Raes, J., Hansen, T., MetaHIT consortium, Bork, P., Wang, J., Ehrlich, S. D., Pedersen, O. (2013) Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **500**, 541-546.

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

- Lewis, S. J., Heaton, K.W. (1997) Stool Form Scale as a Useful Guide to Intestinal Transit Time. *Scand. J. Gastroenterol.* **32**, 920-924.
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., Gordon, J. I. (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**, 1022
- Lindsay, J. O., Whelan, K., Stagg, A. J., Gobin, P., Al-Hassi, H. O., Rayment, N., Kamm, M. A., Knight, S. C., Forbes, A. (2006) Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn`s disease. *Gut* **55**, 348-355.
- Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., Huttenhower, C. (2016) The healthy human microbiome. *Genome Med.* **8**, 51. doi: 10.1186/s13073-016-0307-y
- López-Cepero, A. A., Palacios, C. (2015) Association of the Intestinal Microbiota and Obesity. *P. R. Health Sci. J.* **34**, 60-64.
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., Knight, R. (2012) Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **489(7415)**, 220-230.
- Martinez-Medina, M., Denizot, J., Dreux, N., Robin, F., Billard, E., Bonnet, R., Darfeuille-Michaud, A., Barnich, N. (2014) Western diet induces dysbiosis with increased *E. coli* in CEABAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation. *Gut* **63**, 116-124.
- Mayo Clinic (2018, 04. kolovoza) Shigella infection, <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/shigella/symptoms-causes/syc-20377529>. Pristupljeno 15. veljače 2019.
- Meijnikman, A. S., Gerdes, V. E., Nieuwdorp, M., Herrema, H. (2018) Evaluating Causality of Gut Microbiota in Obesity and Diabetes in Humans. *Endocr. Rev.* **39(2)**, 133-153.
- Morita, C., Tsuji, H., Hata, T., Gondo, M., Takakura, S., Kawai, K., Yoshihara K., Ogata, K., Nomoto, K., Miyazaki, K., Sudo, N. (2015) Gut Dysbiosis in Patients with Anorexia Nervosa. *PLoS One* **10(12)**, e0145274.
- Mueller, N. T., Bakacs, E., Combellick, J., Grigoryan, Z., Dominguez-Bello, M. G. (2015) The infant microbiome development: mom matters. *Trends. Mol. Med.* **21(2)**, 109-117.
- Nagpal, R., Mainali, R., Ahmadi, S., Wang, S., Singh, R., Kavanagh K., Kitzman, D. W., Kushugulova, A., Marotta, F., Yadav, H. (2018) Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. *Nutr. healthy aging* **4**, 267-285.

Parekh, P. J., Balart, L. A., Johnson, D. A. (2015) The Influence of the Gut Microbiome on Obesity, Metabolic Syndrome and Gastrointestinal Disease. *Clin. Trans. Gastroen.* **6**, e91.

Petersen, C., Round, J. L. (2014) Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell. Microbiol.* **16**, 1024-1033.

Plaza-Díaz, J., Fernández-Caballero, J. Á., Chueca, N., García, F., Gómez-Llorente, C., Sáez-Lara, M. J., Fontana, L., Gil, Á. (2015) Pyrosequencing Analysis Reveals Changes in Intestinal Microbiota of Healthy Adults Who Received a Daily Dose of Immunomodulatory Probiotic Strains. *Nutrients* **7**, 3999-4015.

Power, S. E., O'Toole, P. W., Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. (2014) Intestinal microbiota, diet and health. *Brit. J. Nutr.* **111**, 387-402.

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.-M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H. B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Doré, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., MetaHIT Consortium, Bork, P., Ehrlich, S. D., Wang, J. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59-65.

Rabot, S., Membrez, M., Bruneau, A., Gérard, P., Harach, T., Moser, M., Raymond, F., Mansourian, R., Chou, C. J. (2010) Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *The FASEB Journal* **24**, 4948-4959.

Ringel, Y., Ringel-Kulka, T. (2015) The Intestinal Microbiota and Irritable Bowel Syndrome. *J. Clin. Gastroenterol.* **49**, 56-59.

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 D.* **26(1)**, 1651-2235.

Rolhion, N., Chassaing, B. (2016) When pathogenic bacteria meet the intestinal microbiota. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **371**, 20150504. doi: 10.1098/rstb.2015.0504

Rooks, M. G., Garrett, W. S. (2016) Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 341-352.

Russell, W. R., Gratz, S. W., Duncan, S. H., Holtrop, G., Ince, J., Scobbie, L., Duncan, G., Johnstone, A. M., Lobley, G. E., Wallace, R. J., Duthie, G. G., Flint, H. J. (2011) High – protein, reduced – carbohydrate weight – loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health. *Am. J. Clin. Nutr.* **93**, 1062-1072.

Salazar, N., Arboleya, S., Valdés, L., Stanton, C., Ross, P., Ruiz, L., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G. (2014) The human intestinal microbiome at extreme ages of life. Dietary intervention as a way to counteract alterations. *Front. Genet.* **5**, 406. doi: 10.3389/fgene.2014.00406

Salazar, N., Valdés-Varela, L., Gonzáles, S., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G. (2016) Nutrition and the gut microbiome in the elderly. *Gut microbes* **8**, 82-97.

Sánchez, B., Delgado, S., Blanco-Míguez, A., Lourenço, A., Gueimonde, M., Margolles, A. (2017) Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol. Nutr. Food Res.* **61**, 1600240.

Sandek, A., Bauditz, J., Swidsinski, A., Buhner, S., Weber-Eibel, J., von Haehling, S., Schroedl, W., Karhausen, T., Doehner, W., Rauchhaus, M., Poole-Wilson, P., Volk, H. D., Lochs, H., Anker, S. D. (2007) Altered Intestinal Function in Patients With Chronic Heart Failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**, 1561-1569.

Sandholt, C.H., Hanse, T., Pedersen, O. (2012) Beyond the fourth wave of genome-wide obesity association studies. *Nutr. Diabetes.* (objavljeno online 30. srpnja 2012.). doi: 10.1038/nutd.2012.9

Schulz, M. D., Atay, C., Heringer, J., Romrig, F. K., Schwitalla, S., Aydin, B., Ziegler, P. K., Varga, J., Reindl, W., Pommerenke, C., Salinas-Riester, G., Böck, A., Alpert, C., Blaut, M., Polson, S. C., Brandl, L., Kirchner, T., Greten, F. R., Polson, S. W., Arkan, M. C. (2014) High-fat diet-mediated dysbiosis promotes intestinal carcinogenesis independent of obesity. *Nature* **514**, 508-512.

Schwabe, R. F., Jobin, C. (2013) The microbiome and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 800-812.

Schwiertz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N. A., Donus, C., Hardt, P. D. (2010) Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. *Obesity* **18**, 190-195.

- Scott, K. P., Jean-Michel, A., Midtvedt, T., van Hemert, S. (2015) Manipulating the gut microbiota to maintain health and treat disease. *Microb. Ecol. Health D.* **26**, 25877.
- Seganfredo, F. B., Blume, C. A., Moehlecke, M., Giongo, A., Casagrande, D. S., Spolidoro, J. V. N., Padoin, A. V., Schaan, B. D., Mottin, C. C. (2017) Weight-loss interventions and gut microbiota changes in overweight and obese patients: a systematic review. *Obes. Rev.* **18**, 832-851.
- Shahinas, D., Silverman, M., Sittler, T., Chiu, C., Kim, P., Allen-Vercoe, E., Weese, S., Wong, A., Low, D. E., Pillai, D. R. (2012) Toward an Understanding of Changes in Diversity Associated with Fecal Microbiome Transplantation Based on 16S Rrna Gene Deep Sequencing. *MBio.* **3(5)**, e00338-12. doi: 10.1128/mBio.00338-12
- Sheflin, A. M., Melby, C. L., Carbonero, F., Weir, T. L. (2017) Linking dietary patterns with gut microbial composition and function. *Gut microbes* **8**, 113-129.
- Shin, N. R., Whon, T. W., Bae, J. W. (2015) *Proteobacteria*: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.* **33(9)**, 496-503.
- Silk, D. B. A., Davis, A., Vulevic, J., Tzortzis, G., Gibson, G. R. (2009) Clinical trial: the effects of a trans-galactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharm. Ther.* **29**, 508-518.
- 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., Yatsunencko, T., Manary, M. J., Trehan, I., Mkakosya, R., Cheng, J., Kau, A. L., Rich, S. S., Concannon, P., Mychaleckyj, J. C., Liu, J., Hought, 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.
- Sokol, H., Lay, C., Seksik, P., Tannock, G. W. (2008) Analysis of Bacterial Bowel Communities of IBD Patients: What Has It Revealed? *Inflamm. Bowel Dis.* **14**, 858-867.
- Stecher, B. (2015) The Roles of Inflammation, Nutrient Availability and the Commensal Microbiota in Enteric Pathogen Infection. U: *Metabolism and Bacterial Pathogenesis*, (Conway, T., Cohen, P., ured.), ASM Press, Washington DC, str. 297-320.

Stedman`s (2006) Stedman`s Medical Dictionary, 28. izd., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.

Strober, W., Fuss, I., Mannon, P. (2007) The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* **117**, 514-521.

Subramanian, S., Huq, S., Yatsunencko, T., Haque, R., Mahfuz, M., Alam, M. A., Benezra, A., DeStefano, J., Meier, M. F., Muegge, B. D., Barratt, M. J., VanArendonk, L. G., Zhang, Q., Province, M. A., Petri Jr, W. A., Ahmed, T., Gordon, J. I. (2014) Persistent gut microbiota immaturity in malnourished Bangladeshi children. *Nature* **510**, 417-421.

Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman – Schapira, G., Thaiss, C. A., Maza, O., Israeli, D., Zmora, N., Gilad, S., Weinberger, A., Kuperman, Y., Harmelin, A., Kolodkin – Gal, I., Shapiro, H., Halpern, Z., Segal, E., Elinav, E. (2014) Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature* **514**, 181-186.

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.

The Human Microbiome Project Consortium (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**, 207-214.

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

Tilg, H., Moschen, A. R. (2014) Microbiota and diabetes: an evolving relationship. *Gut* **63**, 1513-1521.

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., Gordon, J. I. (2006) An obesity – associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**, 1027-1031.

Verdam, F. J., Fuentes, S., de Jonge, C., Zoetendal, E. G., Erbil, R., Greve, J. W., Buurman, W. A., de Vos, W. M., Rensen, S. S. (2013) Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. *Obesity* **21**, 607-615.

Voreades, N., Kozil, A., Weir, T. L. (2014) Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Front. Microbiol.* **5**, 494. doi: 10.3389/fmicb.2014.00494

Walker, R. W., Clemente, J. C., Peter, I., Loos, R. J. F. (2017) The prenatal gut microbiome: are we colonized with bacteria in utero?. *Pediatr. Obes.* **12**, 3-17.

Wang, J., Tang, H., Zhang, C., Zhao, Y., Derrien, M., Rocher, E., van-Hylckama Vlieg, J. E. T., Strissel, K., Zhao, L., Obin, M, Shen, J. (2015) Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *The ISME J.* **9**, 1-15.

WCRF (2018) Colorectal cancer. How diet, nutrition and physical activity affect colorectal (bowel) cancer risk. WCRF – World Cancer Research Fund, <<https://www.wcrf.org/dietandcancer/colorectal-cancer>>. Pristupljeno 29. studenoga 2018.

WHO (2011) Waist Circumference and Waist-Hip Ratio. Report of a WHO Expert Consultation. WHO – World Health Organization, [online]<<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44583/?sequence=1>>. Pristupljeno 5. veljače 2019.

WHO (2018) BMI classification. WHO - World Health Organization, <http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html>. Pristupljeno 26. studenoga 2018.

Williams, B., Mancia, G., Spiering, W., Agabiti Rosei, E., Azizi, M., Burnier, M., Clement, D. L., Coca, A., de Simone, G., Dominiczak, A., Kahan, T., Mahfoud, F., Redon, J., Ruilope, L., Zanchetti, A., Kerins, M., Kjeldsen, S. E., Kreutz, R., Laurent, S., Lip, G. Y. H., mcManus, R., Narkiewicz, K., Ruschitzka, F., Schmieder, R. E., Shlyakhto, E., Tsioufis, C., Aboyans, V., Desormais, I., ESC Scientific Document Group. (2018) 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur. Heart J.* **39**, 3021-3104. doi: 10.1093/eurheartj/ehy339

Willson, K., Situ, C. (2017) Systematic Review on Effects of Diet on Gut Microbiota in Relation to Metabolic Syndromes. *J. Clin. Nutr. Metab.* **1(2)**, [online] <https://www.scitechnol.com/peer-review/systematic-review-on-effects-of-diet-on-gut-microbiota-in-relation-to-metabolic-syndromes-2Tp9.php?article_id=7001>. Pristupljeno 6. studenoga 2018.

Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y. Y., Keilbaugh, S. A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W. A., Knight, R., Sinha, R., Gilroy, E., Gupta, K., Baldassano, R., Nessel, L., Li, H., Bushman, F. D., Lewis, J. D. (2011) Linking Long – Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science* **334**, 105-108.

Xu, Z., Knight, R. (2015) Dietary effects on human gut microbiome diversity. *Brit. J. Nutr.* **113**, S1-S5.

Yang, Y., Jobin, C. (2014) Microbial imbalance and intestinal pathologies: connections and contributions. *Dis. Model. Mech.* **7**, 1131-1142.

Yin, J., Liao, S. X., He, J., Wang, S., Xia, G. H., Liu, F. T., Zhu, J. J., You, C., Chen, Q., Zhou, L., Pan, S. Y., Zhou, H. W. (2015) Dysbiosis of Gut Microbiota With Reduced Trimethylamine-N-Oxide Level in Patients With Large-Artery Atherosclerotic Stroke or Transient Ischemic Attack. *J. Am. Heart Assoc.* **4(11)**, e002699. doi: 10.1161/JAHA.115002699

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.

Zhang, Y. J., Li, S., Gan, R. Y., Zhou, T., Xu, D. P., Li, H. B. (2015) Impacts of Gut Bacteria on Human Health and Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 7493-7519.

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.

Ivana Gulec

Ime i prezime studenta