

Pridržavanje mediteranskog načina prehrane i utjecaj na mikrobiotu

Škarupka, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:159:239166>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2022.

Matea Škarupka

PRIDRŽAVANJE MEDITERANSKOG
NAČINA PREHRANE I UTJECAJ 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.

Rad je izrađen u sklopu projekta pod nazivom „Pilot projekt crijevna mikrobiota radno - aktivne populacije RH“. Ovaj projekt rezultat je suradnje znanstvenika s Instituta za antropologiju pod vodstvom dr. sc. Luke Bočkora sa znanstvenicima Prehrambeno- biotehnološkog fakulteta pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Jurice Žučka s ciljem određivanja sastava crijevne mikrobiote u radno-aktivnoj populaciji stanovništva RH na preliminarnom uzorku. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Instituta za antropologiju.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svom mentoru, izv. prof. dr. sc. Jurici Žučku, na pomoći, svim stručnim savjetima pri izradi diplomskog rada te vremenu i strpljenju za sva moja pitanja i nedoumice.

Najveću zahvalu dugujem svojim roditeljima i ostaloj obitelji na bezuvjetnoj podršci tijekom studiranja, što su bili uz mene, pomagali mi i ohrabivali me na svakom koraku mog studentskog i životnog puta.

Zahvaljujem se i svojim prijateljima i kolegama na pomoći i odličnom društvu tijekom studiranja.

Hvala Vam!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

PRIDRŽAVANJE MEDITERANSKOG NAČINA PREHRANE I UTJECAJ NA MIKROBIOTU

Matea Škarupka, univ. bacc. nutr. 0058211660

Sažetak: Mediteranska prehrana je način prehrane ljudi s područja mediteranskog bazena, a povezuje se s nizom pozitivnih učinaka na zdravlje. Glavna obilježja ovakvog tipa prehrane su visok udio nezasićenih masnih kiselina, visok unos žitarica, voća i povrća te nizak unos crvenog mesa. Crijevna mikrobiota je zajednica mikroorganizama koji obitavaju u probavnom sustavu domaćina, a sastav mikrobiote podložan je promjenama tijekom života. Prehrana ima velik utjecaj na sastav mikrobiote, stoga je cilj ovog rada bio povezati sastav mikrobiote s usklađenošću prehrane ispitanika s mediteranskom prehranom. U istraživanju je sudjelovalo 59 ispitanika oba spola, koji su ispunili opći upitnik o životnim i prehrambenim navikama te upitnik o usklađenošću prehrane s mediteranskom. Sastav crijevne mikrobiote određen je izolacijom DNA iz uzoraka stolice te sekvenciranjem na Illumina MiSeq uređaju. Podaci dobiveni sekvenciranjem obrađeni su QIIME2 programom. Prema rezultatima ovog rada nije uočena značajna povezanost usklađenošću prehrane s mediteranskom prehranom i sastavom crijevne mikrobiote na promatranoj skupini ispitanika.

Ključne riječi: *mikrobiota, sastav mikrobiote, mediteranska prehrana, životni stil*

Rad sadrži: 47 stranica, 16 slika, 2 tablice, 65 literaturnih navoda, 1 prilog

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. Ivana Rumora Samarin (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Jurica Žučko (mentor)
3. doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (član)
4. doc. dr. sc. Janko Diminić (zamjenski član)

Datum obrane: 21. srpnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

Graduate university study programme: Nutrition

ADHERENCE TO THE MEDITERRANEAN DIET AND IMPACT ON GUT MICROBIOME

Matea Škarupka, univ. bacc. nutr. 0058211660

Abstract: Mediterranean diet is a diet pattern followed by people from the Mediterranean basin area, and is associated with a number of positive health effects. Main characteristics of this type of diet are high content of unsaturated fatty acids, high intake of cereals, fruits and vegetables and low intake of red meat. Intestinal microbiota is a community of microorganisms that inhabit the hosts digestive system and its composition is susceptible to changes throughout life. Diet has a great influence on the composition of the microbiota, so the aim of this study was to link the composition of microbiota with the compliance of the subjects' diet with the Mediterranean diet. The study involved 59 subjects of both sexes, who completed a general questionnaire on lifestyle and eating habits and a questionnaire on the compliance of diet with the Mediterranean diet. The composition of the intestinal microbiota was determined by isolating DNA from stool samples and sequencing on an Illumina MiSeq device. The data obtained by sequencing was processed using QIIME2. The results of this study show no significant association of compliance with the Mediterranean diet and the composition of the intestinal microbiota in the observed group of subjects.

Keywords: *microbiota, composition of microbiota, Mediterranean diet, lifestyle*

Thesis contains: 47 pages, 16 figures, 2 tables, 65 references, 1 supplement

Original in: Croatian

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

Mentor: Jurica Žučko, PhD, Associate professor

Reviewers:

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

Thesis defended: July 21st, 2022

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. MIKROBIOTA.....	3
2.1.1. Sastav mikrobiote u probavnom sustavu ljudi	3
2.1.2. Utjecaj prehrane na sastav mikrobiote	5
2.1.3. Utjecaj životnog stila na sastav mikrobiote.....	6
2.1.4. Utjecaj mikrobiote na zdravlje ljudi.....	7
2.2. MEDITERANSKA PREHRANA	8
2.2.1. Značajke mediteranskog načina prehrane	9
2.2.2. Utjecaj mediteranske prehrane na zdravlje ljudi	12
2.2.3. Utjecaj mediteranske prehrane na sastav mikrobiote	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. ISPITANICI.....	15
3.2. METODE RADA.....	15
3.2.1. Dijetetičke metode	15
3.2.2. Genomičke metode	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1. ISPITANICI.....	19
4.2. USKLAĐENOST PREHRANE ISPITANIKA S MEDITERANSKOM PREHRANOM	21
4.3. TAKSONOMSKA ZASTUPLJENOST MIKROORGANIZAMA U UZORCIMA	24
4.3.1. Taksonomska zastupljenost mikroorganizama u uzorku svakog ispitanika.....	24
4.3.2. Taksonomska zastupljenost mikroorganizama sukladno usklađenosti prehrane s mediteranskom	26
4.4. ALFA RAZNOLIKOST	29
4.5. BETA RAZNOLIKOST	36
5. ZAKLJUČCI.....	40
6. LITERATURA.....	41

1. UVOD

Sa strogo nutricionističkog stajališta, mediteranska prehrana se odnosi na prehrambene navike stanovništva koje živi u zemljama koje okružuju Sredozemno more. Mediteranska prehrana, definirana tijekom polovice 20. stoljeća, karakterizirana je visokom konzumacijom hrane biljnog podrijetla, umjerenom konzumacijom ribe, mesa, mliječnih proizvoda i crnog vina uz obrok, te malom konzumacijom dodanih šećera i visoko prerađene hrane (Willett i sur., 1995). Međutim, pod pojmom mediteranske prehrane danas se obuhvaća i socijalno-kulturološki aspekt koji podrazumijeva druženje uz obrok, njegovanje kulinarskih znanja i vještina te druge bitne sastavnice poput adekvatnog odmora, tjelesne aktivnosti te sezonskog karaktera prehrane (Serra-Majem i sur., 2020). Mediteranska prehrana također ima potencijal pozitivnog djelovanja na okoliš u smislu korištenja tla, energetske potrebe, potrošnje vode i emisije stakleničkih plinova (Elliot, 2019). Uz sve navedeno, mediteranska prehrana pokazuje i pozitivan učinak na zdravlje. Veća usklađenost s mediteranskom prehranom povezuje se s manjom incidencijom te manjom učestalosti smrti od srčano-žilnih bolesti i različitih vrsta karcinoma. Također, pokazuje zaštitnički učinak na kognitivne funkcije, posebice kod Alzheimerove bolesti te demencije (Dinu i sur., 2018).

U današnje vrijeme, sve više istraživanja povezuje zdravlje, ali i razvoj bolesti s crijevnom mikrobiotom. Brojni klinički poremećaji povezani su s promjenama u sastavu mikrobnih zajednica povezanih s domaćinom, uključujući pretilost, pothranjenost i razne upalne bolesti kože, usta i probavnog sustava. Stoga se ljudsko tijelo može promatrati kao ekosustav, a ljudsko zdravlje kao proizvod usluga ekosustava koje djelomično pruža mikrobiota (Costello i sur., 2012). Mikrobiota crijeva je promjenjivi ekosustav, sadrži trilijune bakterija koje oblikuju mnogi čimbenici kao što su prehrambene navike, sezonalnost, način života, stres, upotreba antibiotika ili prisustvo bolesti (Rinninella i sur., 2019).

Postojeća istraživanja pokazuju da usvajanje pretežito biljne prehrane te visoko pridržavanje mediteranskom načinu prehrane ima povoljan učinak na mikrobiotu domaćina, pomaže u smanjenju upale, poboljšanju osjetljivosti na inzulin i promicanju optimalne energetske ravnoteže, što bi dodatno moglo dovesti do suzbijanja kroničnih bolesti koje su povezane s upalom niskog stupnja (Beam i sur., 2021).

Cilj ovoga rada bio je sekvenciranjem 16S rRNA i obradom podataka u QIIME 2 programu utvrditi povezanost između usklađenosti prehrane ispitanika s mediteranskom prehranom te sastava crijevne mikrobiote kod ispitanika oba spola različitih dobnih skupina. Osim usklađenosti prehrane s mediteranskom, u obzir su uzeti i drugi parametri koji utječu na sastav mikrobiote poput životnog stila, tjelesne aktivnosti, uzimanja probiotika te dodataka prehrani.

2. TEORIJSKI DIO

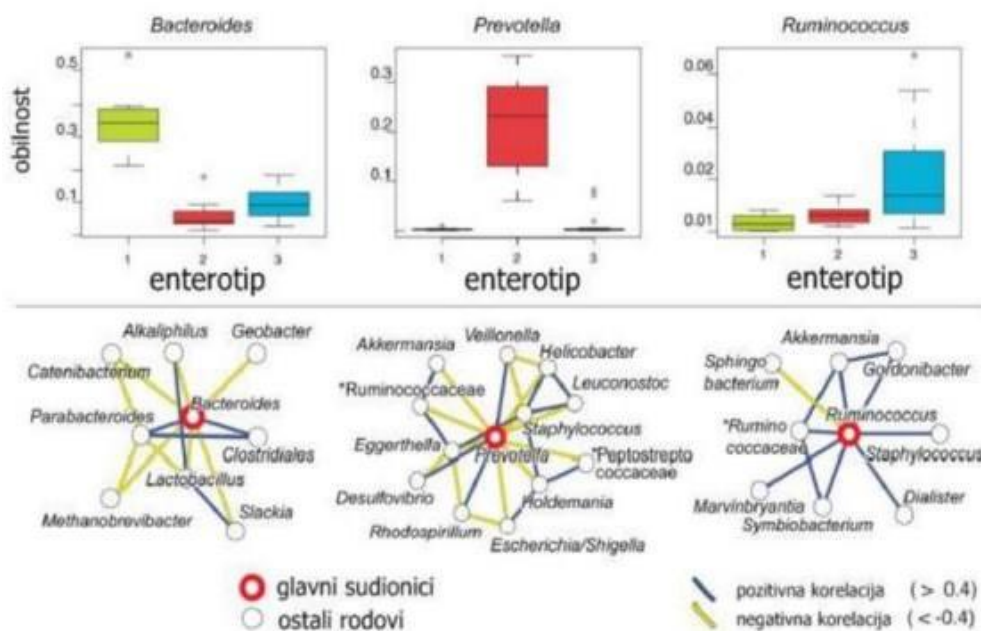
2.1. MIKROBIOTA

Mikrobiota se definira kao zajednica mikroorganizama koja uključuje viruse, bakterije, arheje te neke jednostanične eukariote koji nastanjuju određeno područje. Kada govorimo o ljudskoj mikrobioti, podrazumijevamo zajednicu svih ovih mikroorganizama koja nastanjuje površinu i unutrašnjost ljudskog organizma (D'Argenio i Salvatore, 2015). Nalazimo ih na koži, u probavnom sustavu, sluznici očiju te u slini. Bakterije su najbrojnija vrsta mikroorganizama koji čine mikrobiotu, premašujući broj virusa i arheja za 2 – 3 puta (Qin i sur., 2010). Otprilike 2 – 3 % tjelesne mase čovjeka čine sve bakterije koje nastanjuju ljudski organizam, a broj bakterijskih stanica gotovo je jednak broju ljudskih stanica i procjenjuje se na $3,8 * 10^{13}$ (Sender i sur., 2016). Mikrobiom se odnosi na ukupnost gena mikrobne populacije koja sačinjava mikrobiotu određenog staništa. Ljudski mikrobiom sastoji se od gotovo 5 milijuna gena, što nas čini „superorganizmima“ jer uvelike ovisimo o genima mikrobne populacije koja nastanjuje naš organizam (Walsh i sur., 2014; Qin i sur., 2010). Mikrobiota se dobiva rođenjem, a ona uvelike ovisi o načinu porođaja. Postporođajni sastav ljudske mikrobiote igra važnu ulogu u zdravlju dojenčadi pružajući otpornost na različite patogene, čime potiče stvaranje zdravog imunskog sustava (Costello i sur., 2012). Iako se sastav mikrobiote razlikuje kod svakog pojedinca, istraživanja su pokazala da pojedinci koji su u krvnom srodstvu često imaju sličan sastav mikrobiote. Zajednički život, uz druge okolišne faktore poput konzumacije iste vrste hrane smatraju se glavnim silama koje oblikuju humani mikrobiom (Gacesa i sur., 2022; Goodrich i sur., 2014).

2.1.1. Sastav mikrobiote u probavnom sustavu ljudi

Sastav mikrobiote u probavnom sustavu ljudi pod utjecajem je različitih faktora. Kao što je ranije spomenuto, prvi doticaj s mikrobim svijetom događa se za vrijeme porođaja (Costello i sur., 2012). Međutim, smatra se kako mikrobna kolonizacija crijeva započinje već *in utero* mikrobiotom placente i amnijske tekućine. Tijekom porođaja te kroz prvih nekoliko godina života, dolazi do stabilizacije sastava crijevne mikrobiote. Djeca rođena prirodnim putem imaju sastav crijevne mikrobiote koji dominira vrstama *Lactobacillus* i *Prevotella*, dok djeca rođena carskim rezom imaju sastav crijevne mikrobiote koji potiče od mikrobiote kože dobivene pri rođenju. Sastav njihove crijevne mikrobiote dominira bakterijskim vrstama rodova *Streptococcus*, *Corynebacterium* te *Propionibacterium*. Ovaj primarni sastav mikrobiote razvija

se s vremenom, postaje raznovrsniji te se stabilizira do treće godine starosti kada postaje sličniji onome u odrasloj životnoj dobi (Hasan i Yang, 2019; Collado i sur., 2016). U prvoj godini života sastav mikrobiote također ovisi o vrsti prehrane. Dojenčad hranjena majčinim mlijekom razvija stabilniju mikrobiotu koja dovodi do bolje razvijenog imunskog sustava, za razliku od djece hranjene dojenačkim formulama (Boudry i sur., 2021). Tijekom života, mikrobiota probavnog sustava nastavlja se razvijati i mijenjati pod različitim utjecajima. Iako sastav crijevne mikrobiote varira kod pojedinaca, sugerirano je da se mikrobiota većine pojedinaca može kategorizirati u jednu od tri vrste enterotipa na temelju dominantnih rodova. Tako pojedinci kod kojih prevladavaju bakterije roda *Bacteroides* pripadaju enterotipu 1, enterotipu 2 pripadaju pojedinci kod kojih prevladavaju bakterije roda *Prevotella*, a oni kod kojih dominiraju bakterije roda *Ruminococcus* pripadaju skupini enterotip 3 (slika 1) (Arumugam i sur., 2011). Međutim, iako ideja enterotipa uvelike olakšava definiranje i klasificiranje pojedinih mikrobiota, trenutno prevladavajuće mišljenje je da je mikrobiota kontinuiran i fluidan skup mikrobnih populacija te da definiranje diskretnih enterotipova nije moguće (Koren i sur., 2013).



Slika 1. Različiti enterotipovi u ljudskoj mikrobioti i njihove filogenetske razlike (prema Arumugam i sur., 2011)

2.1.2. Utjecaj prehrane na sastav mikrobiote

Prehrana je jedan od ključnih modulatora sastava crijevne mikrobiote, a sastav ovisi o makro- i mikronutrijentima, količini vlakana u prehrani te adekvatnoj hidraciji. Prehrambene navike mogu snažno utjecati na sastav crijevne mikrobiote pa tako zapadnjačka prehrana, bogata prerađenom hranom i aditivima, može smanjiti raznolikost crijevne mikrobiote što dovodi do disbioze, promjene barijere i propusnosti crijevne sluznice te abnormalne aktivacije imunoloških stanica, a rezultat je povećana incidencija kroničnih bolesti (Rinninella i sur., 2019).

Istraživanja su pokazala da promjenom prehrane iz prvenstveno zapadnjačke, bogate proteinima životinjskog podrijetla, u većinom biljnu prehranu, dolazi do promjene sastava mikrobiote u 24 sata. Također, pojedinci koji se hrane uglavnom hranom bogatom mastima imaju veći udio bakterija roda *Bacteroidetes*, dok oni čija se prehrana bazira na ugljikohidratima imaju više bakterija roda *Prevotella* (Clemente i sur., 2012).

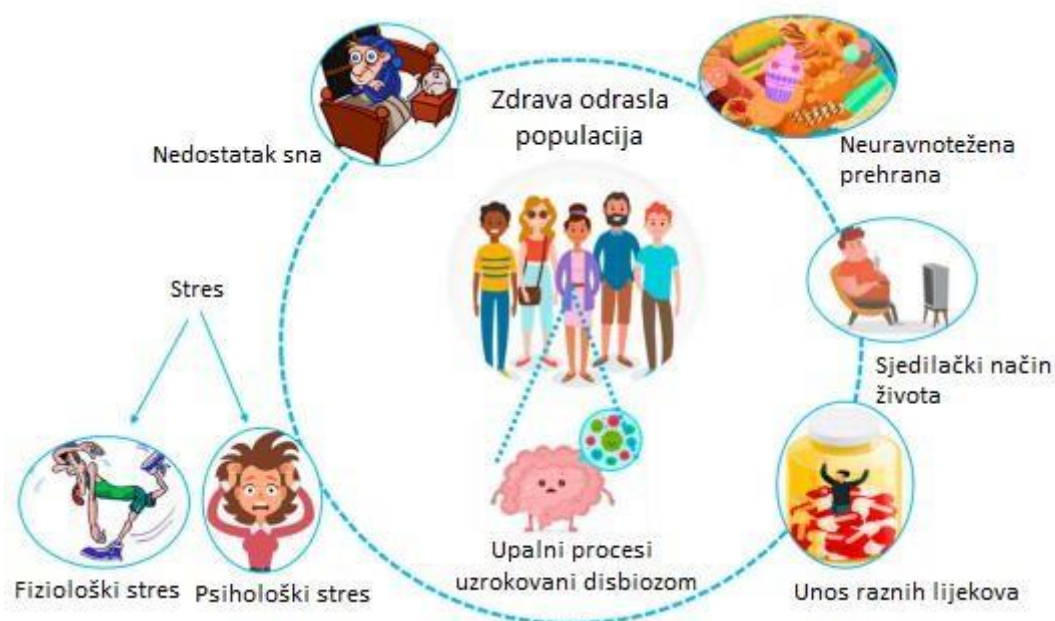
Osobe koje se hrane pretežito hranom biljnog podrijetla, vegetarijanci i vegani, imaju veći udio bakterija roda *Prevotella*. Također, imaju povećan udio bakterija roda *Ruminococcus*. Različite vrste ovog roda specijalizirane su za razgradnju složenih ugljikohidrata, kao što su celuloza i škrob, koje nalazimo u biljnoj hrani. Mikrobnom razgradnjom prehrambenih vlakana nastaje butirat, koji ima protuupalno djelovanje. Biljna prehrana bogata je prehrambenim vlaknima, polifenolima i drugim mikronutrijentima koji mogu imati pozitivan utjecaj na povećanje broja korisnih bakterija kao što su *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* (Rinninella i sur., 2019; Tomova i sur., 2019).

Suprotno od biljne prehrane, zapadnjačka prehrana često se bazira na većem unosu proteina životinjskog podrijetla, bogata je zasićenim mastima i industrijski prerađenom hranom. Ovakva prehrana često se povezuje s razvojem niza kroničnih bolesti. Također, ovakva prehrana povezuje se s razvojem crijevne disbioze koja može potaknuti lokaliziranu upalnu reakciju i uzrokovati povećanje crijevne propusnosti. Prehrana bogata mastima povećava proliferaciju određenih Gram – negativnih bakterija poput *Enterobacteriaceae* koje mogu negativno djelovati na zdravlje crijeva (Bibbò i sur., 2016).

2.1.3. Utjecaj životnog stila na sastav mikrobiote

Kao što je već rečeno, prehrana igra najvažniju ulogu u modulaciji sastava mikrobiote, međutim novija istraživanja ukazuju na vezu između crijevne mikrobiote i često zaboravljenih čimbenika životnog stila poput stresa, tjelesne aktivnosti, konzumacije raznih lijekova, mjesta stanovanja te korištenja cigareta. Stres je važan faktor koji utječe na zdravlje, promičući pozitivan ili negativan odgovor organizma. Kratkotrajno izlaganje stresu, fizičkom ili psihičkom, može pozitivno djelovati na imunosni sustav aktivirajući ga, međutim, kroničan stres dovodi do imunosupresivnosti, negativnog utjecaja na mentalno zdravlje te zdravlje probavnog sustava. Također, sve se više istražuje međusobna povezanost crijeva i mozga (eng. *gut-brain axis*) te na koje sve načine ova povezanost utječe na cjelokupno zdravlje. Promjene u sastavu crijevne mikrobiote mogu utjecati na moždanu aktivnost preko hormonalnih i živčanih puteva, pa tako neka istraživanja ukazuju na to da sastav crijevne mikrobiote može djelovati na raspoloženje što je povezano i s odgovorom na stres. Stanja emocionalnog stresa, kao što su anksioznost i depresija, obilježja su poremećaja raspoloženja koji su također povezani s promjenama u crijevnoj mikrobioti zdravih odraslih osoba poput smanjene količine potencijalno korisne bakterije *Lactobacillus* te prisutnosti tegoba probavnog sustava. Stres se također povezuje i s razvojem sindroma iritabilnog crijeva. Tjelesna aktivnost važna je za održavanje zdravlja srčano-žilnog sustava, mišića, zglobova, adekvatne tjelesne mase te promovira cjelokupno zdravlje. Osobe koje su tjelesno aktivne imaju veću raznolikost bakterija u probavnom sustavu za razliku od osoba koje žive sjedilačkim načinom života. Osim povećane raznolikosti, istraživanja pokazuju da prakticiranje umjerene tjelesne aktivnosti može modulirati bakterijske funkcije povećavajući proizvodnju korisnih metabolita, primjerice butirata, koji sudjeluju u regulaciji kolesterola i glukoze. Unos lijekova, zajedno s prehranom, jedan je od najvažnijih čimbenika koji sudjeluju u promjenama sastava crijevne mikrobiote. Najveća razlika u smanjenju raznolikosti u sastavu crijevne mikrobiote očituje se nakon unosa antibiotika. Određeni lijekovi poput antihistaminika, statina i mukolitika također negativno utječu na sastav i raznolikost crijevne mikrobiote. Mjesto stanovanja je također povezano sa sastavom crijevne mikrobiote, a ovisi faktorima poput načina prehrane u određenim zemljama svijeta te zagađenosti zraka i vode. Povezanost pušenja sa sastavom crijevne mikrobiote još uvijek nije dobro razjašnjena. Neka istraživanja ne pokazuju vezu između prestanka korištenja cigareta i sastava mikrobiote dok druga istraživanja pokazuju pozitivnu korelaciju - prestanak pušenja tijekom 8 tjedana može modificirati crijevnju mikrobiotu zdravih odraslih osoba, povećavajući

ukupnu raznolikost bakterija. Također, nakon intervencije došlo je do porasta količine bakterija koljena *Firmicutes* i *Actinobacteria* te smanjenja količine bakterija koljena *Proteobacteria* i *Bacteroidetes* (Redondo-Useros i sur., 2020; Conlon i Bird, 2015). Slika 2 prikazuje komponente životnog stila koje negativno utječu na sastav mikrobiote kod zdrave odrasle populacije.



Slika 2. Čimbenici životnog stila koji negativno utječu na zdravlje promičući disbiozu crijevne mikrobiote (prema Redondo-Useros i sur., 2020)

2.1.4. Utjecaj mikrobiote na zdravlje ljudi

Različite mikrobne vrste koje nastanjuju ljudski probavni sustav igraju temeljnu ulogu u dobrobiti domaćina. Mikrobiota sudjeluje u izvlačenju i skladištenju energije, probavi makro- i mikronutrijenata, fermentaciji neprobavljivih ugljikohidrata te stupa u interakcije s imunim sustavom dajući signale za poticanje sazrijevanja stanica koje sudjeluju u imunološkom odgovoru. Upravo iz ovih razloga, mikrobiota igra veliku ulogu u promicanju zdravlja, ali i u razvoju različitih bolesti. Pojava bolesti ne povezuje se s prekomjernim razmnožavanjem jedne bakterijske vrste, već s ukupnom disbiozom ili neravnotežom mikrobiote. Disbioza se može definirati kao smanjenje mikrobne raznolikosti te kombinacija gubitka korisnih bakterija, kao bakterija koje proizvode butirat, i povećanja bakterija koje mogu biti patogene u određenim

uvjetima (Humphreys, 2020). Bolesti povezane s mikrobnom disbiozom uključuju pretilost, autoimune i alergijske bolesti, upalnu bolest crijeva (IBD) te dijabetes (Clemente i sur., 2012). Kod pretilih osoba zamijećeno je povećanje u broju bakterija koljena *Firmicutes*, te proporcionalno smanjenje broja bakterija koljena *Bacteroidetes* što povećava kapacitet za pohranu energije. Određena istraživanja povezuju pretilost sa specifičnim bakterijama, kao što su obitelj *Christensenellaceae* i rodovi *Methanobacteriales*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Akkermansia*. Nedavno je utvrđeno da je obitelj *Christensenellaceae* povezana s gubitkom težine, a njezina relativna brojnost bila je obrnuto povezana s indeksom tjelesne mase domaćina. Novija istraživanja pokazuju i pozitivan utjecaj suplementacije bakterijom *Akkermansia muciniphila* koja poboljšava metaboličke parametre u pretilih subjekata (Bing-Nan i sur., 2021; Depommier i sur., 2020).

Pojedinci koji imaju genetsku predispoziciju za razvitak dijabetesa također pokazuju različit sastav mikrobiote u usporedbi sa zdravim pojedincima, sa smanjenom raznolikošću u sastavu tijekom vremena te većom zastupljenošću bakterije *Bacteroides ovatus* i nekih sojeva bakterija koljena *Firmicutes* (Clemente i sur., 2012).

Kako bismo bolje mogli razumjeti način na koji mikrobiota utječe na zdravlje, ali i razvoj bolesti, potrebno je provesti više integrativnih istraživanja koja uzimaju u obzir varijabilnost mikrobiote te interakciju između okoliša, mikrobiote i domaćina. Ovakva istraživanja ključna su u sprječavanju razvoja bolesti djelovanjem na mikrobiotu domaćina (Walsh i sur., 2014).

2.2. MEDITERANSKA PREHRANA

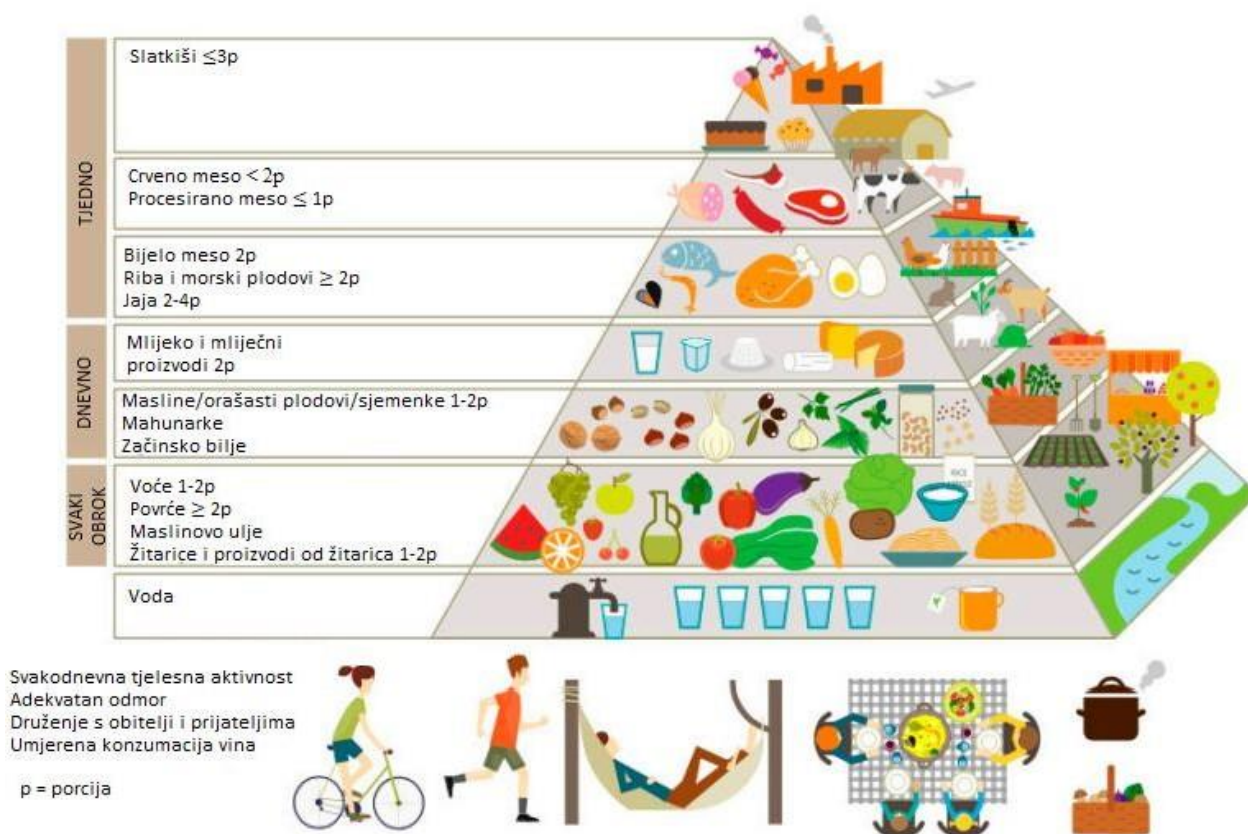
Koncept mediteranske prehrane potječe iz starogrčkog *diaita* što znači način života, odnosno od latinske riječi *diaeta* što možemo prevesti kao propisani način života. Osim načina i kulture prehrane, ovaj koncept uključuje i tradicionalan način života u mediteranskoj regiji. Ancel Keys bio je prvi znanstvenik koji je povezo mediteransku prehranu sa zdravljem krvožilnog sustava u svojoj Studiji sedam zemalja. Mediteransku prehranu opisao je kao društvenu prehranu u čijem je središtu ljudsko povezivanje, a sama prehrana sastojala se od bogatstva žitarica, voća, povrća i leguminoza. Kao izvor proteina najčešće se koristi meso peradi, riba, jaja te mliječni proizvodi, dok su glavni izvori masti maslinovo ulje i orašasti plodovi. Studija sedam zemalja provedena je krajem pedesetih godina 20. stoljeća u sedam zemalja – Grčkoj, Italiji, Jugoslaviji, Finskoj, Japanu, Nizozemskoj i Sjedinjenim Američkim Državama. Ovo istraživanje bilo je prvo takve

vrste u kojoj se prehrana mediteranskog podneblja povezala sa smanjenom stopom smrtnosti od krvožilnih bolesti (Keys i sur., 1980). Nakon istraživanja koje je proveo Ancel Keys, došlo je do porasta interesa o mediteranskoj prehrani i njenom utjecaju na zdravlje ljudi. *Lyon diet heart study* odnosno lionska studija srca bilo je drugo važno istraživanje provedeno krajem 20. stoljeća u kojem se ispitivao zaštitni učinak mediteranske prehrane obogaćene alfa – linolenskom kiselinom na ponovnu pojavu infarkta miokarda. Rezultati ove velike randomizirane studije pokazale su da ovakav način prehrane ima zaštitno djelovanje i do četiri godine nakon prvog infarkta miokarda te se još jednom dokazalo pozitivno djelovanje mediteranske prehrane na zdravlje krvožilnog sustava (De Lorgeril i sur., 1999). Sljedeća skupina istraživanja proizašla je iz tzv. PREDIMED studije (šp. *Prevención con Dieta Mediterránea*). U ovom više – centričnom istraživanju ispitanici su se podijelili u tri grupe – grupa na prehrani sa smanjenim udjelom masti, grupa na mediteranskoj prehrani obogaćenoj s 1 L maslinova ulja na tjedan te grupa na mediteranskoj prehrani obogaćenoj s 30 g orašastih plodova dnevno. Nakon tri mjeseca intervencije, grupe koje su se hranile mediteranskom prehranom imale su manji sistolički tlak, niži razinu glukoze u krvi te bolji omjer ukupnog kolesterola i kolesterola visoke gustoće (HDL kolesterola) (Estruch i sur., 2006). Ovi su rezultati još jednom potvrdili zaštitni učinak mediteranske prehrane na zdravlje srca i krvožilnog sustava. 2010. godine mediteranska prehrana uključena je na UNESCO – vu (eng. *United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization*) listu nematerijalne baštine Cipra, Španjolske, Grčke, Italije i Maroka, a 2013. uključeni su Portugal i Hrvatska. Prema UNESCO-u, obilježja mediteranske prehrane nisu samo hrana, već i sva obilježja tradicionalnog načina života na ovim područjima. Zajedničko objedovanje temelj je kulturnog identiteta mediteranskog bazena, to je vrijeme društvene razmjene, komunikacije i zajedništva. Mediteranska prehrana naglašava vrijednosti susjedstva, gostoprimitstva, kreativnosti te načina života poštivanjem različitosti (UNESCO, 2013).

2.2.1. Značajke mediteranskog načina prehrane

Mediteranska prehrana je skup različitih prehrana zemalja u području mediteranskog bazena. Iako mediteranski bazen čine 23 različite zemlje, a svaka od njih ima svoja specifična obilježja prehrane, postoje glavna obilježja mediteranske prehrane koja su zajednička svim ovim područjima. Glavne značajke mediteranske prehrane su: visok udio nezasićenih masnih kiselina, umjerena konzumacija alkohola, visok unos žitarica, voća i povrća te leguminoza, nizak unos

mesa i mesnih prerađevina te umjeren unos mlijeka i mliječnih proizvoda (Trichopolou i Vasillopoulou, 2000). Slika 3 prikazuje piramidu mediteranske prehrane. Na dnu ove piramide nalaze se namirnice koje čine bazu svakog obroka te najviše doprinose dnevnom unosu energije. Proizvodi životinjskog podrijetla čine sredinu piramide, a njihova pozicija sugerira nižu učestalost konzumacije koja bi trebala biti na tjednoj bazi. Na vrhu piramide nalaze se namirnice koje se preporučuju konzumirati rijetko odnosno u posebnim prigodama. Ova piramida također sadrži i ekološki aspekt mediteranske prehrane prikazan u trećoj dimenziji, a odnosi se na utjecaj koji proizvodnja svake od navedenih skupina namirnica ima na okoliš.



Slika 3. Piramida mediteranske prehrane (prema Serra-Majem i sur., 2020)

Svaki obrok trebao bi se sastojati od tri glavne komponente: žitarica, povrća i voća. Dva serviranja žitarica, poželjno žitarica cjelovitog zrna u obliku kruha, riže ili tjestenine, u svakom obroku doprinose dnevnom unosu minerala poput magnezija i željeza, vitamina i vlakna. Minimalno dva serviranja povrća trebala bi biti dio svakog obroka. Povrće je bogato vitaminima i mineralima, a kako bi zadovoljili dnevne potrebe za ovim nutrijentima, preporuča se barem jedno serviranje sirovog povrća na dan. Povrće se može konzumirati u obliku salata, povrtnih juha i raznih priloga od povrća poput popečaka, kuhanog i pečenog povrća.

Kao desert poslije obroka preporuča se konzumacija jednog serviranja voća. Voće bi trebalo biti raznoliko kako bi se osigurao unos raznih fitonutrijenata poput antioksidansa, vitamina i minerala. Na dnevnoj bazi preporuča se konzumacija orašastih plodova i sjemenka, maslina i maslinova ulja, začinskog bilja te mlijeka i mliječnih proizvoda. Orašasti plodovi, različite sjemenke i masline bogati su izvori fitosterola, minerala i proteina stoga se preporuča konzumacija jednogserviranja, što je ekvivalent jednoj šaci, u sklopu međuobroka. Maslinovo ulje odličan je izvor jednostruko nezasićenih masnih kiselina poput oleinske kiseline i antioksidansa koji imaju pozitivan učinak na zdravlje. Maslinovo ulje ima i visoku točku žarenja stoga se preporuča za kuhanje, pečenje, a može se konzumirati i sirovo kao preljev za salate. Mlijeko i mliječni proizvodi dobar su izvor proteina i kalcija. Dva serviranja niskomasnih mliječnih proizvoda u obliku jogurta, sireva i fermentiranih mliječnih proizvoda, doprinose dnevnom unosu kalcija. Mlijeko i mliječni proizvodi su izvor i zasićenih masti, stoga se preporuča konzumacija proizvoda sa smanjenim udjelom masnoća. Fermentirani proizvodi dobar su izvor bakterija koje djeluju kao probiotici i imaju pozitivan učinak na mikrobiotu i zdravlje probavnog sustava. Začini i začinsko bilje daju bolji okus jelima te pridonose smanjenju upotrebe soli pri pripremi jela. Niži unos soli važan je za očuvanje zdravlja srca i krvnih žila. Meso, riba i jaja konzumiraju se nekoliko puta tjedno te su važan izvor proteina u mediteranskoj prehrani. Bijelo meso peradi te riba konzumiraju se u količini od dva serviranja tjedno. Osim što je izvor proteina, riba je odličan izvor i omega-3 masnih kiselina koje doprinose zdravlju srčano-žilnog sustava. Crveno meso poput govedine i svinjetine konzumira se najviše jednom tjedno, a preporuča se konzumacija dva puta mjesečno. Procesirano meso, poput kobasica, sušenih i dimljenih proizvoda, pokušava se izbjeći ili konzumirati u količini manjoj od jednog serviranja u posebnim prilikama. Na vrhu piramide nalaze se slatkiši poput kolača, čokoladica i ostalih visoko procesiranih namirnica čija se konzumacija preporuča ne više od tri puta tjedno. Unos tekućine iznimno je važan, a ovisi o dobi, spolu i tjelesnoj aktivnosti. Preporuča se unos tekućine od 1,5 – 2 L u obliku vode, čajeva i biljnih infuzija te bistrh juha (Serra-Majem i sur., 2020; Bach-Faig i sur., 2011).

Crveno vino tradicionalno se proizvodi i konzumira u području Mediterana. Umjerena konzumacija od jedne čaše dnevno za žene i dvije za muškarce (jedno piće ekvivalent je 100 mL crvenog vina) pokazala je pozitivne učinke na zdravlje. Crveno vino bogato je polifenolima i antioksidansima koji pokazuju zaštitni utjecaj na srčano-žilni sustav (Minzer i sur., 2020).

Uz preporuke o vrsti hrane i učestalosti konzumacije, za mediteransku prehranu važno je usvajanje i zadržavanje zdravog načina života te očuvanje kulturnih elemenata.

Naglašava se sklonost lokalnoj, sezonskoj, svježoj i minimalno prerađenoj hrani, podržavajući biološku raznolikost te ekološki prihvatljivu i tradicionalnu hranu. Ovi važni dijelovi prikazani su na dnu piramide mediteranske prehrane (slika 3), a uključuju socijalni aspekt, kuhanje i pripremanje hrane, fizičku aktivnost, adekvatan odmor te konzumaciju sezonske i tradicionalne hrane. Ovakav način prehrane i života ne samo da ima pozitivan utjecaj na fizičko zdravlje pojedinca, već i na mentalno zdravlje te na očuvanje okoliša i bioraznolikosti (Bach-Faig i sur., 2011).

2.2.2. Utjecaj mediteranske prehrane na zdravlje ljudi

U današnje vrijeme, mediteranska prehrana postala je sinonim za pravilnu prehranu zbog svog pozitivnog učinka na zdravlje. Takav učinak ne možemo pripisati samo jednoj namirnici karakterističnoj za mediteransku prehranu, već njezinoj cjelokupnosti. Istraživanja su pokazala da visoko pridržavanje mediteranskoj prehrani smanjuje rizik od smrtnosti uslijed različitih kroničnih bolesti poput karcinoma, metaboličkog i kardiovaskularnog sindroma, neurodegenerativnih bolesti, dijabetesa tipa 2 te masne jetre. Također, mediteranska prehrana povezuje se s višom kvalitetom života što rezultira boljim psihološkim, fiziološkim i metaboličkim profilom (Chierico i sur., 2014). Točan mehanizam djelovanja mediteranske prehrane na snižavanje rizika od kroničnih bolesti nije poznat, međutim, takav učinak može se pripisati kombinaciji pet različitih metaboličkih prilagodbi na ovakav način prehrane: učinak na snižavanje lipida u krvi, zaštita od oksidativnog stresa, upale i agregacije trombocita, modifikacija hormona i faktora rasta uključenih u patogenezu karcinoma, inhibicija puteva osjetljivosti nutrijenata ograničavanjem određenih aminokiselina te proizvodnja metabolita posredovanih crijevnom mikrobiotom koji utječu na metaboličko zdravlje.

Jedna od najvažnijih karakteristika mediteranske prehrane je visoka konzumacija maslinova ulja. *Olea europaea* L. je biljka karakteristična za mediteransko podneblje, a njezin plod – maslina, koristi se svakodnevno. Ekstra djevičansko maslinovo ulje dobiva se ekstrakcijom iz ploda masline, a zbog svojih karakteristika smatra se najzdravijim uljem za konzumaciju. Bogato je nezasićenim masnim kiselinama poput oleinske kiseline, fenolinim komponentama, fitosterolima, tokoferolima i skvalanom. Najznačajniji fenolni spojevi u maslinovom ulju su tirozol, hidroksitirozol, oleuropein, oleokantal i olacein, a istraživanja su pokazala da upravo ovi spojevi imaju najjače kardioprotektivno, neuroprotektivno i antitumorsko djelovanje. Uz fenolne spojeve, značajni su i antioksidansi poput vitamina A i E koji štite kolesterol niske gustoće (LDL kolesterol) od oksidacije.

Sve ove komponente su iznimno biološki vrijedne i imaju visoku farmakološku aktivnost djelujući na snižavanje kolesterola i povišenog krvnog tlaka (Romani i sur., 2019; Parkinson i Cicerale, 2016).

Mediteranska prehrana je također bogata i orašastim plodovima koji, osim što su izvor poželjnih nezasićenih masnih kiselina, sadrže i biljna vlakna, proteine, minerale poput kalcija, magnezija i kalija, fitosterole, tokoferole, vitamin E i ostale antioksidanse. Svi ovi nutrijenti, u kombinaciji s ostalim sastavnicama mediteranske prehrane, mogu poboljšati upalni odgovor, oksidativni stres i endotelnu funkciju. Osim toga, prehrambena vlakna u orašastim plodovima mogu pozitivno djelovati na zdravlje probavnog sustava, djelujući kao prebiotici (Gervasi i sur., 2021).

U posljednjih nekoliko godina, provodi se sve više istraživanja o utjecaju višestruko nezasićenih omega – 3 i omega – 6 masnih kiselina iz ribe na smanjenje rizika od pojave fatalnih srčanih aritmija. U mediteranskoj regiji, konzumacija ribe integralni je dio tjednog menija. Riba i ostali morski plodovi bogati su omega – 3 masnim kiselinama, specifično dokosaheksaenskom (DHA) i eikosapentaenskom (EPA) masnom kiselinom. Ove masne kiseline imaju pozitivan učinak na smanjenje smrtnosti od bolesti srčano-žilnog sustava, kao i na usporavanje progresije Alzheimerove bolesti te razgradnju mišića uzrokovanu starenjem. Osim toga, riba je odličan izvor različitih bioaktivnih nutrijenata poput esencijalnih aminokiselina, vitamina topivih u mastima i minerala. Selen i kalcij u ribi i morskim plodovima ima antioksidativno i protuupalno djelovanje, dok vitamin D ima potencijalnu ulogu u regulaciji krvnog tlaka, djeluje protuupalno te inhibira kalcifikaciju krvnih žila (Garcia-Esquinas i sur., 2020; Krittanawong i sur., 2020).

2.2.3. Utjecaj mediteranske prehrane na sastav mikrobiote

Način prehrane uvelike utječe na sastav, raznolikost i aktivnost mikrobne populacije u probavnom sustavu. Zapadnjačka prehrana povezana je s manjom bakterijskom raznolikošću i različitim mikrobnim profilima u usporedbi s tradicionalnim načinima prehrane kao što je mediteranska prehrana. Mediteranska prehrana usmjerena je na hranu biljnog podrijetla, bogata je vlaknima i omega-3 masnim kiselinama te niska u životinjskim proteinima i zasićenim mastima. Istraživanja su pokazala da osobe koje se hrane pretežito hranom biljnog podrijetla imaju veći postotak kratkolančanih masnih kiselina te veću zastupljenost bakterija koje sudjeluju u probavi prehrambenih vlakana u uzorcima stolice.

Također, imaju manju prisutnost bakterije *Escherichia coli* te općenito veću raznolikost u sastavu mikroflore koja uključuje veću brojnost bakterija roda *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Faecalibacterium* i *Oscillospira*, te manju zastupljenost bakterija roda *Ruminococcus* i *Coprococcus*. Tipične komponente hrane prisutne u mediteranskoj prehrani povezane su s prisutnošću određenih bakterija u crijevnoj mikrobioti. Na primjer, konzumacija žitarica povezana je s prisutnošću bakterija roda *Bifidobacterium* i *Faecalibacterium*. Konzumacija maslinovog ulja i crnog vina povezana je s prisutnošću bakterija roda *Faecalibacterium*, konzumacija povrća vezana je za prisutnost bakterija roda *Alistipes* i *Ruminococcus*, a konzumacija mahunarki povezana je s prisutnošću vrste *Coprococcus*. Kombinacija prehrambenih komponenti tipičnih za mediteransku prehranu i sastava mikrobiote dovodi do proizvodnje specifičnih metabolita, kao što su kratkolančane masne kiseline, koje imaju pozitivan utjecaj na zdravlje. Postojeća istraživanja pokazuju da usvajanje pretežito biljne prehrane ima povoljan učinak na mikrobiom domaćina, pomaže u smanjenju upale, poboljšanju osjetljivosti na inzulin i promicanju optimalne energetske ravnoteže, što bi moglo smanjiti pojavu kroničnih bolesti (Beam i sur., 2021; Merra i sur., 2021; Garcia-Mantrana i sur., 2018; Chierico i sur., 2014).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ISPITANICI

Istraživanje je provedeno u sklopu pilot projekta pod nazivom „Crijevna mikrobiota radno – aktivne populacije RH“, provedenog od strane Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u suradnji s Institutom za Antropologiju u vremenskom periodu od 2021. do 2022. godine.

Regrutacija ispitanika provedena je interno, oglašavanjem unutar Instituta za Antropologiju i Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta.

Prilikom regrutacije ispitanika, vodilo se računa o popunjavanju pojedinih starosnih kategorija u skladu s dobnom i spolnom strukturom stanovništva Republike Hrvatske. Uključeno je 59 ispitanika oba spola u dobi od 18 do 59 godina starosti.

Svi ispitanici dragovoljno su sudjelovali u istraživanju te su prije samog početka detaljno informirani o ciljevima i metodologiji istraživanja. Svaki ispitanik potpisao je informirani pristanak za sudjelovanje u projektu te je za sudjelovanje u istraživanju trebao ispuniti internet upitnik o prehranbenim i životnim navikama i dostaviti uzorak stolice istraživačima.

U cilju zaštite podataka, svi podaci dobiveni u istraživanju, kao i identitet ispitanika su šifrirani te je identitet ispitanika poznat samo određenim istraživačima iz tima zaduženog za dostavljanje osobnog izvješća o sastavu mikrobiote.

Također, istraživanje je prije početka provedbe Projekta odobreno pozitivnim rješenjem Etičkog povjerenstva Instituta za antropologiju.

3.2. METODE RADA

Metode korištene u istraživanju mogu se podijeliti na dijetetičke i genomičke metode.

3.2.1. Dijetetičke metode

Ispitanici su popunjavali upitnik koji je sadržavao opća pitanja o životnim i prehranbenim navikama te pitanja o usklađenosti s mediteranskim načinom prehrane. Upitnik se popunjavao preko platforme *Google forms*.

Upitnik je sadržavao ukupno 65 pitanja od kojih se posljednjih 14 odnosilo na usklađenost s mediteranskim načinom prehrane. Upitnik je sadržavao pitanja vezana uz opće podatke o

ispitanicima (spol, dob, bračni status, obrazovanje), antropometrijske podatke (visina i tjelesna masa), podatke o načinu života (tjelesna aktivnost, pušenje) te pitanja o prehranbenim navikama. Upitnik je sadržavao i dva dana 24-satnog prisjećanja u kojima se od ispitanika tražilo da navedu svu konzumiranu hranu u proteklih 48 sati.

Za procjenu usklađenosti prehrane ispitanika s mediteranskom prehranom korišten je vrednovani upitnik od 14 pitanja preveden na hrvatski jezik za potrebe istraživanja. Pitanja u upitniku odnose se na učestalost konzumacije određenih namirnica koje se povezuju s mediteranskim načinom prehrane. Ovisno o odgovorima ispitanika, svaki odgovor bodovao se sjedan ili nula bodova, a ukupan broj bodova služio je za svrstavanje ispitanika u grupe po usklađenosti vlastite prehrane s mediteranskom. Ispitanici s ukupnim brojem bodova ≤ 5 svrstani su u skupinu s niskom usklađenosti, ispitanici s brojem bodova 6-9 svrstani su u skupinu sa srednjom usklađenosti, a ispitanici s brojem bodova ≥ 10 u skupinu s visokom usklađenosti prehrane s mediteranskom. Upitnik je preuzet iz istraživanja provedenog od strane Martínez-González i suradnika te prilagođen istraživanju (tablica 1).

Tablica 1. Vrednovani upitnik od 14 pitanja za procjenu usklađenosti prehrane ispitanika s mediteranskom prehranom (prema Martínez-González i sur., 2012)

Pitanja	Kriterij za 1 bod
1. Koristite li maslinovo ulje kao primarno ulje u prehrani?	Da
2. Koliko maslinova ulja koristite svaki dan (za prženje, salate i slično)?	≥ 4 žlice
3. Koliko serviranja povrća pojedete svaki dan? (1 serviranje = 200 g)	≥ 2 (≥ 1 serviranja sirovo)
4. Koliko serviranja voća (uključujući voćne sokove) pojedete svaki dan?	≥ 3
5. Koliko serviranja crvenog mesa ili mesnih prerađevina konzumirate svaki dan? (1 serviranje = 100 – 150 g)	< 1
6. Koliko serviranja maslaca, margarina ili vrhnja konzumirate svaki dan) (1 serviranje = 12 g)	< 1
7. Koliko zaslađenih ili gaziranih napitaka pijete svaki dan?	< 1
8. Koliko vina pijete tjedno?	≥ 7 čaša
9. Koliko serviranja mahunarki pojedete tjedno? (1 serviranje = 150 g)	≥ 3
10. Koliko serviranja ribe ili morskih plodova pojedete tjedno? (1 serviranje ribe = 100 – 150 g, 1 serviranje morskih plodova = 200 g)	≥ 3
11. Koliko puta tjedno konzumirate slatkiše, kolače i pekarske proizvode?	< 3
12. Koliko serviranja orašastih plodova pojedete tjedno? (1 serviranje = 30 g)	≥ 3
13. Preferirate li konzumirati piletinu i puretinu naspram govedine i svinjetine?	Da
14. Koliko puta tjedno konzumirate tjesteninu, rižu ili povrće začinjeno umakom od rajčice s lukom, češnjakom i maslinovim uljem?	≥ 2

Cijeli upitnik korišten u istraživanju nalazi se u prilogu 1. ovog istraživačkog rada.

3.2.2. Genomičke metode

Sastav crijevne mikrobiote određivan je sekvenciranjem DNA izolirane iz uzoraka stolice svakog ispitanika. Za određivanje sastava crijevne mikrobiote kao marker gen korišten je gen koji kodira za 16S rRNA podjedinicu ribosoma. Lančanom reakcijom polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) umnožene su varijabilne regije 3 i 4 gena koji kodira za 16S rRNA podjedinicu te su dobiveni fragmenti sekvencirani tehnologijom spojenih krajeve (eng. *paired-end*) Illumina MiSeq uređajem. Očitane sekvence obrađene su QIIME2 programskim paketom.

3.2.2.1. Izolacija DNA , sekvenciranje DNA i obrada podataka sekvenciranja

Za izolaciju DNA korišten je QIAmp® PowerFecal® DNA set kemikalija (*kit*) prema Quick Start protokolu dobivenom od proizvođača. Prije izolacije, svi uzorci stolice čuvani su na temperaturi od -80 °C. Sekvenciranje je provedeno u Institutu za antropologiju (Zagreb, Hrvatska) korištenjem platforme Illumina MiSeq i protokola za sekvenciranje spojenih krajeva (eng. *paired-end sequencing*). Korištene su početnice 341F/806R za umnažanje V3 i V4 regija gena koji kodira za 16S rRNA korištenjem lančane reakcije polimeraze u 30 ciklusa. Nakon umnažanja, PCR produkti provjereni su na 2 %-om agaroznom gelu i pročišćeni korištenjem kalibriranih Ampure XP kuglica. Pročišćeni PCR produkti korišteni su za izradu DNA knjižnica upotrebom Illumina TruSeq DNA library protokola te sekvencirani Illumina MiSeq uređajem. Sirovi podaci dobiveni sekvenciranjem preuzeti su direktno s uređaja u obliku Fastq datoteka. Sirove DNA sekvence učitane su u QIIME2 bioinformatičku platformu kroz koju su kvalitativno provjerene i filtrirane sekvence, uklonjene kimerične sekvence i izračunate su umnožene varijante sekvenci (eng. *amplicon sequence variant*, *ASV*) korištenjem DADA2 algoritma. Umnoženim varijantama sekvenci je dodijeljena taksonomija korištenjem Bayesovog klasifikatora na SILVA 138 ribosomskoj bazi podataka klasteriranoj na 99 % identičnosti kao referentnoj taksonomskoj bazi (Robeson i sur., 2021; Quast i sur., 2013). Indeksi alfa i beta raznolikosti izračunati su korištenjem q2-diversity metode QIIME2 platforme na uzorcima razrijeđenim (eng. *rarefied*) na 20 000 očitanih sekvenci DNA po uzorku.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je povezati stupanj usklađenosti prehrane ispitanika s mediteranskom prehranom te utjecaj takvog oblika prehrane na sastav crijevne mikrobiote. Crijevna mikrobiota mijenja se tijekom života pod utjecajem različitih faktora, primjerice uzimanjem dodataka prehrani i lijekova, posebice antibiotika, prisutnosti raznih bolesti probavnog sustava, izloženosti patogenim mikroorganizmima te promjenom životnog stila (Garber i sur., 2020). Poznato je da prehrana ima značajan utjecaj na sastav mikrobiote domaćina. Mediteranska prehrana, bogata cjelovitim žitaricama, ribom, maslinovim uljem i orašastim plodovima ima povoljan utjecaj na cjelokupno zdravlje. Osobe čija je prehrana u skladu s mediteranskom imaju veći udio bakterija koljena *Prevotella*, dok osobe čija se prehrana bazira na namirnicama životinjskog podrijetla imaju veći udio bakterija koljena *Bacteroides*. Slaba usklađenost prehrane s mediteranskom također se povezuje s povećanom koncentracijom trimetilamin N-oksida (TMAO) u urinu, što je faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Modulacija mikrobiote kroz konzumaciju prehrane bogate raznolikom biljnom hranom smatra se jednim od načina za poboljšanje zdravlja i smanjenje rizika od bolesti (De Filippis i sur., 2016). Upravo iz ovih razloga učinjena je analiza prehrane ispitanika pomoću *Google forms* ankete te procjena usklađenosti prehrane s mediteranskom pomoću upitnika od 14 pitanja. Ispitanici su svrstani u tri grupe ovisno o rezultatima te se promatrao sastav njihove crijevne mikrobiote dobiven izolacijom DNA iz uzoraka stolice.

4.1. ISPITANICI

Od ukupno 59 ispitanika, 35 ispitanika bilo je ženskog spola (60 %), dok je 24 ispitanika bilo muškog spola (40 %). Ispitanici su podijeljeni u starosne skupine u skladu s dobnom i spolnom strukturom stanovništva u Republici Hrvatskoj. Dobne kategorije su 18 – 29, 30 – 39, 40 – 49 te 50 – 59 godina starosti. 15 ispitanika (25,4 %) pripada prvoj starosnoj skupini, 20 ispitanika (33,9 %) pripada drugoj starosnoj skupini, 18 ispitanika (30,5 %) pripada trećoj starosnoj skupini te 6 ispitanika (10,2 %) pripada četvrtoj starosnoj skupini. Većina ispitanika (90 %) je visoko obrazovana, od toga 15,1 % ispitanika ima završen preddiplomski studij, 50,9 % ispitanika ima završen diplomski studij, a 34,0 % ispitanika ima doktorat.

53 ispitanika (89,8 %) rođeno je vaginalnim porodom, 4 ispitanika (6,8 %) carskim rezom, a 2 ispitanika (3,4 %) ne znaju način poroda.

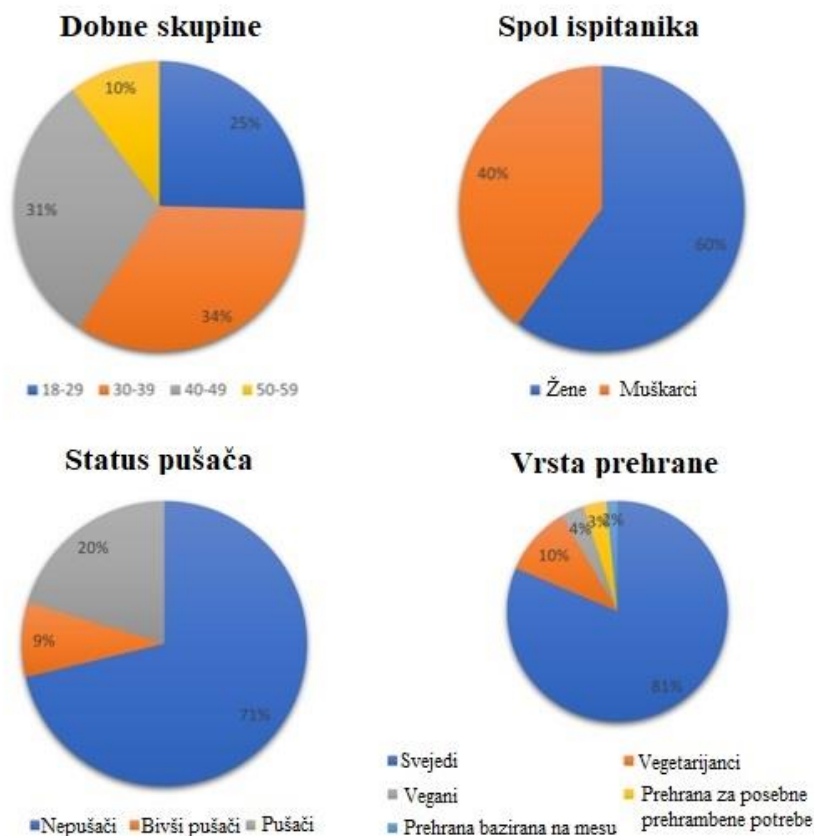
8 ispitanika (13,6 %) koristilo je antibiotik unazad tri mjeseca od ispunjavanja upitnika o prehranbenim navikama i predaje uzorka stolice. Navedene vrste antibiotika su klavocin, sumamed, ninur i augmentin.

47 ispitanika (88,7 %) je tjelesno aktivna, od čega većina navodi hodanje, trčanje i fitness kao najčešću vrstu tjelesne aktivnosti. Većina ispitanika (42; 71,2 %) su nepušači, 5 ispitanika (8,5 %) navodi da su bivši pušači, a 12 ispitanika (20,3 %) su aktivni pušači.

Većina ispitanika (35; 59,3 %) ne koristi probiotike kao dodatke prehrani, niti konzumira prehranbene proizvode s dodacima probiotičkih kultura, 15 ispitanika (25,4 %) konzumira probiotičke jogurte, dok 9 ispitanika (15,3 %) koristi probiotike kao dodatke prehrani.

22 ispitanika (37,3 %) ne koristi nikakve dodatke prehrani, a 37 ispitanika (62,7 %) koristi dodatke prehrani, pretežito u obliku multivitaminskih pripravaka.

48 ispitanika (81,4 %) svoju prehranu opisuje kao prehranu svejeda, 6 ispitanika (10,2 %) hrani se veganskom prehranom te 2 ispitanika (3,4 %) vegetarijanskom prehranom. 2 ispitanika (3,4 %) pridržavaju se prehrane za posebne potrebe (dijabetička prehrana, prehrana za bubrežne bolesnike). Jedan ispitanik opisuje svoju prehranu kao strogo baziranu na namirnicama životinjskog podrijetla s vrlo malo povrća, a voće ne konzumira. Slika 4 prikazuje odgovore ispitanika na pitanja o životnom stilu.



Slika 4. Grafički prikaz odgovora ispitanika na pitanja o životnom stilu i vrsti prehrane

Kao što je navedeno u poglavlju 2.1.3., životni stil i njegove komponente mogu značajno utjecati na sastav mikrobiote. Tjelesna aktivnost ima velik utjecaj smanjenje rizika od razvoja niza bolesti povezanih sa načinom života kao što su inzulinska rezistencija, pretilost i metabolički sindrom te pozitivno utječe na očuvanje zdravlja srčano-žilnog sustava. Istraživanje koje su proveli Kern i suradnici (2020) pokazalo je povećanje alfa raznolikosti u sastavu mikrobiote kod osoba koje su prije bile neaktivne, a uvrstile su tjelesnu aktivnost. Također, osobe koje se bave tjelesnom aktivnosti imaju veću beta raznolikost na razini roda te veću brojnost bakterija *Akkermansia* i *Proteobacteria* (Kern i sur., 2020). Duhanski dim povezuje se s nizom negativnih učinaka na zdravlje poput razvoja karcinoma. Cigaretni dim sadrži mnoge otrovne tvari, uključujući policikličke aromatske ugljikovodike, aldehide, nitrozamine i teške metale koji udisanjem dolaze do pluća. Ove tvari mogu dospjeti u probavni sustav i izazvati disbiozu intestinalne mikrobiote putem različitih mehanizama, primjerice antimikrobnim djelovanjem. Sustavnim pregledom literature Antinozzi i suradnici (2022) povezali su pušenje sa smanjenom alfa raznolikosti u sastavu mikrobiote, međutim, prestankom pušenja dolazi do ponovnog povećanja u raznolikosti mikrobiote.

Također, primijetili su da pušači imaju više razine bakterije roda *Prevotella*, ali nisu našli statistički značajnu povezanost između pušenja i promjena u sastavu bakterija koljena *Bacteroidetes* i *Firmicutes* (Antinozzi i sur., 2022). Još jedna skupina tvari koja negativno utječe na zdravlje probavnog sustava i sastav mikrobiote su antibiotici. Antibiotici se desetljećima koriste za sprječavanje proliferacije bakterijskih patogena, a time i za liječenje bakterijskih infekcija. Međutim, posljednjih desetljeća dolazi do značajnog porasta upotrebe antibiotika zbog dodavanja u stočnu hranu te prekomjerne upotrebe antibiotika širokog spektra u ljudskoj medicini. Yang i suradnici (2021) primijetili su potpuni nestanak aerobnih gram-pozitivnih bakterija te povećanje otpornosti enterobakterija kod ispitanika na terapiji amoksicilinom koji je aktivna tvar antibiotika klavocina. Nakon prestanka uzimanja terapije došlo je do ponovne uspostave ravnoteže u sastavu mikrobiote, međutim, nije došlo do povratka određenih bakterija, primjerice roda *Bifidobacterium* (Yang i sur., 2021).

4.2. USKLAĐENOST PREHRANE ISPITANIKA S MEDITERANSKOM PREHRANOM

Za procjenu usklađenosti mediteranske prehrane korišten je vrednovani upitnik koji se sastoji od 14 pitanja. Svako pitanje boduje se s jednim (1) ili nula (0) bodova, ovisno o kriteriju za svako pojedino pitanje. Pitanja se odnose na učestalost konzumacije pojedinih namirnica koje su povezane s pojmom mediteranske prehrane, a uključuju maslinovo ulje, povrće, voće, mahunarke, orašaste plodove, ribu te umak od rajčice. Veći broj serviranja ovih namirnica boduje se s jednim bodom. Povećana učestalost konzumacije namirnica koje nisu u skladu s mediteranskom prehranom, poput crvenog mesa, prerađenih mesnih proizvoda, maslaca, zaslađena gazirana pića te slatkiša, boduje se s nula bodova.

Većina ispitanika (35; 59,3 %) koristi maslinovo ulje kao primarno ulje u prehrani, međutim, samo 8 ispitanika (13,6 %) koristi više od 4 žlice maslinovog ulja dnevno što je kriterij za dobivanje jednog boda. 12 ispitanika (20,3 %) konzumira dva ili više serviranja povrća dnevno (jedno serviranje označava 200 grama povrća), a samo 5 ispitanika (8,5 %) konzumira tri ili više serviranja voća i voćnih sokova dnevno. Većina ispitanika (44; 74,6 %) konzumira više od jednog serviranja (jedno serviranje označava 100-150 grama) crvenog mesa i mesnih prerađevina dnevno, dok 30 ispitanika (50,8 %) konzumira više od jednog serviranja maslaca, margarina ili vrhnja dnevno.

Ova dva kriterija najviše opisuju odstupanje od mediteranskog načina prehrane gdje se konzumacija crvenog mesa i zasićenih masnoća preporuča svega nekoliko puta mjesečno te je većina ispitanika na ovim pitanjima bodovana s nula bodova.

Iako većina ispitanika (54; 91,5 %) konzumira alkohol, samo 3 ispitanika (5,1 %) konzumiraju sedam ili više čaša crvenog vina tjedno, što je kriterij za dobivanje jednog boda. Većina ispitanika (42; 71,2 %) konzumira manje od jedne čaše zaslađenih gaziranih napitaka dnevno. 13 ispitanika (22 %) konzumira tri ili više serviranja mahunarki tjedno (jedno serviranje jednako je 150 grama mahunarki). Vrlo mali broj ispitanika (4; 6,8 %) konzumira tri ili više serviranja ribe tjedno (jedno serviranje označava 100-150 grama ribe ili 200 grama morskih plodova) što je kriterij za dobivanje jednog boda, dok 33 ispitanika (55,9 %) preferira konzumaciju mesa peradi u odnosu na govedinu i svinjetinu.

Većina ispitanika (36; 61 %) ne konzumira više od tri serviranja slatkiša dnevno, a 28 ispitanika (47,5 %) konzumira tri ili više serviranja orašastih plodova tjedno, pri čemu jedno serviranja označava 30 grama.

29 ispitanika (49,2 %) konzumira dva ili više serviranja tjedno povrća, žitarica ili drugih jela začinja umakom od rajčice koji sadrži luk, poriluk ili češnjak kuhan na maslinovom ulju.

Na osnovu navedenih odgovora učinjeno je bodovanje te svrstavanje ispitanika u jednu od tri kategorije usklađenosti prehrane ispitanika s načelima mediteranske prehrane.

Ispitanici s brojem bodova manjim ili jednakim 5 svrstani su u kategoriju slabe usklađenosti, ispitanici s brojem bodova od 6 do 9 svrstani su u kategoriju srednje usklađenosti, a ispitanici s brojem bodova većim ili jednakim 10 svrstani su u kategoriju visoke usklađenosti prehrane s mediteranskom prehranom. 36 ispitanika (61 %) pripalo je kategoriji slabe usklađenosti, 22 ispitanika (37,3 %) kategoriji srednje usklađenosti, a samo jedan ispitanik (1,7 %) pripao je kategoriji visoke usklađenosti. Ovi rezultati prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Rezultati upitnika o usklađenosti prehrane ispitanika s mediteranskom prehranom

	SLABA USKLAĐENOST	SREDNJA USKLAĐENOST	VISOKA USKLAĐENOST
BROJ ISPITANIKA	36	22	1
POSTOTAK (%)	61	37,3	1,7

Prosječan broj bodova ispitanika svrstanih u kategoriju slabe usklađenosti iznosi 3,6, ispitanika svrstanih u kategoriju srednje usklađenosti iznosi 6,9 bodova, a ispitanik koji je svrstan u kategoriju visoke usklađenosti ima ukupno 11 bodova. Prosječan broj bodova svih ispitanika iznosi 4,95.

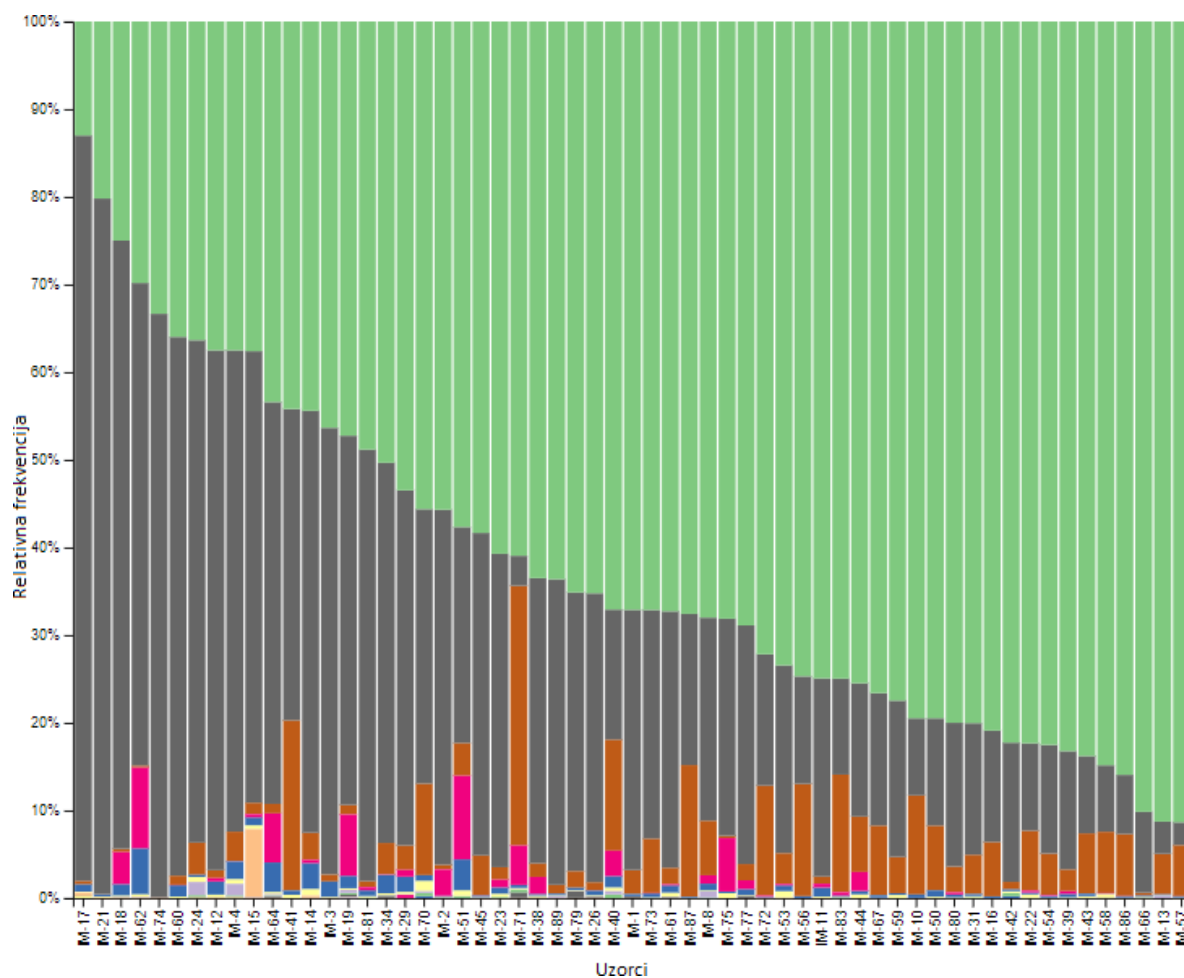
Iz ovih rezultata se može zaključiti kako prehrana većine ispitanika ne zadovoljava kriterije mediteranske prehrane.

Pridržavanje mediteranskom načinu prehrane povezano je s brojnim pozitivnim učincima na zdravlje – smanjenje rizika od razvoja bolesti srca i krvnih žila, raka dojke, depresije, raka debelog crijeva, pretilosti i metaboličkog sindroma. Međutim, zbog sve veće urbanizacije, globalizacije poljoprivrednog tržišta i razvoja masovne kulture prehrane usredotočene na „zapadnjačku prehranu“, mediteranska prehrana i drugi srodni obrasci pravilne prehrane postupno se napuštaju. Ovakav se trend primjećuje pogotovo kod mladih ljudi u urbanim sredinama gdje je sve više prisutan dinamičan i brz način života s prehranom koja se uklapa u takve okvire. Istraživanje koje su proveli Šarac i suradnici (2021) potvrdilo je ovakav trend. Rezultati istraživanja pokazali su da mlada, reproduktivno aktivna generacija na području Dalmacije u Republici Hrvatskoj pokazuje značajno manje pridržavanje mediteranskom načinu prehrane nego starija populacija iz istog područja (Šarac i sur., 2021). Sustavnim pregledom literature Obeid i suradnici (2022) donijeli su sličan zaključak. Većina uključenih istraživanja izvjestila je o niskom ili srednjem pridržavanju mediteranskom načinu prehrane ispitanika s područja Mediteranskog bazena, a razlike između spolnih i dobnih skupina nisu uočene (Obeid i sur., 2022).

4.3. TAKSONOMSKA ZASTUPLJENOST MIKROORGANIZAMA U UZORCIMA

4.3.1. Taksonomska zastupljenost mikroorganizama u uzorku svakog ispitanika

Izolacijom DNA iz uzoraka stolice dobiven je sastav crijevne mikrobiote svakog pojedinog ispitanika. Podaci su obrađeni korištenjem QIIME2 programa te su dobiveni vizualni prikazi taksonomske zastupljenosti mikroorganizama u uzorcima. Slika 5 prikazuje taksonomski sastav mikrobiote stupčastim dijagramima za svaki uzorak na razini koljena. Uzorci su poredani po zastupljenosti bakterija koljena *Firmicutes*, od najmanje do najveće zastupljenosti.



Slika 5. Taksonomska zastupljenost bakterija na razini koljena u uzorku mikrobiote svakog pojedinog ispitanika



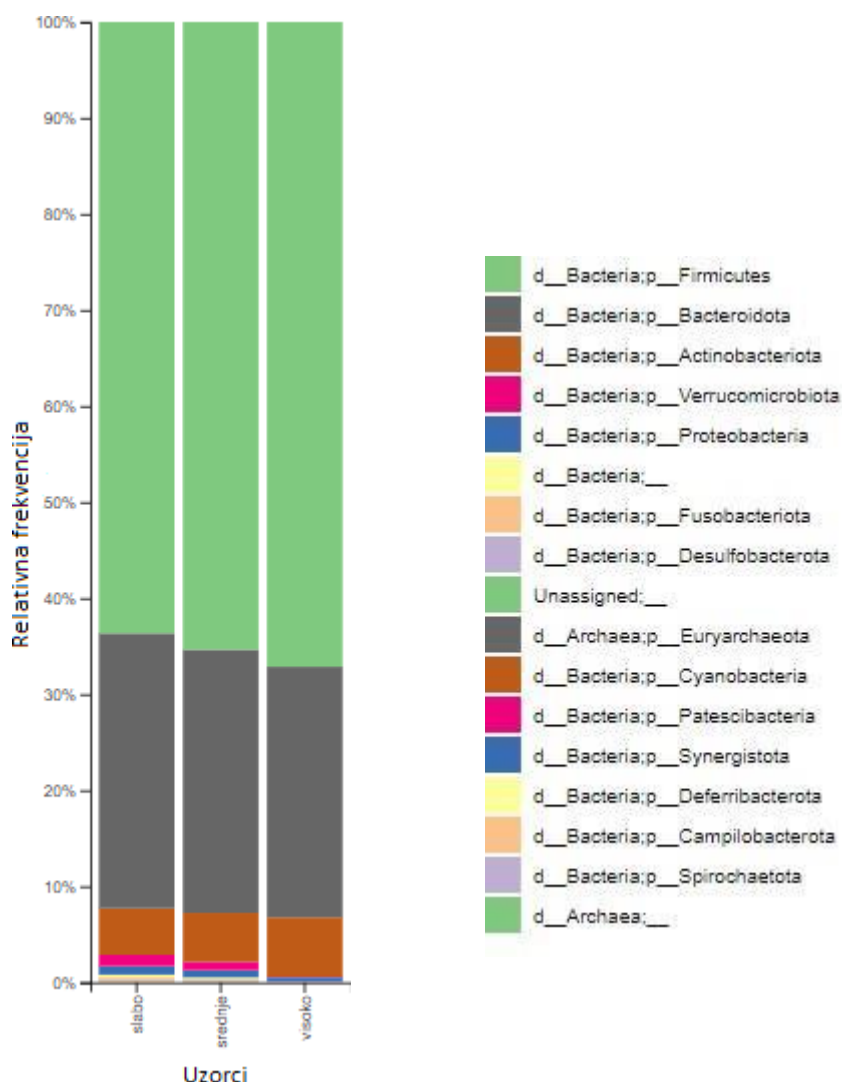
Slika 5. Taksonomska zastupljenost bakterija na razini koljena u uzorku mikrobiote svakog pojedinog ispitanika - *nastavak*

Najmanju zastupljenost bakterija koljena *Firmicutes* ima ispitanik pod šifrom IM-17 te ona iznosi 13 %, dok najveću zastupljenost bakterija ovog koljena od 91,4 % ima ispitanik IM-57. Ispitanik IM-17 pripada skupini srednje usklađenosti prehrane s mediteranskom, ženskog je spola, pripada dobnoj skupini od 40 od 49 godina, unazad 3 mjeseca od davanja uzorka stolice koristila je antibiotik augmentin te boluje od sindroma iritabilnog crijeva. Ispitanik IM-57 pripada skupini slabe usklađenosti prehrane s mediteranskom prehranom, također je ženskog spola te pripada dobnoj skupini od 30 do 39 godina. Obje ispitanice svoju prehranu opisuju kao prehranu svezjeda te koriste probiotike u obliku dodatka prehrani. Ispitanik pod šifrom IM-71 ima veliku zastupljenost (29,6 %) bakterija koljena *Actinobacteriota*, što odskače od ostataka ispitanika. Ovaj ispitanik pripada skupini srednje usklađenosti prehrane s mediteranskom, ženskog je spola, pripada dobnoj skupini od 30 od 39 godina, također je koristila antibiotik augmentin te ne koristi probiotike niti ostale dodatke prehrani. Drugo najzastupljenije koljeno bakterija jest *Bacteroidota*, najveću zastupljenost imaju ispitanici IM-17 (85 %) i IM-21 (79,4 %), a najmanju ispitanici IM-13 (3,7 %) i IM-57 (2,6 %). Ispitanici IM-62 i IM-51 imaju veću zastupljenost bakterija koljena *Verrucomicrobiota* u odnosu na druge ispitanike te ona iznosi 9,2 % i 9,5 %. Ispitanik IM-62 pripada skupini srednje usklađenosti prehrane s mediteranskom, hrani se isključivo hranom biljnog podrijetla (veganska prehrana), ženskog je spola te pripada dobnoj skupini od 18 do 29 godina. Ispitanik IM-51 pripada skupini slabe usklađenosti prehrane s mediteranskom, svezjed je, muškog je spola te pripada dobnoj skupini od 40 do 49 godina.

Ispitanik IM-73 jedini pripada skupini visoke usklađenosti prehrane s mediteranskom. To je osoba ženskog spola koja pripada dobnoj skupini od 30 do 39 godina, bavi se tjelesnom aktivnošću, uzima dodatke prehrani, a svoju prehranu opisuje kao prehranu baziranu na namirnicama biljnog podrijetla (veganska prehrana).

4.3.2. Taksonomska zastupljenost mikroorganizama sukladno usklađenosti prehrane s mediteranskom

Uz vizualni prikaz zastupljenosti pojedinih mikroorganizama u svakom pojedinom uzorku, načinjen je i prikaz zastupljenosti mikroorganizama po skupinama usklađenosti prehrane s mediteranskom. Slika 6 prikazuje sastav mikrobiote kod pojedinih skupina usklađenosti prehrane s mediteranskom – slaba, srednja i visoka usklađenost.



Slika 6. Taksonomska zastupljenost pojedinih bakterija na razini koljena u skupinama uzoraka ovisno o usklađenosti prehrane s mediteranskom

Iz slike je vidljivo kako zastupljenost bakterija koljena *Firmicutes* raste s povećanjem usklađenosti prehrane s mediteranskom. Skupina slabe usklađenosti ima najmanju zastupljenost bakterija koljena *Firmicutes*, a ona iznosi 63,6 %. Skupina srednje usklađenosti ima nešto veću zastupljenost bakterija ovog roda koja iznosi 65,3 %, a zastupljenost skupine visoke usklađenosti iznosi 67,1 %. Zastupljenost bakterija koljena *Bacteroidetes* kod skupine slabe usklađenosti iznosi 28,6 %, srednje usklađenosti 27,4 %, a visoke usklađenosti 26,1 %. Bakterije koljena *Actinobacteriota* predstavljaju treću vrstu bakterija čija je zastupljenost značajnija u ovim uzorcima u odnosu na ostale. U uzorcima skupine slabe usklađenosti, zastupljenost ovog koljena bakterija iznosi 4,8 %, u skupini srednje usklađenosti iznosi 5,1 %, a u skupini visoke usklađenosti iznosi 6,2 %. Kod interpretacije rezultata bitno je naglasiti da raspodjela ispitanika nije ravnomjerna prema stupnju usklađenosti prehrane s mediteranskim obrascem, što je najbolje vidljivo u grupi visoke usklađenosti kojoj pripada samo jedna osoba.

Istraživanje provedeno od strane Di Iorio i suradnika (2019) pokazuje povećan udio bakterija koljena *Firmicutes* te smanjen udio bakterija roda *Bacteroidetes* kod ispitanika s kroničnim bubrežnim bolestima koji se hrane mediteranskim načinom prehrane u usporedbi s kontrolnom skupinom ispitanika koji se hrane uobičajenom prehranom (Di Iorio i sur., 2019). Suprotno tome, Gutiérrez-Díaz i suradnici (2016) povezali su veću usklađenost prehrane s mediteranskom s povećanim udjelom bakterija koljena *Bacteroidetes* i porodice bakterija *Prevotellaceae* te smanjenim udjelom bakterija koljena *Firmicutes* i porodice *Lachnospiraceae*. Autori pretpostavljaju da je ovakav sastav mikrobiote kod pojedinaca koji se pridržavaju mediteranskog načina prehrane povezan s povećanim unosom ugljikohidrata, vlakana i biljnih proteina, a poznato je da bakterije roda *Bacteroides* imaju velik broj hidrolitičkih enzima koji mogu razgraditi polisaharidne stanične stijenke biljaka (Gutiérrez-Díaz i sur., 2016). Mitsuo i suradnici (2017) zaključili su kako slaba usklađenost prehrane pojedinca s mediteranskom prehranom rezultira povećanim omjerom bakterija koljena *Firmicutes* naprema *Bacteroidetes*. Također su zaključili kako je visoko pridržavanje mediteranskom načinu prehrane u korelaciji sa smanjenom količinom bakterije *Escherichia coli*, većim *Bifidobacteria:E. coli* omjerom, povećanim razinama gljivice *Candida albicans* i većim količinama kratkolančane masne kiseline acetata u stolici (Mitsuo i sur., 2017). Sistemskim pregledom randomiziranih kontrolnih istraživanja Kimble i suradnici (2022) nisu našli povezanost između pridržavanja mediteranske prehrane i razlika u sastavu mikrobiote na razini bakterijskih koljena. Međutim, određena istraživanja

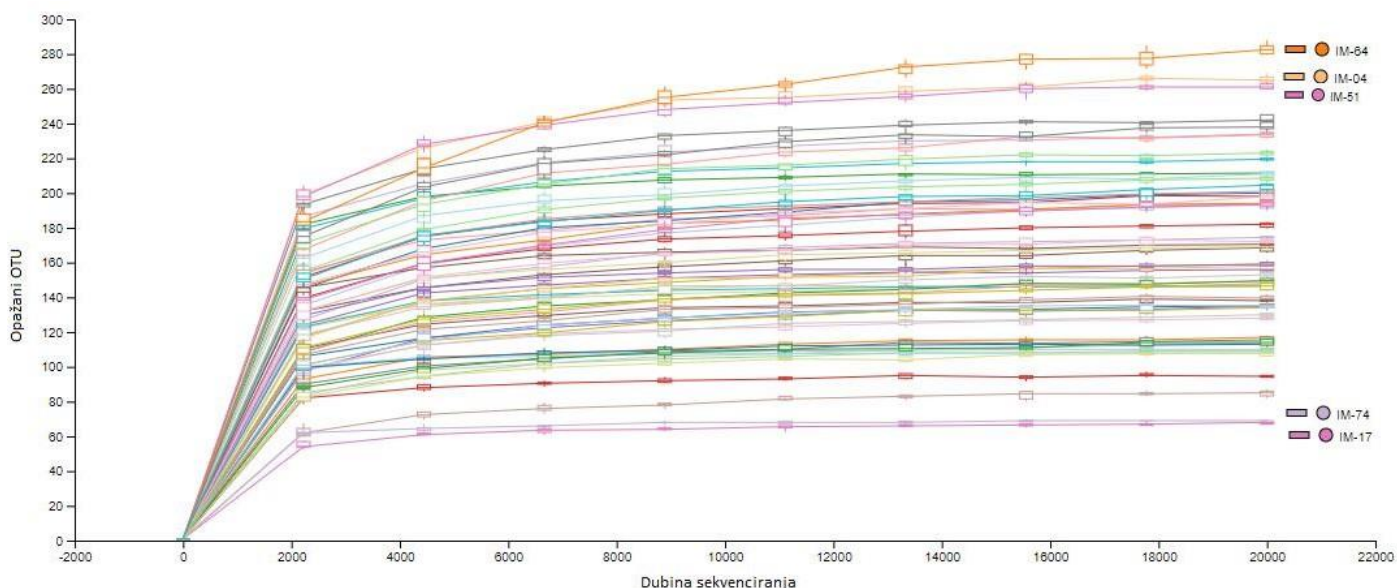
obuhvaćena u tom preglednom radu pokazuju povezanost pridržavanja mediteranske prehrane s povećanjem određenih bakterijskih vrsta. Visoko pridržavanje mediteranskog načina prehrane povezano je s povećanjem zastupljenosti bakterijske vrste *Roseburia hominis* te vrste *Faecalibacterium prausnitzii* (koljeno *Firmicutes*), a smanjenjem zastupljenosti vrste *Collinsella aerofaciens* (koljeno *Actinobacteria*).

Rezultati ovog istraživačkog rada sukladni su s istraživanjem Di Iorio i suradnika (2019), međutim razlika u zastupljenosti pojedinih bakterijskih koljena u promatranim skupinama nije dovoljno značajna kako bi sa sigurnošću mogli utvrditi povezanost između usklađenosti prehrane ispitanika s mediteranskom i sastavom mikrobiote.

Iako je općenito prihvaćeno da je prehrana glavni čimbenik koji utječe na crijevnu mikrobiotu, postoji vrlo ograničeno razumijevanje uzročne veze između sastava prehrane i crijevne mikrobiote kod ljudi. Problem je otežan i nedostatkom razumijevanja te ograničenim konsenzusom o karakteristikama zdravog mikrobioma, tako da je teško protumačiti razlike u mikrobioti povezane s različitim načinima prehrane (Leeming i sur., 2021). Potrebna su daljnja istraživanja kako bi sa sigurnošću mogli potvrditi ovakvu povezanosti.

4.4. ALFA RAZNOLIKOST

Osim taksonomske zastupljenosti pojedinih mikroorganizama u uzorcima ispitanika, promatrana je i alfa raznolikost. Alfa raznolikost daje procjenu raznolikosti vrsta unutar uzoraka. Za potrebe ovog rada korištena je metrika pod nazivom opažani OTU (eng. *observed_otus*) koji uzima u obzir prisutnost različitih mikrobnih vrsta (OTU-a) bez obzira na to kolika je njihova zastupljenost u uzorku. Slike 7-11 prikazuju alfa raznolikost u pojedinim uzorcima ili skupinama uzoraka. Na x-osi prikazana je dubina sekvenciranja koja označava broj korištenih sekvenci po uzorku, a na y-osi nalazi se opažani OTU.

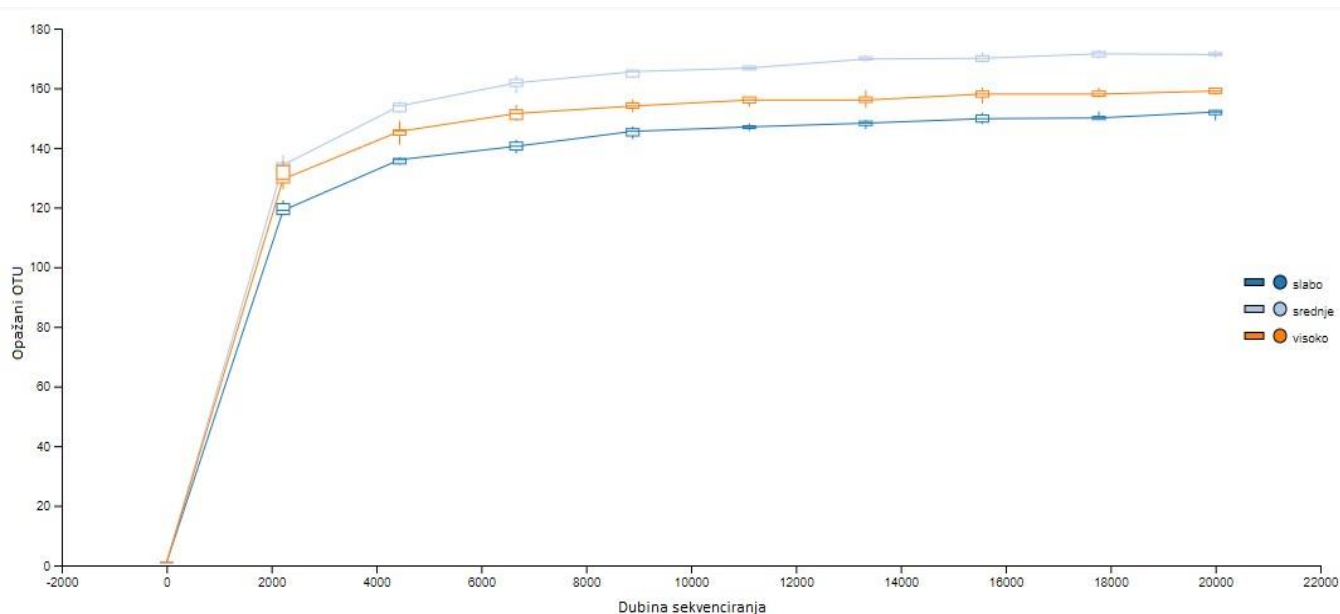


Slika 7. Alfa raznolikost uzorka prikazana *observed_otus* metrikom svakog pojedinca

Iz slike je vidljivo kako najveću alfa raznolikost imaju ispitanici pod šifrom IM-64, IM-04 i IM-51, a najmanju ispitanici IM-74 i IM-17. Ispitanik IM-64 je ženskog spola, pripada dobnoj skupini od 40 do 49 godina, svejed je, nije tjelesno aktivna, ne uzima probiotike u obliku dodataka prehrani, ali konzumira mliječne proizvode s dodanim probiotičkim kulturama. Ispitanik IM-04 je muškog spola, pripada dobnoj skupini od 30 do 39 godina, svejed je, tjelesno aktivan te ne uzima probiotike niti dodatke prehrani. Ispitanik IM-51 je muškog spola, pripada dobnoj skupini od 40 do 49 godina, tjelesno je aktivna osoba, svejed, ne uzima probiotike te uzima dodatke prehrani u obliku multivitaminskih i mineralnih pripravaka. Ispitanik IM-74 je ženskog spola, pripada dobnoj skupini od 30 do 39 godina, veganka, tjelesno neaktivna, ne

uzima probiotike te povremeno uzima dodatke prehrani u obliku vitamina B₁₂ i D₃. Ispitanik IM-17 je ženskog spola, pripada dobnoj skupini od 40 do 49 godina, unazad tri mjeseca od davanja uzorka stolice za potrebe istraživanja koristila je antibiotik augmentin, tjelesno je aktivna, svejed te uzima probiotike i dodatke prehrani (multivitaminski pripravci).

Slika 8 prikazuje alfa raznolikost promatranu po skupinama usklađenosti prehrane ispitanika s mediteranskom prehranom.



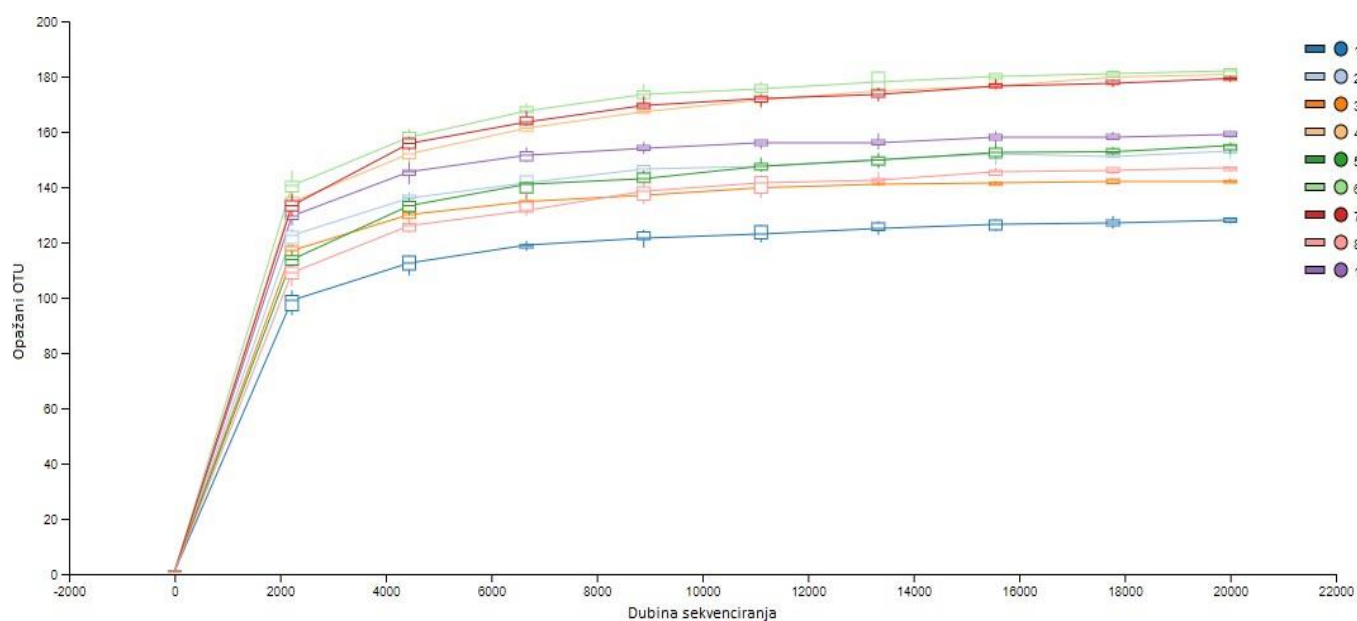
Slika 8. Alfa raznolikost grupe uzoraka prema usklađenosti prehrane s mediteranskom (slaba, srednja i visoka usklađenost), prikazana observed_otus metrikom

Iz slike 8 vidljivo je kako skupina srednje usklađenosti prehrane s mediteranskom ima najveću alfa raznolikost unutar skupine dok skupina slabe usklađenosti ima najmanju alfa raznolikost. Pretpostavka istraživanja bila je da osobe s većom usklađenosti prehrane s mediteranskom imaju veću paletu namirnica od kojih se njihova prehrana sastoji – bogatstvo povrća, voća, cjelovitih žitarica, visok udio vlakana i višestruko nezasićenih masnih kiselina – koje su povezane s povećanjem raznolikosti crijevne mikrobiote te da će osobe koje se pridržavaju mediteranskog načina prehrane imati najveću raznolikost u sastavu mikrobiote.

Maskarinec i suradnici (2019) povezali su veću alfa raznolikost s prehranom koja je bogata povrćem, voćem i cjelovitim žitaricama odnosno prehranom koja je više usklađena s

mediteranskom. Također, veću alfa raznolikost pokazala je grupa ispitanika čija je prehrana bila bogatija vlaknima s nižim unosom masti za razliku od grupe ispitanika čija je prehrana bazirana na masti s nižim udjelom vlakana (Maskarinec i sur., 2019). U istraživanju provedenom od strane Maldonado-Contreras i suradnika (2020) pokazana je negativna povezanost alfa raznolikosti s povećanim udjelom vlakna kod ispitanika s dijabetesom tipa 2. Ovakva negativna povezanost može s objasniti prisutnošću bolesti koja nadilazi promjenu prehrane ispitanika. Iako ispitanici s ovom bolesti najčešće mijenjaju svoju prehranu nakon dijagnoze, takva promjena nije dovoljna da dođe do promjene u raznolikosti sastava crijevne mikrobiote (Maldonado-Contreras i sur., 2020). Garcia-Mantrana i suradnici (2018) nisu našli povezanost između alfa raznolikosti i usklađenosti prehrane s mediteranskom.

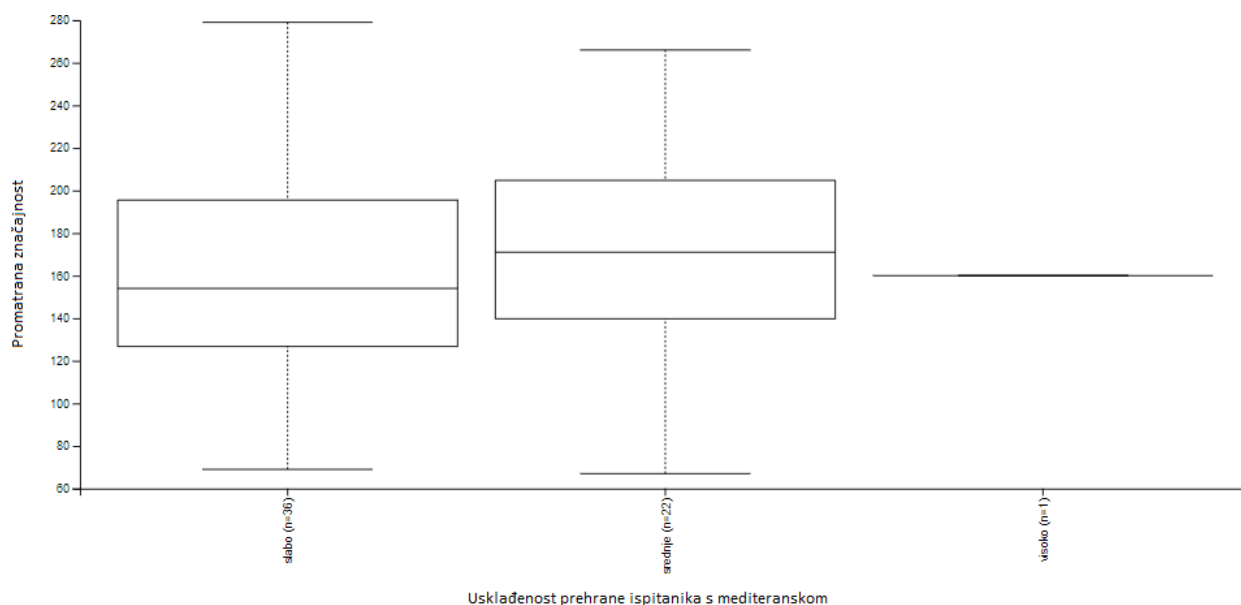
Slika 9 prikazuje alfa raznolikost kod skupina ispitanika ovisno o broju bodova dobivenih u upitniku usklađenosti prehrane s mediteranskom.



Slika 9. Alfa raznolikost grupe uzoraka prema broju bodova dobivenih u upitniku usklađenosti prehrane s mediteranskom, prikazana observed_otus metrikom

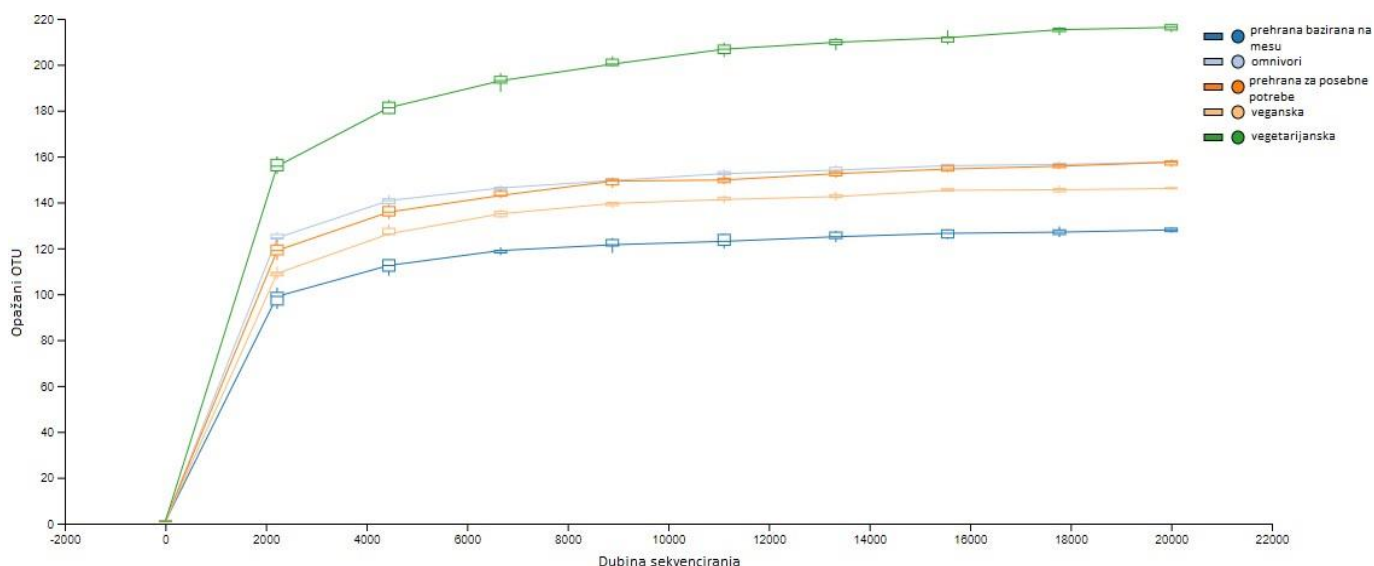
Iz rezultata prikazanih slikama 8 i 9 ne može se utvrditi povezanost između usklađenosti prehrane ispitanika s mediteranskom i alfa raznolikosti njihove mikrobiote.

Provedena je i analiza značajnosti alfa raznolikosti po skupinama usklađenosti prehrane s mediteranskom (slika 10) iz koje se može zaključiti da nema značajne razlike u raznolikosti mikrobiote s obzirom na usklađenost prehrane s mediteranskom. U skupini visoke usklađenosti nalazi se samo jedan ispitanik što se ne može promatrati kao referentnu skupinu na temelju koje bi se mogao donijeti takav zaključak. Potrebno je provesti daljnja istraživanja s većim brojem ispitanika koji imaju visoki stupanj pridržavanja mediteranske prehrane.



Slika 10. Analiza značajnosti alfa raznolikosti po skupinama usklađenosti prehrane s mediteranskim obrascem (slaba, srednja i visoka)

U ovom istraživačkom radu promatrana je i alfa raznolikost unutar skupina ovisno o načinu prehrane ispitanika. Od ispitanika se tražilo da svrstaju svoj način prehrane u jednu od idućih kategorija: omnivorska (svejadi), veganska, vegetarijanska, prehrana za posebne potrebe (dijabetička prehrana, prehrana bez glutena, prehrana za bubrežne bolesnike i sl.). Jedan ispitanik svoju prehranu nije svrstao u niti jednu kategoriju već je prehranu opisao kao izrazito baziranu na mesu i hrani životinjskog podrijetla s vrlo malo povrća i bez konzumacije voća. Slika 11 prikazuje alfa raznolikost u skupinama uzoraka ovisno o načinu prehrane svakog pojedinog ispitanika.



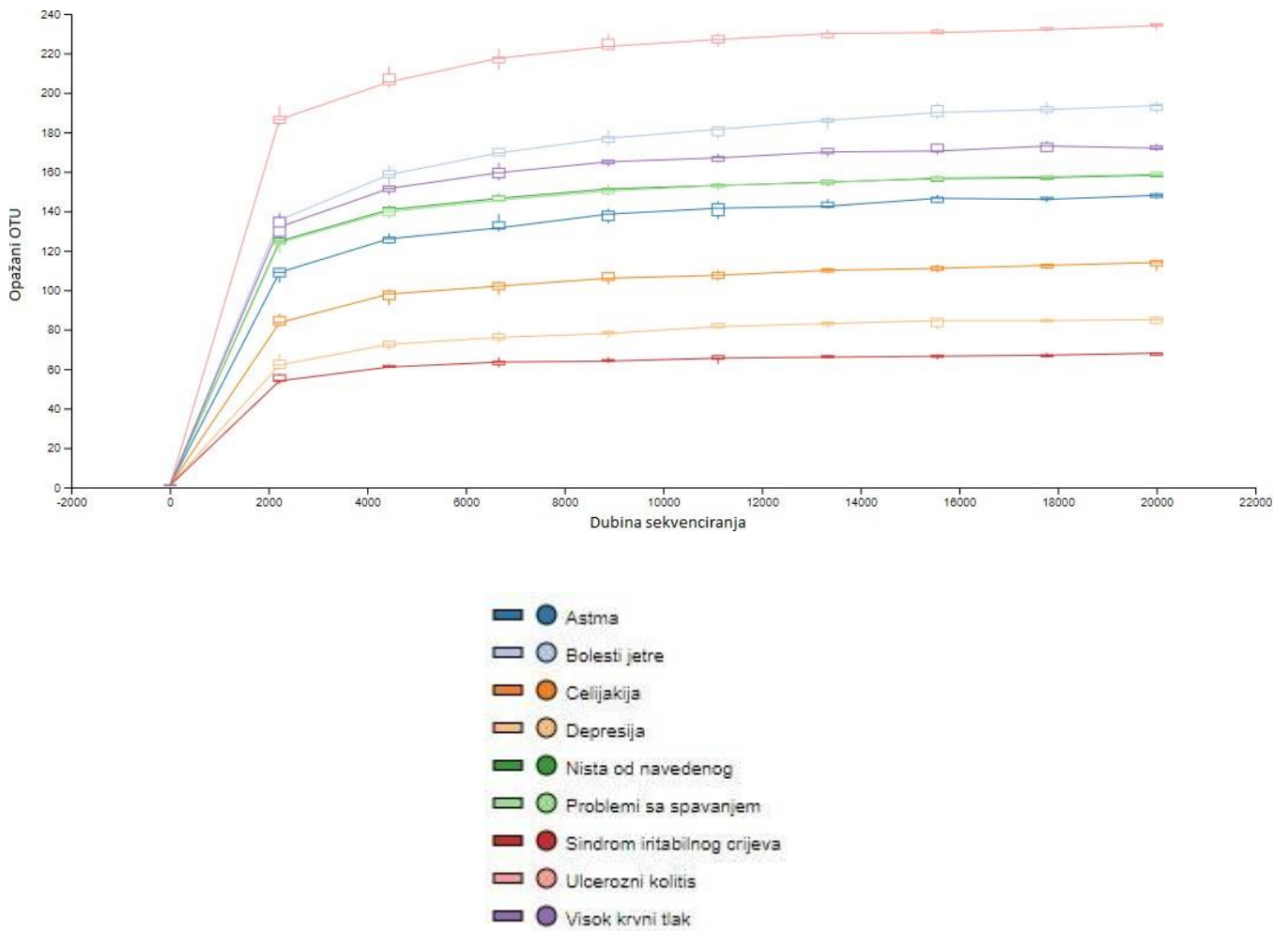
Slika 11. Alfa raznolikost mikroorganizama u skupinama ovisno o vrsti prehrane, prikazana observed_otus metrikom

Iz slike 11 vidljivo je da najveću alfa raznolikost ima skupina vegetarijanaca, dok najmanju alfa raznolikost ima ispitanik čija se prehrana bazira na mesu. Svejadi i ispitanici čija je prehrana prilagođena posebnim potrebama imaju vrlo sličnu alfa raznolikost, dok vegani imaju nešto manju alfa raznolikost. Kod interpretacije rezultata bitno je naglasiti da skupini vegana pripada šest ispitanika, dok skupini vegetarijanaci pripadaju svega dva ispitanika. Iz tog razloga ove skupine se ne mogu promatrati kao referentne te se ne može donijeti konačan zaključak. Potrebno je provesti istraživanja na većem broju ispitanika koji se hrane ovakvim vrstama prehrane.

U istraživanju koje su proveli Losasso i suradnici (2018) promatran je sastav i raznolikost mikrobiote kod vegana, vegetarijanca i omnivora. Ispitanici koji se hrane veganskom i vegetarijanskom prehranu pokazali su znatno veću alfa raznolikost od ispitanika koji se hrane prehranom svejeda (Losasso i sur., 2018). Kohnert i suradnici (2021) proveli su istraživanje u kojem su promatrali sastav i raznolikost crijevne mikrobiote nakon veganske ili prehrane bazirane na mesu u trajanju od 4 tjedna. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine, jedna skupina je konzumirala prehranu bogatu mesom (> 150 g mesa na dan) dok se druga skupina pridržavala veganske prehrane.

Uzorak stolice prikupljen je prije i nakon intervencije te je provedena analiza mikrobiote. Rezultati nisu pokazali značajnu razliku u alfa raznolikosti u promatranim skupinama ovisno o vrsti prehrane (Kohnert i sur., 2021). Također, značajno manja alfa raznolikost povezana je s ketogenom prehranom (prehranom koja se bazira na mesu i namirnicama životinjskog podrijetla s niskim unosom ugljikohidrata) i u istraživanju Olson i suradnika iz 2018. godine.

Raznolikost u sastavu mikrobiote ovisi i o zdravstvenom statusu, odnosno prisustvu određenih bolesti kod domaćina. Istraživanja povezuju pojavu bolesti sa crijevnom disbiozom, odnosno smanjenjem prisutnosti korisnih bakterija, smanjenjem bakterijske raznolikosti u sastavu mikrobiote te povećanjem prisutnosti štetnih bakterijskih vrsta. Smanjena raznolikost u sastavu crijevne mikrobiote posebice se povezuje s bolestima probavnog sustava, kao na primjer sindroma iritabilnog crijeva i ulceroznog kolitisa. Canakis i suradnici (2020) primijetili su smanjenu raznolikost u sastavu mikrobiote kod osoba koje pate od sindroma iritabilnog crijeva u usporedbi sa zdravim pojedincima. Također, primijetili su povećanje udjela bakterija koljena *Firmicutes* te smanjenje bakterija koljena *Bacteroidetes*, te povećanje udjela bakterija razreda *Clostridia* i reda *Clostridiales* (Canakis i sur., 2020). Guo i suradnici (2020) uočili su istu pojavu kod osoba s ulceroznim kolitisom. Smanjena raznolikost u sastavu crijevne mikrobiote jedan je od glavnih indikatora prisustva ulceroznog kolitisa. Zanimljivo je da su istraživanja pokazala da terapija transplantacijom fekalne mikrobiote vraća raznolikost u sastavu mikrobiote kod osoba s ulceroznim kolitisom. Istraživanja pokazuju da i osobe s celijakijom pokazuju smanjen udio korisnih bakterija te povećan udio štetnih bakterija, odnosno disbiozu. Nakon prelaska na prehranu bez glutena dolazi do povećanja raznolikosti crijevne mikrobiote, ali ta raznolikost nije jednaka kao kod zdravih pojedinaca. Istraživanje koje su proveli Marasco i suradnici (2016) pokazalo je značajno poboljšanje raznolikosti sastava crijevne mikrobiote kod pojedinaca na bezglutenskoj prehrani u odnosu na one koji konzumiraju gluten, a boluju od celijakije. Novija istraživanja povezuju mentalne bolesti sa sastavom mikrobiote, a posebna važnost pridaje se razumijevanju povezanosti mikrobiote i mozga (eng. *gut-brain axis*). Du i suradnici (2020) pokazali su da pacijenti s depresijom imaju značajno manju raznolikost crijevne mikrobiote za razliku od zdravih pojedinaca. Također, pokazali su smanjenu raznolikost bakterija iz porodica *Lachnospiraceae* i *Ruminococcaceae* te bakterija roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (Du i sur., 2020). Slika 12 prikazuje alfa raznolikost mikrobiote ispitanika ovisno o prisutnosti određenih bolesti.

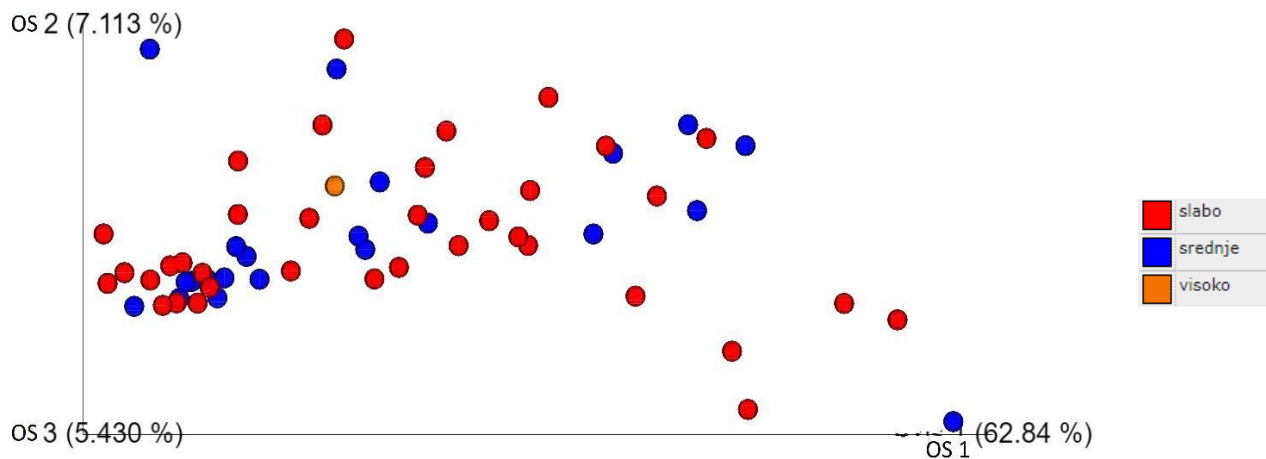


Slika 12. Alfa raznolikost mikroorganizama u skupinama ovisno o prisustvu određenih vrsta bolesti, prikazana observed_otus metrikom

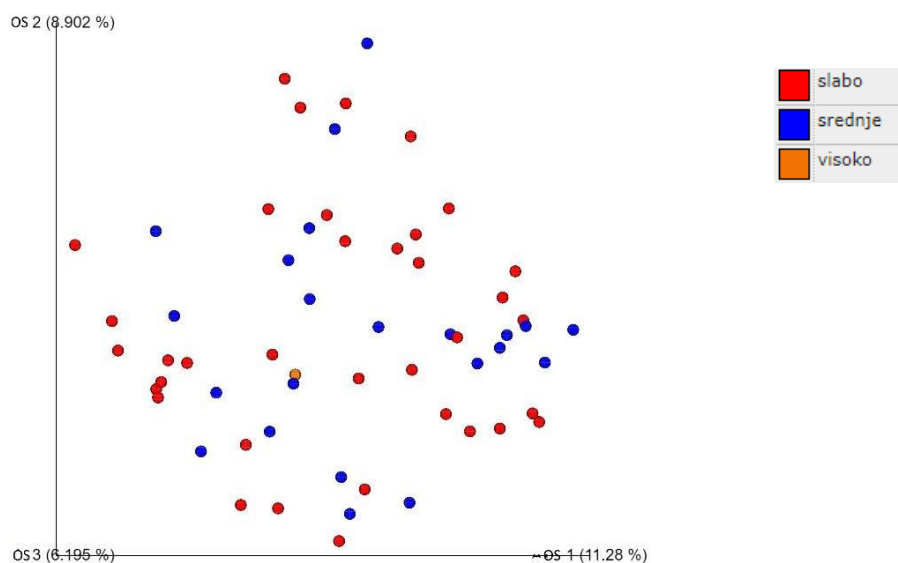
Iz slike 12 vidljivo je da najmanju alfa raznolikost imaju ispitanici koji boluju od sindroma iritabilnog crijeva te ispitanici koji pate od depresije što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima. Najveću alfa raznolikost imaju ispitanici s ulceroznim kolitisom. Kako bi se mogli donijeti zaključci o alfa raznolikosti kod osoba koje pate od određenih vrsta bolesti, potrebno je provesti daljnja istraživanja s većim brojem ispitanika.

4.5. BETA RAZNOLIKOST

Osim alfa raznolikosti, u ovom istraživačkom radu promatrana je i beta raznolikost uzoraka. Beta raznolikost daje mjeru sličnosti između promatranih uzoraka. Za prikaz rezultata korištena je PCoA metoda (eng. *Principal Coordinates Analysis*) u kojoj su uzorci smješteni u trodimenzionalni okvir te je udaljenost određena UniFrac metrikom. Korištene su težinske (eng. *weighted*) i netežinske (eng. *unweighted*) UniFrac udaljenosti. Težinski prikaz uzima u obzir prisutnost i zastupljenost pojedine bakterije, dok netežinski prikaz uzima u obzir samo prisutnost pojedine bakterije. Sličnost uzoraka vidi se njihovom grupacijom na grafu – što su točke bliže, uzorci su sličniji. Slika 13 prikazuje težinski prikaz beta raznolikosti s obzirom na usklađenost prehrane ispitanika s mediteranskom, dok slika 14 prikazuje netežinsku beta raznolikost.



Slika 13. Težinski UniFrac prikaz beta raznolikosti s obzirom na usklađenost prehrane ispitanika s mediteranskom

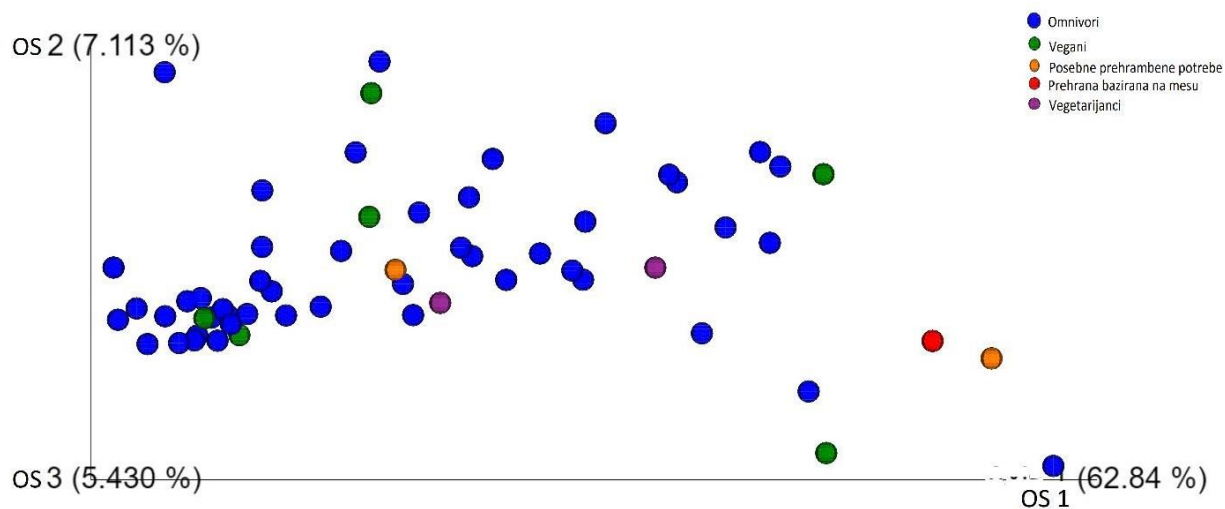


Slika 14. Netežinski UniFrac prikaz beta raznolikosti s obzirom na usklađenost prehrane ispitanika s mediteranskom

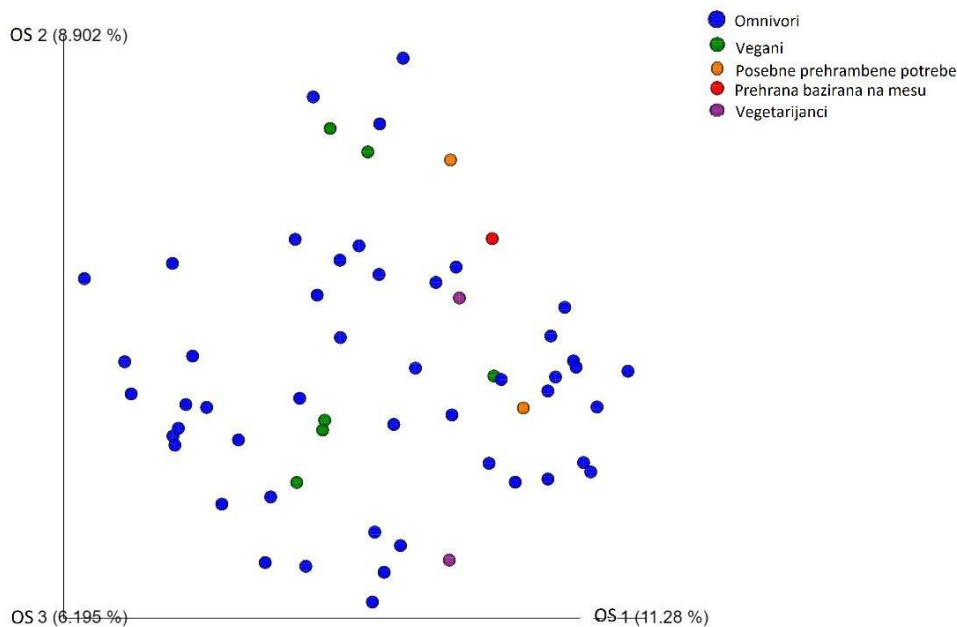
Kao što je vidljivo na slikama 13 i 14, nije došlo do grupiranja uzoraka u promatranim skupinama.

Maldonado-Contreras i suradnici (2020) ustvrdili su pozitivnu korelaciju beta raznolikosti s određenim komponentama mediteranske prehrane kao na primjer većim unosom povrća i cjelovitih žitarica, međutim, nisu ustvrdili povezanost beta raznolikosti s ukupnom usklađenosti prehrane s mediteranskom. Do sličnog zaključka su došli i Maskarinec i suradnici (2019). Povezali su beta raznolikost s većim udjelom vlakana i manjim udjelom masti u prehrani, ali također nisu utvrdili povezanost cjelokupne usklađenosti prehrane s mediteranskom i beta raznolikosti.

Promatrana je i beta raznolikost uzoraka ovisno o vrsti prehrane ispitanika (omnivori, veganska, vegetarijanska, prehrana za posebne potrebe i prehrana bazirana na mesu). Slika 15 prikazuje težinski UniFrac prikaz beta raznolikosti s obzirom na vrstu prehrane ispitanika, dok slika 16 prikazuje netežinsku UniFrac udaljenost.



Slika 15. Težinski UniFrac prikaz beta raznolikosti s obzirom na vrstu prehrane ispitanika



Slika 16. Netežinski UniFrac prikaz beta raznolikosti s obzirom na vrstu prehrane ispitanika

Kao što je prije spomenuto, veću beta raznolikost u sastavu mikrobiote pokazuju osobe čija je prehrana bogata povrćem, voćem, cjelovitim žitaricama i s većim udjelom vlakana, dok je kod ispitanika čija je prehrana bogata mastima i namirnicama životinjskog podrijetla primijećena manja raznolikost (Maldonado-Contreras i sur., 2020; Maskarinec i sur., 2019).

Iz slika 15 i 16 je vidljivo da nije došlo do grupacije uzoraka, tako da se ne može utvrditi povezanost između načina prehrane ispitanika i beta raznolikosti u sastavu crijevne mikrobiote.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja te prikazanih rezultata, može se zaključiti sljedeće:

1. Na temelju rezultata dobivenih upitnikom o procjeni usklađenosti prehrane ispitanika s mediteranskom prehranom možemo zaključiti kako prehrana većine ispitanika nije usklađena s mediteranskom prehranom.
2. Usporedbom taksonomske zastupljenosti mikroorganizama u skupinama usklađenosti prehrane s mediteranskom nije uočena značajna razlika u sastavu crijevne mikrobiote, zastupljenosti koljena *Bacteroidetes* i *Firmicutes*, njihovog međusobnog omjera niti zastupljenosti ostalih mikroorganizama crijevne mikrobiote.
3. Analizom alfa raznolikosti nije uočena značajna povezanost između raznolikosti i bogatstva sastava mikrobiote s usklađenosti prehrane s mediteranskom. Također, nije uočena povezanost između raznolikosti sastava crijevne mikrobiote te vrste prehrane niti prisutnosti određenih bolesti kod ispitanika.
4. Analizom beta raznolikosti te težinskim i netežinskim prikazima nije uočena grupacija uzoraka s obzirom na usklađenost prehrane s mediteranskom niti s obzirom na vrstu prehrane ispitanika.

Potrebno je provesti daljnja istraživanja s većim brojem ispitanika, boljom zastupljenosti po dobnim kategorijama te vrsti prehrane kako bi mogli utvrditi povezanost usklađenosti prehrane ispitanika s mediteranskom prehranom i sastavom crijevne mikrobiote. Također, potrebno je uključiti nutricioniste koji bi ispunjavali upitnik o prehrambenim navikama zajedno s ispitanicima kako bi se smanjila mogućnost zabune i davanja pogrešnih odgovora.

6. LITERATURA

- Antinozzi M, Giffi M, Sini N, Gallè F, Valeriani F, De Vito C, i sur. (2022) Cigarette Smoking and Human Gut Microbiota in Healthy Adults: A Systematic Review. *Biomedicines* **10**, 1–16. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020510>
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Paslier D Le, Yamada T, Mende DR, i sur. (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
- Bach-Faig A, Berry EM, Lairon D, Reguant J, Trichopoulou A, Dernini S, i sur. (2011) Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutr* **14**, 2274–2284. <https://doi.org/10.1017/S1368980011002515>
- Beam A, Clinger E, Hao L (2021) Effect of Diet and Dietary Components on the Composition of the Gut Microbiota. *Nutrients* **13**, 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu13082795>
- Bibbò S, Ianiro G, Giorgio V, Scaldaferrì F, Masucci L, Gasbarrini A, i sur. (2016) The role of diet on gut microbiota composition. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **20**, 4742–4749.
- Bing-Nan L, Xiao-Tong L, Zi-Han L, Ji-Hui W (2021) Gut microbiota in obesity. *World J Gastroenterol* **27**, 3837–3850. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i25.3837>
- Boudry G, Charton E, Le Huerou-Luron I, Ferret-Bernard S, Le Gall S, Even S, i sur. (2021) The Relationship Between Breast Milk Components and the Infant Gut Microbiota. *Front Nutr* **8**, 629740. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.629740>
- Canakis A, Haroon M, Weber HC (2020) Irritable bowel syndrome and gut microbiota. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **27**, 28–35. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000523>
- Chierico F Del, Vernocchi P, Dallapiccola B, Putignani L (2014) Mediterranean Diet and Health : Food Effects on Gut Microbiota and Disease Control. *Int J Mol Sci* **15**, 11678–11699. <https://doi.org/10.3390/ijms150711678>
- Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R (2012) The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. *Cell* **148**, 1258–1270. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035>

- Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S (2016) Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci Rep* **6**. <https://doi.org/10.1038/srep23129>
- Conlon MA, Bird AR (2015) The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients* **7**, 17–44. <https://doi.org/10.3390/nu7010017>
- Costello EK, Stagaman K, Dethlefsen L, Bohannan BJM, Relman DA (2012) The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome. *Science* **336**, 1255–1262. <https://doi.org/10.1126/science.1224203>
- D’Argenio V, Salvatore F (2015) The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clin Chim Acta* **451**, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.01.003>
- De Filippis F, Pellegrini N, Vannini L, Jeffery IB, La Storia A, Laghi L, i sur. (2016) High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut* **65**, 1812–1821. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309957>
- De Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N (1999) Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: Final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* **99**, 779–785. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.99.6.779>
- Depommier C, Everard A, Druart C, Plovier H, Van M, Vieira-silva S, i sur. (2020) Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nat Med* **25**, 1096–1103. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0495-2>
- Di Iorio BR, Rocchetti MT, Angelis M De, Cosola C, Marzocco S, Micco L Di, i sur. (2019) Nutritional Therapy Modulates Intestinal Microbiota and Reduces Serum Levels of Total and Free Indoxyl Sulfate and P-Cresyl Sulfate in Chronic Kidney Disease (Medika Study). *J Clin Med* **8**, 1424. <https://doi.org/10.3390/jcm8091424>
- Dinu M, Pagliai G, Casini A, Sofi F (2018) Mediterranean diet and multiple health outcomes: An umbrella review of meta-analyses of observational studies and randomised trials. *Eur J Clin Nutr* **72**, 30–43. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2017.58>

- Du Y, Gao XR, Peng L, Ge JF (2020) Crosstalk between the microbiota-gut-brain axis and depression. *Heliyon* **6**. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04097>
- Elliot MB (2019) Sustainable Food Systems and the Mediterranean Diet. *Nutrients* **11**, 2229. <https://doi.org/10.3390/nu11092229>
- Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, Ruiz-Gutierrez V, Covas MI, i sur. (2006) Annals of Internal Medicine Article Effects of a Mediterranean-Style Diet on Cardiovascular Risk Factors. *Ann Intern Med* **145**, 1–11. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-145-1-200607040-00004>
- Gacesa, R., Kurilshikov, A, Vich Vila, A, i sur. (2022) Environmental factors shaping the gut microbiome in a Dutch population. *Nature* **604**, 732–739. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04567-7>
- Garber A, Hastie P, Murray JA (2020) Factors Influencing Equine Gut Microbiota: Current Knowledge. *J Equine Vet Sci* **88**. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.102943>
- Garcia-Esquinas E, Ortola R, Ramon Banegas J, Lopez-Garcia E, Rodriguez-Artalejo F (2020) Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids, fish intake and healthy ageing. *Int J Epidemiol* **48**, 1914–1924. <https://doi.org/10.1093/ije/dyz196>
- Garcia-Mantrana I, Selma-royo M, Alcantara C, Collado MC (2018) Shifts on Gut Microbiota Associated to Mediterranean Diet Adherence and Specific Dietary Intakes on General Adult Population **9**, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00890>
- Gervasi T, Barreca D, Lagan G, Mandalari G (2021) Health Benefits Related to Tree Nut Consumption and Their Bioactive Compounds. *Int J Molecul Sci* **22**. <https://doi.org/10.3390/ijms22115960>
- Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, Blekhman R, i sur. (2014) Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* **159**, 789–799. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.053>
- Guo XY, Liu XJ, Hao JY (2020) Gut microbiota in ulcerative colitis: insights on pathogenesis and treatment. *J Dig Dis* **21**, 147–159. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12849>

- Gutiérrez-Díaz I, Fernández-Navarro T, Sánchez B, Margolles A, González S (2016) Mediterranean diet and faecal microbiota: a transversal study. *Food Funct* **7**, 2347–56. <https://doi.org/10.1039/C6FO00105J>
- Hasan N, Yang H (2019) Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ* **7**, <https://doi.org/10.7717/peerj.7502>
- Humphreys C (2020) Intestinal Permeability. U: Pizzorno J E, Murray M T (ured.) Textbook of Natural Medicine, 5 izd. Churchill Livingstone, str. 166-177.e4
- Kern T, Blond MB, Hansen TH, Rosenkilde M, Quist JS, Gram AS, i sur. (2020) Structured exercise alters the gut microbiota in humans with overweight and obesity—A randomized controlled trial. *Int J Obes* **44**, 125–135. <https://doi.org/10.1038/s41366-019-0440-y>
- Keys, A (1980) Seven countries: A multivariate analysis of death and coronary heart disease, 6. izd., Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Kimble R, Gouinguenet P, Ashor A, Stewart C, Deighton K, Matu J, i sur. (2022) Effects of a mediterranean diet on the gut microbiota and microbial metabolites: A systematic review of randomized controlled trials and observational studies. *Crit Rev Food Sci Nutr* **0**, 1–22. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2057416>
- Kohnert E, Kreutz C, Binder N, Hannibal L, Gorkiewicz G, Müller A, i sur. (2021) Changes in Gut Microbiota after a Four-Week Intervention with Vegan vs . Meat-Rich Diets in Healthy Participants : A Randomized Controlled Trial. *Microorganisms* **9**, 727. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040727>
- Koren O, Knights D, Gonzalez A, Waldron L, Segata N, Knight R, i sur. (2013) A Guide to Enterotypes across the Human Body: Meta-Analysis of Microbial Community Structures in Human Microbiome Datasets. *PLoS Comput Biol* **9** (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002863>
- Krittawong C, Isath A, Hahn J, Wang Z (2020) Fish Consumption and Cardiovascular Health : A Systematic Review. *Am J Med* **134**, 713–720. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.12.017>

- Leeming ER, Louca P, Gibson R, Menni C, Spector TD, Roy CI Le (2021) The complexities of the diet-microbiome relationship: advances and perspectives. *Genome Med* **13**, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00813-7>
- Losasso C, Eckert EM, Mastrorilli E, Villiger J, Mancin M, Patuzzi I, i sur. (2018) Assessing the influence of vegan, vegetarian and omnivore oriented westernized dietary styles on human gut microbiota: A cross sectional study. *Front Microbiol* **9**, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00317>
- Maldonado-Contreras A, Noel SE, Ward D V., Velez M, Mangano KM (2020) Associations between Diet, the Gut Microbiome, and Short-Chain Fatty Acid Production among Older Caribbean Latino Adults. *J Acad Nutr Diet* **120**, 2047-2060.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2020.04.018>
- Marasco G, Di Biase AR, Schiumerini R, Eusebi LH, Iughetti L, Ravaioli F, i sur. (2016) Gut Microbiota and Celiac Disease. *Dig Dis Sci* **61**, 1461–1472. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-4020-2>
- Martínez-González MA, García-Arellano A, Toledo E, Salas-Salvadó J, Buil-Cosiales P, Corella D, i sur. (2012) A 14-item mediterranean diet assessment tool and obesity indexes among high-risk subjects: The PREDIMED trial. *PLoS One* **7**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043134>
- Maskarinec G, Hullar MAJ, Monroe KR, Shepherd JA, Hunt J, Randolph TW, i sur. (2019) Fecal microbial diversity and structure are associated with diet quality in the multiethnic cohort adiposity phenotype study. *J Nutr* **149**, 1575–1584. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz065>
- Merra G, Noce A, Marrone G, Cintoni M, Tarsitano MG, Capacci A, i sur. (2021) Influence of Mediterranean Diet on Human Gut Microbiota. *Nutrients* **13**, 1–12. <https://doi.org/10.3390/nu13010007>
- Minzer S, Estruch R, Casas R (2020) Wine Intake in the Framework of a Mediterranean Diet and Chronic Non-Communicable Diseases: A Short Literature Review of the Last 5 Years. *Molecules* **25**, 5045. <https://doi.org/10.3390/molecules25215045>

- Mitsou EK, Kakali A, Antonopoulou S, Mountzouris KC, Yannakoulia M, Panagiotakos DB, i sur. (2017) Adherence to the Mediterranean diet is associated with the gut microbiota pattern and gastrointestinal characteristics in an adult population. *Br J Nutr* **117**, 1645–1655. <https://doi.org/10.1017/S0007114517001593>
- Obeid CA, Gubbels JS, Jaalouk D, Kremers SPJ, Oenema A (2022) Adherence to the Mediterranean diet among adults in Mediterranean countries: a systematic literature review. *Eur J Nutr*. <https://doi.org/10.1007/s00394-022-02885-0>
- Olson CA, Vuong HE, Yano JM, Liang QY, Nusbaum DJ, Hsiao EY (2018) The Gut Microbiota Mediates the Anti-Seizure Effects of the Ketogenic Diet. *Cell* **173**, 1728-1741.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.04.027>
- Parkinson L, Cicerale S (2016) The health benefiting mechanisms of virgin olive oil phenolic compounds. *Molecules* **21**, 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules21121734>
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, i sur. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, i sur. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* **41**, 590–596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Redondo-Useros N, Nova E, Gonz N, Ligia ED, Sonia G (2020) Microbiota and Lifestyle : A Special Focus on Diet. *Nutrients* **12**. <https://doi.org/10.3390/nu12061776>
- Rinninella E, Cintoni M, Raoul P, Lopetuso LR, Scaldaferri F, Pulcini G, i sur. (2019) Food components and dietary habits: Keys for a healthy gut microbiota composition. *Nutrients* **11**, 1–23. <https://doi.org/10.3390/nu11102393>
- Robeson MS, O'Rourke DR, Kaehler BD, Ziemski M, Dillon MR, Foster JT, i sur. (2021) RESCRIPT: Reproducible sequence taxonomy reference database management. *PLoS Comput Biol* **17**, 1-37. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009581>
- Romani A, Ieri F, Urciuoli S, Noce A, Marrone G, Nediani C, i sur. (2019) Health Effects of Phenolic Compounds Found in Extra-Virgin Olive Oil, By-Products, and Leaf of *Olea europaea* L. *Nutrients* **11**, 1–33. <https://doi.org/10.3390/nu11081776>

- Sender R, Fuchs S, Milo R (2016) Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* **14**, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Serra-Majem L, Tomaino L, Dernini S, Berry EM, Lairon D, Ngo J, i sur. (2020) Updating the Mediterranean Diet Pyramid towards Sustainability : Focus on Environmental Concerns. *Int J Enviironmental Res Public Heal* **17**, 8758. <https://doi.org/10.3390/ijerph17238758>
- Šarac J, Auguštin DH, Lovrić M, Stryeck S, Šunić I, Novokmet N, i sur. (2021) A generation shift in mediterranean diet adherence and its association with biological markers and health in dalmatia, Croatia. *Nutrients* **13**. <https://doi.org/10.3390/nu13124564>
- Tomova A, Bukovsky I, Rembert E, Yonas W, Alwarith J, Barnard ND, i sur. (2019) The effects of vegetarian and vegan diets on gut microbiota. *Front Nutr* **6**, 47. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00047>
- Trichopolou A, Vasillopoulou E (2000) Mediterranean diet and longevity. *Br J Nutr* **84**, S205–S209. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.62178-5>
- UNESCO (2013) Mediterranean diet. UNESCO - United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, <https://ich.unesco.org/en/RL/mediterranean-diet-00884>.
Pristupljeno 21. veljače 2021.
- Walsh CJ, Guinane CM, O’Toole PW, Cotter PD (2014) Beneficial modulation of the gut microbiota. *FEBS Lett* **588**, 4120–4130. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.03.035>
- Willett WC, Sacks F, Trichopoulou A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, i sur. (1995) Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr* **61**, 1402S–1406S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/61.6.1402S>
- Yang L, Bajinka O, Jarju PO, Tan Y, Taal AM, Ozdemir G (2021) The varying effects of antibiotics on gut microbiota. *AMB Express* **11**. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01274-w>

PRILOZI

PRILOG 1. UPITNIK PILOT PROJEKTA CRIJEVNA MIKROBIOTA RADNO-AKTIVNE POPULACIJE RH

Pilot projekt: Crijevna mikrobiota radno-aktivne populacije RH

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

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

* Required

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

2. Spol *

Mark only one oval.

Muški

Ženski

3. Dob *

Mark only one oval.

18 - 29

30 - 39

40 - 49

50 - 59

4. Bračni status *

Mark only one oval.

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

5. Obrazovanje *

Mark only one oval.

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

6. Visina u centimetrima: *

7. Masa u kilogramima: *

8. Na koji način ste rođeni? *

Mark only one oval.

- vaginalni porođajski
- rez
- ne znam

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

Mark only one oval.

D

A

NE

10. Ako da, koji?

11. Jeste li tjelesno aktivni? *

Mark only one oval.

D

A

NE

12. Koliko ste tjelesno aktivni na tjednoj bazi? *

Mark only one oval.

Manje od 1 sata

do 2 sata

2 do 3 sata

3 do 4 sata

Više od 4 sata

13. Kojim tjelesnim aktivnostima se bavite? *

Check all that apply.

Hodanje

Trčanje

Biciklizam

Plivanje

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

aerobik, pilates, joga i sl.

Other: _____

14. Pušite li? *

Mark only one oval.

- Da
- Ne
- Bivši sam pušač/ica

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

Mark only one oval.

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








16. Prosječna učestalost stolice? *

Mark only one oval.

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

17. Izaberite uobičajeni tip stolice *

The Bristol Stool Form Scale

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

Mark only one oval.

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

18. Za sebe smatrate da ste: *

Mark only one oval.

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

19. Smatrate li da se debljate brzo? *

Mark only one oval.

- Ne
- Da
- Samo ako dulje vrijeme previše jedem

20. Želite li biti u boljoj formi? *

Mark only one oval.

- Da
- Ne

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

Check all that apply.

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

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

Check all that apply.

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

Other: _____

23. Koliko prosječno spavate dnevno? *

Mark only one oval.

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

24. Koliko prosječno jedete obroka dnevno? *

Mark only one oval.

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5 i više

25. Koliko često doručkujete? *

Mark only one oval.

- svaki dan
- ponekad
- rijetko
- nikad

26. Za ručak na poslu/školi: *

Check all that apply.

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

Other: _____

27. Koristite li umjetne zaslađivače? *

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

Mark only one oval.

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

28. Koliko ste često naduti? *

Mark only one oval.

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

29. Uzimate li neke od sljedećih lijekova? *

Check all that apply.

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

Other: _____

30. Bolujete li od sljedećih bolesti/poremećaja: *

Check all that apply.

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

31. Kakav Vam je COVID-19 status? *

Check all that apply.

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

32. Alergičan/na sam na: *

Check all that apply.

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

Other: _____

33. Uzimate li probiotike? *

Mark only one oval.

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

34. Uzimate li dodatke prehrani? *

Check all that apply.

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

Prehrambene navike

35. Koliko često konzumirate kavu? *

Mark only one oval.

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

36. **Koliko često konzumirate čaj? ***

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

Mark only one oval.

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

37. **Koliko često konzumirate jedno serviranje alkoholnog pića? ***

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

Mark only one oval.

- Nikad
- Manje od 1 mjesečno1 -
- 3 puta mjesečno
- 1 tjedno
- 2 - 3 puta tjedno
- 4 - 6 puta tjedno
- 1 dnevno
- Više puta dnevno

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

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

Mark only one oval.

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

39. Koliko često konzumirate gazirana bezalkoholna pića? *

Mark only one oval.

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

40. Koliko često konzumirate mlijeko i mliječne proizvode? *

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

Mark only one oval.

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

41. Koliko često konzumirate voće? *

Odnosi se isključivo na svježe, neprerađeno voće

Mark only one oval.

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

42. Koliko često konzumirate povrće? *

Ne uključuje krumpir

Mark only one oval.

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

43. Koliko često konzumirate meso? *

Mark only one oval.

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

44. Koliko često konzumirate ribu? *

Mark only one oval.

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

45. Koliko često konzumirate kruh i pekarske proizvode? *

Mark only one oval.

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

46. Što ste jučer jeli za doručak? *

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

47. Što ste jučer jeli za ručak? *

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

48. Što ste jučer jeli za večeru? *

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

49. Što ste prekjučer jeli za doručak? *

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

50. Što ste prekjučer jeli za ručak? *

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

51. Što ste prekjučer jeli za večeru? *

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

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

Mark only one oval.

D

A

NE

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

54. Koliko porcija povrća jedete dnevno (porcija = 200 g) ? *

55. Koliko porcija voća jedete dnevno (porcija = 200 g), uključujući prirodne sokove ? *

56. Koliko porcija crvenog mesa ili mesnih prerađevina (šunka, kobasice...) jedete dnevno (porcija = 100-150 g) ?

57. Koliko porcija maslaca, margarina ili vrhnja jedete dnevno (porcija = 12 g) ?

58. Koliko zaslađenih ili gaziranih napitaka pijete dnevno?

59. Koliko čaša vina pijete tjedno?

60. Koliko porcija mahunarki jedete tjedno (porcija = 150g) ? *

61. Koliko porcija ribe ili školjkaša jedete tjedno (riba porcija = 100-150g, školjkaši porcija = 200g) ? *

62. Koliko kupovnih slatkiša ili kolača jedete tjedno? *

63. Koliko porcija orašastih plodova (uključujući kikiriki) jedete tjedno (porcija = 30g) ? *

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

Mark only one oval.

Da

Ne

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

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis