

# Utjecaj pretilosti i životnog stila na crijevnu mikrobiotu

---

**Balorda, Patricia**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:133873>

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

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



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2020.

Patricia Balorda

1181/N

**UTJECAJ PRETILOST I  
ŽIVOTNOG STILA NA CRIJEVNU  
MIKROBIOTU**

Rad je izrađen u Laboratoriju za bioinformatiku na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Jurice Žučka, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## **ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem svom mentoru, izv.prof.dr.sc. Jurici Žučku na strpljenju, savjetima i pomoći pri izradi diplomskog rada. Posebno se želim zahvaliti svojoj obitelji na bezuvjetnoj ljubavi i podršci. Zahvaljujem se i prijateljima na savjetima i podršci tijekom studiranja.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

### UTJECAJ PRETILOSTI I ŽIVOTNOG STILA NA CRIJEVNU MIKROBIOTU

*Patricia Balorda, 1181/N*

**Sažetak:** Pretilost, koja je danas sve češća pojava, se povezuje s razvojem kroničnih bolesti i povećanim mortalitetom. Zbog prevencije pretilosti važno je otkriti čimbenike koji utječu na njen razvoj. Pretilost se počela povezivati s promjenom u sastavu crijevne mikrobiote. Cilj rada bio je provjeriti povezanost indeksa tjelesne mase (ITM) i životnog stila sa sastavom crijevne mikrobiote. U rad je uključeno 25 pretilih ( $ITM > 27 \text{ kg m}^{-2}$ ) i 15 pothranjenih ( $ITM < 20 \text{ kg m}^{-2}$ ) ispitanika koji su ispunjavali opći upitnik o životnom stilu. Sastav crijevne mikrobiote je određen izolacijom DNA iz uzoraka fecesa ispitanika i njenim sekvencioniranjem na Illumina MiSeq uređaju. Sirovi podaci sekvencioniranja su obrađeni QIIME 2 programom. Prema rezultatima ovog rada nije uočen statistički značajan utjecaj ITM i životnog stila na sastav i bogatstvo crijevne mikrobiote na promatranoj grupi ispitanika.

**Ključne riječi:** pretilost, životni stil, crijevna mikrobiota, QIIME

**Rad sadrži:** 50 stranica, 18 slika, 83 literaturnih navoda, 2 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc.dr.sc. *Janko Diminić*
2. Izv.prof.dr.sc. *Jurica Žučko*
3. Doc.dr.sc. *Andreja Leboš Pavunc*
4. Doc.dr.sc. *Ivana Rumora Samarin* (zamjena)

**Datum obrane:** 22. prosinca 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Nutrition

### IMPACT OF OBESITY AND LIFESTYLE FACTORS ON GUT MICROBIOTA

*Patricia Balorda, 1181/N*

**Abstract:** Obesity, which has become prevalent in recent years, is associated with development of chronic diseases and increased mortality. Because of that it is important to analyse factors that have impact on obesity development. Some studies point to altered gut microbiota in obese subjects. The aim of this study was to analyse the impact of Body Mass Index (BMI) and lifestyle factors on gut microbiota. Subjects filled out a general questionnaire containing lifestyle questions. Study included 15 underweight (BMI < 20 kg m<sup>-2</sup>) and 25 overweight (BMI > 27 kg m<sup>-2</sup>) subjects. Gut microbiota composition was determined by isolation of DNA from fecal samples which was then sequenced by Illumina MiSeq technology. Raw sequencing data was processed using QIIME 2. The results show no statistical significance of BMI and lifestyle factors on composition and richness of gut microbiota in test subjects.

**Keywords:** *obesity, lifestyle, gut microbiota, QIIME*

**Thesis contains:** 50 pages, 18 figures, 83 references, 2 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. *Jurica Žučko, Associate Professor*

**Reviewers:**

1. PhD. *Janko Diminić, Assistant professor*
2. PhD. *Jurica Žučko, Associate professor*
3. PhD. *Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor*
4. PhD. *Ivana Rumora Samarin, Assistant professor (substitute)*

**Thesis defended:** December 22nd 2020

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. PRETILOST .....	2
2.1.1. Klasifikacija, definicija i mjerenje pretilosti .....	2
2.1.2. Utjecaj pretilosti na zdravlje .....	4
2.1.3. Uzroci pretilosti .....	7
2.2. CRIJEVNA MIKROBIOTA.....	11
2.2.1. Razvoj crijevne mikrobiote tijekom života .....	12
2.2.2. Čimbenici koji utječu na crijevnju mikrobiotu.....	14
2.2.3. Određivanje sastava crijevne mikrobiote .....	19
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	23
3.1. ISPITANICI.....	23
3.2. METODE RADA.....	23
3.2.1. Dijetetičke metode.....	23
3.2.2. Antropometrijske metode.....	24
3.2.3. Genomičke metode .....	24
3.2.4. Obrada podataka sekvenciranja DNA QIIME 2 programom .....	25
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	31
4.1. ISPITANICI.....	31
4.2. TAKSONOMSKA ZASTUPLJENOST MIKROORGANIZAMA U UZORCIMA.....	33
4.3. ALFA RAZNOLIKOST .....	35
4.4. BETA RAZNOLIKOST .....	40
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	42
<b>6. LITERATURA</b> .....	43
<b>PRILOZI</b>	
PRILOG 1. UPITNIK PROJEKTA BIODINAMIK	
PRILOG 2. UPITNIK PROJEKTA MICROEQUILIBRIUM	



# 1. UVOD

Prekomjerna tjelesna masa se kroz povijest smatrala pokazateljem zdravlja i bogatstva, ali se to počelo mijenjati u 19. stoljeću kad dolazi sve više dokaza o njenom lošem utjecaju na zdravlje (Eknoyan, 2006). Prekomjerna tjelesna masa je 1998. godine definirana mjerom indeksa tjelesne mase (ITM) većeg od  $25 \text{ kg m}^{-2}$ , a pretilost kao ITM veći od  $30 \text{ kg m}^{-2}$  (Komaroff, 2016). Pretilost se definira kao abnormalno nakupljanje masnog tkiva u mjeri da predstavlja opasnost za zdravlje (WHO, 2020). U praksi procjena ITM i udjela masnog tkiva se vrši antropometrijskim metodama: mjerenjem tjelesne mase, tjelesne visine, opsega struka, kožnih nabora te omjerom struka i bokova (Purnell, 2018). Pretilost se povezuje s razvojem bolesti kardiovaskularnog sustava, tumorima, razvojem dijabetesa melitusa tip II itd. te na njihov razvoj velik učinak ima bijelo masno tkivo, posebno u području abdomena (Ellulu i sur., 2017; Fruh, 2017). Uzroci pretilosti su kompleksni te oni uključuju utjecaj gena, rasu, spol, prehranu, prehrambene poremećaje, utjecaj socijalnih čimbenika, ekonomskih čimbenika, uzimanje lijekova i određene bolesti (NHS, 2020; McCuen-Wurst i sur., 2018; Thaker, 2017; Hruby i Hu, 2015). U zadnje vrijeme razvoj pretilosti se povezuje i s crijevnom mikrobiotom. Neke studije navode da pretili ispitanici imaju veći udio koljena *Firmicutes* te smanjeni udio koljena *Bacteroidetes* (Davis, 2016), dok druge studije to opovrgavaju (Wan i sur., 2020).

Crijevna mikrobiota ima različite uloge u organizmu domaćina, a samo neke od njih su jačanje imunološkog sustava, proizvodnja vitamina i proizvodnja kratkolančanih masnih kiselina (Telle-Hansen i sur., 2018). Čimbenici koji utječu na crijevnu mikrobiotu su raznoliki, a u ovom radu su uzeti u obzir ITM i životni stil (konzumiranje alkohola, kave, pušenje i tjelesna aktivnost). Sastav i funkcije crijevne mikrobiote se mogu odrediti izolacijom kultura, taksonomskim profilom, funkcionalnih profilom i gnotobiotičkim životinjskim modelima. Određivanje taksonomskog profila podrazumjeva ciljano sekvencioniranje i/ili sekvencioniranje cijelog metagenoma (Koppel i Balskus, 2016), a za obradu podataka sekvencioniranja se koriste bioinformatički programi (Marizzoni i sur., 2020).

Cilj ovog rada je sekvencioniranjem 16S rRNA i obradom podataka u QIIME 2 programu utvrditi postoje li razlike u crijevnoj mikrobioti između pretilih i pothranjenih ispitanika te da li na sastav i bogatstvo cijevne mikrobiote utječe životni stil.

## 2. TEORIJSKI DIO

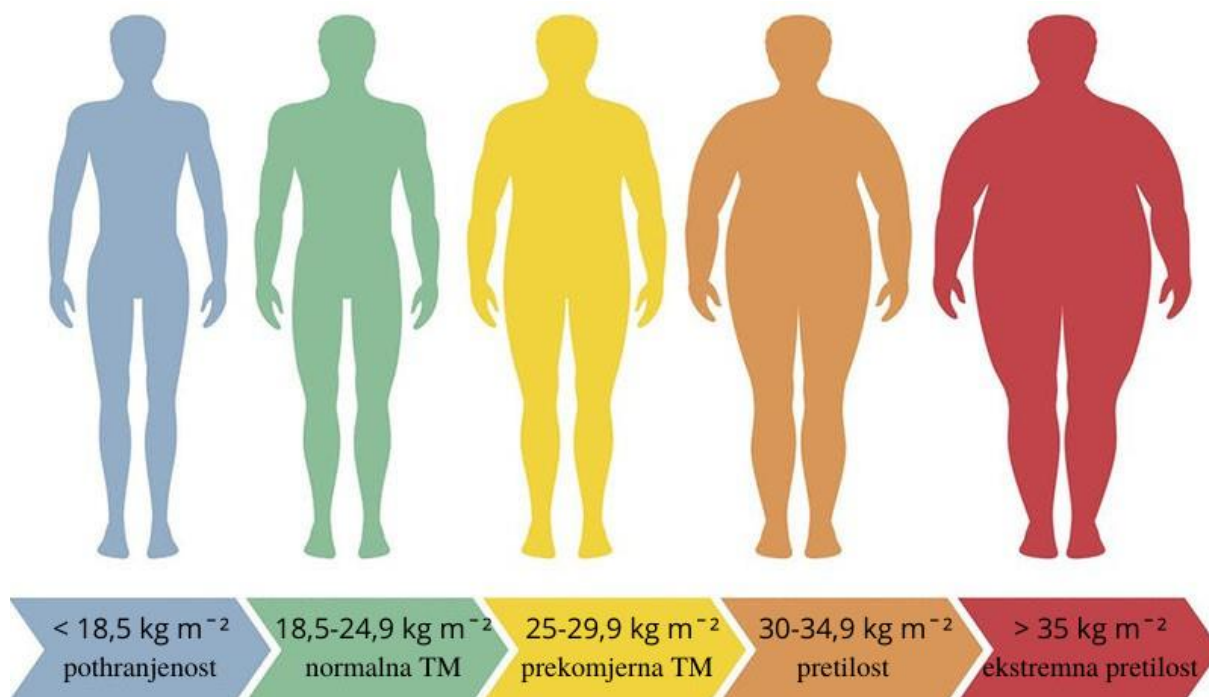
### 2.1. PRETILOST

Nestašica hrane tijekom povijesti čovječanstva dovela je do toga da se prekomjerna tjelesna masa smatrala poželjnom te se često u pozitivnom svijetlu spominjala kroz umjetnost, literaturu i bilješke liječnika. Utjecaj pretilosti na kvalitetu života počeo se primjećivati u 18. stoljeću, ali tek pri sredini 19. stoljeća se prepoznaje kao uzrok lošeg zdravlja, a u 20. stoljeću pretilost se počela povezivati s mortalitetom. Studije o pretilosti započele su 1960-ih godina te se tad masno tkivo počelo definirati kao organ s vlastitim hormonima, receptorima i genima, a ne samo kao tkivo koje služi za pohranu energije (Eknoyan, 2006).

#### 2.1.1. Klasifikacija, definicija i mjerenje pretilosti

U Ženevi je 1995. godine Komisija stručnjaka za fizički status (Expert Committee on Physical Status) Svjetske zdravstvene organizacije (World Health Organization - WHO) objavila izvještaj Uporaba i interpretacija antropometrije (The Use and Interpretation of Anthropometry) u kojem su prihvaćene osnovne antropometrijske mjere tjelesne visine i tjelesne mase. Preporučeno je da se one kombiniraju u dvije osnovne mjere za odrasle: Indeks Tjelesne Mase (ITM; tjelesna masa/tjelesna visina<sup>2</sup>) ili Ponderal Indeks (tjelesna masa/tjelesna visina<sup>3</sup>) te tri mjere za djecu: tjelesna masa za tjelesnu visinu, tjelesna visina za godine i tjelesna masa za godine. Također je preporučeno da su točke prijelaza za ITM 25, 30 i 40 zbog povezanosti ITM i mortaliteta. Kliničke smjernice za identifikaciju, evaluaciju i tretman prekomjerne tjelesne mase i pretilosti kod odraslih (Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults) Nacionalnog instituta za zdravlje (National Institutes of Health - NIH) su 1998. godine definirale prekomjernu tjelesnu masu kao ITM od 25 do 29,9 kg m<sup>-2</sup>, a pretilost kao ITM veći od 30 kg m<sup>-2</sup> (Komaroff, 2016).

Pretilost se s obzirom na ITM može podijeliti u 3 stupnja: prvi stupanj pretilosti (ITM od 30 do 34,9 kg m<sup>-2</sup>), drugi stupanj pretilosti (ITM od 35 do 39,9 kg m<sup>-2</sup>) i treći stupanj pretilosti (ITM veći od 40 kg m<sup>-2</sup>) (Aronne, 2002). ITM je prikazan slikom 1.



**Slika 1.** Prikaz ITM (The medical biochemistry page, 2020)

Svjetska zdravstvena organizacija (World Health Organization - WHO) je 2000. godine definirala pretilost kao abnormalno nakupljanje masnog tkiva u mjeri da predstavlja opasnost za zdravlje. WHO navodi Indeks Tjelesne Mase (ITM) (Body Mass Indeks - BMI) kao metodu za određivanje pretilosti. Indeks tjelesne mase računa se na način da se tjelesna masa u kilogramima podijeli s kvadriranom tjelesnom visinom u metrima (WHO, 2020).

Postotak pretilih u Hrvatskoj iznosi 20,37 %, od čega su 20,14 % muškarci, a 20,60 % žene. U Europi postotak pretilih iznosi 20 %, dok u Sjedinjenim Američkim Državama iznosi 31 % (Musić Milanović, 2020).

Najtočnije metode za mjerenje udjela masnog tkiva kao što su hidrodensitometrija (podvodno vaganje), denzitometrija (eng. dual-energy X-ray absorptiometry - DEXA ili DXA), kompjuterizirana tomografija (CT) i magnetska rezonancija (MRI) nisu praktične za korištenje u svakodnevnoj kliničkoj upotrebi. Procjena udjela masnog tkiva antropometrijskim mjerama kao što su ITM, opseg struka, omjer struka i bokova te mjerenje kožnih nabora imaju ograničenja u usporedbi s prije navedenim metodama, ali su prikladnije za upotrebu u praksi. Masno tkivo se može mjeriti indirektno i bioimpedancijom (BIA). Ova metoda se više koristi kod sportaša zbog toga što na interpretaciju rezultata mogu utjecati uobičajena stanja koja prate pretilost kao zatajenje srca i kronične bolesti bubrega (Ghesmaty Sangachin i sur., 2018; Purnell, 2018).

Kvadriranjem visine u formuli za ITM smanjuje se utjecaj dužine nogu na rezultat te se time normalizira preraspodjela tjelesne mase za svaku visinu odnosno smanjuje se utjecaj visine na vezu između težine i visine. To je važno jer je većina masnog tkiva u trupu. Problem s ITM kao mjerom za pretilost je da ona ne razlikuje masnu masu i nemasnu masu odnosno osoba može imati visok ITM, ali nizak udio masnog tkiva i obrnuto (Nuttall, 2015).

Opseg struka je važna mjera za određivanje nakupljanja abdominalnog masnog tkiva. Abdominalno masno tkivo je primarno visceralno, metabolički aktivno masno tkivo koje okružuje organe te se asocira s metaboličkom neravnotežom i predstavlja rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti i povezanih stanja (Hurby i Hu, 2015).

Muškarci s većim rizikom za dijabetes i kardiovaskularne bolesti imaju opseg struka veći od 102 centimetara (cm), a žene veći od 88 cm. Tako da se osoba s prekomjernom tjelesnom masom i dominantno abdominalnim masnim tkivom smatra u većem riziku iako po standardima ITM nije pretila (Purnell, 2018).

Omjer struka i bokova nije prikladan za procjenu pretilosti zbog toga što pretili pacijent i pacijent normalne tjelesne mase mogu imati isti rezultat omjera te on prilikom gubitka na tjelesnoj masi može ostati isti. Omjer struka i bokova se najčešće koristi uz druge antropometrijske metode te pri procjeni rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (de Koning i sur., 2007).

Svjetska zdravstvena organizacija je definirala granične rezultate omjera struka i bokova koji se povezuju s rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti, a to su 0,9 za muškarce i 0,85 za žene. Omjer struka i bokova se računa tako da se podijeli opseg struka i opseg bokova u centimetrima (WHO, 2008).

Procjena udjela masnog tkiva mjerenjem kožnih nabora kaliperom najčešće se koristi kod pojedinaca normalne tjelesne mase zbog praktičnosti i limita skale na kaliperu. Nabori kože se mjere na bicepsu, tricepsu, subskapularno i suprailijačno te se te mjere dalje uvrštavaju u jednadžbe koje su specifične za spol i dob (Kuriyan, 2018; Duren i sur., 2008).

### 2.1.2. Utjecaj pretilosti na zdravlje

Neke od bolesti koje se povezuju s pretilošću su dijabetes melitus tip II, kardiovaskularne bolesti, hipertenzija, različite vrste tumora i astma (prikazano slikom 2). Pretilost u djetinjstvu i adolescenciji dovodi do povećanog rizika za razvoj bolesti i prerane

smrti. Međutim smanjenje tjelesne mase od 5 % -10 % može znatno smanjiti rizik za razvoj bolesti (Fruh, 2017).

Prema raspodjeli masnog tkiva razlikuju se dva tipa debljine: abdominalna i ginoidna. Kod abdominalnog ili androindnog tipa debljine dolazi do nakupljanja masnog tkiva u području trbuha, posebno visceralnog masnog tkiva. Dok je kod ginoidnog tipa karakteristično nakupljanje masnog tkiva oko bokova i natkoljenice (Perić i sur., 2011).

Masno tkivo se dijeli na bijelo masno tkivo i smeđe masno tkivo. Bijelo masno tkivo luči proteine koji utječu na razvoj inzulinske rezistencije, ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti (Cercato i Fonseca, 2019).

Smeđe masno tkivo u tijelu provodi termogenezu, odnosno proizvodi toplinu oksidacijom masnih kiselina. Odrasli ga sadrže manje nego djeca. Smeđe masno tkivo dobiva boju zbog toga što je bogato krvnim žilama i mitohondrijima (Coelho i sur., 2013).

Smeđe masno tkivo proizvodi toplinu preko proteina razdvajanja 1 (eng. uncoupling protein 1 - UCP1) koji se nalazi u unutrašnjoj membrani mitohondrija. UCP1 odvaja mitohondrijsku oksidativnu fosforilaciju od proizvodnje ATP-a i time gubi kemijsku energiju kao toplinu. Najjednostavniji način da se poveća udio smeđeg masnog tkiva je izlaganje niskim temperaturama (Elattar i Satyanarayana, 2015).

Kod pretilih pojedinaca sadržaj smeđeg masnog tkiva je manji jer pri razvoju pretilosti dolazi do njegove pretvorbe u stanice koje su slične bijelom masnom tkivu (Kotzbeck i sur., 2018).

Pri pretilosti bijelo masno tkivo postaje nefunkcionalno te se ne proširuje kako treba da bi u obliku lipida pohranilo višak energije. Zbog toga dolazi do nakupljanja masti u drugim tkivima što uzrokuje upalu i inzulinsku rezistenciju (Longo i sur., 2019).

Bijelo masno tkivo se dalje dijeli na potkožno i visceralno masno tkivo. Visceralno masno tkivo se povezuje s inzulinskom rezistencijom i povećanim rizikom za razvoj metaboličkog sindroma dok se potkožno povezuje sa zaštitnim učinkom (Luong i sur., 2019).

Neki od adipokina koje luči bijelo masno tkivo su adiponektin, leptin, rezistin, faktor tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ), interleukin 6 (IL-6) i monocit kemoatraktni protein 1 (MCP-1). Trećina cirkulirajućeg IL-6 je proizvedena u masnom tkivu. Nakon stimulacije s pretjeranom količinom nutrijenata dolazi do hipertrofije i hiperplazije stanica masnog tkiva (adipocita). S povećanjem veličine adipocita odnosno hiperplazijom adipocita dolazi do smanjenog dotoka

krvi u adipocite što dovodi do hipoksije. Zbog toga makrofagi ulaze u masno tkivo što dovodi do stvaranja pro-upalnih medijatora. Makrofagi luče vlastite citokine i inhibiraju diferencijaciju adipocita te zbog toga dolazi do njihove hipertrofije i promjena u sekreciji adipokina što rezultira pohranom masti u jetri, mišićima i ostalim tkivima (Ellulu i sur., 2017; Perić i sur., 2011).

Adiponektin je proteinski hormon koji smanjuje rizik za aterosklerozu, dijabetes melitus tip II i inzulinsku rezistenciju. Serumski adiponektin je značajno smanjen kod pretilih pojedinaca te visceralni adipociti proizvode više adiponektina od potkožnih adipocita. Postoji pretpostavka da su povećane serumske razine pro-upalnih medijatora IL-6 i TNF- $\alpha$  odgovorne za smanjenje sinteze i sekrecije adiponektina te zbog toga njegove smanjene zaštitne funkcije na kardiovaskularni sustav (Ellulu i sur., 2017).

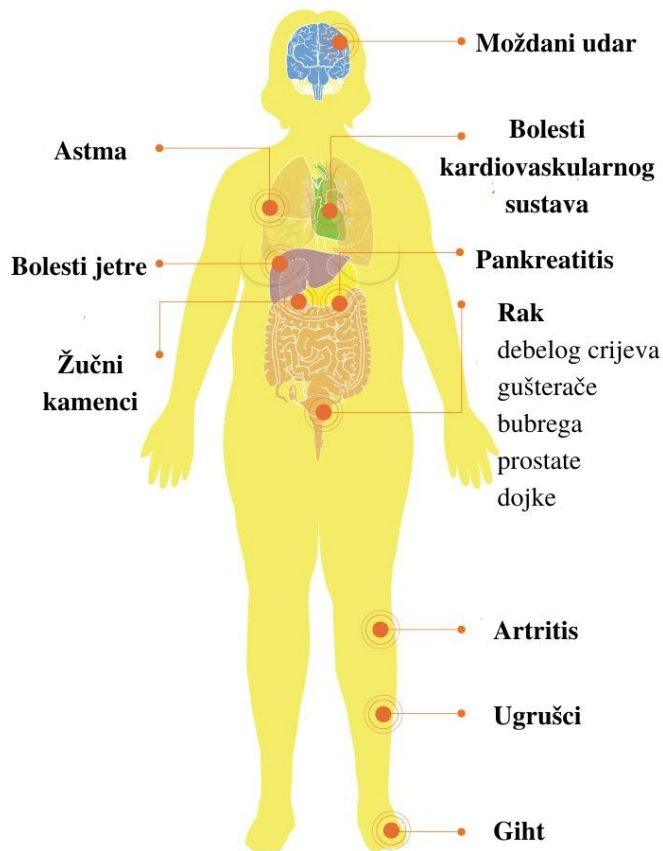
Neki od faktora koji utječu na razvoj kardiovaskularnih bolesti kod pretilih su inzulinska rezistencija, hipertenzija, dislipidemija, hipertrofija srčanog mišića, poremećena ventrikularna i dijastolička funkcija i aritmije. Kod pretilih također dolazi do lučenja pro-upalnih citokina iz jetre ili bijelog masnog tkiva te to može utjecati na mehanizam inzulinske rezistencije, nastanak plaka na arterijama, hipertrofiju miokarda te pogoršanje kardiovaskularnih bolesti (Apovian i Gokce, 2012).

Kod pretilosti dolazi do povećanja razine leptina. Leptin utječe na proizvodnju dušikovog oksida što dovodi do zadržavanja natrija, vazokonstrikcije te povećanja krvnog tlaka (Cercato i Fonseca, 2019).

Pretilost povećava rizik za razvoj dijabetesa melitusa tipa II zbog toga što bijelo masno tkivo lučenjem adipokina, citokina i kemokina ometa inzulinom regulirane procese kao što su homeostaza glukoze i metabolizam lipida (Perić i sur., 2011).

Pretilost povećava rizik za razvoj raka 1,5 do 2,4 puta, pogotovo tumora gastrointestinalnog sustava. Vrste raka koje se najčešće povezuju s pretilošću su rak dojke kod žena u postmenopauzi, rak debelog crijeva, rak endometrija, rak jednjaka i rak bubrega. Leptin stimulira proliferaciju stanica i rast tumora te je kod nekoliko vrsta raka uočena povećana ekspresija receptora za leptin. Povećane razine leptina povećavaju rizik za razvoj raka debelog crijeva i raka dojke. Žene u postmenopauzi sa širim opsegom struka najčešće imaju povećanu razinu leptina te ih to dodatno stavlja u veći rizik za razvoj raka dojke. Također povećano lučenje TNF- $\alpha$  i IL-6 povećava rizik za razvoj raka debelog crijeva. Adiponektin ima ulogu u metabolizmu glukoze, povećanju osjetljivosti na inzulin i oksidaciji masnih kiselina te bi on

mogao prevenirati rast tumora povećanjem inzulinske osjetljivosti što dovodi do smanjenja razine inzulina u krvi i faktora rasta sličnog inzulinu 1 (IGF-1) (Stone i sur., 2018).



**Slika 2.** Utjecaj pretilosti na zdravlje (CDC, 2020)

### 2.1.3. Uzroci pretilosti

Uzroci pretilosti su kompleksni i još uvijek ne u potpunosti razjašnjeni. Smatra se da je glavni razlog razvoja pretilosti disbalans energije između unosa kalorija i njihove potrošnje, što stvara višak energije odnosno pozitivnu energetska ravnotežu te rezultira viškom tjelesne mase. Pretjeran unos energije djelomično je rezultat socijalnih i ekonomskih promjena na razini koja je izvan kontrole pojedinaca. Neke od njih su ekonomski rast, dostupnost i obilnost jeftine i nutrijentima siromašne hrane, industrijalizacija i urbanizacija. Faktori na koje ne možemo utjecati su geni, rasa i spol. Prehrambeno ponašanje pojedinca je najčešće odgovor na vanjske faktore i na njega se najviše može utjecati povećavanjem svijesti pojedinca i edukacijom (Hruby i Hu, 2015).

Obiteljska povijest pretilosti je rizik za razvoj pretilosti u djetinjstvu. Ako je jedan roditelj pretio rizik za razvoj pretilosti kod djece je 2,5 do 4 puta veći, a 10 puta veći ako su oba

roditelja pretila u usporedbi ako dijete ima roditelje adekvatne tjelesne mase. Genetski faktori utječu na postotak masnog tkiva, opseg struka, razinu tjelesne aktivnost i potrošnju energije. Visoka razina tjelesne aktivnosti može značajno smanjiti utjecaj gena na ITM (Choquet i Meyre, 2011).

Ako pretilost ima genetsku podlogu razlikuje se, ovisno o broju gena povezanih s razvojem pretilosti, monogenetski, sindromski i poligenetski uzrokovanu pretilost. Monogenetska je uzrokovana mutacijom jednog gena te se primarno događa u leptin-melanokortin putu. Monogenetska pretilost uglavnom utječe na regulaciju apetita. Mutacije se najčešće događaju na genima za leptin (LEP), receptoru leptina (LEPR), proopiomelanokortinu (POMC) i receptoru melanokortin 4 (MC4R). Sindromska pretilost je pretilost koja se povezuje s određenim fenotipovima kao što su malformacije organa i abnormalnosti razvoja živčanog sustava. Karakterizira ju skoro 100 različitih sindroma. Može biti uzrokovana promjenom u jednom genu ili kromosomskoj regiji koja obuhvaća više gena. Najčešći oblici sindromske pretilosti su Bardet Biedl i Prader Willi sindrom. Poligenetska pretilost je uzrokovana mutacijom više gena čiji učinak može biti povećan utjecajem okoliša. Poligenetska pretilost je češća od monogenetske pretilosti (Thaker, 2017).

Neke bolesti također mogu povećati rizik za razvoj pretilosti, kao na primjer hipotireoza i Cushingov sindrom (NHS, 2020).

Hipotireozu karakterizira smanjena funkcija štitne žlijezde što znači da dolazi do smanjenog izlučivanja hormona štitnjače (trijodtironin (T3) i tiroksin (T4)). Povezuje se sa smanjenom termogenezom, nižim bazalnim metabolizmom i smanjenom bubrežnom funkcijom što vodi do zadržavanja tekućine. Hormoni štitnjače potiču glukoneogenezu, lipolizu i lipogenezu te utječu na homeostazu energije u smeđem masnom tkivu. Hipotireoza se često povezuje s pretilosti iako se dobitak na tjelesnoj masi uglavnom događa zbog zadržavanja tekućine, a ne povećanja količine masnog tkiva. Uz sve navedeno važno je napomenuti da je hipotireoza ipak češća kod pretilih pojedinaca (Ríos-Prego i sur., 2019; Sanyal i Raychaudhuri, 2016).

Cushingov sindrom je poremećaj koji nastaje zbog dugotrajne izloženosti visokim koncentracijama glukokortikoida te to vodi do povećane količine visceralnog masnog tkiva, pretilosti, dijabetesa melitusa tipa II, hipertenzije i osteoporoze. U 82 % slučajeva dolazi do povećanja na tjelesnoj masi, a od toga je pretilo 32-41 % pacijenata. Glukokortikoidi narušavaju lučenje inzulina i osjetljivost na inzulin (Scherthaner-Reiter i sur., 2019).



Prehrambeni poremećaji koji se povezuju s pretilošću su poremećaj kompulzivnog prejedanja i sindrom noćnog jedenja. Pojedinci koji pate od kompulzivnog prejedanja imaju 3-6 puta veći rizik za razvoj pretilosti dok je sindrom noćnog jedenja 2,5 puta češći kod pretilih pojedinaca. Ovi poremećaji su povezani zbog toga što oba poremećaja potiče stres, javljaju se kod drugih psihičkih poremećaja te 15-20 % pacijenata koji pate od sindroma noćnog jedenja pate i od poremećaja kompulzivnog prejedanja (McCuen-Wurst i sur., 2018).

Povećanje tjelesne mase može biti uzrokovano lijekovima kao što su lijekovi za dijabetes, steroidni hormoni, kontraceptivi, antihistaminici, inhibitori proteaza i psihotropni lijekovi (psihofarmaci) (Wright i Aronne, 2012).

Jedan od najvažnijih faktora koji pridonosi pretilosti je prehrana. Hrana visoke energetske gustoće sadrži više od 225-275 kilokalorija (kcal) na 100 grama (g). To se uglavnom odnosi na brzu hranu koja je siromašna mikronutrijentima, a bogata dodanim šećerom, procesiranim škrobom te zasićenim i trans masnim kiselinama. Na unos dodanog šećera i razvoj pretilosti jako pridonose i gazirana pića. Ona predstavljaju visok rizik za razvoj pretilosti kod djece, pogotovo u obiteljima s niskim prihodom. Dok se konzumacija mahunarki, proizvoda od cjelovitog zrna, voća, povrća i orašastih plodova povezuje sa smanjenim rizikom za razvoj pretilosti i kroničnih nezaraznih bolesti. Najbolja opcija pri prevenciji razvoja pretilosti je kombinacija adekvatne prehrane i tjelesne aktivnosti. Tjelesna aktivnost povećava gubitak masne mase te održava nemasnu masu i time vodi do boljeg sastava tijela. Za prevenciju razvoja pretilosti preporuča se 150-250 minuta tjelesne aktivnosti umjerenog intenziteta tjedno, a za održavanje gubitka na tjelesnoj masi preporuča se više od 250 minuta tjelesne aktivnosti umjerenog intenziteta tjedno. Za gubitak na tjelesnoj masi preporuča se kombinacija aerobnih vježbi i vježbi s utezima. Sjedilački način života i vrijeme provedeno ispred televizora povećavaju rizik za razvoj pretilosti za 23 %. Posebno rizična skupina su djeca i adolescenti zbog toga što se u tom razdoblju života ustaljuju navike i uče ponašanja (Romieu i sur., 2017).

Pretilost se počela povezivati i s crijevnom mikrobiotom. Pretili pojedinci imaju malu raznolikost fekalnih bakterija te se to povezuje s dislipidemijom. Pretili pojedinci također u crijevnoj mikrobioti imaju više bakterija koljena *Firmicutes* te do 90 % manje koljena *Bacteroidetes* od pojedinaca adekvatne tjelesne mase. Konzumacija visokokalorične hrane povećava broj bakterija roda *Firmicutes* za 20 % te za toliko smanjuje broj roda *Bacteroidetes*. Crijevna mikrobiota novorođenčadi može predvidjeti pretilost kasnije u životu. Djeca koja su sa 7 godina života imala adekvatnu tjelesnu masu su kao novorođenčad u razdoblju 6-12

mjeseci imala veću zastupljenost soja *Bifidobacterium*, a nižu zastupljenost *Staphylococcus aureus* od novorođenčadi koja su sa 7 godina bila pretila (Davis, 2016).

Wan i sur. (2020) su promatrali razliku u sastavu crijevne mikrobiote između pothranjenih ispitanika (29), ispitanika normalne tjelesne mase (67) i pretilih ispitanika (67). Došli su do zaključka da nema statistički značajne razlike u sastavu crijevne mikrobiote između grupa na razini koljena, porodice i roda. Kad se rezultati grupa s pretilim i pothranjenim ispitanicima usporede s rezultatima ispitanika normalne tjelesne mase uočena je razlika u alfa raznolikosti, viša je kod ispitanika normalne tjelesne mase. U svim grupama dominiraju koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* te nije bilo razlike u zastupljenosti između grupa ni u omjeru *Firmicutes/Bacteroidetes*.

Yun i sur. (2017) su ispitivali odnos stupnja uhranjenosti, sastava crijevne mikrobiote i bogatstva crijevne mikrobiote. Ispitanike su podijelili u tri grupe, ispitanike s normalnom tjelesnom masom, ispitanike s prekomjernom tjelesnom masom i pretili ispitanike. Nema razlike u omjeru *Firmicutes/Bacteroidetes* između grupa. Kad se uspoređuju rezultati ispitanika normalne tjelesne mase i pretilih uočava se razlika na razini porodice i vrste te pretili ispitanici imaju manju filogenetsku raznolikost od ispitanika normalne tjelesne mase i ispitanika s prekomjernom tjelesnom masom. Raznolikost crijevne mikrobiote se smanjuje povećanjem ITM.

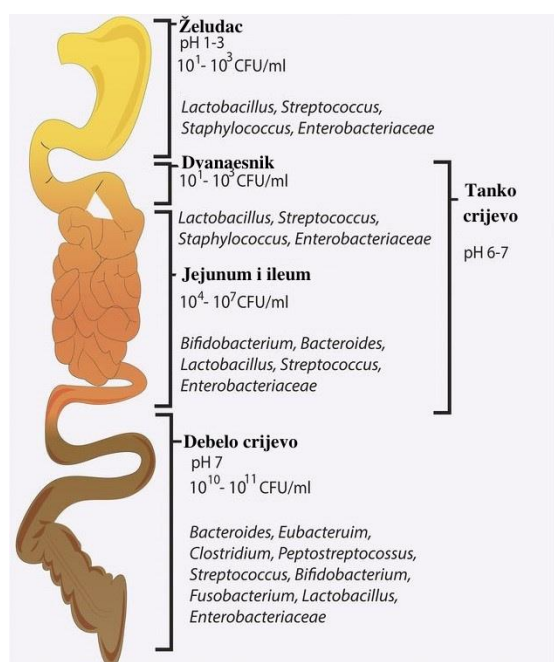
Gao i sur. (2018) su promatrali razliku u crijevnoj mikrobioti pothranjenih ispitanika, ispitanika normalne tjelesne mase, ispitanika s povećanom tjelesnom masom i pretilih ispitanika. Primijetili su veću alfa raznolikost kod pothranjenih ispitanika u usporedbi s ispitanicima s većim ITM, isto nije primijećeno usporedbom rezultata pretilih ispitanika i ispitanika normalne tjelesne mase. Analiza beta raznolikosti je pokazala da nema razlike između skupina. Taksonomskom analizom je uočeno da pretili ispitanici imaju veću zastupljenost koljena *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* i *Proteobacteria* u usporedbi s pothranjenim ispitanicima. Zastupljenost koljena *Firmicutes* se ne razlikuje između grupa.

Crijevna mikrobiota može utjecati na razvoj pretilosti preko više mehanizama. Jedan od njih je proizvodnja kratkolančanih masnih kiselina fermentacijom vlakana i proteina. Kratkolančane masne kiseline utječu na tjelesnu masu, osjetljivost na inzulin te smanjuju upalne procese. Također utječu na sitost odnosno smanjuju apetit time što potiču otpuštanje peptida YY (PYY). Pretilost se povezuje s povećanim koncentracijama IL-6, TNF i C-reaktivnog proteina, a crijevna mikrobiota smanjuje otpuštanje pro-upalnih citokina (Aoun i sur., 2020).

Važnost kratkolančanih masnih kiselina leži i u drugim funkcijama. Propionska kiselina je važna za sintezu lipida i glukoze u jetri, octena kiselina se koristi kao supstrat za sintezu kolesterola, a maslačna kiselina je izvor energije za kolonocite. Pripadnici bakterijskih koljena *Firmicutes* i *Actinobacteria* proizvode konjugiranu linolnu kiselinu i time smanjuju rizik za razvoj pretilosti. Konjugirana linolna kiselina povećava energetske metabolizam, potrošnju energije i lipolizu. Smanjuje sintezu lipida, sintezu adipocita te potiče njihovu apoptozu (Mazloom i sur., 2019).

## 2.2. CRIJEVNA MIKROBIOTA

Brojnost mikroorganizama mijenja se kroz probavni sustav, kao što se vidi na slici 3, od male koncentracije u želucu (do  $10^1$  bakterija po gramu sadržaja) i dvanaesniku ( $10^3$  bakterija po gramu sadržaja) prema većim koncentracijama u crijevima. Mali broj bakterija prisutnih u želucu i proksimalnom dvanaesniku može se pripisati uvjetima niskog pH, žučnim kiselinama i prisutnosti enzima gušterače u kojima mali broj bakterija može preživjeti. Broj bakterija po gramu sadržaja u tankom crijevu iznosi od  $10^4$  do  $10^7$ , dok taj broj u debelom crijevu iznosi približno  $10^{12}$  bakterija po gramu sadržaja. Većina mikroba u crijevima su anaerobi te pripadaju koljenima *Firmicutes*, *Bacteroidetes* i *Proteobacteria*. Ostali mikrobi prisutni u probavnom sustavu ljudi u malom postotku (~1 %) su *Actinobacteria*, *Verrumicrobia*, *Acidobacteria* i *Fusobacteria*.



**Slika 3.** Prikaz prisutnosti mikroorganizama kroz probavni sustav (Clarke i sur., 2019)

Mikrobi iz crijeva se mogu izolirati na dva načina, iz uzorka fecesa ili iz uzorka biopsije. Uzorak fecesa sadržava bakterije koje se nalaze u lumenu crijeva dok uzorak biopsije sadržava bakterije koje se nalaze u mukoznom sloju. Dokazana je velika razlika u sastavu i raznolikosti bakterija iz uzorka fecesa i biopsije istog ispitanika. Uzorak mikroba iz lumena najčešće sadrži vrste kao što su *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* i *Ruminococcus*. Dok su najčešći mikroorganizmi prisutni u mukoznom sloju *Clostridium*, *Lactobacillus* i *Enterococcus*. Iz navedenog možemo vidjeti da je u lumenu prisutan veći broj rodova te da broj i vrsta prisutnih mikroorganizama ovise o smještaju u probavnom sustavu. Mikroorganizmi koji se nalaze u mukoznom sloju crijeva pokazuju malu raznolikost ovisno o lokaciji te su u kontaktu s epitelnim stanicama domaćina, što ukazuje na ulogu u signalizaciji s domaćinom, potencijalan utjecaj na ravnotežu u crijevima i utjecaj na imunološki sustav domaćina (Dieterich i sur., 2018).

Koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* predstavljaju najveći udio bakterija prisutnih u crijevima, oko 90 %. *Firmicutes* se sastoji od više od 200 različitih rodova, najzastupljeniji su *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* i *Ruminococcus*. Najzastupljeniji rodovi koljena *Bacteroidetes* su *Bacteroides* i *Prevotella*. Važan rod iz koljena *Actinobacteria* je *Bifidobacterium*, a iz koljena *Proteobacteria* važni su rodovi *Escherichia* i *Helicobacter* (Rinninella i sur., 2019a).

Uloga crijevne mikrobiote je zaštita od patogenih bakterija, jačanje imunološkog sustava, održavanje intestinalne barijere, razgradnja neprobavljivih komponenti hrane, proizvodnja vitamina (vitamin K, vitamini B skupine) i proizvodnja kratkolančanih masnih kiselina (acetat, propionat i butirac) (Telle-Hansen i sur., 2018).

### 2.2.1. Razvoj crijevne mikrobiote tijekom života

Uspostavljanje mikrobiote novorođenčeta počinje i prije rođenja, mikroorganizmima koji su pronađeni u posteljici, fetalnim membranama, plodnoj vodi i krvi koja se nalazi u pupčanoj vrpici. Mehanizam bakterijske translokacije u intrauterinu šupljinu nije još razjašnjen. S obzirom na to da su iz posteljice i plodne vode izolirane bakterijske vrste koje se nalaze u ustima (*Firmicutes*, *Proteobacteria*) i probavnom sustavu (*Enterococcus*, *Streptococcus*) pretpostavlja se da je došlo do hematogene translokacije tih vrsta. Izolirani su i vaginalni mikrobi te se to objašnjava na način da su se bakterije iz vaginalnog kanala uzdigle do

intrauterine šupljine. Sekvenciranjem metagenoma posteljice pronađene su i *Escherichia coli*, *Prevotella tanneriae* i *Bacteroidetes* u niskim koncentracijama (Dunn i sur., 2017).

Na sastav i raznolikost mikrobiote novorođenčeta utječe način poroda, vaginalno ili carskim rezom. Vaginalni porod omogućava vertikalni prijenos vaginalne mikroflore s majke prolaskom djeteta kroz rodni kanal, dok porođaj carskim rezom omogućuje horizontalni prijelaz mikroorganizama s majčine kože. Mora se uzeti u obzir i carski rez koji je druga opcija nakon neuspješnog porođaja vaginalnim putem, te zbog toga novorođenče može doći u doticaj s vaginalnom mikroflorom iako je na kraju rođeno carskim rezom. Novorođenčad koja su rođena vaginalnim putem imaju veću raznolikost mikrobiote što se smatra povoljnim jer se slaba raznolikost povezuje s razvojem upalne bolesti crijeva i pretilosti kasnije u životu. *Lactobacillus*, *Prevotella* i *Sneathia spp.* dominiraju kod novorođenčadi rođene vaginalnim putem, te nakon nekoliko mjeseci dolazi do povećanja broja bakterija rodova *Bifidobacterium* i *Bacteroides*. Uz navedene mikroorganizme tijekom prvih 6 tjedana života novorođenčeta nađene su i vrste *Atopobium*, *Streptococcus*, *Enterococcus* i *Enterobacteriaceae*. Kod novorođenčadi rođene carskim rezom mikrobiota uključuje rodove *Staphylococcus*, koji imaju patogeni potencijal, *Corynebacteria* i *Propionibacterium spp.*, s manjim udjelom rodova *Bifidobacteria* i *Bacteroides* koje imaju blagotvorno djelovanje na zdravlje. Uspostavljanje povoljnog sastava i raznolikosti mikrobiote tijekom djetetovog odrastanja ima blagotvorne učinke na zdravlje te utječe na razvoj bolesti i alergija. Kod novorođenčadi mikrobiota ima tri važne funkcije koje su bitne za rast, razvoj i zdravlje, a to su zaštitna funkcija, metabolička funkcija i trofička funkcija. Mikrobiota djeluje zaštitno jer sprječava proliferaciju patogenih mikroba tako da tvori zaštitnu barijeru, sprječava vezanje patogenih mikroba i natječe se s njima za hranu. Metabolička funkcija uključuje probavu kolostruma, majčinog mlijeka, dojenačke formule, razgradnju toksina i lijekova, sintezu vitamina i apsorpciju iona. Trofička funkcija uključuje diferencijaciju epitelnih stanica koje oblažu crijevni lumen, homeostazu imunološkog sustava što uključuje toleranciju na antigene iz hrane (Yang i sur., 2016; Fouhy i sur., 2012).

Prehrana dojenčadi ima važnu ulogu u daljnjem razvoju crijevne mikrobiote. Dojenčad hranjena majčinim mlijekom sadrži više vrsta iz roda *Actinobacteria*, dok dojenčad hranjena dojenačkom formulom sadrži više vrsta iz bakterijskog razreda  $\gamma$ -*Proteobacteria*. Razlike u sastavu crijevne mikrobiote između dojenčadi hranjene formulom i majčinim mlijekom rezultiraju različitom transkripcijom gena. Crijevna mikrobiota dojenčadi hranjene majčinim mlijekom je manje raznolika od dojenčadi hranjene formulom, ali kod njih geni mikrobiote dva puta više utječu na gene domaćina povezanih s imunološkim i metaboličkim funkcijama. Dvije

vrste roda *Bifidobacteria* koje se nalaze kod dojenčadi hranjene majčinim mlijekom su *Bifidobacterium longum* i *Bifidobacterium breve* (O'Sullivan i sur., 2015). Navedeni čimbenici su prikazani na slici 4.



**Slika 4.** Faktori koji utječu na razvoj crijevne mikrobiote *in utero*, kod novorođenčeta i u dojenačkoj dobi (Moore i Townsend, 2019)

### 2.2.2. Čimbenici koji utječu na crijevnu mikrobiotu

Mnogo različitih čimbenika utječe na sastav i bogatstvo crijevne mikrobiote. Nadalje će biti objašnjen utjecaj samo nekih od čimbenika.

#### 2.2.2.1. Utjecaj prehrane

Konzumacija proteina iz životinjskih i biljnih izvora povećava raznolikost crijevne mikrobiote. Konzumacijom proteina samo iz životinjskih izvora povećava se broj anaerobnih bakterija koje su tolerantne na žuč kao što su *Bacteroides*, *Alistipes* i *Bilophila*. Konzumacijom crvenog mesa povećava se koncentracija nekoliko vrsta mikroba koji se povezuju s povećanjem razine trimetilamin-N-oksida (TMAO), spoja koji povećava rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Prehrana bogata mastima povećava ukupni broj anaerobnih mikroorganizama i vrsta roda *Bacteroides*. Prehrana siromašna mastima povećava zastupljenost vrsta roda *Bifidobacterium*, što utječe na smanjenje ukupnog kolesterola. Prehrana bogata zasićenim mastima povećava udio *Faecalibacterium prausnitzii*, dok prehrana bogata mononezasićenim masnim kiselinama ne utječe na broj i obilje niti jedne bakterijske vrste, ali smanjuje ukupni broj bakterija te ukupni i LDL kolesterol. Ugljikohidrati se dijele na probavljive i neprobavljive ugljikohidrate. Probavljivi ugljikohidrati se enzimski razgrađuju u tankom crijevu te uključuju

škrob i šećere, kao što su glukoza, fruktoza, saharoza i laktoza. Prehrana bogata glukozom, fruktozom i saharozom iz datulja povećava broj vrsta roda *Bifidobacteria*, a smanjuje broj vrsta roda *Bacteroides*. Neprobavljivi ugljikohidrati, koje još nazivamo i vlaknima, su otporni na enzime gornjeg probavnog sustava te nepromijenjeni dolaze do debelog crijeva gdje ih fermentira crijevna mikrobiota. Prehrambena vlakna se mogu podijeliti na topljiva i netopljiva. Topljiva vlakna su inulin, pektin, beta-glukan, fruktooligosaharidi (FOS) i galaktooligosaharidi (GOS) te njih bakterije u debelom crijevu fermentiraju. Netopljiva vlakna bakterije u debelom crijevu ne mogu fermentirati i ona uključuju celulozu, hemicelulozu, lignin i otporni škrob. Prehrana bogata proizvodima od cjelovitog zrna povećava udio vrsta koljena *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. Otporni škrob i ječam povećavaju obilje *Ruminococcus*, *E. rectale* i *Roseburia* vrsta. Prebiotici bogati fruktooligosaharidima (FOS) smanjuju broj *Clostridium* i *Enterococcus* vrsta. Hrana bogata polifenolima poput voća, sjemenki, povrća, čaja, proizvoda od kakaa i vina važni su zbog svoje antioksidativne aktivnosti. Konzumacijom polifenola iz crvenog vina dolazi do povećanja broja vrsta roda *Bacteroides*. Nakon konzumacije polifenola iz voća, sjemenki, vina i čaja dolazi do smanjenja patogenih vrsta *Clostridium* (*C. perfringens* i *C. histolyticum*). Umjetna sladila kao što su saharin, sukraloza i aspartam utječu na raznolikost crijevne mikrobiote te time uzrokuju intoleranciju glukoze više nego čista glukoza i saharoza (Rinninella i sur., 2019b; Singh i sur., 2017).

Smanjena raznolikost crijevne mikrobiote se povezuje s bolestima probavnog sustava kao što su Crohnova bolest, sindrom iritabilnog crijeva i rakom debelog crijeva. Pretilost se također povezuje sa smanjenjem raznolikosti crijevne mikrobiote odnosno s 20 % smanjenja filogenetske raznolikosti (Mosca i sur., 2016).

Raznolikost crijevne mikrobiote se povećava s povećanjem kvalitete prehrane odnosno većim unosom proizvoda od cjelovitog žita i povrća, posebno krstašica. Također konzumacija mora biti svakodnevna jer kad se navedeni proizvodi konzumiraju rjeđe nemaju utjecaja na raznolikost (Laitinen i Makkala, 2019).

#### 2.2.2.2. Utjecaj lijekova

Antibiotici mogu direktno i indirektno utjecati na crijevnu mikrobiotu. Direktni utjecaj uključuje uništavanje ili inhibiciju rasta osjetljivih bakterija, dok je indirektni utjecaj rezultat narušene ravnoteže mikrobiote zbog čega dolazi do negativnog učinka na bakterije na koje antibiotici nisu direktno utjecali. Različiti antibiotici utječu na različite rodove. Tako

vankomicin smanjuje mikrobnu raznolikost i ukupni broj gram-pozitivnih bakterija, najčešće koljena *Firmicutes*, dok amoksicilin ne mijenja značajno ukupni broj bakterija niti njihovu raznolikost. Primjenom kombinacije antibiotika mijenja se značajno ukupni broj i sastav crijevne mikrobiote. Antibiotici eliminiraju rodove koji su osjetljivi te time daju više prostora i nutrijenata za rast rodova koja su otporni na antibiotike. Utječu i na metabolite crijevne mikrobiote te komunikaciju između mikrobiote i domaćina (Zhang i Chen, 2019).

Osim antibiotika i za druge klase lijekova, poput inhibitora protonske pumpe, metformina, statina i laksativa je pokazan značajan utjecaj na mikrobiotu. Najčešće dovode do promjena u metabolizmu odnosno metaboličkog potencijala mikrobiote i biosintezi koju obavljaju bakterije pogotovo kod uzimanja inhibitora protonske pumpe i metformina. Metformin se koristi kod dijabetesa melitusa tipa II za kontrolu razine šećera u krvi i povezan je s povećanjem broja *E. coli* u probavnom sustavu. Metformin utječe i na sastav crijevne mikrobiote tako što povećava koncentraciju bakterija koje proizvode kratkolančane masne kiseline te time utječe na druge bakterijske vrste. Inhibitori protonske pumpe zbog promjene pH gastrointestinalnog sustava utječu na povećanje koncentracije bakterija koje su karakteristične za usnu šupljinu u donjem dijelu probavnog sustava (Vich Vila i sur., 2020; Zhernakova i sur., 2016).

Da bi se smanjio negativan utjecaj antibiotika na crijevnu mikrobiotu preporuča se uzimanje probiotika i prebiotika, iako se ta preporuka u zadnje vrijeme dovodi u pitanje. Komercijalno dostupni probiotici najčešće sadrže bakterije poput *Lactobacillus spp.* i *Bifidobacterium spp.*, a prebiotici najčešće sadrže fruktooligosaharide (Dudek-Wicher i sur., 2018).

Preporuka za uzimanje probiotika nakon korištenja antibiotika se dovodi u pitanje zbog toga što je uočeno da probiotici mogu usporiti oporavak autohtone crijevne mikrobiote te tako utjecati na njen sastav i funkciju. Disbioza može trajati do 5 mjeseci nakon uzimanja probiotika (Suez i sur., 2018).

Osim što različiti lijekovi različito djeluju na crijevnu mikrobiotu, ona može djelovati na apsorpciju i farmakološke učinke lijekova, ili djelovanjem direktno na enzimsku razgradnju lijekova ili djelovanjem na metabolizam domaćina (Sun i sur., 2019).



### 2.2.2.3. Utjecaj pušenja, alkohola i kave na crijevnu mikrobiotu

Dim cigareta sadrži preko 7000 spojeva koji dolaze do pluća u plinovitom stanju. Pušenje utječe na različita tkiva i organe, a sve više se promatra i učinak na crijevnu mikrobiotu. Na životinjskim modelima je zapaženo da pušenje može utjecati na crijevnu mikrobiotu preko promjena u crijevnoj mukozi, mucinu i imunološkom sustavu. Crijevna mikrobiota održava ravnotežu mukozne barijere i imunološkog sustava. Pušači imaju viši udio bakterija koljena *Bacteroidetes* te imaju niži udio *Firmicutes* i *Proteobacteria* u usporedbi s nepušačima te niži omjer *Firmicutes/Bacteroidetes*. Dok se sastav crijevnih mikrobiota između nepušača i prijašnjih pušača bitno ne razlikuje. Prestanak pušenja rezultira povećanjem broja bakterija koljena *Firmicutes* i *Actinobacteria*, a smanjenjem *Bacteroidetes* i *Proteobacteria* (Lee i sur., 2018).

Sublette i sur. (2020) su promatrali utjecaj prestanka pušenja na crijevnu mikrobiotu i rizik od kardiovaskularnih bolesti nakon 12 tjedana te su došli do zaključka da se kod ispitanika koji su uspješno prestali pušiti povećao udio koljena *Bacteroidetes*, smanjio udio koljena *Firmicutes*, a da se povećanje alfa raznolikosti među ispitanicima koji su prestali pušiti povezuje sa smanjenjem faktora rizika za kardiovaskularne bolesti.

Za električne cigarete nije dokazan utjecaj na crijevnu mikrobiotu (Stewart i sur., 2018).

Pri prekomjernoj konzumaciji alkohola dolazi do bakterijskog prerastanja, malapsorpcije, poremećaja ravnoteže bakterija i njihovog metabolizma. Mehanizmi kojima konzumacija alkohola utječe na crijevnu mikrobiotu nisu još u potpunosti razjašnjeni, ali se smatra da na to utječe smanjeni motilitet crijeva. Kod pojedinaca koji prekomjerno konzumiraju alkohol pronađene su manje koncentracije bakterija koljena *Bacteroidetes* i roda *Lactobacillus*, a veće koncentracije bakterija koljena *Proteobacteria* i *Fusobacteria* (Bjørkhaug i sur., 2019; Meroni i sur., 2019).

Pri umjerenom konzumaciji alkoholnih pića bogatih polifenolima, kao na primjer crveno vino, dolazi do povećanja koncentracije rodova kao što su *Enterococcus*, *Prevotella*, *Bacteroides* i *Bifidobacterium* (Quesada-Molina i sur., 2019).

Umjerenom konzumaciji alkoholnog ili bezalkoholnog piva povećava obilje koljena *Bacteroidetes*, a smanjuje zastupljenost koljena *Firmicutes*. Bezalkoholno pivo povećava alfa i beta raznolikost crijevnih mikrobiota dok kod piva koje sadrži alkohol nije uočen isti učinak (Hernández-Quiroz i sur., 2019).

Kava djeluje blagotvorno na zdravlje zbog toga što sadrži fenolne spojeve, vlakna, minerale i kofein. Zbog spojeva koje sadrži umjerena konzumacija kave smanjuje rizik za razvoj metaboličkog sindroma, pretilosti, dijabetesa melitusa tipa II i kardiovaskularnih bolesti. Umjerena konzumacija kave utječe i na crijevnu mikrobiotu odnosno povećava udio *Bifidobacterium* roda i smanjuje roda *Clostridium* i vrste *Escherichia coli*. Kod pojedinaca koji često konzumiraju kavu pronađena je veća zastupljenost rodova *Bacteroides*, *Prevotella* i *Porphyromonas*. Smatra se da kava utječe na crijevnu mikrobiotu tako što povećava motilitet crijeva (González i sur., 2020).

Jacquet i sur. (2009) su promatrali unos tri šalice kave kroz tri tjedna na crijevnu mikrobiotu kod 16 zdravih ispitanika te su došli do zaključka da se povećao samo broj *Bifidobacterium* roda, a da nema utjecaja na dominantne vrste mikroba u crijevnoj mikrobioti.

Promatran je i utjecaj kombinirane konzumacije 200 mg (miligrama) kofeina na dan i 200 mg klorogenske kiseline kod ispitanika s nealkoholnom bolesti masne jetre i dijabetesom melitusom tipa II te je uočeno povećanje broja *Bifidobacterium* roda, ali se to povećanje nije pokazalo statistički značajnim (Mansour i sur., 2020).

#### 2.2.2.4. Utjecaj tjelesne aktivnosti

Umjerena do intenzivna tjelesna aktivnost poboljšava mikrobnu raznolikost, imunološki sustav i smanjuje rizik za kronične bolesti. Svakodnevna tjelesna aktivnost poboljšava zdravlje kardiovaskularnog sustava te je uočeno da ljudi sa zdravijim kardiovaskularnim sustavom imaju veću raznolikost crijevne mikrobiote i smanjenu biosintezu lipopolisaharida (LPS). Također kod ljudi koji se svakodnevno bave umjerenom tjelesnom aktivnošću uočena je veća količina bakterija koje proizvode butirat kao što su porodice *Erysipelotrichaceae* i *Lachnospiraceae*. Vježbe izdržljivosti mogu pozitivno utjecati na permeabilnost gastrointestinalnog sustava i motilitet (Sohail i sur., 2019).

Omjer *Firmicutes/Bacteroidetes* pozitivno korelira s maksimalnim aerobnim kapacitetom koji predstavlja maksimalnu količinu kisika koje srce može prenijeti mišićima koji se onda iskorištava za proizvodnju energije. Pojedinci s niskim maksimalnim aerobnim kapacitetom imaju smanjeni udio koljena *Bacteroidetes*, a veću zastupljenost vrsta *Eubacterium rectale* i *Clostridium coccooides* (Mohr i sur., 2020).

Kod žena koje su se bavile umjerenom tjelesnom aktivnošću pronađene su više koncentracije vrsta *Roseburia hominis*, *Akkermansia muciniphila* i *Faecalibacterium prausnitzii*. Vrsta *A. muciniphila* se nalazi u višim koncentracijama kod sportaša te se njegova niska koncentracija povezuje s pretilosti, metaboličkim sindromom i dijabetesom tipa II (Bressa i sur., 2017).

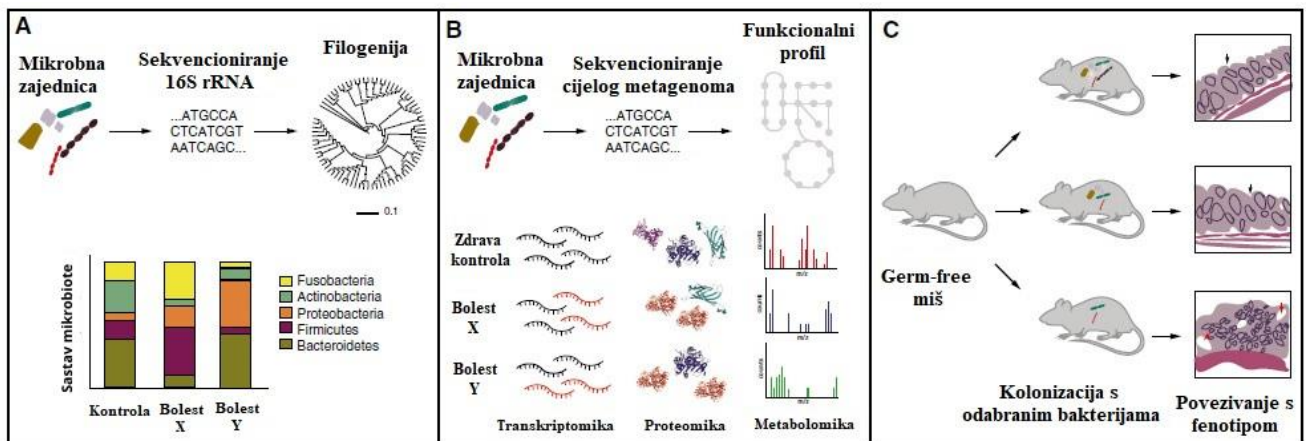
Clarke i sur. (2014) su uočili da je alfa raznolikost crijevne mikrobiote sportaša statistički veća od kontrolnih grupa (prva grupa ITM < 25 kg m<sup>-2</sup>, druga grupa ITM > 28 kg m<sup>-2</sup>), dok se alfa raznolikost između kontrolnih grupa ne razlikuje. Taksonomskom analizom kod sportaša je primijećeno 22 koljena, 68 porodica i 113 rodova. Kod kontrolne grupe s ITM < 25 kg m<sup>-2</sup>, 11 koljena, 33 porodice i 65 rodova, a kod kontrolne grupe s ITM > 28 kg m<sup>-2</sup>, 9 koljena, 33 porodice i 61 rod. Kod sportaša je uočeno znatno manje koljena *Bacteroidetes* nego kod kontrolnih grupa.

Mörkl i sur. (2017) su promatrali crijevnu mikrobiotu između pothranjenih ispitanika (*Anorexia Nervosa*), ispitanika normalne tjelesne mase, ispitanika s povećanom tjelesnom masom, pretilih ispitanika i sportaša. Pretili i pothranjeni ispitanici su imali smanjeno bogatstvo mikrobne zajednice dok je ono najveće kod sportaša u usporedbi sa svim ostalim grupama.

### 2.2.3. Određivanje sastava crijevne mikrobiote

Za određivanje sastava crijevne mikrobiote prije razvoja molekularnih metoda koristile su se metode kojima su se izolirale čiste stanične kulture pomoću kojih se onda moglo povezati određeni fenotip sa specifičnim genima. Iako se koristi i danas nedostaci metode su nemogućnost kultiviranja nekih bakterija i teška uspostava u laboratorijskim uvjetima uvjeta kakve nalazimo u crijevima - od dostupnosti različitih nutrijenata do interakcije između samih bakterija te bakterija i domaćina. Druge metode kojima se može odrediti sastav crijevne mikrobiote i njezine funkcije su taksonomsko profiliranje, funkcionalno profiliranje i gnotobiotički životinjski modeli, prikazano na slici 5. Taksonomski profil daje informacije o identitetu i zastupljenosti različitih mikroorganizama unutar kompleksnih mikrobnih zajednica. Funkcionalni profil daje informaciju o ukupnom sadržaju gena mikrobnih zajednica (metagenomika), genskih transkripata (transkriptomika), proteina (proteomika) i metabolita (metabolomika). Gnotobiotički modeli omogućuju utvrđivanje interakcija između specifičnih mikroba i njihovih funkcija s fenotipom domaćina. Taksonomsko profiliranje je najčešće korištena tehnika karakterizacije crijevne mikrobiote koja se služi varijabilnim regijama 16S

rRNA gena kao filogenetičkog markera. Problem ove metode je da ne daje informacije o funkcionalnim sposobnostima mikrobne zajednice. Sekvencioniranje cijelog metagenoma daje ukupni sadržaj gena mikrobnih zajednica uključujući taksonomske markere i funkcionalne gene. Da bi se utvrdilo koji su geni eksprimirani i koji su proteini aktivni u zajednici upotrebljavaju se i druge metode poput transkriptomike, proteomike i metabolomike. Multi-omički pristup nam daje uvid u transkribirane gene i male RNA molekule koje imaju ulogu u regulaciji procesa mikrobne zajednice, otkrivanje ortologa proteinskih klastera koji su različito eksprimirani pri neravnoteži mikrobiote i identifikaciju metaboličkih potpisa pri bolestima probavnog sustava. Gnotobiotički životinjski modeli služe za razumijevanje utjecaja crijevnih bakterija na fiziologiju domaćina (Koppel i Balskus, 2016).



**Slika 5.** Prikaz metoda za određivanje sastava i funkcije crijevne mikrobiote, A) taksonomski profil, B) funkcionalni profil, C) gnotobiotički životinjski model (Koppel i Balskus, 2016)

### 2.2.3.1. 16S rRNA marker gen

16S rRNA gen je gen koji kodira za 16S komponentu male podjedinice prokariotskog ribosoma. Sastoji se od varijabilnih i konzerviranih regija što omogućava sastavljanje univerzalnih početnica za umnažanje željenih regija gena koje služe za identifikaciju i detekciju bakterija. Ukupno gen ima 9 varijabilnih regija (V1-V9), a odabirom različite varijabilne regije za 16S početnice dobiva se različita razlučivost taksonomske klasifikacije (Song i sur., 2018).

Sekvencioniranje 16S rRNA gena se najčešće koristi za identifikaciju bakterija zbog njegove sveprisutnosti, konzerviranosti i dovoljne količine informacija za taksonomsku

klasifikaciju. Iako daje dobre rezultate klasifikacije bakterija raspoznavanje bakterija na razini vrste je limitirano (Janda i Abbott, 2007).

### 2.2.3.2. Ciljano sekvenciranje i sekvencioniranje cijelog metagenoma

Metagenomska istraživanja, u kojima se analizira okolišni uzorak bez koraka kultivacije, se uglavnom sastoje od četiri koraka: sakupljanja uzoraka mikrobnih zajednica, ekstrakcije DNA, sekvencioniranja DNA i bioinformatičke analize podataka sekvencioniranja. Preporuča se da se nakon uzimanja uzoraka odmah nastavi s daljnjim koracima, a ako to nije moguće uzorke se treba do ekstrakcije DNA zamrznuti pomoću suhog leda ili tekućeg dušika i pohraniti na -80 °C. Zamrzavanje može utjecati na sastav mikrobnih zajednica, neke studije navode da dolazi do promjene omjera koljena *Firmicutes/Bacteroidetes* (Song i sur., 2018).

Prije razvoja novih tehnologija sekvencioniranja (Next generation sequencing - NGS) 16S rRNA geni bi se prvo umnožili pomoću lančane reakcije polimere (PCR) te nakon toga sekvencionirali Sanger-ovom metodom. Nakon toga razvijena je Roche 454 tehnologija sekvenciranja DNA (454 pirosekvencioniranje) koja je „iščitavala“ DNA fragmente dužine 400 parova baza (pb). Smanjivanje duljine fragmenta DNA koji se može očitati dovodi do ciljanog sekvenciranja samo određenih varijabilnih regija 16S rRNA gena, što dovodi do smanjene rezolucije i osjetljivosti metode. Trenutno najzastupljenija metoda sekvencioniranja u istraživanjima koja uspoređuju sastav crijevne mikrobiote kod određene prehrane, uzimanja pojedinih lijekova, dodataka prehrani ili zdravih pojedinaca i pojedinaca s bolestima je Illumina. Iako očitava kratke regije DNA molekule – 100 pb HiSeq do 300 pb MiSeq, što je dovoljno za iščitavanje jedne do dvije varijabilne regije 16S rRNA gena, popularnost zahvaljuje visokoj točnosti i pokrivenosti, te niskoj cijeni po jednoj bazi (Weinstock, 2012).

Sekvencioniranje cijelog genoma je metoda kojom se iščita cjelokupni genetički materijal pojedinog organizma. Pri tom se DNA razdijeli na manje dijelove, sekvencionira i posloži kako bi se dobio cjeloviti genom. Skuplja je od analize amplikona, ali sadrži više podataka i omogućava osim taksonomske i funkcionalnu analizu uzorka (Allaband i sur., 2019).

Kako bi podatke sekvencioniranja mogli pravilno rastumačiti potrebno ih je obraditi raznim bioinformatičkim alatima. Program korišten u ovom radu je QIIME2. QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) je javno dostupan bioinformatički program koji podatke dobivene Illumina metodom ili drugim metodama sekvencioniranja pretvara u

taksonomsku reprezentaciju mikrobne zajednice te raznim statističkim analizama i grafičkim prikazom rezultata daje osnovu za tumačenje i analizu mikrobiote (QIIME, 2020).

U usporedbi s ostalim bioinformatičkim programima (Bioconductor, mothur i UPARSE) procesiranje uzoraka traje kraće, nema razlike u rezultatima između operativnih sustava koji se koriste (Linux i Mac), ne traži široko znanje programiranja, sintakse su jednostavne, potrebna je konfiguracija pri instaliranju, daje veći broj očitavanja i identificira veći broj rodova bakterija (Marizzoni i sur., 2020).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. ISPITANICI

U ovom diplomskom radu kombinirani su podaci iz dvaju projekata Laboratorija za bioinformatiku - *Praćenje biodinamike mješovitih kultura pomoću novorazvijene metode uzimanja otiska prsta* (BioDinaMik), financiranog od strane Europskog socijalnog fonda, i Istraživanje ravnoteže mikrobioma debelog crijeva (MicroEquilibrium), financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

Regrutacija ispitanika za oba projekta je provedena putem društvenih mreža i osobnih poznanstava istraživača uključenih u projekt. Jedini kriterij za isključivanje ispitanika je bio uzimanje antibiotika u protekla 3 mjeseca. Sudjelovali su ispitanici oba spola, s kroničnim bolestima i rasponom dobi od 20 do 56 godina. Za izradu diplomskog rada korišten je dio ispitanika oba projekta koji je zadovoljavao uvjet da im je indeks tjelesne mase veći od  $27 \text{ kg m}^{-2}$  ili manji od  $20 \text{ kg m}^{-2}$  kako bi provjerili da li veća razlika u ITM ispitanika utječe na sastav crijevne mikrobiote. Ukupno je 40 ispitanika zadovoljavalo navedene uvjete – 10 ispitanika iz projekta BioDinaMik i 30 ispitanika iz projekta MicroEquilibrium. Unutar svake grupe ispitanici su podijeljeni na pretile ( $\text{ITM} > 27 \text{ kg m}^{-2}$ ) i pothranjene ( $\text{ITM} < 20 \text{ kg m}^{-2}$ ). U grupi MicroEquilibrium pretilih ispitanika je bilo 17, a u grupi BioDinaMik 8. Pothranjenih ispitanika je u grupi MicroEquilibrium bilo 13, a u grupi BioDinaMik 2. Pretili ispitanici grupe MicroEquilibrium su označeni s brojevima od 101 do 117, a pothranjeni ispitanici s brojevima od 301 do 313. Pretili ispitanici grupe BioDinaMik su označeni s oznakama F1, F2, F3, F5, F10, F11, F12, F13, a pothranjeni ispitanici su označeni s F6 i F9. Grupa MicroEquilibrium sadrži 13 žena i 17 muškaraca, dok grupa BioDinaMik sadrži 5 žena i 5 muškaraca.

### 3.2. METODE RADA

Metode koje su korištene pri izradi rada su antropometrijske, dijetetičke i genomičke.

#### 3.2.1. Dijetetičke metode

Ispitanici su ispunjavali upitnik o prehrambenih navikama, 24-satno prisjećanje i opći upitnik o životnim navikama. Obje grupe ispitanika su ispunjavale upitnike preko Google formi.

Upitnik projekta BioDinaMik sastojao se od 53 pitanja te je sadržavao pitanja vezana uz opće podatke (ID broj, spol, dob, bračni status, obrazovanje, visina, težina, korištenje antibiotika itd.), životne navike (konzumiranje kave, alkohola, pušenje, tjelesna aktivnost itd.), prehrambene navike (učestalost konzumacije namirnica) i 24-satno prisjećanje. Upitnik je priložen u prilogu 1. ovog rada.

Upitnik za sudjelovanje projekta MicroEquilibrium se sastojao od 26 pitanja te je uključivao pitanja vezana za datum rođenja, spol, konzumaciju kave, alkohola, cigareta, dodataka prehrani, prisutnost kroničnih bolesti, tjelesnu aktivnost, regularnost stolice, osjetljivost na alergene, te dodatno pitanja za žene vezana uz amenoreju i menopauzu. Također ispitanici su u upitnicima sami unosili podatke o tjelesnoj visini i tjelesnoj masi kako bi se podijelili u grupe prema ITM. Upitnik je priložen u prilogu 2. Za izradu ovog rada uzeti su u obzir samo podaci vezani uz životni stil pojedinca korištenjem pitanja o konzumaciji alkohola, kave, pušenju i tjelesnoj aktivnosti. Kod obrade podataka pitanja koja su kao odgovor imala učestalost konzumacije su pretvorena u da ili ne odgovore. Tjelesna aktivnost je definirana kao minimalno 30 minuta umjerene tjelesne aktivnosti dnevno.

### 3.2.2. Antropometrijske metode

Za potrebu ovog rada uzeti su podaci mjerenja tjelesne mase i tjelesne visine iz kojih je onda izračunat ITM. Tjelesna masa je u grupi MicroEquilibrium određena s *TANITA DC-430MA*, a u grupi BioDinaMik s *OMRON BF-511*, nema statistički značajne razlike s obzirom na to koji se uređaj koristio. Osim tjelesne mase prikupljeni su i drugi podaci, ali oni nisu korišteni pri izradi ovog rada. Tjelesna visina je određena visinomjerom *Seca 2017*.

### 3.2.3. Genomičke metode

Crijevnna mikrobiota je određena iz uzoraka fecesa koji su nakon zaprimanja čuvani na  $-80^{\circ}\text{C}$ . Za postupak izolacije DNA uzorci su otopljeni na sobnoj temperaturi i homogenizirani, te je za sam postupak izolacije DNA uzeto 0,25 g uzorka.

Za izolaciju DNA korišten je QIAamp® PowerFecal® DNA kit koji se koristi za laku i brzu izolaciju mikrobne DNA. Do raspada stanica mikroba dolazi zbog mehaničke razgradnje kuglicama i zbog uništenja membrane kemikalijama. Kit je korišten sukladno uputama



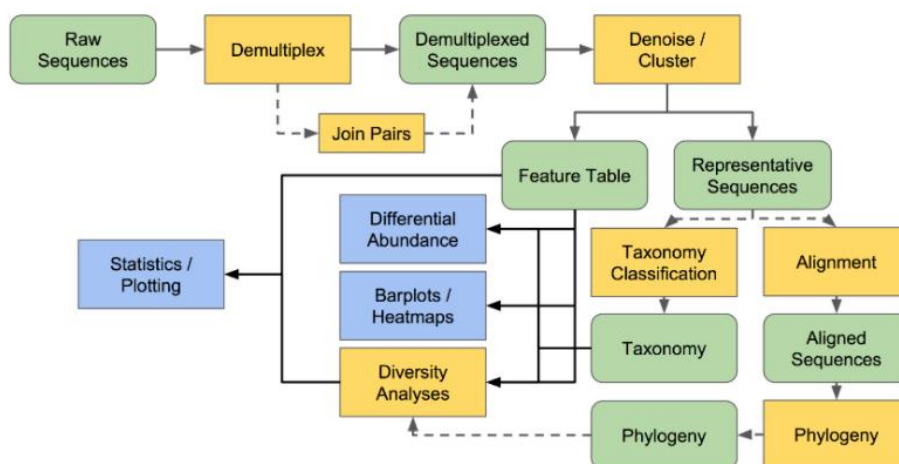
proizvođača u kojima je u 20 koraka opisan postupak izolacije DNA nakon koje je dobiveno 50-100 µl čiste DNA u otopini elucijskog pufera.

Koncentracija izolirane DNA za svaki uzorak je određena na Shimadzu BioSpec Nano spektrofotometru. Za slijepu probu je korišten čisti elucijski pufer.

Sekvenciranje uzoraka DNA je odrađeno na Illumina MiSeq uređaju u certificiranom laboratoriju Molecular Reaserch Lab (Shallowater, Texas, USA), odrađeno je pair-end sekvenciranje V3 i V4 varijabilne regije 16S rRNA. Varijabilne regije su umnožene u 30 ciklusa PCR-a (lančana reakcija polimeraze) pomoću početnica F341 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' i R806 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'. Provjera uspješnosti amplifikacije je provedena na 2 %-om agaroznom gelu te su nakon toga produkti pročišćeni Ampure XP kuglicama i korišteni za pripremu Illumina DNA knjižnice. Dobivena DNA knjižnica sekvencirana je Illumina MiSeq platformom korištenjem protokola spojenih krajeva (eng. Paired-end protocol) te je rezultat sekvenciranja prebačen u FASTQ datoteku.

### 3.2.4. Obrada podataka sekvenciranja DNA QIIME 2 programom

Kao što je već rečeno QIIME 2 je bioinformatički program koji se koristi za analizu sirovih podataka sekvenciranja, kako bi njime dobili informacije o sastavu mikrobnih zajednica te obavili daljnje analize. Kako bi koristili programski paket QIIME 2 potrebno ga je instalirati. Instalacija ovisi o korištenom operativnom sistemu, a sve upute dostupne su na QIIME mrežnoj stranici (<https://docs.qiime2.org/2020.6/install/#core-distribution>). Skraćeni prikaz koraka obrade podataka sekvencioniranja QIIME 2 programom je prikazan slikom 6.



**Slika 6.** Prikaz sheme obrade podataka u QIIME 2 programu (QIIME 2, 2020)

Podaci sekvenciranja mogu biti u FASTA ili FASTQ formatu, FASTA format ne sadrži podatke o kvaliteti sekvenci dok FASTQ sadrži. U ovom radu su obrađena dva seta sirovih podataka sekvenciranja u FASTQ formatu (ESF i ME). Postupak će biti prikazan za samo jedan set podataka jer je identičan. ME set podataka sadrži podatke iz MicroEquilibrium grupe ispitanika (30), a ESF sadrži podatke BioDinaMik grupe ispitanika (10). Dokumenti FASTQ formatu je prvo potrebno učitati u QIIME 2 da bi od njih nastao nativni qza (QIIME Zipped Artifact) format naredbom:

```
qiime tools import --type EMPPairedEndSequences --input-path fastq/  
--output-path ESF-paired-multiplexed.qza
```

Podaci dobiveni sekvenciranjem su obično multipleksirani što označava da se svi sekvencirani uzorci nalaze u jednoj datoteci. Kako bi znali iz kojeg uzorka je svaka sekvenca na jedan ili oba kraja DNA sekvence se stavljaju barkodovi uz pomoć kojih se sekvence mogu na kraju spojiti i spariti s podacima iz kojeg uzorka su došle te se to naziva demultipleksiranjem. Ono se može obaviti q2-demux ili q2-cutadapt postupkom. U ovom radu je za demultipleksiranje korištena q2-demux metoda pomoću slijedeće naredbe:

```
qiime demux emp-paired --m-barcodes-file 120616JZ341F-mapping2.txt -  
-m-barcodes-column BarcodeSequence --i-seqs ESF-paired-  
multiplexed.qza --o-per-sample-sequences ESF-paired-  
DEmultiplexed.qza --o-error-correction-details demux-details.qza --  
p-no-golay-error-correction.
```

Da bi provjerili uspješnost postupka koristi se naredba kojom će se dobiti sažetak dobivenog dokumenta koji vizualno prikazuje broj sekvenci dobivenih po uzorku:

```
qiime demux summarize --i-data ESF-paired-DEmultiplexed.qza --o-  
visualization ESF-paired-DEmultiplexed.qzv
```

Dokumenti sa sufiksom qzv (QIIME Zipped Visualization) su vizualizacije rezultata dobivenih QIIME 2 programom te se mogu otvarati i preko QIIME 2 View-a. U slučaju da je korišteno pair-end sekvenciranje potrebno je spojiti dobivena očitavanja (eng. reads). To se može napraviti automatski preko q2-dada2 dodatka, ali ako se koriste q2-deblur ili OTU declustering metoda za spajanje se koristi q2-vsearch. Za denoising, odnosno pročišćavanje sekvenci od

grešaka i šumova, može se koristiti DADA2 ili Deblur metoda. DADA2 i Deblur obavljaju dereplikaciju i filtriranje smetnji, ali DADA2 obavlja još i prije navedeno spajanje očitavanja i ispravljanje pogrešaka u sekvencama. Korištena je metoda DADA2 naredbom:

```
qiime dada2 denoise-paired --i-demultiplexed-seqs ESF-paired-DEmultiplexed.qza --p-trim-left-f 17 --p-trim-left-r 6 --p-trunc-len-f 290 --p-trunc-len-r 250 --o-table ESF-paired-DEmultiplexed-TABLE.qza --o-representative-sequences ESF-paired-DEmultiplexed-SEQS.qza --o-denoising-stats denoising-stats.qza
```

Naredba `--p-trim-left-f` i `--p-trim-left-r` označavaju koliko baza se reže s forward (17) i reverse (6) očitavanja svake sekvence, a `--p-trunc-len-f` i `--p-trunc-len-r` označuju na koliko se baza skraćuju očitavanja (`-f 290` i `-r 250`), `--i` označava input odnosno s čim ulazimo u obradu, `--o` označava output odnosno što dobivamo nakon obrade, a `--p` označava parametre koji se provode. Zatim se unosi naredba kojom se dobiva tablicu sa svojstvima (eng. feature table):

```
qiime feature-table summarize --i-table ESF-paired-DEmultiplexed-TABLE.qza --o-visualization ESF-paired-DEmultiplexed-TABLE.qzv
```

Kako se u ovom diplomskom radu koriste samo ispitanici čiji je ITM veći od  $27 \text{ kg m}^{-2}$  ili manji od  $20 \text{ kg m}^{-2}$  važno je odvojiti uzorke koji će se koristiti u daljnjim analizama. To se vrši upotrebom naredbe:

```
qiime feature-table filter-samples --i-table ESF-paired-DEmultiplexed-TABLE.qza --m-metadata-file samples-to-keep.txt --o-filtered-table ESF-filtered-table.qza.
```

Pri tome popis uzoraka koje se želi zadržati definira se dokumentom `samples-to-keep.txt`, a programu definira se parametrom `--m-metadata-file` naziv dokumenta. Kao rezultat ove naredbe dobiva se nova tablica sa svojstvima (eng. feature table) koja sadržava samo one uzorke (ispitanike) koji zadovoljavaju naše uvjete. Kad je filtrirana tablica sa svojstvima potrebno je filtrirati i sekvence naredbom:

```
qiime feature-table filter-seqs --i-data ESF-paired-DEmultiplexed-SEQS.qza --i-table ESF-filtered-table.qza --o-filtered-data ESF-filtered-seqs.qza.
```

Na početku se spominje da su prisutna dva seta podataka - ME i ESF, za svaki od njih se dobila tablica sa svojstvima i sekvence koje se za daljnje analize spajaju slijedećim naredbama. Za spajanje tablica sa svojstvima:

```
qiime feature-table merge --i-tables ESF-filtered-table.qza --i-tables miEQ-filtered-table.qza --o-merged-table table-ME+ESF.qza
```

Za spajanje sekvenci naredba je:

```
qiime feature-table merge-seqs --i-data ESF-filtered-seqs.qza --i-data miEQ-filtered-seqs.qza --o-merged-data rep-seqs-ME+ESF.qza
```

Na kraju ovih koraka dobiju se dva dokumenta – tablica sa svojstvima (eng. FeatureTable[Frequency]) i sekvence (eng. FeatureData[Sequence]) koje se koriste za daljnje analize (određivanje taksonomije, alfa raznolikost, beta raznolikost i statističke analize). Taksonomska klasifikacija se odvija na način da se naša sekvenca uspoređi sa sekvencama iz baze podataka kojima je određena taksonomija. Za to se koristi program `q2-feature-classifier` koji sadrži više metoda klasifikacije, a to su `classify-consensus-blast` i `classify-consensus-vsearch`. Navedene metode direktno koriste podatke tablice sa svojstvima i sekvence koje zatim uspoređuju s taksonomskom bazom. Još jedna od metoda je `classify-sklearn`, ali za nju je potrebno „naučiti“ koje značajke najbolje razlikuju taksonomske grupe, specifična je za bazu podataka i marker gen. Zbog toga se klasifikator mora trenirati za svaku kombinaciju baze i marker gena prije korištenja. Za klasifikaciju 16S rRNA gena je `classify-sklearn` preferirana metoda, a poziva se naredbom:

```
qiime feature-classifier classify-sklearn --i-classifier classifier-gg_13_8_99_341-806-2020.6.qza --i-reads rep-seqs-ME+ESF.qza --o-classification taxonomy-ESF-ME.qza
```

Kako bi vidjeli rezultate taksonomske klasifikacije potrebno ih je vizualizirati stupičastim dijagramom korištenjem naredbe:

```
qiime taxa barplot --i-table table-ME+ESF.qza --i-taxonomy taxonomy-ESF-ME.qza --m-metadata-file mapping_me+esf.txt --o-visualization taxa-bar-plots-ESF+ME.qzv
```

Kako bi mogli analizirati metrike alfa i beta raznolikosti koji se baziraju na filogeniji potrebno je izračunati filogenetsko drvo sekvenci uzoraka naredbom:

```
qiime phylogeny align-to-tree-mafft-fasttree --i-sequences rep-seqs-ME+ESF.qza --o-alignment aligned-rep-seqs.qza --o-masked-alignment masked-alignment-rep-seqs.qza --o-tree unrooted-tree.qza --o-rooted-tree rooted-tree.qza
```

Alfa raznolikost daje procjenu o raznolikosti i bogatstvu pojedinog uzorka, dok beta raznolikost daje mjeru o tome koliko su slični pojedini uzorci. Naredba za određivanje metrika za alfa i beta raznolikost:

```
qiime diversity core-metrics-phylogenetic --i-phylogeny rooted-tree.qza --i-table table-ME+ESF.qza --p-sampling-depth 12000 --m-metadata-file mapping_me+esf.txt --output-dir core-metrics-results
```

Analizom alfa raznolikosti dobiva se Shannon's diversity indeks, Observed Features, Faith's Phylogenetic Diversity i Evenness. Analizom beta raznolikosti dobiva se Jaccard distance, Bray-Curtis distance, unweighted UniFrac distance i weighted UniFrac distance. Za računanje alfa i beta raznolikosti potrebno je odrediti dubinu uzorkovanja (eng. sampling depth) za što koristimo DADA2 feature table summary naredbu. Dubina uzorkovanja određuje broj očitanih sekvenci (eng. reads) po uzorku koji se koriste u analizi alfa i beta raznolikosti. Tu je važno odabrati vrijednost koja je dovoljno visoka da broj uzoraka koji nisu uključeni bude što manji jer se uzorci s vrijednošću manjom od odabrane ne uključuju. Nakon toga se može unijeti naredba za prikaz krivulja alfa raznolikosti:

```
qiime diversity alpha-rarefaction --i-table table-ME+ESF.qza --i-phylogeny rooted-tree.qza --p-max-depth 12000 --m-metadata-file mapping_me+esf.txt --o-visualization alpha-rarefaction-ME+ESF.qzv
```

ANCOM analiza (analiza sastava mikrobioma) se koristi kako bi se odredila značajnost svojstva (eng. feature) koja su prisutna u različitim količinama kroz grupe uzoraka. Kako bi obavili

ANCOM analizu podaci se prvo moraju pripremiti tako da se izbace svojstva koja se pojavljuju u manje od 5 uzoraka i manje od 10 puta, za to se koristi naredba:

```
qiime feature-table filter-features --i-table table-ME+ESF.qza --p-  
min-samples 5 --p-min-frequency 10 --o-filtered-table  
ancom/filtered-table-5sam-10fq-ESF-ME.qza
```

Treba se izdvojiti taksonomija na nivou roda koja će se obraditi ANCOM analizom, naredbom:

```
qiime taxa collapse --i-table filtered-table-5sam-10fq-ESF-ME.qza -  
-i-taxonomy ../taxonomy-ESF-ME.qza --p-level 6 --o-collapsed-table  
table_l6.qza
```

Feature table se isto mora pripremiti da može raditi s ANCOM analizom naredbom:

```
qiime composition add-pseudocount --i-table table_l6.qza --o-  
composition-table comp-table-l6.qza
```

Provedba same ANCOM analize za svaki faktor se čini naredbom:

```
qiime composition ancom --i-table comp-table-l6.qza --m-metadata-  
file ../mapping_me+esf.txt --m-metadata-column Kava --o-  
visualization ancom-l6-kava.qzv
```

Na kraju se može izračunati značajnost razlika između grupa za alfa raznolikost, naredbom:

```
qiime diversity alpha-group-significance --i-alpha-diversity  
observed_features_vector.qza --m-metadata-file  
../mapping_me+esf.txt --o-visualization  
observed_features_group_significance.qzv
```

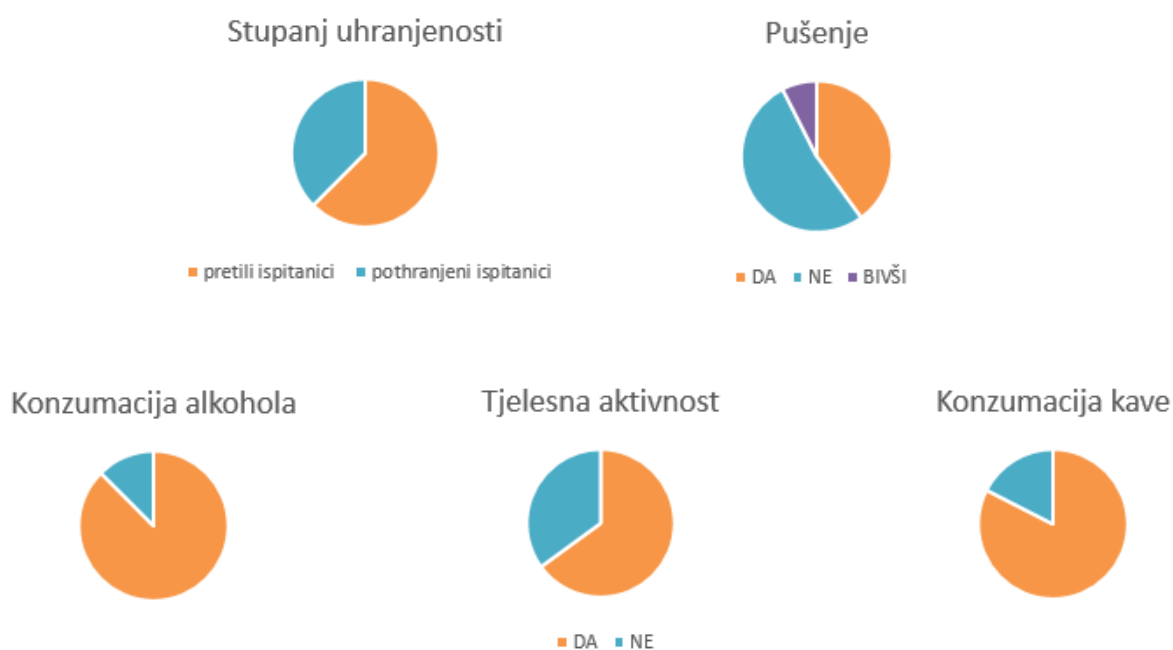
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Svrha ovog rada bila je povezivanje stupnja uhranjenosti sa sastavom crijevne mikrobiote te povezivanje različitih životnih stilova s razlikama u crijevnoj mikrobioti ispitanika. Pretilost i pothranjenost su faktori koji iznimno utječu na zdravlje te njih u općoj populaciji se određuje računanjem ITM. Pretilost se smatra bolešću 21. stoljeća te se povezuje s razvojem kardiovaskularnih bolesti, dijabetesom tipa II, hipertenzije, različitih vrsta tumora itd. Uzroci pretilosti su višestruki i kompleksni te se u zadnje vrijeme proučava veza između zastupljenosti određenih vrsta mikroorganizama u crijevnoj mikrobioti s pretilošću. Crijevna mikrobiota ima važnu ulogu u zdravlju i održavanju zdravlja ljudi, neke od njenih funkcija su jačanje imunskog sustava, proizvodnja vitamina, zaštita od patogenih bakterija i proizvodnja kratkolančanih masnih kiselina. Njen sastav i raznolikost se mijenjaju kroz život, pri različitim prehranbenim obrascima, pri bolestima probavnog sustava, uzimanju lijekova, posebno antibiotika, te pri različitom stilu života. Faktori koji su uključeni u ovaj rad i koji mogu utjecati na raznolikost, bogatstvo i sastav crijevne mikrobiote su konzumacija alkohola, kave, cigareta i tjelesna aktivnost. Na uzorku od ukupno 40 ispitanika provjeravane su razlike u sastavu i bogatstvu crijevne mikrobiote s obzirom na stupanj uhranjenosti i različit životni stil. Ispitanici su prvo ispunjavali upitnik koji je sadržavao pitanja o životnim i prehranbenim navikama. Nakon toga su prikupljeni uzorci fecesa i zamrznuti na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Iz uzoraka je izolirana DNA QIAamp® PowerFecal® DNA kitom, izmjerena je koncentracija DNA Shimadzu BioSpec Nano spektrofotometrom te je čista DNA sekvencionirana Illumina MiSeq uređajem. Sirovi podaci sekvencioniranja DNA su obrađeni QIIME 2 programom nakon čega su dobiveni rezultati kao taksonomska zastupljenost bakterija u pojedinom uzorku, alfa i beta raznolikost te ancom analiza kojom se određuje značajnost različite zastupljenosti bakterija između grupa (pušači, konzumacija alkohola, kave, tjelesna aktivnost).

### 4.1. ISPITANICI

Od ukupno 40 ispitanika žena je bilo 18 (45 %), a muškaraca 22 (55 %). Ispitanici su izabrani iz dva provedena istraživanja Laboratorija za bioinformatiku na osnovu ITM-a i to tako da su korišteni podaci ispitanika čiji je ITM bio veći od  $27\text{ kg m}^{-2}$  ili manji od  $20\text{ kg m}^{-2}$  kako bi se naglasile razlike između grupa. Pretelih ispitanika je bilo 25 (62,5 %), a pothranjenih 15 (37,5 %). Životni stil obuhvaća pitanja o konzumaciji alkohola, konzumaciji kave, pušenju i tjelesnoj aktivnosti te su odgovori ispitanika prikazani na slici 7. Tjelesnom aktivnosti se bavi

26 ispitanika (65 %), a ne bavi 14 ispitanika (35 %). Među ispitanicima su pušači (16; 40 %), nepušači (21; 52,5 %) i bivši pušači (3; 7,5 %). Većina ispitanika konzumira alkohol (35; 87,5 %), dok manji broj ispitanika ne konzumira alkohol (5; 12,5 %). Kavu konzumiraju 33 ispitanika (82,5 %), dok 7 ispitanika (17,5 %) ne konzumira kavu. Kad se promatraju posebno pretili i pothranjeni ispitanici, skupine su prilično slične po spolu, udjelu ispitanika koji se bave tjelesnom aktivnosti te onih koji konzumiraju alkohol i kavu. Razlika je jedino da manje ispitanika u pothranjenoj skupini puši. U skupini pretilih ispitanika 64 % se bavi tjelesnom aktivnosti dok se 36 % ne bavi; 48 % ispitanika puši, 44 % ne puši dok su 8 % bivši pušači; alkohol konzumira 84 % ispitanika, a 16 % ne konzumira alkohol; kavu konzumira 88 % ispitanika dok 12 % ispitanika ne konzumira kavu. U skupini pothranjenih ispitanika tjelesnom aktivnosti se bavi 67 % ispitanika, a 33 % se ne bavi tjelesnom aktivnosti; 27 % su pušači, 67 % su nepušači, a 6 % su bivši pušači; alkohol konzumira 93 % ispitanika dok ih 7 % ne konzumira alkohol; kavu konzumiraju 73 % ispitanika, a 27 % ispitanika ne konzumira kavu.

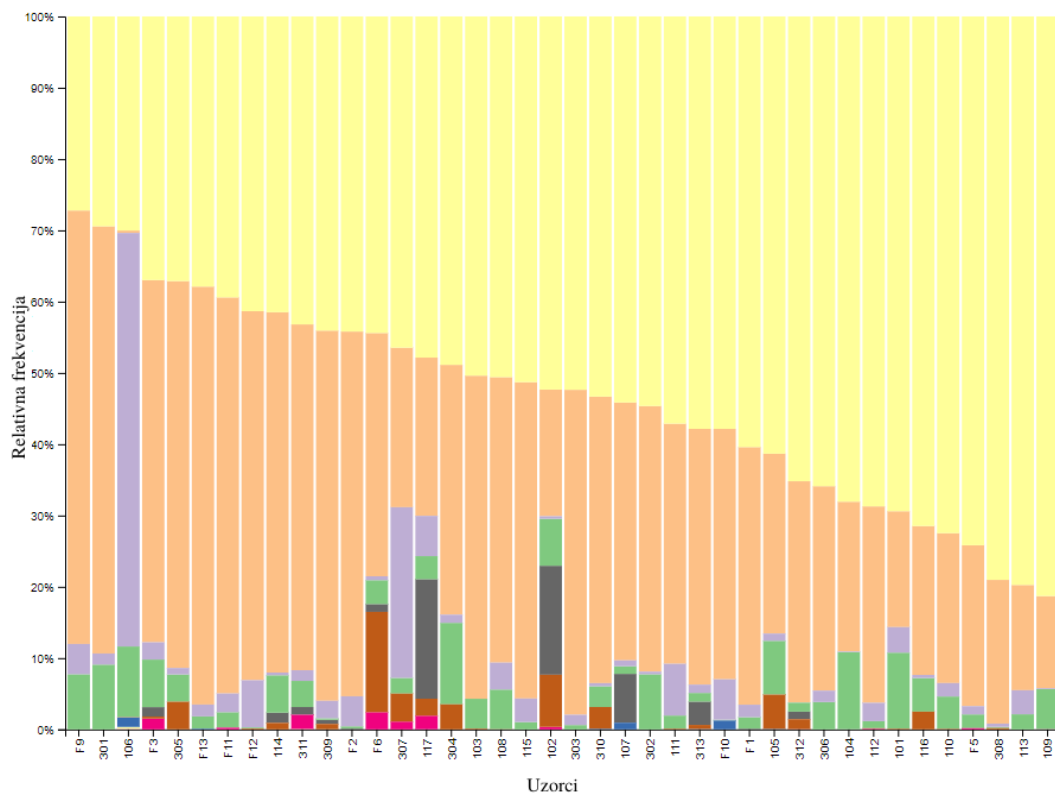


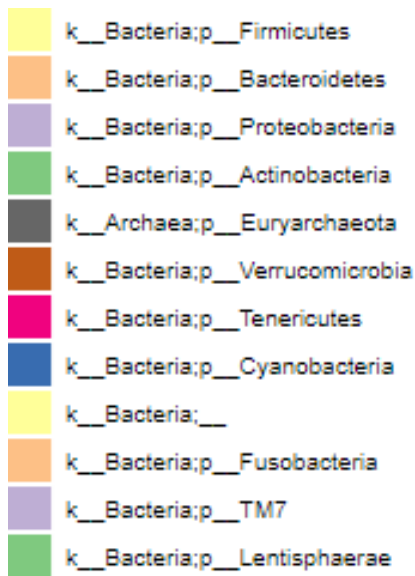
**Slika 7.** Grafički prikazi odgovora ukupnih ispitanika na upitnik o životnom stilu i prehranbenim navikama



## 4.2. TAKSONOMSKA ZASTUPLJENOST MIKROORGANIZAMA U UZORCIMA

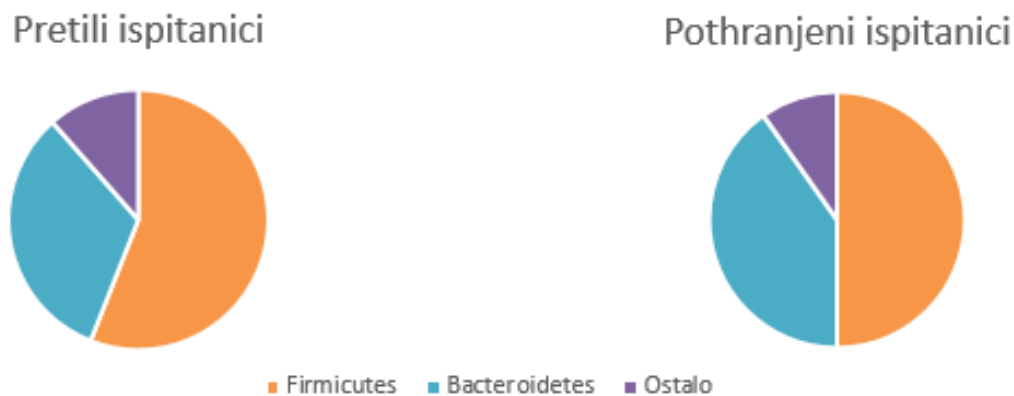
Vizualni prikaz taksonomske zastupljenosti nam daje udio pojedine taksonomske kategorije u uzorku. Taksonomske kategorije su prikazane slovima te označavaju domenu („k“), koljeno („p“), razred („c“), red („o“), porodicu („f“), rod („g“) i vrstu („s“). Slika 8 prikazuje vizualizaciju rezultata taksonomske zastupljenosti u QIIME 2 pregledniku. Iz slike je vidljiva zastupljenost koljena *Firmicutes* u uzorcima, poredana od najmanje do najveće zastupljenosti. Uzorci koji imaju najmanju zastupljenost koljena *Firmicutes* su F9 (27,2 %), 301 (29,4 %) i 106 (30 %). Ispitanici pod šifrom F9 i 301 pripadaju pothranjenoj skupini, dok 106 pripada pretiloj skupini. Uzorci koji imaju najveću zastupljenost koljena *Firmicutes* su 109 (81,3 %), 113 (79,7%) i 308 (79 %). Ispitanici 109 i 113 pripadaju pretiloj skupini ispitanika, dok 308 pripada pothranjenoj skupini. Na dijagramu još iskače podatak za ispitanicu 106. Spomenuta ima malu zastupljenost koljena *Firmicutes* dok ima najveći udio koljena *Proteobacteria* (58 %). Ispitanica se ne bavi tjelesnom aktivnosti, konzumira alkohol, ne puši i ne konzumira kavu. Na slici se može vidjeti i zastupljenost ostalih koljena od kojih je još važno spomenuti zastupljenost koljena *Bacteroidetes*. Ispitanici F9 (60,8 %) i 301 (59,9 %) imaju najveću zastupljenost koljena, dok ispitanica 106 ima daleko najmanju zastupljenost od 0,3 %.





**Slika 8.** Stupčasti dijagram zastupljenosti koljena *Firmicutes* u uzorcima (Projekt MicroEquilibrium: 101-117 pretili ispitanici, 301-313 pothranjeni ispitanici; Projekt BioDinamik: F1, F2, F3, F5, F10, F11, F12, F13 pretili ispitanici, F6 i F9 pothranjeni ispitanici)

Wan i sur. (2020) nisu uočili statistički značajne razlike u sastavu crijevne mikrobiote i omjeru *Firmicutes/Bacteroidetes* kod pretilih, pothranjenih i ispitanika normalne tjelesne mase. Yun i sur. (2017) su također došli do zaključka da nema statistički značajne razlike u omjeru *Firmicutes/Bacteroidetes* između grupa. Gao i sur. (2020) su među grupama primijetili jednaku zastupljenosti koljena *Firmicutes*, ali veću zastupljenost koljena *Bacteroidetes* kod pretilih ispitanika. Rezultati istraživanja u ovom radu su u skladu s rezultatima Wan i sur. (2020) te Yun i sur. (2017). Na slici 9 može se vidjeti da je kod pretilih ispitanika veća razlika između udjela *Firmicutes* i *Bacteroidetes* nego kod pothranjenih ispitanika. Kako je i očekivano pretili ispitanici imaju više udjela koljena *Firmicutes* (56 %) u odnosu na *Bacteroidetes* (33 %) dok pothranjeni ispitanici imaju veći udio koljena *Bacteroidetes* (50 %) nego koljena *Firmicutes* (40 %). Međutim primijećena razlika nije statistički značajna, što je i potvrđeno ANCOM analizom na nivou koljena, porodice i roda.

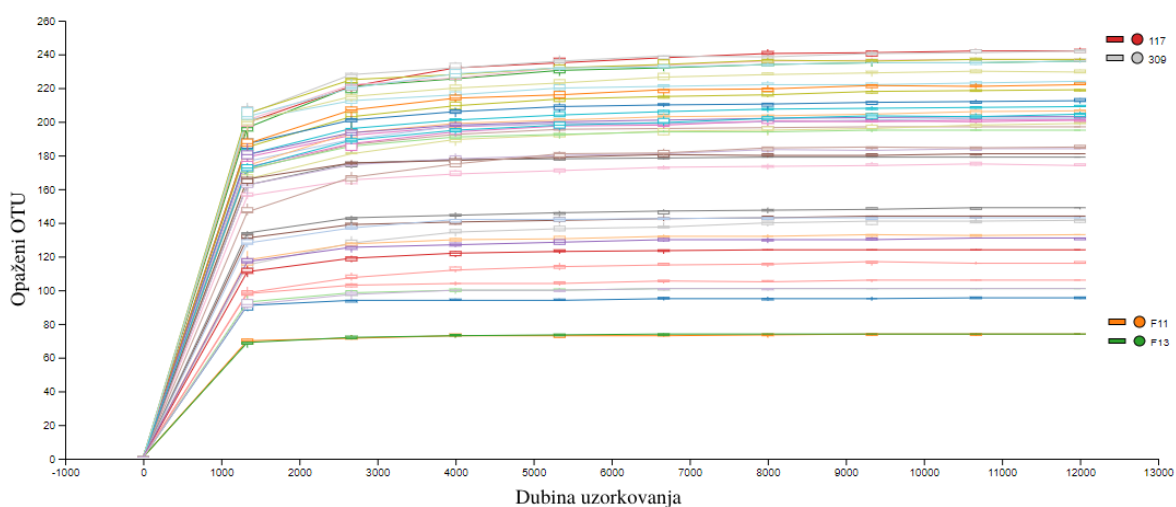


**Slika 9.** Udio koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* kod pretilih i pothranjenih ispitanika

### 4.3. ALFA RAZNOLIKOST

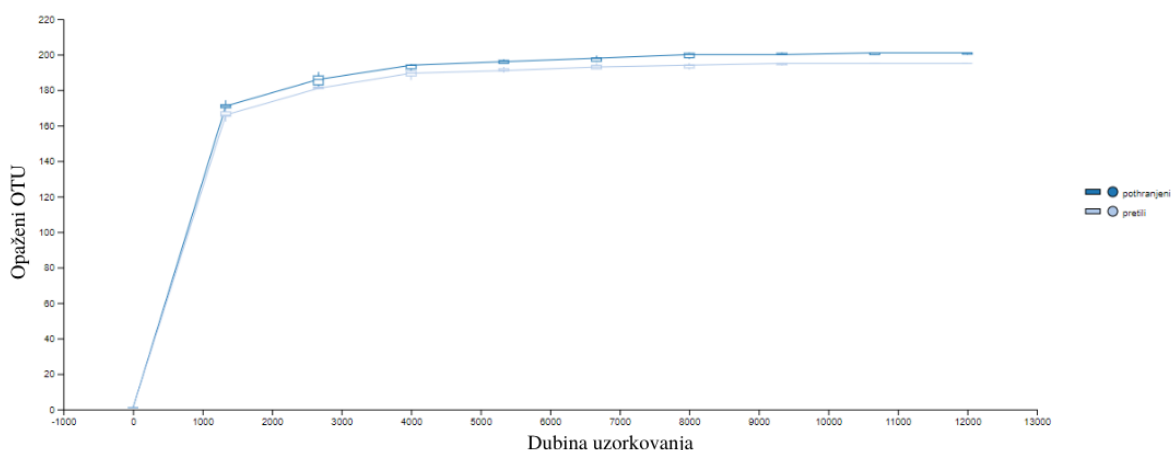
Alfa raznolikost daje procjenu o raznolikosti i bogatstvu pojedinog uzorka odnosno daje nam procjenu broja vrsta u svakom uzorku. Na x-osi se nalazi dubina uzorkovanja (eng. sequencing depth), a na y-osi broj opaženih OTU-a (eng. observed otus). Broj opaženih OTU-a uzima u obzir samo prisutnost ili odsutnost određenih taksonomskih jedinica, a ne uzima u obzir koliko puta su se pojavile u uzorku. Dubina uzorkovanja određuje broj očitanih sekvenci po uzorku.

Slika 10 prikazuje alfa raznolikost po uzorcima mjerenu observed\_otus metrikom, najveću raznolikost imaju uzorci 309 (pothranjeni) i 117 (pretili), a najmanju raznolikost imaju uzorci F11 i F13 koji pripadaju skupini pretilih ispitanika.



**Slika 10.** Alfa raznolikost mjerena observed\_otus metrikom, prikazana po uzorcima

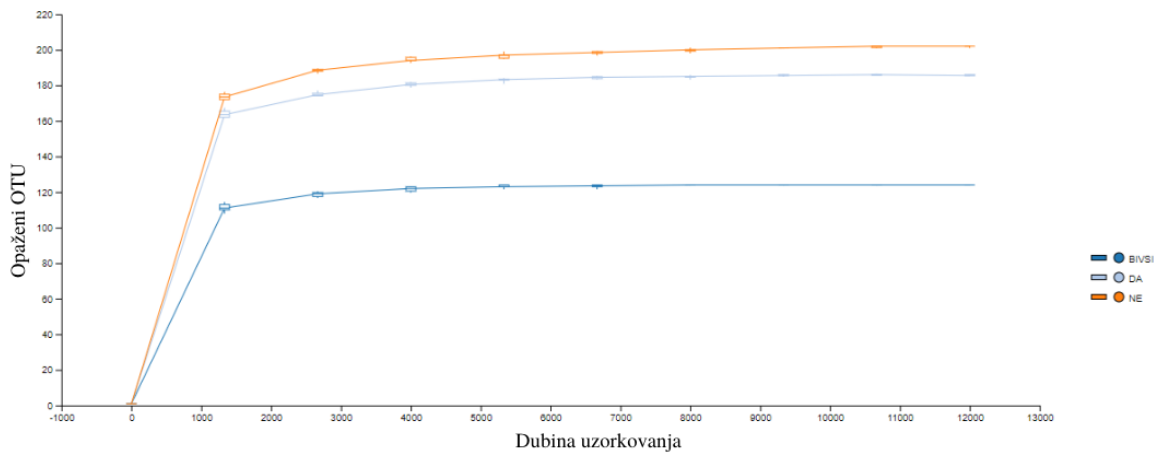
Wan i sur. (2020) su uočili da pretili i pothranjeni ispitanici imaju manju alfa raznolikost od ispitanika normalne tjelesne mase. Yun i sur. (2017) potvrđuju manju raznolikost crijevne mikrobiote pretilih ispitanika. Dok su Gao i sur. (2018) zaključili da pothranjeni ispitanici imaju najveću alfa raznolikost. U ovom radu nije uočena velika razlika u alfa raznolikosti između pothranjenih i pretilih ispitanika, što je prikazano slikom 11, te je to potvrđeno i analizom značajnosti između grupa (eng. alpha-group-significance). U obzir se mora uzeti da u radu nije bila uključena grupa ispitanika normalne tjelesne mase pa se raznolikost drugih grupa nije mogla usporediti s njom, za pothranjene ispitanike uzet je ITM manji od  $20 \text{ kg m}^{-2}$ , iako bi po definiciji to trebali biti ispitanici s ITM manjim od  $18,5 \text{ kg m}^{-2}$ , a pretili ispitanici nisu podijeljeni u ispitanike s prekomjernom tjelesnom masom i na stupnjeve pretilosti nego su grupirani svi skupa.



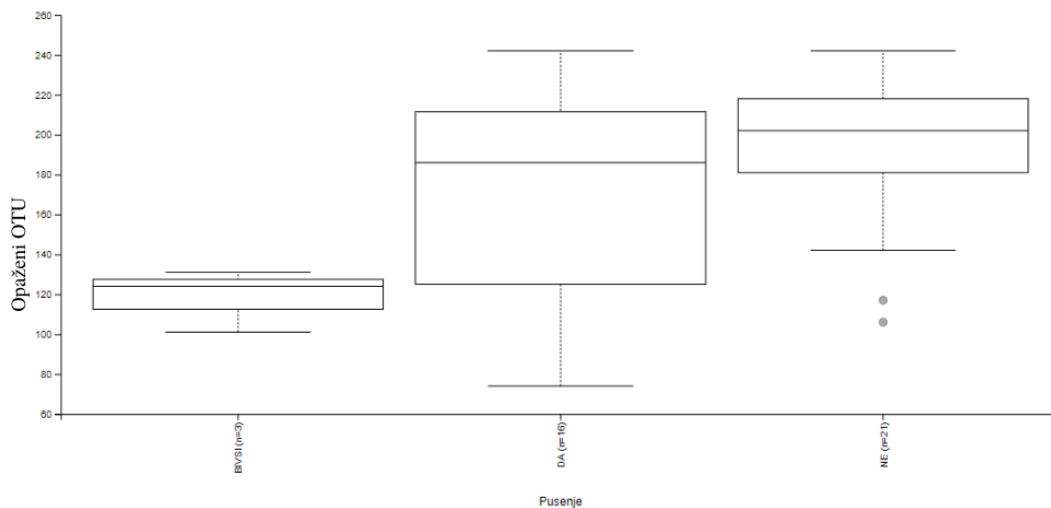
**Slika 11.** Alfa raznolikost prikazana observed\_otus metrikom za grupe ispitanika podijeljene prema ITM

Kod bivših pušača dolazi do povećanja alfa raznolikosti, povećanja udjela koljena *Bacteroidetes* i smanjenja udjela koljena *Fimicutes* (Sublette i sur., 2020). Drugo istraživanje je imalo suprotne zaključke, a to su da prestankom pušenja dolazi do povećanja udjela koljena *Firmicutes*, a smanjenja udjela koljena *Bacteroidetes* te da nema statistički značajne razlike u alfa raznolikosti (Lee i sur., 2018). U ovom radu nakon analize značajnosti alfa raznolikosti po grupama nema statistički značajne razlike u alfa raznolikosti između pušača, nepušača i bivših pušača (prikazano slikom 13) što je u skladu s istraživanjem Lee i sur. (2018). Bivši pušači

imaju najmanju alfa raznolikost što se ne poklapa s rezultatima navedenih istraživanja u kojima je ona sličnija raznolikosti nepušača (prikazano slikom 12). Također ANCOM analizom je zaključeno nema statistički značajne razlike u zastupljenosti pojedinih bakterija između pušača i nepušača što nije u skladu s navedenim istraživanjima.



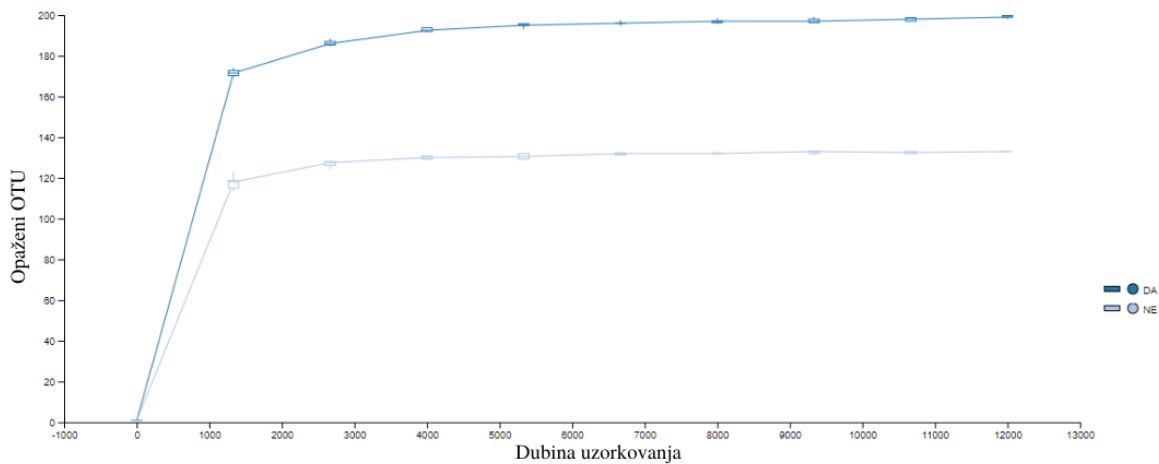
**Slika 12.** Alfa raznolikost prikazana observed\_otus metrikom za grupe pušača, nepušača i bivših pušača



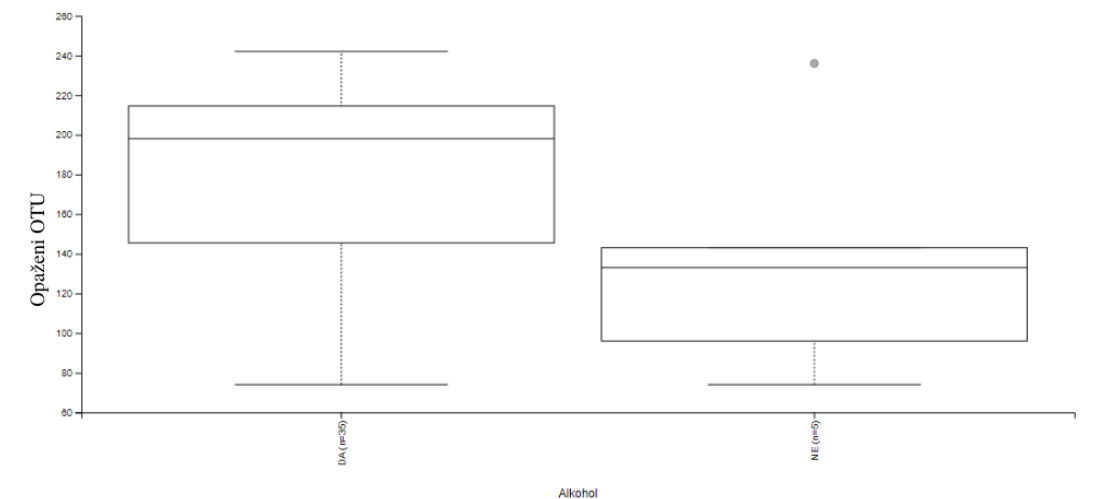
**Slika 13.** Analiza značajnosti alfa raznolikosti po grupi (pušači, nepušači i bivši pušači)

Umjerenja konzumacija alkoholnih pića koja su bogata polifenolima općenito blagotvorno utječe na zdravlje te povećava koncentraciju rodova kao što su *Bacteroides* i *Bifidobacterium* (Quesada-Molina i sur., 2019), dok pretjerana konzumacija alkohola dovodi do poremećaja ravnoteže mikrobiote i smanjuje udio koljena *Bacteroidetes* i roda *Lactobacillus*

(Meroni i sur., 2019). Usporedbom utjecaja konzumacije bezalkoholnog i alkoholnog piva uočena je razlika u alfa i beta raznolikosti što govori da alkohol negativno utječe na raznolikost crijevne mikrobiote. Uočeno je i da konzumiranje obje vrste piva povećava udio koljena *Bacteroidetes* te smanjuje udio koljena *Firmicutes* (Hernández-Quiroz i sur., 2019). Upitnik nije sadržavao pitanja vezana uz vrstu konzumiranog alkohola, ali je na slici 14, koja prikazuje graf alfa raznolikosti, vidljiva razlika u bogatstvu između skupine koja konzumira i ne konzumira alkohol. Ta razlika se nakon analize značajnosti alfa raznolikosti po grupama nije pokazala statistički značajnom te je to prikazano slikom 15.

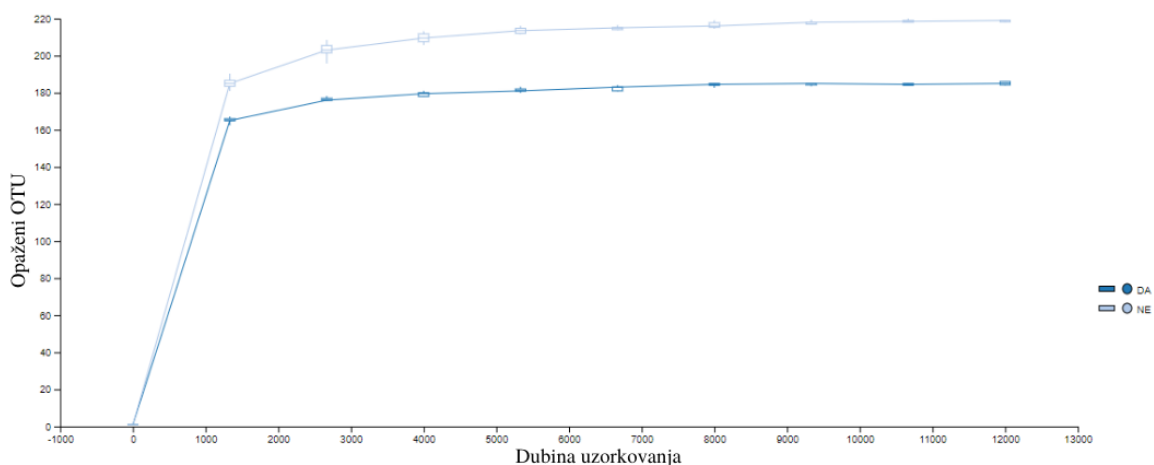


**Slika 14.** Alfa raznolikosti prikazana observed\_otus metrikom za grupe ispitanika koji konzumiraju i ne konzumiraju alkohol



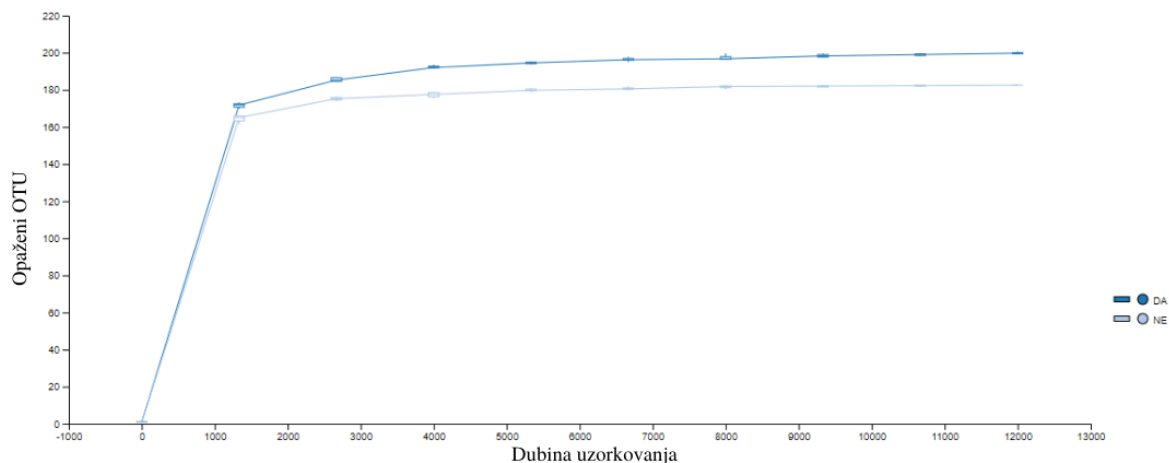
**Slika 15.** Analiza značajnosti između grupa ispitanika koji konzumiraju i ne konzumiraju alkohol

Svakodnevna konzumacija kave povećava udio *Bifidobacterium* roda (Gonzales i sur., 2020; Mansour i sur., 2020; Jacquet i sur., 2009). Nakon provedene ANCOM analize istraživanje nije potvrdilo značajne razlike u sastavu crijevne mikrobiote između grupa ispitanika. Alfa raznolikost kod ispitanika koji konzumiraju i onih koji ne konzumiraju kavu prikazana je na slici 16. Iako je iz grafa vidljivo da postoji razlika u bogatstvu između grupa analiza značajnosti alfa raznolikosti po grupama pokazala je da razlika nije statistički značajna.



**Slika 16.** Alfa raznolikost prikazana observed\_otus metrikom za grupe ispitanika ovisno o konzumaciji kave

Clarke i sur. (2014) su zaključili da sportaši imaju veću alfa raznolikost, znatno manju zastupljenost koljena *Bacteroidetes* te veći broj koljena, porodica i rodova. Mörkl i sur. (2017) su također uočili da sportaši imaju najveću alfa raznolikost. Tjelesna aktivnost povećava maksimalni aerobni kapacitet te se to povezuje s većim udjelom koljena *Bacteroidetes* (Mohr i sur., 2020). Bavljenje umjerenom tjelesnom aktivnosti povećava udio *Roseburia hominis*, *Akkermansia muciniphila* i *Faecalibacterium prausnitzii* (Bressa i sur., 2017). Istraživanje u ovom radu nakon provedene ANCOM analize nije potvrdilo statistički značajne razlike u sastavu crijevne mikrobiote ispitanika koji se bave tjelesnom aktivnosti i onih koji nisu tjelesno aktivni. Slika 17 prikazuje razliku u bogatstvu crijevne mikrobiote kod ispitanika koji se bave i onih koji se ne bave tjelesnom aktivnosti, razlika između skupina nije velika i analiza značajnosti alfa raznolikosti po grupama je to potvrdila.

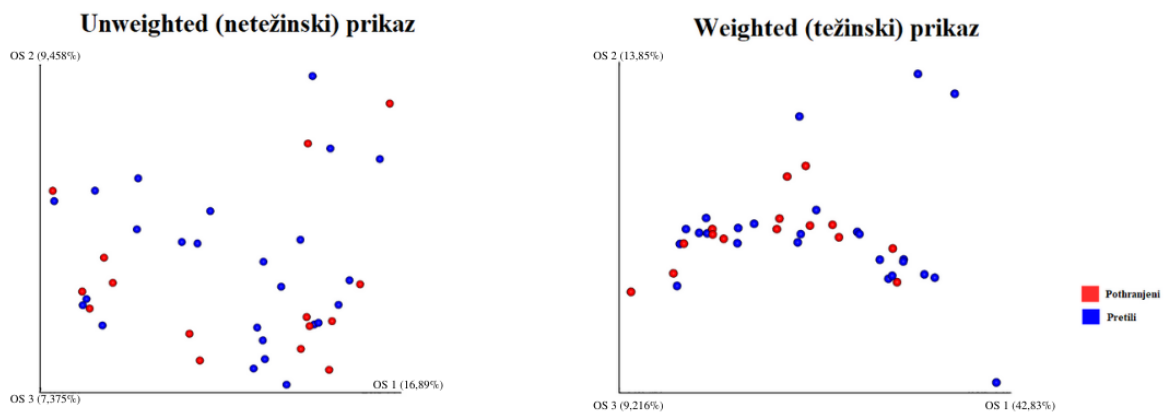


**Slika 17.** Alfa raznolikost prikazana `observed_otus` metrikom za grupe ispitanika ovisno o tjelesnoj aktivnosti

#### 4.4. BETA RAZNOLIKOST

Beta raznolikost daje mjeru sličnosti između uzoraka. Korištena je PCoA metoda (eng. Principal Coordinates Analysis) za prikaz rezultata u kojoj su uzorci smješteni u trodimenzionalni okvir te je udaljenost određena UniFrac metrikom. Time su dobivene `weighted.unifrac.emperor` i `unweighted.unifrac.emperor` datoteke. Unweighted (netežinski) prikaz uzima u obzir samo prisutnost pojedine bakterije, dok weighted (težinski) prikaz uzima u obzir prisutnost i zastupljenost pojedine bakterije. Što su točke na grafu bliže to su uzorci sličniji. U ovom radu nije došlo do grupiranja sličnih uzoraka vjerojatno zbog malog broja ispitanika i velike raznolikosti u sastavu crijevne mikrobiote te slika 18 prikazuje graf beta raznolikosti na temelju ITM i kao što je rečeno nije vidljivo grupiranje skupine pretilih ni pothranjenih. Prikazom beta raznolikosti s obzirom na pušenje, konzumiranje kave, alkohola i tjelesnu aktivnost također nije došlo do grupiranja sličnih uzoraka. Provedena analiza značajnosti između grupa nije pronašla statistički značajne razlike grupa definiranih životnim stilom.





**Slika 18.** Prikaz beta raznolikosti s obzirom na ITM ispitanika

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata provedenog istraživanja i rasprave, može se zaključiti sljedeće:

1. Nakon usporedbe taksonomske zastupljenosti mikroorganizama između pretile grupe ispitanika i pothranjene grupe ispitanika provedbom ANCOM analize nisu uočene statistički značajne razlike u sastavu crijevne mikrobiote, zastupljenosti koljena *Bacteroidetes*, zastupljenosti koljena *Firmicutes*, zastupljenosti ostalih mikroorganizama crijevne mikrobiote i omjera *Firmicutes/Bacteroidetes* s obzirom na ITM, konzumaciju kave, konzumaciju alkohola, pušenje i tjelesnu aktivnost.

2. Provedbom analize alfa raznolikosti i statističke provjere rezultata analizom značajnosti između grupa nisu utvrđene razlike u raznolikosti i bogatstvu crijevne mikrobiote s obzirom na ITM, konzumaciju kave, konzumaciju alkohola, pušenje i bavljenje tjelesnom aktivnosti.

3. Analizom beta raznolikosti, težinskim i netežinskim prikazom nije uočena grupacija uzoraka s obzirom na ITM, konzumaciju kave, konzumaciju alkohola, pušenje i tjelesnu aktivnost. Isto je potvrđeno i analizom značajnosti između grupa.

Potreban je veći broj ispitanika, kategorizacija po kroničnim bolestima, uključivanje učestalosti u životne faktore kako bi se utvrdio utjecaj ITM i životnog stila na sastav i bogatstvo crijevne mikrobiote.

## 6. LITERATURA

Allaband, C., McDonald, D., Vázquez-Baeza, Y., Minich, J. J., Tripathi, A., Brenner, D. A., Loomba, R., Smarr, L., Sandborn, W. J., Schnabl, B., Dorrestein, P., Zarrinpar, A., Knight, R. (2019) Microbiome 101: Studying, Analyzing, and Interpreting Gut Microbiome Data for Clinicians. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **17(2)**, 218–230.

Aoun, A., Darwish, F., Hamod, N. (2020) The Influence of the Gut Microbiome on Obesity in Adults and the Role of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics for Weight Loss. *Prev. Nutr. Food Sci.* **25(2)**, 113–123.

Apovian, C. M., Gokce, N. (2012) Obesity and cardiovascular disease. *Circulation.* **125(9)**, 1178–1182.

Aronne, L. J. (2002) Classification of Obesity and Assessment of Obesity-Related Health Risks. *Obes. Res.* **10(2)**, 105-115.

Bjørkhaug, S. T., Aanes, H., Neupane, S. P., Bramness, J. G., Malvik, S., Henriksen, C., Skar, V., Medhus, A. W., Valeur, J. (2019) Characterization of gut microbiota composition and functions in patients with chronic alcohol overconsumption. *Gut microbes.* **10(6)**, 663–675.

Bressa, C., Bailén-Andrino, M., Pérez-Santiago, J., González-Soltero, R., Pérez, M., Montalvo-Lominchar, M. G., Maté-Muñoz, J. L., Domínguez, R., Moreno, D., Larrosa, M. (2017) Differences in gut microbiota profile between women with active lifestyle and sedentary women. *PLoS One*, **12(2)**.

CDC (2020) Medical Complications of Obesity. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. <<https://www.cdc.gov/vitalsigns/adultobesity/infographic.html>> Pristupljeno 3. prosinca, 2020.

Cercato, C., Fonseca, F. A. (2019) Cardiovascular risk and obesity. *Diabetol. Metab. Syndr.* **11**, 74.

Choquet, H., Meyre, D. (2011) Molecular basis of obesity: current status and future prospects. *Curr. Genomics.* **12(3)**, 154–168.

Clarke, G., Sandhu, K. V., Griffin, B. T., Dinan, T. G., Cryan, J. F., Hyland, N. P., France, C. P. (2019) Gut Reactions: Breaking Down Xenobiotic–Microbiome Interactions. *Pharmacol. Rev.* **71(2)**, 198-224.

- Clarke, S. F., Murphy, E. F., O'Sullivan, O., Lucey, A. J., Humphreys, M., Hogan, A., Hayes, P., O'Reilly, M., Jeffery, I. B., Wood-Martin, R., Kerins, D. M., Quigley, E., Ross, R. P., O'Toole, P. W., Molloy, M. G., Falvey, E., Shanahan, F., Cotter, P. D. (2014) Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut*. **63(12)**, 1913–1920.
- Coelho, M., Oliveira, T., Fernandes, R. (2013) Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch. Med. Sci.* **9(2)**, 191–200.
- Davis C. D. (2016) The Gut Microbiome and Its Role in Obesity. *Nutr. Today*. **51(4)**, 167–174.
- de Koning, L., Merchant, A. T., Pogue, J., Anand, S. S. (2007) Waist circumference and waist-to-hip ratio as predictors of cardiovascular events: meta-regression analysis of prospective studies. *Eur. Heart J.* **28(7)**, 850–856.
- Dieterich, W., Schink, M., Zopf, Y. (2018) Microbiota in the Gastrointestinal Tract. *Med. Sci.* **6(4)**, 116.
- Dudek-Wicher, R. K., Junka, A., Bartoszewicz, M. (2018) The influence of antibiotics and dietary components on gut microbiota. *Prz. Gastroenterol.* **13(2)**, 85–92.
- Dunn, A. B., Jordan, S., Baker, B. J., Carlson, N. S. (2017) The Maternal Infant Microbiome: Considerations for Labor and Birth. *MCN Am. J. Matern. Child. Nurs.* **42(6)**, 318–325.
- Duren, D. L., Sherwood, R. J., Czerwinski, S. A., Lee, M., Choh, A. C., Siervogel, R. M., Cameron Chumlea, W. (2008) Body composition methods: comparisons and interpretation. *J. Diabetes Sci. Technol.* **2(6)**, 1139–1146.
- Eknoyan, G. A. (2006) History of obesity, or how what was good became ugly and then bad. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **13(4)**, 421–427.
- Elattar, S. Satyanarayana, A. (2015) Can Brown Fat Win the Battle Against White Fat? *J. Cell. Physiol.* **230(10)**, 2311–2317.
- Ellulu, M. S., Patimah, I., Khaza'ai, H., Rahmat, A., Abed, Y. (2017) Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Arch. Med. Sci.* **13(4)**, 851–863.
- Fouhy, F., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C., Cotter, P. D. (2012) Composition of the early intestinal microbiota: knowledge, knowledge gaps and the use of high-throughput sequencing to address these gaps. *Gut microbes.* **3(3)**, 203–220.

- Fruh S. M. (2017) Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable long-term weight management. *J. Am. Assoc. Nurse Pract.* **29(1)**, 3–14.
- Gao, X., Zhang, M., Xue, J., Huang, J., Zhuang, R., Zhou, X., Zhang, H., Fu, Q., Hao, Y. (2018) Body Mass Index Differences in the Gut Microbiota Are Gender Specific. *Front. Microbiol.* **9**, 1250.
- Ghesmaty Sangachin, M., Cavuoto, L. A., Wang, Y. (2018) Use of various obesity measurement and classification methods in occupational safety and health research: a systematic review of the literature. *Obesity.* **5**, 28.
- González, S., Salazar, N., Ruiz-Saavedra, S., Gómez-Martín, M., de Los Reyes-Gavilán, C. G., Gueimonde, M. (2020) Long-Term Coffee Consumption is Associated with Fecal Microbial Composition in Humans. *Nutrients.* **12(5)**, 1287.
- Hernández-Quiroz, F., Nirmalkar, K., Villalobos-Flores, L. E., Murugesan, S., Cruz-Narváez, Y., Rico-Arzate, E., Hoyo-Vadillo, C., Chavez-Carbajal, A., Pizano-Zárate, M. L., García-Mena, J. (2020) Influence of moderate beer consumption on human gut microbiota and its impact on fasting glucose and  $\beta$ -cell function. *Alcohol*, **85**, 77–94.
- Hruby, A., Hu, F. B. (2015) The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics.* **33(7)**, 673-89.
- Janda, J. M., Abbott, S. L. (2007) 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* **45(9)**, 2761–2764.
- Jaquet, M., Rochat, I., Moulin, J., Cavin, C., Bibiloni, R. (2009) Impact of coffee consumption on the gut microbiota: a human volunteer study. *Int. J. Food Microbiol.* **130(2)**, 117–121.
- Komaroff, M. (2016) For Researchers on Obesity: Historical Review of Extra Body Weight Definitions. *J. Obes.* 1-9.
- Koppel, N., Balskus, E. P. (2016) Exploring and Understanding the Biochemical Diversity of the Human Microbiota. *Cell Chem Biol.* **23(1)**, 18-30.
- Kotzbeck, P., Giordano, A., Mondini, E., Murano, I., Severi, I., Venema, W., Cecchini, M. P., Kershaw, E. E., Barbatelli, G., Haemmerle, G., Zechner, R., Cinti, S. (2018) Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation. *J. Lipid Res.* **59(5)**, 784–794.

- Kuriyan, R. (2018) Body composition techniques. *Indian J. Med. Res.* **148(5)**, 648–658.
- Laitinen, K., Morkkala, K. (2019) Overall Dietary Quality Relates to Gut Microbiota Diversity and Abundance. *Int. J. Mol. Sci.* **20(8)**, 1835.
- Lee, S. H., Yun, Y., Kim, S. J., Lee, E. J., Chang, Y., Ryu, S., Shin, H., Kim, H. L., Kim, H. N., Lee, J. H. (2018) Association between Cigarette Smoking Status and Composition of Gut Microbiota: Population-Based Cross-Sectional Study. *J. Clin. Med.* **7(9)**, 282.
- Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Parrillo, L., Formisano, P., Raciti, G. A., Beguinot, F., Miele, C. (2019) Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int. J. Mol. Sci.* **20(9)**, 2358.
- Luong, Q., Huang, J., Lee, K. Y. (2019) Deciphering White Adipose Tissue Heterogeneity. *Biology.* **8(2)**, 23.
- Mansour, A., Mohajeri-Tehrani, M. R., Karimi, S., Sanginabadi, M., Poustchi, H., Enayati, S., Asgarbeik, S., Nasrollahzadeh, J., Hekmatdoost, A. (2020) Short term effects of coffee components consumption on gut microbiota in patients with non-alcoholic fatty liver and diabetes: A pilot randomized placebo-controlled, clinical trial. *EXCLI J.* **19**, 241–250.
- Marizzoni, M., Gurry, T., Provasi, S., Greub, G., Lopizzo, N., Ribaldi, F., Festari, C., Mazzelli, M., Mombelli, E., Salvatore, M., Mirabelli, P., Franzese, M., Soricelli, A., Frisoni, G. B., Cattaneo, A. (2020) Comparison of Bioinformatics Pipelines and Operating Systems for the Analyses of 16S rRNA Gene Amplicon Sequences in Human Fecal Samples. *Front. Microbiol.* **11**, 1262.
- Mazloom, K., Siddiqi, I., Covasa, M. (2019) Probiotics: How Effective Are They in the Fight against Obesity? *Nutrients.* **11(2)**, 258.
- McCuen-Wurst, C., Ruggieri, M., Allison, K. C. (2018) Disordered eating and obesity: associations between binge-eating disorder, night-eating syndrome, and weight-related comorbidities. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1411(1)**, 96–105.
- Meroni, M., Longo, M., Dongiovanni, P. (2019) Alcohol or Gut Microbiota: Who Is the Guilty? *Int. J. Mol. Sci.* **20(18)**, 4568.
- Mohr, A. E., Jäger, R., Carpenter, K. C., Kerksick, C. M., Purpura, M., Townsend, J. R., West, N. P., Black, K., Gleeson, M., Pyne, D. B., Wells, S. D., Arent, S. M., Kreider, R. B., Campbell, B. I., Bannock, L., Scheiman, J., Wissent, C. J., Pane, M., Kalman, D. S., Pugh, J. N., Ortega-

Santos, C. P., Ter Haar, J. A., Arciero, P. J., Antonio, J. (2020) The athletic gut microbiota. *J. Int. Soc. Sports. Nutr.* **17(1)**, 24.

Moore, R. E., Townsend, S. D. (2019) Temporal development of the infant gut microbiome. *Open Biol.* **9**.

Mörkl, S., Lackner, S., Müller, W., Gorkiewicz, G., Kashofer, K., Oberascher, A., Painold, A., Holl, A., Holzer, P., Meinitzer, A., Mangge, H., Holasek, S. (2017) Gut microbiota and body composition in anorexia nervosa inpatients in comparison to athletes, overweight, obese, and normal weight controls. *Int. J. Eat. Disord.* **50(12)**, 1421–1431.

Mosca, A., Leclerc, M., Hugot, J. P. (2016) Gut Microbiota Diversity and Human Diseases: Should We Reintroduce Key Predators in Our Ecosystem? *Front. Microbiol.* **7**, 455.

Musić Milanović, S. (2020) Odjel za promicanje tjelesnog zdravlja. Hrvatski Zavod za Javno Zdravstvo (HZJZ) <<https://www.hzjz.hr/sluzba-promicanje-zdravlja/odjel-za-prevenciju-debljine/>> Pristupljeno 1. kolovoza 2020.

NHS (2020) 9 medical reasons for putting on weight. NHS – National Health Service <<https://www.nhs.uk/live-well/healthy-weight/nine-medical-reasons-for-putting-on-weight/>> Pristupljeno 26. kolovoza 2020.

Nuttall, F. Q. (2015) Body Mass Index: Obesity, BMI, and Health: A Critical Review. *Nutr. Today.* **50(3)**, 117–128.

O'Sullivan, A., Farver, M., Smilowitz, J. T. (2015) The Influence of Early Infant-Feeding Practices on the Intestinal Microbiome and Body Composition in Infants. *Nutr. Metab. Insights*, **8**, 1–9.

Perić, M., Čipičić Paljetak, H., Matijašić, M., Verbanac, D. (2011) Debljina, Mikrobiote i imunomodulacija. *Infektološki glasnik.* **31(1)**, 49-58.

Purnell, J. Q. (2018) Definitions, Classification, and Epidemiology of Obesity. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279167/>> Pristupljeno 1. kolovoza 2020.

QIIME (2020) <<http://qiime.org/>> Pristupljeno 5. studenog 2020.

QIIME (2020) Overview of QIIME 2 Plugin Workflows. <<https://docs.qiime2.org/2020.8/tutorials/overview/>> Pristupljeno 25. studenog 2020.

- Quesada-Molina, M., Muñoz-Garach, A., Tinahones, F. J., Moreno-Indias, I. (2019) A New Perspective on the Health Benefits of Moderate Beer Consumption: Involvement of the Gut Microbiota. *Metabolites*. **9(11)**, 272.
- Rinninella, E., Cintoni, M., Raoul, P., Lopetuso, L. R., Scaldaferri, F., Pulcini, G., Miggianno, G., Gasbarrini, A., Mele, M. C. (2019b) Food Components and Dietary Habits: Keys for a Healthy Gut Microbiota Composition. *Nutrients*. **11(10)**, 2393.
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggianno, G., Gasbarrini, A., Mele, M. C. (2019a) What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*. **7(1)**, 14.
- Ríos-Prego, M., Anibarro, L., Sánchez-Sobrino, P. (2019) Relationship between thyroid dysfunction and body weight: a not so evident paradigm. *Int. J. Gen. Med.* **12**, 299–304.
- Romieu, I., Dossus, L., Barquera, S., Blottière, H. M., Franks, P. W., Gunter, M., Hwalla, N., Hursting, S. D., Leitzmann, M., Margetts, B., Nishida, C., Potischman, N., Seidell, J., Stepien, M., Wang, Y., Westerterp, K., Winichagoon, P., Wiseman, M., Willett, W. C. (2017) Energy balance and obesity: what are the main drivers? *Cancer Causes Control*. **28(3)**, 247–258.
- Sanyal, D., Raychaudhuri, M. (2016) Hypothyroidism and obesity: An intriguing link. *Indian J. Endocrinol Metab.* **20(4)**, 554–557.
- Schernthaner-Reiter, M. H., Siess, C., Gessl, A., Scheuba, C., Wolfsberger, S., Riss, P., Knosp, E., Luger, A., Vila, G. (2019) Factors predicting long-term comorbidities in patients with Cushing's syndrome in remission. *Endocrine*. **64(1)**, 157–168.
- 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(1)**, 73.
- Sohail, M. U., Yassine, H. M., Sohail, A., Al Thani, A. A. (2019) Impact of Physical Exercise on Gut Microbiome, Inflammation, and the Pathobiology of Metabolic Disorders. *Rev. Diabet Stud.* **15**, 35–48.
- Song, E. J., Lee, E. S., Nam, Y. D. (2018) Progress of analytical tools and techniques for human gut microbiome research. *J. Microbiol.* **56(10)**, 693-705.



Stewart, C. J., Auchtung, T. A., Ajami, N. J., Velasquez, K., Smith, D. P., De La Garza, R., 2nd, Salas, R., Petrosino, J. F. (2018) Effects of tobacco smoke and electronic cigarette vapor exposure on the oral and gut microbiota in humans: a pilot study. *PeerJ*. **6**, 4693.

Stone, T. W., McPherson, M., Gail Darlington, L. (2018) Obesity and Cancer: Existing and New Hypotheses for a Causal Connection. *EBioMedicine*. **30**, 14–28.

Sublette, M. G., Cross, T. L., Korcarz, C. E., Hansen, K. M., Murga-Garrido, S. M., Hazen, S. L., Wang, Z., Oguss, M. K., Rey, F. E., Stein, J. H. (2020) Effects of Smoking and Smoking Cessation on the Intestinal Microbiota. *J. Clin. Med.* **9(9)**, 2963.

Suez, J., Zmora, N., Zilberman-Schapira, G., Mor, U., Dori-Bachash, M., Bashiardes, S., Zur, M., Regev-Lehavi, D., Ben-Zeev Brik, R., Federici, S., Horn, M., Cohen, Y., Moor, A. E., Zeevi, D., Korem, T., Kotler, E., Harmelin, A., Itzkovitz, S., Maharshak, N., Shibolet, O., Pevsner-Fischer, M., Shapiro, H., Sharon, I., Halpern, Z., Segal, E., Elinav, E. (2018) Post-Antibiotic Gut Mucosal Microbiome Reconstitution Is Impaired by Probiotics and Improved by Autologous FMT. *Cell*, **174(6)**,1406-1423

Sun, C., Chen, L., Shen, Z. (2019) Mechanisms of gastrointestinal microflora on drug metabolism in clinical practice. *Saudi Pharm J.* **27(8)**, 1146–1156.

Telle-Hansen, V. H., Holven, K. B., Ulven, S. M. (2018) Impact of a Healthy Dietary Pattern on Gut Microbiota and Systemic Inflammation in Humans. *Nutrients*. **10(11)**, 1783.

Thaker V. V. (2017) Genetic and epigenetic causes of obesity. *Adolesc. Med. State. Art. Rev.* **28(2)**, 379–405.

The medical biochemistry page (2020) Obesity: Metabolic and Clinical Consequences. <<http://themedicalbiochemistrypage.org/obesity-metabolic-and-clinical-consequences/>>

Pristupljeno 3. prosinca 2020.

Vich Vila, A., Collij, V., Sanna, S., Sinha, T., Imhann, F., Bourgonje, A. R., Mujagic, Z., Jonkers, D., Masclee, A., Fu, J., Kurilshikov, A., Wijmenga, C., Zhernakova, A., Weersma, R. K. (2020) Impact of commonly used drugs on the composition and metabolic function of the gut microbiota. *Nat. Commun.* **11(1)**, 362.

Wan, Y., Yuan, J., Li, J., Li, H., Yin, K., Wang, F., Li, D. (2020) Overweight and underweight status are linked to specific gut microbiota and intestinal tricarboxylic acid cycle intermediates. *Clin. Nutr.* **39(10)**, 3189–3198.

Weinstock G. M. (2012) Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature*, **489(7415)**, 250–256.

WHO (2008) Waist Circumference and Waist-Hip Ratio. Report of WHO Expert Consultation, Geneva. WHO - World Health Organization.

WHO (2020) Obesity. WHO - World Health Organization. <[https://www.who.int/topics/obesity/en/#:~:text=Overweight%20and%20obesity%20are%20defined,her%20height%20\(in%20metres\)](https://www.who.int/topics/obesity/en/#:~:text=Overweight%20and%20obesity%20are%20defined,her%20height%20(in%20metres))> Pristupljeno 1. kolovoza 2020.

Wright, S. M., Aronne, L. J. (2012) Causes of obesity. *Abdom. Imaging*, **37(5)**, 730-732.

Yang, I., Corwin, E. J., Brennan, P. A., Jordan, S., Murphy, J. R., Dunlop, A. (2016) The Infant Microbiome: Implications for Infant Health and Neurocognitive Development. *Nurs. Res.* **65(1)**, 76-88.

Yun, Y., Kim, H. N., Kim, S. E., Heo, S. G., Chang, Y., Ryu, S., Shin, H., Kim, H. L. (2017) Comparative analysis of gut microbiota associated with body mass index in a large Korean cohort. *BMC microbiology*, **17(1)**, 151.

Zhang, S., Chen, D. C. (2019) Facing a new challenge: the adverse effects of antibiotics on gut microbiota and host immunity. *Chin. Med. J.* **132(10)**, 1135–1138.

Zhernakova, A., Kurilshikov, A., Bonder, M. J., Tigchelaar, E. F., Schirmer, M., Vatanen, T., Mujagic, Z., Vila, A. V., Falony, G., Vieira-Silva, S., Wang, J., Imhann, F., Brandsma, E., Jankipersadsing, S. A., Joossens, M., Cenit, M. C., Deelen, P., Swertz, M. A., Weersma, R. K., Feskens, E. J., Netea, M. G., Gevers, D., Jonkers, D., Franke, L., Aulchenko, Y. S., Huttenhower, C., Raes, J., Hofker, M. H., Xavier, R. J., Wijmenga, C., Fu, J. (2016) Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science*, **352(6285)**, 565-569.

# PRILOZI

## PRILOG 1. UPITNIK PROJEKTA BIODINAMIK

### Copy of ANKETA

Istraživanje, metode prikupljanja uzoraka i metode analize uzoraka su odobrene od strane Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta (MZOS) i Europskog socijalnog fonda (ESF). Istraživanje će biti provedeno u Republici Hrvatskoj.

Ove informacije će se koristiti pri analizi mog mikrobioma te se mogu koristiti sada i u budućnosti u znanstvenim publikacijama i dodatnim istraživanjima. Pristajem pružiti minimalne potrebne informacije bez otkrivanja vlastitog identiteta. Jamčim da neću krivotvoriti informacije.

Za dobivanje anonimnog ID-a koje će Biodinamik anketase koristiti u istraživanju se možete prijaviti na stranici projekta <http://biodinamik.pbf.hr/id.php>

\* Required

1. Vaš ID broj u istraživanju je: \*

---

2. Spol \*

Mark only one oval.

Muški

Ženski

3. Starost \*

Mark only one oval.

18 - 29

30 -39

40 -49

50 - 59

60 - 69

4. Bračni status \*

Mark only one oval.

oženjen/udana

živim u vanbračnoj zajednici

rastavljen/a

slobodan(na)

ne želim odgovoriti

5. Obrazovanje \*

Mark only one oval.

- osnovna škola
- srednja škola
- fakultet
- ne želim odgovoriti

6. Visina u cm: \*

\_\_\_\_\_

7. Težina u kg: \*

\_\_\_\_\_

8. Jeste li uzimali antibiotike u zadnja 3 mjeseca? \*

Mark only one oval.

- DA
- NE

9. Ako ste uzimali antibiotik molimo napisite koji.

\_\_\_\_\_

10. Tip prehrane \*

Mark only one oval.

- svejed
- vegetarijanac
- vegan
- posebna prehrana (za dijabetičare, bubrežne bolesnike, srčane bolesnike...)
- Other: \_\_\_\_\_

11. Jeste li fizički aktivni? \*

Mark only one oval.

- DA
- NE

12. Koliko vremena trošite na fizičke aktivnosti?

*Mark only one oval.*

- više od pola sata dnevno
- do pola sata dnevno
- pola sata tjedno
- pola sata mjesečno

13. Kojim fizičkim aktivnostima se bavite?

*Check all that apply.*

- Trčanje/hodanje
- Biciklizam
- Plivanje
- Društveni sportovi (nogomet, košarka, odbojka, hokej...)
- Fitness, aerobik, pilates, joga i sl.

Other:  \_\_\_\_\_

14. Pušite li? \*

*Mark only one oval.*

- Da
- Ne
- Bivši pušač

15. Konzumirate li alkohol? \*

*Mark only one oval.*

- Ne
- svaki dan
- jednom tjedno
- jednom mjesečno

16. Način poroda \*

*Mark only one oval.*

- vaginalno
- carski rez
- ne znam

17. Prosječna učestalost stolice? \*

*Mark only one oval.*

- > dva puta dnevno
- jednom dnevno
- jednom u dva dana
- < jednom u dva dana

18. Smatrate li da ste? \*

*Mark only one oval.*

- Normalne težine
- Imam nekoliko kila viška
- Premršav(a)
- Pretil(a)

19. Debljate li se brzo? \*

*Mark only one oval.*

- Ne
- Da
- Samo ako dulje vrijeme previše jedem

20. Želite li biti u boljoj formi? \*

*Mark only one oval.*

- Da
- Ne

21. Što radite da bi poboljšali zdravstveno stanje ili smanjili težinu? \*

*Check all that apply.*

- Jedem zdraviju hranu
- Pazim na veličinu porcija
- Radim kardio vježbe (trčanje, hodanje, biciklizam, ples...)
- Radim vježbe za jačanje i tonus (sklekovi, dizanje utega, teretana...)
- Na restriktivskoj dijeti sam
- Ne radim ništa

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

*Check all that apply.*

- stres
- nedostatak vremena
- nedostatak potpore okoline
- finansijski razlozi
- nedostatak informacija
- nedostatak upornosti

23. Koliko prosječno spavate dnevno? \*

*Mark only one oval.*

- Manje od 5 sati
- Između 5 i 7 sati
- Više od 8 sati

24. Koliko prosječno jedete obroka dnevno? \*

*Mark only one oval.*

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5 i više

25. Koliko često doručkujete? \*

*Mark only one oval.*

- svaki dan
- ponekad
- rijetko
- nikad

26. Na poslu/školi: \*

*Mark only one oval.*

- donosite ručak od doma
- kupujete hranu u menzi
- kupujete fast food
- jedete grickalice
- jedem slatkiše
- preskačem ručak

27. Koliko često konzumirate kavu? \*

*Mark only one oval.*

- svaki dan
- jednom tjedno
- nekoliko puta tjedno
- jednom mjesečno
- nekoliko puta mjesečno
- nekoliko puta godišnje
- ne konzumiram

28. Koliko često konzumirate čaj? \*

*Mark only one oval.*

- svaki dan
- jednom tjedno
- nekoliko puta tjedno
- jednom mjesečno
- nekoliko puta mjesečno
- nekoliko puta godišnje
- ne konzumiram



29. Koliko često konzumirate mlijeko? \*

*Mark only one oval.*

- svaki dan
- jednom tjedno
- nekoliko puta tjedno
- jednom mjesečno
- nekoliko puta mjesečno
- nekoliko puta godišnje
- ne konzumiram

30. Koliko često konzumirate pivo? \*

*Mark only one oval.*

- svaki dan
- jednom tjedno
- nekoliko puta tjedno
- jednom mjesečno
- nekoliko puta mjesečno
- nekoliko puta godišnje
- ne konzumiram

31. Koliko često konzumirate vino? \*

*Mark only one oval.*

- svaki dan
- jednom tjedno
- nekoliko puta tjedno
- jednom mjesečno
- nekoliko puta mjesečno
- nekoliko puta godišnje
- ne konzumiram

32. Koliko često konzumirate jaka alkoholna pića? \*

*Mark only one oval.*

- svaki dan
- jednom tjedno
- nekoliko puta tjedno
- jednom mjesečno
- nekoliko puta mjesečno
- nekoliko puta godišnje
- ne konzumiram

33. Koliko često konzumirate 100%-tne prirodne sokove ? \*

*Mark only one oval.*

- svaki dan
- jednom tjedno
- nekoliko puta tjedno
- jednom mjesečno
- nekoliko puta mjesečno
- nekoliko puta godišnje
- ne konzumiram

34. Koliko često konzumirate gazirana pića? \*

*Mark only one oval.*

- svaki dan
- jednom tjedno
- nekoliko puta tjedno
- jednom mjesečno
- nekoliko puta mjesečno
- nekoliko puta godišnje
- ne konzumiram

35. Koliko često konzumirate voće? \*

*Mark only one oval.*

- svaki dan
- jednom tjedno
- nekoliko puta tjedno
- jednom mjesečno
- nekoliko puta mjesečno
- nekoliko puta godišnje
- ne konzumiram

36. Koliko često konzumirate povrće? \*

*Mark only one oval.*

- svaki dan
- jednom tjedno
- nekoliko puta tjedno
- jednom mjesečno
- nekoliko puta mjesečno
- nekoliko puta godišnje
- ne konzumiram

37. Koliko često konzumirate meso? \*

*Mark only one oval.*

- svaki dan
- jednom tjedno
- nekoliko puta tjedno
- jednom mjesečno
- nekoliko puta mjesečno
- nekoliko puta godišnje
- ne konzumiram

38. Koliko često konzumirate ribu? \*

Mark only one oval.

- svaki dan
- jednom tjedno
- nekoliko puta tjedno
- jednom mjesečno
- nekoliko puta mjesečno
- nekoliko puta godišnje
- ne konzumiram

39. Koliko često konzumirate kruh? \*

Mark only one oval.

- svaki dan
- jednom tjedno
- nekoliko puta tjedno
- jednom mjesečno
- nekoliko puta mjesečno
- nekoliko puta godišnje
- ne konzumiram

40. Koristite li umjetne zaslađivače? \*

Mark only one oval.

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

41. Kako se osjećate u zadnjih mjesec dana? \*

Mark only one oval.

- |           | 1                     | 2                     | 3                     | 4                     | 5                     |         |
|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------|
| Vrlo loše | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | Odlično |

42. Koliko ste često naduti? \*

Mark only one oval.

	1	2	3	4	5	
nikada	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	svaki dan

43. Konzumirate li neke od sljedećih lijekova? \*

Check all that apply.

- Hormonalna terapija
- Analgetici
- Antidepresivi
- Dodatne supleme
- Statini (kolesterol)
- Drugo
- Ništa od navedenog

44. Da li patite od neke od sljedećih bolesti/poremećaja:

Check all that apply.

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

45. Alergič(an/na) sam na: \*

*Check all that apply.*

- Pelud
- Orašaste plodove (kikiriki, lješnak, brazilski oraščić, badem, kokos)
- Voće (jagoda, kruška, banana, breskva, limun, naranča, ananas, jabuka)
- Povrće (rajčica, špinat, kupus, paprika)
- Meso (svinjetina, govedina, piletina, puretina)
- Plodovi mora (riba, račići, školjke, losos, tuna)
- Žitarice (pšenice, zob, kukuruz, sezam, heljda)
- Gluten
- Jaje
- Mlijeko
- Nemam alergiju

Other:  \_\_\_\_\_

46. Uzimate li probiotike? \*

*Mark only one oval.*

- Da
- Ne
- Ne kao suplemente, ali pijem probiotičke jogurte

47. Uzimate li suplemente (dodatke prehrani)? \*

*Check all that apply.*

- Ne
- Da, vitamine
- Da, minerale
- Da, amino kiseline
- Da, proteinske dodatke
- Da, vlakna (prebiotike)
- Da, biljne suplemente

48. Što ste jučer jeli za doručak? \*

---

---

---

---

---

49. Što ste jučer jeli za ručak? \*

---

---

---

---

---

50. Što ste jučer jeli za večeru? \*

---

---

---

---

---

51. Što ste prekjučer jeli za doručak? \*

---

---

---

---

---

52. Što ste prekjučer jeli za ručak?

---

---

---

---

---

53. Što ste prekjučer jeli prekjučer za večeru?

---

---

---

---

---

## PRILOG 2. UPITNIK PROJEKTA MICROEQUILIBRIUM

### MicroEquilibrium - kratki upitnik za sudjelovanje

\* Required

1. Email address \*

---

2. Ime i prezime: \*

---

3. Datum rođenja: \*

---

*Example: January 7, 2019*

4. Spol: \*

*Mark only one oval.*

Muški

Ženski

5. Visina (cm): \*

---

6. Tjelesna masa (kg): \*

---

7. Bolujete li od neke kronične bolesti? \*

*Check all that apply.*

Ne bolujem od nikakvih kroničnih bolesti

Kardiovaskularna oboljenja

Visoki krvni tlak

Dijabetes (šećerna bolest) tip I

Dijabetes (šećerna bolest) tip II

Hiperlipidemija

Hiperkolesterolemija

Other:  

---



8. Jeste li uzimali antibiotik u zadnja 3 mjeseca? \*

Mark only one oval.

DA

NE

9. Patite li od zatvora? \*

Mark only one oval.

DA

NE

10. Osjetljivost na alergene (uključujući lijekove) \*

Mark only one oval.

DA

NE

11. Ako ste osjetljivi na neki alergen molimo navedite koji:

\_\_\_\_\_

12. Muči li Vas prekomjerna tjelesna masa i/ili pretilost: \*

Mark only one oval.

DA

NE

13. Uzimate li TRENUTNO neke od ovih LIJEKOVA (terapija)? \*

Check all that apply.

Analgetici

Antidepresivi

Hormonalna terapija

Statini (kolesterol)

Antihipertenzivi (visoki krvni tlak)

Oralni hipoglikemizantni lijekovi (dijabetes)

Ne uzimam nikakvu terapiju

Other:  \_\_\_\_\_

14. Uzimate li TRENUTNO neki od ovih DODATAKA PREHRANI? \*

*Check all that apply.*

- Vitaminsko – mineralni pripravci / biljni suplementi
- Zamjenski obroci (npr. Nupo, Herbalife, Spirutein i sl.)
- Energetske / proteinske pločice
- Proteinski dodatak prehrani
- Ne uzimam

15. Pušite li trenutno? \*

*Mark only one oval.*

- DA
- NE

16. Konzumirate li alkoholna pića? \*

*Mark only one oval.*

- DA
- NE
- Prigodno

17. Konzumirate li kavu? \*

*Mark only one oval.*

- DA
- NE

18. Provodite li neki poseban režim prehrane? \*

*Check all that apply.*

- Ne provodim poseban režim prehrane, konzumiram sve namirnice bez ograničenja
- Dijabetička prehrana
- Hrana sa smanjenim udjelom natrija
- Hrana sa smanjenim udjelom masnoća
- Vegetarijanstvo / veganstvo
- Hrana bez glutena

Other:  \_\_\_\_\_

19. Ukoliko provodite poseban režim prehrane on je:

*Mark only one oval.*

- Propisan od strane liječnika/dijetetičara  
 Moja osobna odluka bez utjecaja drugih osoba  
 Other: \_\_\_\_\_

20. Jeste li u posljednjih mjesec dana imali gubitak tjelesne mase veći od 5 kg? \*

*Mark only one oval.*

- DA  
 NE

21. Jeste li trenutno na dijeti s ciljem smanjenja tjelesne mase? \*

*Mark only one oval.*

- DA  
 NE

22. Ako DA, navesti kakvu dijetu provodite:

---

---

---

---

---

23. Bavite li se redovitom tjelesnom aktivnošću? \*

*Mark only one oval.*

- DA  
 NE

Za žene:

24. Amenoreja:

*Mark only one oval.*

- DA  
 NE

25. Menopauza

*Mark only one oval.*

- DA  
 NE

## Izjava o izvornosti

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

*Patricia Balorda*

---

Patricia Balorda