

Identifikacija ključnih mikrobnih vrsta u mikrobioti hrvatske populacije

Krnet, Bruna

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:687825>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, ožujak 2023.

Bruna Krneta

**IDENTIFIKACIJA KLJUČNIH
MIKROBNIH VRSTA U
MIKROBIOTI HRVATSKE
POPULACIJE**

Rad je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Antonia Starčevića (Prehrambeno-biotehnološki fakultet)
u Institutu za antropologiju, uz pomoć izv. prof. dr. sc. Jurice Žučka i dr. sc. Damira Orosa.

Ovaj rad je napravljen u sklopu HRZZ projekta IP-06-2016-3509 Istraživanje ravnoteže mikrobioma debelog crijeva - MicroEquilibrium, voditelja prof. dr. sc. Antonio Starčević.



TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

IDENTIFIKACIJA KLJUČNIH MIKROBNIH VRSTA U MIKROBIOTI HRVATSKE POPULACIJE

Bruna Krneta, univ. bacc. nutr. 0058211767

Sažetak: Gastrointestinalna mikrobiota odraz je genetike, načina života i prehrane te je u neposrednoj vezi sa zdravljem pojedinca. Njena uloga u homeostazi organizma je esencijalna te je kao takva predmet sve češćih istraživanja sastava mikrobiote. Hrvatska prati trend urbanizacije, promjene načina života i prehrane koja sve više nalikuje zapadnjačkoj, a rezultat toga je visoka pojavnost pretilosti i kroničnih nezaraznih bolesti. Cilj ovog rada bio je odrediti raznolikost te taksonomski sastav crijevne mikrobiote 59 ispitanika metagenomskom analizom fecesa. Primjenjene su molekularno-genetičke metode lančana reakcija polimerazom i amplikon sekvenciranje, a rezultati su analizirani bioinformatičkom platformom. Širok raspon vrijednosti alfa raznolikosti te visoka razina beta raznolikosti potvrdile su značajne interpersonalne varijacije raznolikosti sastava. Biomarker pretilosti - povećan omjer koljena *Firmicutes* naspram *Bacteroidota* prisutan je u > 22 % ispitanika. Dominantni rodovi odraz su prehrane s prekomjernim unosom ugljikohidrata, animalnih proteina i zasićenih masti. U ispitanika narušenog zdravlja utvrđene su promjene zastupljenosti određenih bakterijskih rodova.

Ključne riječi: *gastrointestinalna mikrobiota, metagenom, amplikon sekvenciranje, bioinformatička platforma*

Rad sadrži: 60 stranica, 12 slika, 1 tablicu, 136 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Antonio Starčević

Pomoć pri izradi: izv. prof. dr. sc. Jurica Žučko, dr. sc. Damir Oros

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Blaženka Kos (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Antonio Starčević (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Jurica Žučko (član)
4. prof. dr. sc. Jasna Novak (zamjenski član)

Datum obrane: 7. travnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

IDENTIFICATION OF CORE MICROBIAL SPECIES FROM CROATIAN POPULATION'S MICROBIOTA

Bruna Krneta, univ. bacc. nutr. 0058211767

Abstract: Gastrointestinal microbiota is affected by genetics, lifestyle and diet, and is correlated with health. Its role in organisms' homeostasis is essential so microbiota has become a common research topic lately. Croatia follows a trend of urbanization, lifestyle and dietary changes belonging to a western culture dietary patterns that results with high occurrence of obesity and chronic diseases. The aim of this work was to determine diversity and taxonomy composition of microbiota of 59 individuals by feces metagenomic analysis. Methods including polymerase chain reaction and amplicon sequencing were applied and the obtained results were analyzed. Wide range of alpha diversity values and high beta diversity confirmed significant interpersonal variations of compositional diversity. The biomarker of obesity – high *Firmicutes* to *Bacteroidota* ratio was detected in > 22 % of participants. Key bacterial genera reflect the diet that includes high intake of carbohydrates, animal proteins and saturated fats. Relative abundances of specific genera are correlated in microbiota of unhealthy individuals.

Keywords: *gastrointestinal microbiota, metagenomic, amplicon sequencing, bioinformatic platform*

Thesis contains: 60 pages, 12 figures, 1 table, 136 references, 0 supplements

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: Antonio Starčević, PhD, Full professor

Technical support and assistance: Jurica Žučko, PhD, Associate professor; Damir Oros, PhD

Reviewers:

1. Blaženka Kos, PhD, Full professor (president)
2. Antonio Starčević, PhD, Full professor (mentor)
3. Jurica Žučko, PhD, Associate professor (member)
4. Jasna Novak, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: April 7th, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Gastrointestinalna mikrobiota i funkcija	3
2.1.1. Mikrobiom, mikrobiomika	6
2.1.2. Razvoj humane mikrobiote i čimbenici koji utječu na njen sastav	6
2.1.3. Dominantne bakterije humane gastrointestinalne mikrobiote	9
2.1.4. Povezanost sastava mikrobiote sa zdravstvenim statusom domaćina	11
2.1.5. Terapijski pristup gastrointestinalnoj mikrobioti	13
2.2. Analiza gastrointestinalne mikrobiote	14
2.2.1. Uzorkovanje i pohrana	15
2.2.2. Izolacija genetskog materijala	15
2.2.3. Priprema DNA knjižnice i sekvenciranje	16
2.2.4. Mjerenje mikrobne raznolikosti	19
2.2.5. Bioinformatička analiza.....	19
3. EKSPERIMENTALNI DIO	21
3.1. Materijali	21
3.2. Metode.....	23
3.2.1. Prikupljanje i skladištenje fekalnih uzoraka.....	23
3.2.2. Izolacija DNA.....	23
3.2.3. Priprema DNA knjižnice i sekvenciranje 16S rRNA gena	23
3.2.4. Bioinformatička obrada podataka programskim paketom QIIME 2	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. Alfa raznolikost	27
4.2. Beta raznolikost.....	33
4.3. Taksonomski sastav.....	35
5. ZAKLJUČAK	45
6. LITERATURA	46

1. UVOD

Gastrointestinalni sustav čovjeka velika je i aktivna površina koja posreduje interakcije domaćina, okoline te brojnih mikroorganizama koji ga koloniziraju. Gastrointestinalna mikrobiota obuhvaća sve žive organizme koji koloniziraju gastrointestinalni sustav, uključujući bakterije, arheje, protozoe, viruse, gljive i druge eukariote. Dugi se niz godina fokus istraživanja usmjeravao isključivo na bakterije zbog njihove najveće zastupljenosti. Sama mikrobiota kompleksno je sastavljena uglavnom od anaerobnih, nepatogenih bakterija koje sudjeluju u razvoju, vitalnim fiziološkim i imunosnim procesima, probavi i metabolizmu domaćina te prevenciji bolesti i obrani od patogena. Važan utjecaj na mikrobiotu pojedinca imaju način života i prehrana. Raznolikost gastrointestinalne mikrobiote potencijalni je biomarker - pokazatelj kakvoće dugoročne prehrane koja je usko povezana s razvojem bolesti. Eubioza označava ravnotežu ekosustava gastrointestinalne mikrobiote. Promjene u sastavu i zastupljenosti određenih mikrobnih populacija koje dovode do zdravstvenih problema nazivamo disbiozom te su usko povezane s različitim zdravstvenim stanjima i bolestima što gastrointestinalnu mikrobiotu čini potencijalnom metom budućih istraživanja, prevencije, dijagnostike i liječenja. Mikrobiom jest naziv za ukupan genetski materijal prisutnih mikroorganizama. Mikrobiomika je kao novo istraživačko polje metagenomike posljednjih deset godina napredovala razvojem tehnologije sekvenciranja i bioinformatike te omogućila interdisciplinarni pristup i detaljnije spoznaje o mikrobioti. Stjecanje uvida u sastav mikrobiote temelji se na analizi DNA molekula, odnosno metodama sekvenciranja sljedeće generacije. Glavni načini istraživanja mikrobioma su amplikon sekvenciranje marker gena te sekvenciranje cjelovitih genoma. Rezultate ovih molekularnih analiza potrebno je bioinformatički obraditi i interpretirati.

U Hrvatskoj kronične nezarazne bolesti predstavljaju velik javnozdravstveni problem te su vodeći uzrok smrtnosti. Uzrok tome su sjedilački i stresan način života, nedovoljna tjelesna aktivnost i neuravnotežena prehrana koja se odlikuje čestom konzumacijom brze hrane, hrane uzgojene na „umjetan“ način, odnosno visokoprocisirane hrane. Ukupan energetska unos i unos proteina i masti veći su od preporučenih. Namirnice životinjskog porijekla visoko su zastupljene u prehrani Hrvata, posebice meso i mesni proizvodi. Hrana je nerijetko visokokalorična, bogata mastima (unos zasićenih masnih kiselina veći je od preporučenog) i šećerima. U hrvatskoj je populaciji velik postotak ljudi prekomjerne tjelesne mase i pretilih ljudi predisponiranih za razvoj kroničnih nezaraznih bolesti. Također, velik je broj pušača i ljudi koji konzumiraju alkoholna pića.

Cilj ovog rada bio je istražiti raznolikost i taksonomski sastav crijevne mikrobiote reprezentativnog dijela urbane hrvatske populacije, odrediti ključne mikroorganizme na nižim taksonomskim razinama, ukoliko je moguće, te ih povezati s načinom života i prehrane u Hrvatskoj. To su omogućile odabrane molekularne metode analize te bioinformatička obrada QIIME 2 računalnom platformom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. GASTROINTESTINALNA MIKROBIOTA I FUNKCIJA

Mikrobiota je taksonomski sastav mikroorganizama na određenom području uzorkovanja (Tseng i Wu, 2019). Glavna mjesta kolonizacije mikroorganizama na i u ljudskom tijelu su usna šupljina, koža, pluća, gastrointestinalno (GI) te vaginalno područje žena (The Human Microbiome Project Consortium, 2012). GI mikrobiotu sisavaca čini složena zajednica mikroorganizama koji koloniziraju probavni sustav domaćina, što ga čini dinamičnim i simbiotskim organizmom. Taj raznoliki ekosustav najbogatiji je u ljudskom organizmu te ga čini više od tisuću milijardi (10^{12}) bakterija, arheja, protozoa, virusa, gljiva i drugih eukariotskih organizama od kojih je većina nepatogenih (Barko i sur., 2018). Zastupljenošću prevladavaju bakterije među kojima razlikujemo oko 100 različitih vrsta (Loftus i sur., 2021). Većina se nalazi u debelom crijevu čovjeka (oko 10^{12} stanica) obzirom da su želudac, čija je pH vrijednost vrlo niska, i tanko crijevo, u koje se izlučuju sokovi gušterače, nepovoljna sredina za rast mikroorganizama. Također, peristaltika crijeva ograničava stabilnu kolonizaciju (Bull i Plummer, 2014).

Mješovita bakterijska zajednica esencijalna je za homeostazu i normalno funkcioniranje organizma. Mikroorganizmi GI sustava žive u lumenu crijeva, gdje pomažu primarni i sekundarni metabolizam te na površini crijevne sluznice, gdje ostvaruju interakcije sa stanicama domaćinovog imunskog sustava (Durack i Lynch, 2018). U ljudi su za nastajanje simbiotske zajednice između mikrobiote i sluznice crijeva zaslužne složene interakcije bakterijskih i domaćinskih imunoloških signalnih puteva koji omogućuju uzajamnu toleranciju i koegzistenciju. Interakcije domaćin-stanica-mikroorganizam vrlo su kompleksne te ovise o samom tipu stanice. Na primjer, mikrobiom u kriptama tankog crijeva regulira proliferaciju enterocita putem regulacije replikacije DNA i ekspresije gena, dok mikrobiom koji kolonizira područje vila regulira ekspresiju gena povezanih s metaboličkim i imunološkim funkcijama (Olszak i sur., 2012). S druge strane, domaćinove stanice utječu na mikrobiotu tako što enterociti i Panethove stanice luče sluz i antibakterijske tvari (Pelaseyed i sur., 2014). Pomoću malih, difuzibilnih *quorum sensing* molekula koje luče, mikrobne stanice komuniciraju međusobno, ali i s domaćinom. Također, stanice mikroorganizama proizvode i kompleksnije molekule poput makrolida i poliketida, od kojih mnoge imaju antimikrobni potencijal i/ili imunomodulatornu aktivnost (Donia i Fischbach, 2015).

Brojne studije provedene na čovjeku, ali i drugim sisavcima potvrđuju sudjelovanje i utjecaj mikrobioma na brojne fiziološke procese u organizmu poput probavljanja hrane, metabolizma ugljikohidrata i aminokiselina, homeostaze energije, sinteze aminokiselina, vitamina i drugih nutrijenata, endokrinog signaliziranja, prevencije enteropatogene kolonizacije, metabolizma ksenobiotika, statusa probavnog epitela te njegove proliferacije, imunološke aktivnosti te neurološkog razvoja (Barko i sur., 2018). Mikrobiota sudjeluje u biotransformacijama kojima tvari iz hrane postaju bioaktivne. Također, zaslužna je i za konverziju inaktivnih terapeutika (engl. *prodrugs*) u njihove aktivne oblike (Carmody i Turnbaugh, 2014; Sousa i sur., 2008; Peppercorn i Goldman, 1972).

Kako bi usmjerila određene aktivnosti crijevne sluznice i crijevnog živčanog sustava, mikrobiota sintetizira brojne kemijske medijatore koji će putem krvotoka ostvariti komunikaciju s organima poput mozga, srca i jetre (Evans i sur., 2013). Istraživanjem na miševima dokazano je da mikrobiom ostvaruje interakciju s oko 10 % metaboličkih puteva domaćina te da su brojni metaboliti plazme upravo mikrobnog porijekla (Wikoff i sur., 2009). Među identificiranim metaboličkim putevima mikrobnog porijekla nalaze se oni uključeni u katabolizam složenih ugljikohidrata kojim nastaju kratkolančane masne kiseline (engl. *short chain fatty acids*, SCFA) te anti-upalni i anti-proliferativni lipidi koji su esencijalni izvor energije epitelnim stanicama gastrointestinalnog sustava (Kelly i sur., 2015). S druge strane, bakterijskom fermentacijom aminokiselina i proteina, koja se odvija u distalnom dijelu debelog crijeva, nastaju produkti od kojih mnogi imaju toksični potencijal: hidrogen sulfid, masne kiseline razgranatog lanca, fenol, indol, p-krezol, indoksilsulfat, p-krezilsulfat i amonijak (Portune i sur., 2016; Verbeke i sur., 2015; Nyangale i sur., 2012). Mnogim produktima mikrobnog metabolizma još uvijek nije jasno definirana funkcija (Guo i sur., 2017; Donia i Fischbach, 2015).

Osim što doprinosi sistemskom metabolizmu, mikrobiota utječe i na razvoj te održavanje imunskog sustava domaćina (Durack i Lynch, 2018). Važna uloga GI mikrobiote je metabolička proizvodnja SCFA mikrobnom fermentacijom složenih ugljikohidrata, prehrambenih vlakana u debelom crijevu putem uzajamnog prihranjivanja (engl. *cross-feeding*) te transporta nutrijenata između stanica (Sarbini i Rastall, 2011). Bakterije koje razgrađuju prehrambena vlakna uključuju *Ruminococcus callidus*, *Ruminococcus albus*, *Blautia obeum* te *Prevotella* spp. Takvom razgradnjom nastaju oligo- i poli- saharidi koji su supstrati butirat-producirajućim vrstama poput *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*, *Roseburia* spp, *Eubacterium hallii* te *Anaerostipes* spp (Flint i sur., 2012). Također, u glavne bakterijske

rodove proizvođače SCFA ubrajamo: *Xylanibacter*, *Prevotella*, *Butyrivibrio* i *Treponema* (Flint i sur., 2008). Upravo su SCFA: acetat, propionat i butirir esencijalni i izravni izvor energije kolonocitima te održavaju epitelnu barijeru i međustanične veze, pomažu regulaciju crijevne peristaltike te potiču proizvodnju mucina i anti-upalnih tvari (Barko i sur., 2018). SCFA su i signalne molekule koje se vežu na receptore različitih stanica (crijevne epitelne stanice, makrofagi, dendritičke stanice i mastociti). Na taj način SCFA sudjeluju u održavanju homeostaze glukoze i energije, regulaciji imunskog odgovora i upale, regulaciji hormona s ulogom u kontroli apetita, supresije tumora (butirat), regulaciji centralnog i perifernog živčanog sustava (Bienenstock i sur., 2015; Cox i Blaser, 2013; Kim i sur., 2013; Flint i sur., 2012; Hamer i sur., 2008). SCFA također snižavaju intestinalnu pH vrijednost te time dodatno otežavaju kolonizaciju patogena (Barko i sur., 2018).

GI mikrobiota različitim putevima ostvaruje dvosmjernu komunikaciju sa središnjim živčanim sustavom (SŽS) domaćina putem vagusnog živca, veze hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda, sinteze neurotransmitera ili njihovih prekursora te putem hormona i bakterijskih metabolita (npr. SCFA) (Scheperjans, 2016). GI mikrobiota ostvaruje i indirektnu kemijsku komunikaciju s mozgom, utječe na njegovu neurokemiju i psihološke procese poput emocija, raspoloženja, ponašanja, percepcije, odgovora na stres, anksioznosti, refleksa, osjeta boli. Komunikacijska os mikrobiom-crijeva-mozak vrlo je važna za pravilan neurološki razvoj i funkciju (Mohajeri i sur., 2018). Pretkliničke studije o odgovoru na stres proučavaju djelovanje SŽS na GI mikrobiom. U primata pre- i postnatalni stres utječu na sastav mikrobiote (Bailey i sur., 2004). Mehanizmi kojima mikrobiota utječe na mozak sve su češći predmet istraživanja. U krvotoku cirkulirajuće SCFA utječu na integritet zaštitne barijere krv-mozak putem povećane proizvodnje proteina tijesnog spoja i okludina. Tako povećan integritet onemogućava ulazak nepoželjnih metabolita u moždano tkivo. Također, brojni mikrobn metaboliti utječu na neuroimunološku funkciju poticanjem oslobađanja citokina iz stanica kao što su dendritičke stanice, neutrofili i makrofazi. Takvi citokini prolaze spomenutu barijeru te mogu aktivirati određene neurološke funkcije (Sampson i Mazmanian, 2015).

Urođeni i stečeni imunološki sustav zajednički djeluju u prevenciji kolonizacije patogena kojima je gastrointestinalni sustav izložen kroz konstantni unos stranih mikroorganizama i antigena putem hrane. Zdrava mikrobiota prva je unutarnja linija obrane protiv patogena i toksina te u sinergiji s imunskim sustavom domaćina štiti cijeli organizam. Proizvodnjom antimikrobnih i zaštitnih tvari poput bakteriocina i/ili butirata te kompeticijom za vezna mjesta crijevnog epitela, kao i za nutrijente, mikrobiota štiti domaćinov organizam od patogena (Bull

i Plummer, 2014). Izloženost različitim bakterijama u djetinjstvu potiče imunosti sustav domaćina na razvoj specifičnih i poželjnih imunosti odgovora. Drugim riječima, smanjena mikrobnost raznolikost i manja izloženost mikroorganizmima iz okoliša tijekom djetinjstva može podržati razvoj imunosti sustava koji pretjerano reagira na antigene, odnosno koji je predisponiraniji za razvoj autoimunosti bolesti i alergija (Björkstén i sur., 2001).

2.1.1. Mikrobiom, mikrobiomika

Ukupan genetski materijal mikroorganizama koji žive u, ali i na domaćinu, te njihove genske produkte nazivamo mikrobiomom (Barko i sur., 2018). Mikrobiom je skup taksonomskih, genomskih informacija te drugih abiotičkih čimbenika mikrobnosti zajednice. U zdravih je sisavaca mikrobiota ko-evoluirala u simbiozi s domaćinom, pri čemu mikrobiom kodira mnoštvo funkcionalnih gena. Neke procjene upućuju na oko 100 puta više kodirajućih gena u usporedbi s ljudskim genomom (Qin i sur., 2010). Smatra se da GI sustav sisavaca ne koloniziraju specifični potpuno samostalni mikroorganizmi već oni s međusobno preklapajućim metaboličkim funkcijama te da je srž mikrobioma definirana relativno konstantnom genskom zalihom (engl. *gene pool*) unatoč varijacijama u sastavu mikrobiote (Barko i sur., 2018). Mikrobiomika je novonastajuće istraživačko polje usmjereno na proučavanje zajednica mikroorganizama u različitim ekosustavima, uključujući složene višestanične organizme. Mikrobiomika određuje taksonomski sastav mikroorganizama, analizira pripadne genome, karakterizira interakcije s domaćinom te određuje utjecaj mikrobioma na patologiju bolesti (Barko i sur., 2018).

2.1.2. Razvoj humane mikrobiote i čimbenici koji utječu na njen sastav

Dugo uvriježenu tvrdnju da se sisavci rađaju sterilni, odnosno da se prva inokulacija GI sustava novorođenčeta zbiva pri samom rođenju kada će crijeva novorođenčeta kolonizirati mikroorganizmi prilikom kontakta s majkom, ali i okolinom (Salazar i sur., 2014), suzbijaju studije koje dokazuju postojanje mikroorganizama još u posteljici, amniotskoj tekućini, pupčanoj vrpci i mekoniju te govore o vertikalnom prijenosu mikroorganizama s majke na plod prije samog poroda (Aagard i sur., 2014; DiGiulio, 2012; Jiménez i sur., 2005). Sastav GI mikrobiote novorođenčadi također ovisi i o načinu poroda. U novorođenčadi rođenoj prirodno putem većim su dijelom prisutne bakterije rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* koje prirodno koloniziraju i štite ženski porođajni kanal. S druge strane, u novorođenčadi rođenoj carskim rezom prevladavaju zajednice bakterija prisutnih na ljudskoj koži, dominantno roda *Staphylococcus* i *Acinetobacter* (Collado i sur., 2015; Huurre i sur., 2008). Potonja se

mikrobiota smatra manje poželjnom budući da određena istraživanja dokazuju da su djeca rođena carskim rezom podložnija razvoju astme, alergija, dijabetesa te celijakije (Neu i Rushing, 2011). Još jedno istraživanje otkriva da je epitel crijeva novorođenčadi selektivan prema mikroorganizmima. Naime, GI mikrobiota novorođenčeta sličnija je majčinoj iz prvog tromjesečja trudnoće nego onoj iz posljednjeg koja je manje raznolika te ujedno i povezana sa sistemskim metaboličkim upalnim stanjima (Koren i sur., 2012). Ekspresijom primarno stečenog mikrobioma sintetizirani će se enzimi koji će katalizirati reakcije metabolizma šećera iz majčinog mlijeka, kao i sintezu folata (Yatsuneneko i sur., 2012; Kurokawa i sur., 2007). Probavni trakt prvo koloniziraju aerobni mikroorganizmi poput enterobakterija, stafilokoka i streptokoka, od kojih mnogi imaju patogeni potencijal (Pop, 2012). Probavni mikrookoliš počinje se mijenjati kroz nekoliko dana kada slijedi kolonizacija anaeroba, kada rod *Bifidobacterium* postaje dominantan, i takav ostaje za prvih nekoliko mjeseci života (Bezirtzoglou, 1997). Nakon uspostavljanja ove prve mikrobiote koja se odlikuje niskim koncentracijama i relativno je siromašna mikroorganizmima, te koja je direktna posljedica majčine mikrobiote, na njen daljnji razvoj utjecat će razni čimbenici: spol (Fujimura i sur., 2016), prelazak na krutu hranu te stjecanje prehrambenih navika, ali i sredina odrastanja. Mikrobiota djece odrasle u ruralnim područjima bitno se razlikuje od mikrobiote djece urbanih sredina. Ruralni okoliš povezan je s većom relativnom zastupljenošću različitih bakterijskih rodova i/ili vrsta čija prisutnost pozitivno korelira s boljim zdravljem: *Prevotella copri*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Rothia mucilaginosa* te rodovi *Bifidobacterium* i *Mitsuokella*. Mikrobiota djece urbanih područja pokazala je manju zastupljenost bakterijskih rodova *Bacteroides*, *Alistipes* i *Bilophila* (Gacesa i sur., 2022). Prelaskom na krutu hranu organizmu će biti potrebni brojni novi enzimi koji kataliziraju reakcije metabolizma složenih nutrijenata i ksenobiotika te sintezu vitamina. Mnoge od tih enzima omogućit će upravo ekspresija postojećeg mikrobioma (Barko i sur., 2018). Uvođenjem krute hrane sastav mikrobiote sve više počinje nalikovati onom u odraslih osoba te zastupljenošću dominiraju bakterijska koljena *Firmicutes* i *Bacteroidota* (Bezirtzoglou, 1997).

Zrela mikrobiota uspostavlja se između prve i treće godine života te ostaje relativno stabilna (Schloss i Handelsman, 2004) kroz niz godina. Kompleksnost GI mikrobiote (broj zastupljenih taksonomskih razina i funkcionalnih gena) na razini odraslog organizma obično se doseže u doba preadolescencije (7-12 godina starosti). Zastupljenost bakterijskog roda *Bacteroides* tada je manja, a roda *Bifidobacterium* veća nego u odraslih (Hollister i sur., 2015). U daljnjem razvoju i narednim fazama života prisutne su velike interpersonalne varijacije u sastavu i

funkciji mikrobiote ovisno o geografskom području i kulturi, te prehrani, zdravstvenom stanju, uporabi lijekova i izloženosti stresu (Yatsunenکو i sur., 2012). Također, poznat je i važan utjecaj genetike na strukturu i raznolikost GI mikrobiote pojedinca (The Human Microbiome Project Consortium, 2012).

Mikrobiotu odraslih osoba odlikuje veća raznolikost i dugoročna stabilnost sastava i strukture (Lozupone i sur., 2012). U odraslih ljudi je 60 - 70% mikrobiote stabilno uz određene varijacije stabilnosti sastava među različitim bakterijskim koljenima (Faith i sur., 2012). Upravo otpornost ka promjenama tijekom patoloških i neuobičajenih metaboličkih stanja organizma mikrobiotu čini metom za prevenciju, dijagnosticiranje i liječenje bolesti (Barko i sur., 2018).

Tijekom trudnoće se u žena sastav GI mikrobiote znatno mijenja. Prvo tromjesečje obilježava veća relativna zastupljenost *Proteobacteria* i *Actinobacteria*, manja zastupljenost *Firmicutes* i *Bacteroidota* te manja ukupna raznolikost mikrobiote. Uzroci takvih promjena uglavnom su nejasni, ali smatra se da su one vrlo važne u održavanju imunskog statusa i hormonalnih promjena (Koren i sur., 2012; Wu i Wu, 2012).

U starijoj dobi mikrobiota postaje manje raznolika i stabilna (Odamaki i sur., 2016), što se povezuje sa slabljenjem fizioloških i imunskih funkcija organizma domaćina (Claesson i sur., 2012) te s povećanom smrtnošću (Ticinesi i sur., 2017). Zabilježen je pad zastupljenosti bakterijskih rodova *Bifidobacterium*, *Bacteroides* te *Clostridium* (Van Tongeren i sur., 2005). Nasuprot tome, veća se zastupljenost određenih bakterijskih rodova poput *Akkermansia* i *Bifidobacterium* povezuje s dugovječnošću (Biagi i sur., 2016).

The Dutch Microbiome Project (DMP) – istraživanje mikrobnog sastava, funkcije, antibiotske rezistencije te virulentnih faktora GI mikrobioma, uključilo je kohortu ispitanika sastavljenu od preko 8000 stanovnika Nizozemske europskog porijekla, koji pripadaju u više od 2000 obitelji. Uključene su sve tri generacije te oba spola. Karakterizacija individualnih mikrobiota povezana je s pojedinačnim fenotipovima. Zaključeno je da mikrobiotu primarno određuju vanjski čimbenici te mikrobiota ukućana (suživot). Tek 6,6 % bakterijskih taksonomskih skupina je nasljedivo (primjerice vrste *Akkermansia muciniphila*, *Bifidobacterium longum* i porodica *Bacteroidaceae*). U najmanje nasljedive bakterijske rodove ubrajamo *Ruminococcus*, *Streptococcus* i *Veillonella*. Mikrobiote pripadnika istih kućanstava međusobno su imale vrlo sličan bakterijski sastav, neovisno o krvnoj povezanosti. Ovu tvrdnju podupire i činjenica da se sastav mikrobiote blizanaca, koja je inače vrlo slična, počeo mijenjati tek kada su prestali

živjeti zajedno. Također, mikrobiota ljudi i njihovih kućnih ljubimaca dijeli brojne zajedničke karakteristike (Gacesa i sur., 2022).

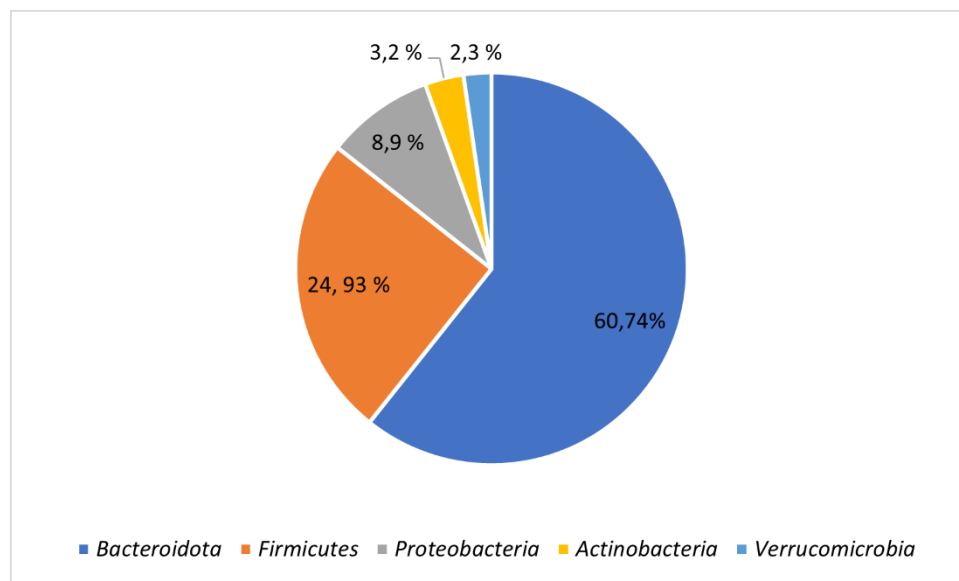
Prehrana značajno utječe na sastav GI mikrobiote, primarno unos prehrambenih vlakana. Mikrobiotu pojedinaca čija prehrana sadržava dovoljno prehrambenih vlakana odlikuje veća zastupljenost bakterija koje metaboliziraju takve supstrate što utječe na proizvodnju blagotvorne SCFA. Općenito, raznovrsna prehrana uglavnom je povezana s većom raznolikošću mikrobiote (Cresci i Bawden, 2015). Sastav mikrobiote podložen je i utjecaju prehrambenih aditiva te kontaminanata koje nalazimo u hrani poput teških metala, pesticida, organskih zagađivača, antibiotika te mikotoksina (Candela i sur., 2012).

Unos antibiotika dovodi do promjena u sastavu GI mikrobiote. Mikrobiota tada ima novu, dugoročnu i stabilnu kompoziciju koju uglavnom karakteriziraju manja raznolikost i koncentracija mikroorganizama (Barko i sur., 2018). Još neki od neželjenih posljedica uporabe antibiotika su i gubitak bakterijskih liganada koje domaćinov GI sustav prepoznaje, gubitak specifičnih bakterijskih signalnih molekula te promjene u koncentraciji produkata bakterijskog metabolizma kao što su SCFA (Topping i Clifton, 2001). Osim antibiotika, i drugi lijekovi mogu značajno narušiti raznolikost GI mikrobiote čime dovode do povećanja zastupljenosti potencijalnih patogena. Tu se posebno ističu inhibitori protonskih pumpi (Imhann i sur., 2016).

2.1.3. Dominantne bakterije humane gastrointestinalne mikrobiote

Duž i širom GI sustava, zajednice mikroorganizama koje koloniziraju različite slojeve sluznice se razlikuju obzirom na uvjete koji vladaju u mikrookolini. Ileum i debelo crijevo imunološki su znatno više aktivni te posjeduju veću raznolikost mikroorganizama nego početni dio tankog crijeva (Sommer i Backhed, 2015). Zrela i stabilna mikrobiota uglavnom je sastavljena od anaerobnih bakterija s više od 50 zastupljenih koljena i 1000 bakterijskih vrsta (Schloss i Handelsman, 2004). GI mikrobiotu svake osobe čini nekoliko stotina različitih bakterijskih vrsta (Leviatan i sur., 2022). Unatoč takvoj raznolikosti, većina pripada bakterijskim koljenima *Bacteroidota* i *Firmicutes*, koja čine više od 90 % bakterija GI mikrobiote. Subdominantna koljena uključuju *Proteobacteria*, *Actinobacteria* i *Verrucomicrobia* (Qin i sur., 2010). Gacesa i suradnici (2022) predstavljaju prosječne relativne zastupljenosti dominantnih bakterijskih koljena DMP kohorte (slika 1). *Human Gastrointestinal Bacteria Culture Collection* (HBC) sadrži cjelovite genome 273 vrste (od čega ih je 105 novootkriveno te prisutno u većini od ukupno 13 490 uzoraka) iz 31 bakterijske porodice detektirane u izolatima bakterijskih kultura fekalnih uzoraka humane GI mikrobiote,

sastavljene metagenomskim sekvenciranjem 16S rRNA gena metodom ampikon sekvenciranja. Identificirana su koljena: *Actinobacteria*, *Bacteroidota*, *Firmicutes* i *Proteobacteria*. Širok je raspon vrsta prisutan u svim koljenima. Najveća filogenetska raznolikost uočena je unutar koljena *Firmicutes* (razredi *Clostridia*, *Erysipelotrichia* i *Negativicutes*), dok je najviše dominantnih vrsta unutar koljena *Bacteroidota* (Forster i sur., 2019). DMP-om je identificirano 9 ključnih bakterijskih vrsta visoke prevalencije (> 95 %) koje visoko koreliraju s uzorcima iz ostatka Europe, ali i svijeta: *Subdoligranulum* sp., *Alistipes onderdonkii*, *A. putredinis*, *A. shahii*, *Bacteroides uniformis*, *B. vulgatus*, *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii* i *Oscillibacter* sp. Među nekim od nabrojanih rodova i vrsta uočena je značajna koegzistencija, npr. između glavnog proizvođača butirata, *F. prausnitzii*, čija je relativna zastupljenost smanjena u mnogih oboljelih od kroničnih bolesti, te vrsta rodova *Bacteroidota* i *Bifidobacterium*. Unatoč niskoj prevalenciji (< 10 %), smatra se da ključnim vrstama mikrobiote pripadaju i *Ruminococcus gnavus* te brojne patogene vrste roda *Clostridium* (Gacesa i sur., 2022). Posljednjih je godina sve više novo identificiranih vrsta bakterija koje čine humanu GI mikrobiotu. Istraživanje kojim je analizirano gotovo 12000 uzoraka na području Sjeverne Amerike i Europe predstavlja gotovo 2000 do sada nekultiviranih vrsta. Bakterijske porodice *Coriobacteriaceae*, *Rumicoccaceae*, *Peptostreptococcaceae* te rodovi *Collinsella*, *Clostridium* i *Prevotella* istaknuti su kao najzastupljeniji novootkriveni rodovi (Almeida i sur., 2019).



Slika 1. Prosječne relativne zastupljenosti bakterijskih koljena prisutnih u > 0,1 % DMP kohorte (prema Gacesa i sur., 2022)

2.1.4. Povezanost sastava mikrobiote sa zdravstvenim statusom domaćina

Bez obzira na taksonomsku jedinstvenost mikrobiote te njenu heterogenost među zdravim pojedincima, funkcijske karakteristike bivaju relativno konstantnima u populacijama zdravih odraslih ljudi, a metabolički putevi ostaju stabilni (The Human Microbiome Project Consortium, 2012). Promjene u sastavu mikrobiote ponekad su prisutne i puno prije razvoja bolesti, a prisustvo određenih molekularnih biomarkera omogućava procjenu postojećeg rizika te ranu prevenciju bolesti (Durack i Lynch, 2018). Iako ne postoji jedinstvena definicija zdrave GI mikrobiote, važno je da ista ima visoki stupanj raznolikosti poželjnih mikroorganizama, stabilnosti, otpornosti na promjene povezane sa stresom (antibiotici, infekcije, imunosupresija) te redundancije metaboličkih puteva (Bäckhed i sur., 2012). Kod određenih GI i sistemskih zdravstvenih stanja, bolesti poput upalne bolesti crijeva, astme, pretilosti, metaboličkog sindroma, kardiovaskularnih i jetrenih bolesti, nekih tumora, imunološki posredovanih te neuroloških stanja, uočen je promijenjen sastav GI mikrobiote. Takvu pojavu neravnoteže sastava GI mikrobiote nazivamo disbiozom i najčešće je okarakterizirana smanjenom mikrobnom raznolikošću, upalnim promjenama na razini crijeva, ali i cijelog organizma te promijenjenim metaboličkim odnosom mikrobiote i domaćina. Ovisno o uzroku i trajanju, disbioza može biti privremena ili trajna. Iako nije sasvim jasno sudjeluje li mikrobiota direktno, sve više istraživanja upućuje na važnu ulogu složenih interakcija metabolizma te imunskih sustava mikrobiote i domaćina u patogenezi (Sidhu i van der Poorten, 2017). Obilježja disbioze variraju ovisno o samom domaćinu, patološkom stanju, smanjenju relativne zastupljenosti obligatnih anaerobnih bakterija te povećanju relativne zastupljenosti fakultativno anaerobnih kao što su patogene bakterije *E. coli*, *Salmonella*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Shigella* (Walker i Lawley, 2013). S druge strane, disbioza ne znači uvijek kolonizaciju patogenima. Odsustvo pojedinih komenzalnih mikroorganizama može također biti vrlo štetno (Barko i sur., 2018).

Upalna bolest crijeva (engl. *inflammatory bowel disease*, IBD) naziv je za različita stanja u koja ubajamo i Chronovu bolest (engl. *Chron's disease*, CD) te ulcerozni kolitis (engl. *ulcerative colitis*, UC). Ova stanja okarakterizirana su smanjenom raznolikošću mikrobiote s varijacijama u zastupljenosti pojedinih bakterijskih rodova i vrsta (Mar i sur., 2016; Gevers i sur., 2014). Uočena je povećana zastupljenost bakterijske porodice *Enterobacteriaceae* (Gevers i sur., 2014) te smanjena zastupljenost simbiotske bakterije *Faecalibacterium prausnitzii* (Sokol i sur., 2008). U supernatantu kulture *F. prausnitzii* identificirana je bioaktivna anti-upalna molekula (Quévrain i sur., 2016). U fecesu pacijenata s UC detektirani su mikrobnih produkti za koje je dokazano da potiču upalu. Kod pacijenata najteže kliničke

slike, utvrđene su povećane zastupljenosti *Bacteroides* i *Candida* (Mar i sur., 2016). Dokazana je zaštitna uloga bakterijskog roda *Lactobacillus* u oboljelih od UC (Lamas i sur., 2016).

Pretilost, jedan od glavnih problema humane medicine danas, te dijabetes melitus tip 2 (T2DM) kao i metabolički sindrom pokazuju jaku etiološku povezanost s određenim oblicima GI disbioze (Yong, 2017). Ovisnost sastava GI mikrobiote i indeksa tjelesne mase također je dokazana (Aguirre i sur., 2014). Lipopolisaharid (LPS) koji se nalazi u staničnoj stijenci Gram-negativnih bakterija pozitivno korelira s većim unosom energije te je u povišenoj koncentraciji zastupljen u pacijenata oboljelih od T2DM. Prehrana s visokim udjelom masti uzrokuje smanjenje relativne zastupljenosti roda *Bifidobacteria*, povećanje crijevne propusnosti te povišene koncentracije LPS u krvnoj plazmi. Probiotička suplementacija koja sadrži *Bifidobacteria* probiotike smanjuje razinu LPS, poboljšava toleranciju glukoze te smiruje upalne procese. Također, u pretilih je osoba disbioza opisana kao povećan omjer *Firmicutes* naspram *Bacteroidota* relativnih zastupljenosti, predlažući isti kao potencijalni biomarker u dijagnostici (Magne i sur., 2020). S druge strane, u pretilih je ljudi utvrđena manja relativna zastupljenost mucin-degradirajuće bakterije *Akkermansia muciniphila* (koljeno *Verrucomicrobia*), povezane sa stabilizacijom funkcije crijevne barijere, sekrecijom antibakterijskih peptida i kontrolom upale (Dao i sur., 2016; Everard i sur., 2013). Omjer zastupljenosti *Firmicutes* naspram *Bacteroidota* nerijetko ovisi i o analitičkim metodama (način pohrane uzoraka, metoda izolacije DNA, izbor početnica za umnažanje specifičnih sekvenci, metoda sekvenciranja, bioinformatička analiza – odabir taksonomske baze podataka ili algoritama u određivanju taksonomije) korištenim pri određivanju sastava mikrobiote pa je upitna robusnost potencijalnog biomarkera GI disbioze povezane s pretilošću. Također, različiti omjeri zastupljenosti dvaju bakterijskih koljena mogu biti posljedica različitih načina života i prehrane pojedinaca (Magne i sur., 2020).

Mikrobiota ima važnu ulogu u komunikaciji i signaliziranju između gastrointestinalnog sustava i živčanog sustava (Fung i sur., 2017). Određeni se poremećaji u ponašanju povezuju sa stanjem disbioze. U djece s dijagnosticiranim poremećajima autističnog spektra (ASD) dokazana je smanjena raznolikost sastava mikrobiote (Finegold i sur., 2010), no veća zastupljenost rodova *Collinsella*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus* te fungalnog patobionta roda *Candida* (Strati i sur., 2017).

DMP donosi popis bakterijskih rodova čija je povećana zastupljenost uočena u većine bolesti: *Anaerotruncus*, *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Holdemania*, *Flavonifractor*, *Eggerthella* te

Clostridium vrste. Također, uočena je manja zastupljenost sljedećih rodova: *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium*, *Butyrivibrio*, *Subdoligranulum*, *Oxalobacter*, *Eubacterium* i *Roseburia* (Gacesa i sur., 2022).

2.1.5. Terapijski pristup gastrointestinalnoj mikrobioti

Terapije koje se provode radi postizanja eubioze GI mikrobiote uglavnom se odnose na promjene u prehrani te suplementaciju prebioticima i probioticima te uporabu antibiotika, a u literaturi sve popularnijom postaje i fekalna transplantacija mikrobiote.

Prebiotici u prehrani definirani su kao mikroorganizmima selektivno fermentirane tvari iz hrane koje uzrokuju specifične promjene u sastavu i/ili aktivnosti GI mikrobiote te na taj način pridonose zdravlju organizma domaćina (Gibson i sur., 2011). Glavim prebioticima smatramo polisaharide biljnog porijekla, a kao produkt mikrobnog metabolizma nastaju SCFA. Time je ujedno potaknuto i razmnožavanje poželjne mikrobiote (Barko i sur., 2018). Nekoliko studija bilježi modulaciju sastava crijevne mikrobiote nakon tretmana inulinom ili sličnim fruktanima. Značajno se povećala prevalencija *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bifidobacterium adolescentis* te *B. bifidum* (Ramirez-Farias i sur., 2009).

Probiotici su od strane Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) definirani kao pripravci živih organizama (bakterija ili kvasaca) koji, iako ne koloniziraju GI sustav trajno, u domaćina uzrokuju niz povoljnih učinaka ukoliko su prisutni u dovoljnim koncentracijama. Oni smanjuju intestinalnu propusnost, pojačavaju sekreciju mucina, defenzina i imunoglobulina A (IgA), proizvode SCFA, snižavaju intestinalni pH te pojačavaju i usmjeravaju imunosni odgovor domaćina. *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* najčešće su korišteni probiotički organizmi. Slijede ih *Bacillus*, *Streptococcus* te kvasac *Saccharomyces boulardii* (Barko i sur., 2018). Mnogobrojna istraživanja usmjerena su na zdravstvene učinke liofiliziranih mješovitih probiotičkih kultura budući da pojedine analize transkriptoma u ljudi dokazuju da svaka vrsta potiče ekspresiju različitih gena u metaboličkim mrežama uključenim u glavne bazalne puteve mukoze tankog crijeva, nalik onima induciranim bioaktivnim molekulama i lijekovima (van Baarlen i sur., 2011).

Za razliku od probiotika, čija je primjena indicirana smanjenom zastupljenošću poželjnih bakterijskih vrsta, povećana zastupljenost patogenih bakterija zahtijeva antimikrobnu terapiju tj. uporabu antibiotika. Dugoročna primjena antimikrobnih lijekova kao terapije kroničnih oboljenja nije poželjna te predstavlja mogućnost razvoja antimikrobne rezistencije. Ipak,

smatra se poželjnom u početnoj fazi liječenja budući da će usporiti razmnožavanje patogena i ometati njihov životni ciklus te na taj način pripremiti GI mikrobiotu za suplementaciju probioticima ili fekalnu mikrobnu transplantaciju (Durack i Lynch, 2018).

Fekalna mikrobna transplantacija (engl. *fecal microbiome transplantation*, FMT) podrazumijeva više mogućih puteva prijenosa mikrobiote zdravog donora u intestinalni sustav pacijenta primatelja. Još uvijek je nejasno proizlaze li pozitivni učinci primjene FMT iz prijenosa isključivo održivih komenzalnih mikroorganizama ili do njih dolazi uz dodatak virusa, proteina, žučnih kiselina, vitamina, SCFA i mnoštva drugih tvari; također postoji mogućnost da su ti učinci rezultat sinergije svega navedenog (Barko i sur., 2018). Dugoročni učinci FMT nisu poznati te je moguć razvoj kroničnih bolesti povezanih s promjenama sastava mikrobiote ili prijenosom nepoznatih patogena iz donorskog uzorka (Choi i Cho, 2016). FMT zahtijeva selekciju zdravih donora testiranjem uzoraka krvi i fecesa na patogene, pripremu njihovih fekalnih uzoraka i odabir metoda transplantacije te se i dalje ne preporučuje osim u slučaju *Clostridium*-povezanih dijareja i drugih kroničnih enteropatija otpornih na standardne terapije (Barko i sur., 2018).

2.2. ANALIZA GASTROINTESTINALNE MIKROBIOTE

Zbog pretpostavke povezanosti sa zdravljem ljudi, osamdesetih godina prošlog stoljeća počinje istraživanje sastava GI mikrobiote. Tadašnje metode ovisile su o uzgojenim mikrobnim kulturama. Devedesetih se godina počinju primjenjivati o kulturi neovisne molekularne tehnike koje sve više otkrivaju karakteristike mikrobiote, no iziskuju dugotrajan rad. Početkom 21. stoljeća ovo istraživačko polje postaje mnogo naprednije budući da je to vrijeme razvoja metoda sekvenciranja sljedeće (druge) generacije (engl. *next-generation sequencing*, NGS) i bioinformatike. Istraživanja postaju opsežnija, ekonomski dostupnija te zahtijevaju manje vremena (Mardis, 2008). Određivanje sastava mikrobiote ograničeno je činjenicom da još uvijek nisu identificirane sve postojeće vrste mikroorganizama. Velik je broj vrsta koje je vrlo teško ili nemoguće kultivirati. Do danas je velik trud uložen u metagenomsko sekvenciranje, sklapanje novih genoma mikroorganizama i uspostavljanje načina klasifikacije tih genoma u svrhu otkrivanja vjerodostojnih referentnih setova humanog mikrobioma. Dva su glavna načina istraživanja mikrobioma: putem marker gena (npr. 16S rRNA geni) te putem poravnanja sekvenci dobivenih *whole genome shotgun* sekvenciranjem s referentnima (Leviatan i sur., 2022). Obzirom da brojne mikrobne vrste još uvijek nisu uspješno uzgojene, upravo je

sekvenciranje 16S rRNA gena (amplikon sekvenciranje) omogućilo značajan napredak mikrobiomike (Barko i sur., 2018).

2.2.1. Uzorkovanje i pohrana

Za potrebe istraživanja humane mikrobiote, uzorkovanje može biti provedeno na različitim dijelovima tijela (npr. koža, usna i nosna šupljina, urogenitalni te GI sustav). Iako studije ukazuju na različitost sastava GI mikrobiote, odnosno različitu zastupljenost određenih mikrobnih populacija u fekalnom i uzorku dobivenom biopsijom sluznice crijeva, postoje studije koje ukazuju na jaku povezanost između tih uzoraka kada je riječ o određenim bakterijskim rodovima (npr. *Bifidobacterium*). Proučavanje GI mikrobiote sisavaca i dalje se vrši uzorkovanjem fecesa (Green i sur., 2006; Ouwehand i sur., 2004; Zoetendal i sur., 2002), koji se jednostavno prikuplja te sadrži dovoljno biomase i dobro korelira sa sastavom mikrobiote u crijevima (Weinroth i sur., 2022).

Pravilno rukovanje uzorcima od velike je važnosti kada je riječ o istraživanjima temeljenim na sekvenciranju nukleinskih kiselina te u obzir valja uzeti mogućnost kontaminacije te uvjete transporta i skladištenja (Bharti i Grimm, 2021). Dokazan je značajan utjecaj vremena proteklog od uzorkovanja do smrzavanja u laboratoriju na analizu sastava mikrobiote sekvenciranjem 16S rRNA gena. Uzorke je potrebno odmah smrznuti na temperaturu od najviše $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ radi očuvanja sastava mikrobiote tijekom transporta, što u praksi često nije moguće (Carruthers i sur., 2019). Obzirom na 16S rRNA profile, dokazano je da temperatura kratkotrajnog skladištenja (14 dana) nema značajan utjecaj na strukturu i raznolikost mikrobiote (Tap i sur., 2019). Također, brzo zamrzavanje uzoraka na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u laboratoriju, koje se ujedno smatra i najboljom praksom, pridonosi očuvanju mikrobne raznolikosti za razliku od skladištenja uzoraka na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Danas su na tržištu brojni prezervirajući pufri koji predstavljaju alternativu kada hladni transportni lanac ili optimalno skladištenje nisu dostupni (Choo i sur., 2015). Kako bi se spriječila degradacija DNA, uzorke je zabranjeno odmrznuti pa ponovo zamrzavati.

2.2.2. Izolacija genetskog materijala

U svrhu dobivanja genomske DNA koja je potrebna za umnažanje 16S rRNA gena, stanice moraju biti lizirane jednom ili kombinacijom više metoda (mehaničke, fizikalne, kemijske i/ili enzimske), nakon čega DNA mora biti ukoncentrirana. Liziranje mora biti podešeno vrsti uzoraka, odnosno tipovima stanica u istraživanju (Weinroth i sur., 2022).

Također, treba imati na umu da su neke stanice otpornije na proces liziranja od drugih, primjerice Gram-pozitivne bakterije i bakterijske endospore. Kod takvih se stanica mehaničko razbijanje kuglicama pokazalo vrlo učinkovitim (Walker i sur., 2015; Guo i Zhang, 2013; Henderson i sur., 2013; Maukonen i sur., 2012; Salonen i sur., 2010). Iz oslobođenog staničnog sadržaja potrebno je prikladnom metodom izolirati DNA molekule odgovarajuće koncentracije i kvalitete kako u sljedećem koraku, umnažanju lančanom reakcijom polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), nebi došlo do umnažanja loše kvalitete. Komercijalni kitovi za ekstrakciju stanične DNA obuhvaćaju nekoliko tehnika te tako maksimiziraju efikasnost postupka, a posebno su prilagođeni vrsti uzorka, odnosno ciljanoj skupini organizama. Jedan od njih je QIAamp PowerFecal Pro Kit specifično namijenjen izolaciji DNA iz fekalnih uzoraka (Weinroth i sur., 2022).

2.2.3. Priprema DNA knjižnice i sekvenciranje

Dovoljna količina DNA zadovoljavajuće kvalitete i izmjerene koncentracije potrebna je za umnažanje svakog ciljnog gena PCR-om kako bi se pripremila DNA knjižnica za sekvenciranje. 16S rRNA geni najmanje su varijabilni unutar bakterijskog genoma te kodiraju za RNA molekulu koja gradi 30S podjedinicu prokariotskog ribosoma (bakterijski ribosomi sastavljeni su od velike, 50S, i male, 30S podjedinice), sveprisutni su u bakterija i arheja te omogućavaju filogenetsko određivanje i razlikovanje vrsta obzirom na svoju strukturu i aktivnost (Duchêne i sur., 2016). 16S rRNA gen dug je oko 1550 baznih parova (bp) te sadrži 8 visoko konzerviranih (sačuvanih) i 9 hipervarijabilnih regija (V1-V9) (Clarridge, 2004). Upravo se hipervarijabilne regije koriste u taksonomskoj klasifikaciji na razini roda ili vrste u raznolikim populacijama bakterija. Ovisno o tipu uzorka, važno je odrediti koja (ili koje) će se od 9 hipervarijabilnih regija (veličine oko 100 bp) umnažati metodom PCR-a, specifičnim početnicama koje se vežu na konzervirane regije, pri čemu je svaki nastali produkt izolirani fragment DNA koji predstavlja određenu varijabilnu regiju, odnosno srodnu bakterijsku skupinu (Caporaso i sur., 2011). Izazov je definirati i identificirati jedinstvenu sekvencu – hipervarijabilnu regiju koja se može mijenjati i unutar kraćeg vremenskog perioda ili unutar iste stanice. Takva sekvenca može biti, a često i jest identična u bakterija dviju bliskih rodova (Vetrovsky i Baldrian, 2013).

PCR-om dobivene amplikone potrebno je dokazati gel elektroforezom te ih sekvencirati. Tehnika sekvenciranja omogućava brzo i efikasno razdvajanje DNA sekvenci koje se razlikuju samo u jednom baznom paru. *Single read*-ovi nastaju sekvenciranjem fragmenata samo u

jednom smjeru, s jednog kraja na drugi, dok *paired-end read*-ovi nastaju sekvenciranjem DNA fragmenta u oba smjera čime istovremeno nastaje dvostruko više *read*-ova, no to omogućava točnije poravnanje (engl. *alignment*) i detekciju strukturnih specifičnosti genoma, poput insercija i delecija, što nije moguće sa *single-read* podacima, stoga je to najčešće korištena metoda (Nakazato i sur., 2013). Napredak tehnologije sekvenciranja omogućio je sintezu *read*-ova duljine do 300 bp (500 bp u slučaju *paired-end read*-ova), što omogućava sekvenciranje susjednih hipervarijabilnih regija (Weinroth i sur., 2022). *Short-read* NGS platforme, poput Illumina-e koja nudi više podvrsti ovisno o namjeni (Illumina, 2017), prikladne su za analizu mikrobioma (Caporaso i sur., 2011), budući da su glavna područja primjene cjelovito sekvenciranje malih genoma i ciljanih marker gena te 16S metagenomsko sekvenciranje, ali i određivanje profila ekspresije marker gena, analiza malih RNA molekula i interakcija DNA i proteina. Više od 90 % svjetskih podataka generiranih sekvenciranjem dobiveno je primjenom Illumina-e i kemije sekvenciranja sintezom (engl. *sequencing by synthesis*, SBS) (Illumina, 2017).

Dobivene informacije omogućavaju određivanje taksonomskog sastava i raznolikosti te relativnih zastupljenosti unutar uzoraka putem usporedbe sekvenci hipervarijabilnih regija s onima u javnim bazama podataka poznatih organizama kao što su NCBI (National Center for Biotechnology Information), RDP (Ribosomal Database Project) (Cole i sur., 2014), Silva (Quast i sur., 2013), GreenGenes (DeSantis i sur., 2006) i druge.

Pogrešno vezanje specifičnih početnica (engl. *primers*) na molekulu DNA prilikom PCR-a može biti jedan od razloga pogrešne taksonomske analize mikrobiote, odnosno umnažanjem neželjenih fragmenata dolazi do smanjenja broja identificiranih mikroorganizama u uzorku (Polz i Cavanaugh, 1998). Identifikacija mikroorganizma može izostati i kada je broj umnoženih sekvenci ispod granice detekcije (Mao i sur., 2012). S druge strane, u istraživanjima u kojima su korišteni identični setovi početnica nerijetko dolazi do kontradiktornih rezultata (Zupancic i sur., 2012; Wu i sur., 2011; Turnbaugh i sur., 2009). Sve navedeno ukazuje da je kod ovako kompleksnih analiza više mogućih uzroka pogreške (Walters i sur., 2014).

Važno je poznavati moguća ograničenja sekvenciranja fragmenata 16S rRNA gena, a glavna su: nemogućnost određivanja metaboličkog potencijala i aktivnosti, nedovoljna varijabilnost sekvenci za razlikovanje vrsta ili sojeva, pristup ne razlikuje žive od mrtvih stanica, točnost određivanja relativne zastupljenosti ograničena je činjenicom da različite bakterije imaju različit broj kopija marker gena (Weinroth i sur., 2022). Također, za mjerenje ukupnog

bakterijskog sadržaja potrebno je dodatno primijeniti kvantitativne metode poput qPCR-a (engl. *quantitative PCR*, kvantitativni PCR) (Ganda i sur., 2021; Gloor i sur., 2017). Nadalje, prepreka razlikovanju vrsta može biti i činjenica da se najčešće sekvencira samo jedna ili dvije hipervarijabilne regije, a usporedba rezultata različitih istraživanja otežana je ukoliko se koriste različite regije marker gena (Thomas i sur., 2015). Osim toga, neki bakterijski rodovi (npr. *Streptococcus* i *Enterobacter*) se za manje od 0,5 % razlikuju u svojim 16S rRNA sekvencama, što ometa i identifikaciju patogena ili mikroorganizama rezistentnih na antibiotike (Rogall i sur., 1990).

Sekvenciranje cijelog genoma metodom nasumičnog razbijanja na fragmente (engl. *shotgun sequencing*) predstavlja razbijanje cjelokupnog ekstrahiranog mikrobioma u male fragmente koji se sekvenciraju te uspoređuju s referentnim genomima. Ono omogućava taksonomsku analizu, određivanje broja, vrste ili varijabilnosti određenog gena te identifikaciju bakterijskih, ali i nebakterijskih mikroorganizama koji su isključeni u slučaju ciljanog 16S rRNA sekvenciranja (Barko i sur., 2018). Ovo metagenomsko sekvenciranje osim taksonomske klasifikacije omogućuje i uvid na razini sojeva te funkcionalnih parametara poput metaboličkih puteva i drugih bioloških procesa, faktora virulencije i antibiotske rezistencije (Mohajeri i sur., 2018). Ipak, valja uzeti u obzir mogućnost da trenutne metode *shotgun* sekvenciranja i prateće statističke analize nisu dovoljno osjetljive da prepoznaju male, ali važne promjene koje su u genomu prisutne pod uvjetima provođenja istraživanja ili u slučaju bolesti (disbioze). U budućnosti bi obrada fekalnog transkriptoma qPCR-om mogla omogućiti prepoznavanje promjena u ekspresiji mikrobioma. Metagenomski pristup otkrivanju genoma ograničen je činjenicom da *de novo* sastavljeni genomi mogu biti nepotpuni, čime je smanjena rezolucija taksonomske klasifikacije i funkcijske analize (Lloyd-Price i sur., 2017). Dokazano je da humana GI mikrobiota uglavnom sadrži više različitih sojeva iste bakterijske vrste (Li i sur., 2016) i upravo zato je potrebno unaprijediti preciznost i točnost metagenomskih analiza. Dok prosječno sekvenciranje cijelog genoma ostvaruje pokrivenost 30 – 50 puta, ciljano sekvenciranje marker gena pokriva željenu regiju DNA 500 – 1000 puta ili više (Illumina, 2017). Osim toga, horizontalni prijenos gena pokretnih genetičkih elemenata unutar bakterijskih zajednica može ograničiti točnu i potpunu identifikaciju sastava mikrobiote na razini vrste uslijed pogrešnog sklapanja *read*-ova, izlaznih podataka sekvenciranja. Radi postizanja bolje taksonomske pokrivenosti potrebno je koristiti baze podataka o pokretnim genetičkim elementima, insercijskim sekvencijama i plazmidima kao što je ENA (European Nucleotide Archive) (Silvester i sur., 2017).

2.2.4. Mjerenje mikrobne raznolikosti

Mikrobna raznolikost nekog uzorka jest mjera za varijabilnost pripadnog mikrobioma, uzimajući u obzir brojnost te relativnu zastupljenost operativnih taksonomskih jedinica (engl. Operational Taxonomic Units, OTU). OTU se koriste kao metoda analize na bazi 16S rDNA sekvenciranih gena temeljeno na podudarnosti sekvenci. Takve se operativne taksonomske jedinice statistički klasteriraju ukoliko je sličnost sekvenci vrlo visoka, najčešće $\geq 97\%$. Pojam obilja (sinonim za raznolikost) označava mjeru za ukupan broj jedinstvenih OTU prisutnih u uzorku (Barko i sur., 2018). Relativna zastupljenost predstavlja omjer, odnosno zastupljenost pojedine taksonomske kategorije mikroorganizama u odnosu na ostale prisutne. Razlike u mikrobiomima promatraju se određivanjem alfa i beta raznolikosti. Alfa raznolikost kvantificira raznolikost ključnih bakterijskih vrsta unutar pojedinog uzorka (Kuczynski i sur., 2011) te može biti slična među uzorcima različitog taksonomskog sastava (Weinroth i sur., 2022). Alfa raznolikost izražava se različitim procjeniteljima raznolikosti vrsta kao što je OTU ili u novije vrijeme ASV. ASV (engl. *amplicon sequence variant*) predstavlja individualnu sekvencu različitu u barem jednom nukleotidu koja predstavlja taksonomsku identifikacijsku jedinicu (Weinroth i sur., 2022). Beta raznolikost uspoređuje raznolikost između uzoraka, a rezultat su matrice udaljenosti među parovima uzoraka (Barwell i sur., 2015). Zbog toga beta raznolikost može varirati, a alfa ne (Weinroth i sur., 2022). Algoritmi za kvantifikaciju alfa i beta raznolikosti integrirani su u bioinformatičke platforme (engl. *pipeline*) kao što su QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso i sur., 2010), Mothur (Schloss i sur., 2009) te VEGAN i phloseq (McMurdie i Holmes, 2013) paketi napisani u programskom jeziku R (Galloway-Peña i Hanson, 2020).

2.2.5. Bioinformatička analiza

Bioinformatička platforma jest skup različitih programa i alata koji se koriste za generiranje i interpretaciju rezultata dobivenih molekularnom analizom (Weinroth i sur., 2022). U svrhu obrade sirovih podataka dobivenih sekvenciranjem 16S rDNA gena razvijeno je nekoliko platformi, na primjer: QIIME 2 (Bolyen i sur., 2019), Mothur (Schloss i sur., 2009), RDP (Cole i sur., 2014), Bioconductor i USEARCH. Takve platforme imaju ugrađene algoritme za provedbu kontrole kvalitete, klasteriranje podudarnih sekvenci, taksonomsku klasifikaciju, izračun mjera raznolikosti te vizualizaciju rezultata (Marizzoni i sur., 2020).

Programski paket QIIME 2 najčešće je korišten *software* za analizu mikrobioma napisan u programskom jeziku (Python) s opsežnom korisničkom dokumentacijom. Obrada sirovih

podataka zahtijeva više radnih koraka uz dodatne transformacije podataka jer izlazni format jednog koraka često ne odgovara ulaznom formatu sljedećeg. Platforma zahtijeva sirove podatke u FASTA ili FASTQ formatu. Sirovi podatci dobiveni sekvenciranjem genetskog materijala različitih uzoraka međusobno su pomiješani te ih treba razdvojiti – demultipleksirati. To je moguće budući da sve očitane sekvence pojedinog uzorka imaju jedinstveni, zajednički barkod koji će se prilikom razdvajanja ukloniti kako ne bi smetao u sljedećim koracima analize. Sljedeći korak obrade sekvenci je „trimanje“ (engl. *read trimming*), odnosno uklanjanje nebioloških slijedova - početnica, konzerviranih regija te nukleotida loše kvalitete. Ukoliko je provedeno *pair-end* sekvenciranje, metoda DADA2 omogućava uparivanje očitanih sekvenci s njihovim komplementima, a vrši se i kontrola kvalitete, ispravak i/ili uklanjanje pogrešaka u sekvencama (engl. *denoising*) (Hall i Beiko, 2018), uklanjaju se njihove identične kopije te se sekvence sa sličnosti $\geq 97\%$ klasteriraju zajedno. Konačni produkti su OTU tablica (engl. *operational taxonomic units*) – tablica svojstava (engl. *FeatureTable[Frequency]*) i reprezentativne sekvence (engl. *FeatureData[Sequence]*) namijenjene daljnjoj analizi: taksonomskoj klasifikaciji, određivanju mikrobne raznolikosti te statističkoj obradi. QIIME 2 u slučaju analize 16S rRNA gena kao referentne baze koristi Greengenes i Silva baze podataka (Bolyen i sur., 2019). Vizualizacija taksonomske klasifikacije uzoraka omogućena je kroz interaktivne grafove koji predočavaju podatke obzirom na željenu taksonomsku razinu ili prevalenciju specifične taksonomske grupe. Distribucija evolucijski udaljenih vrsta u uzorcima vidljiva je kroz prikaz filogenetičke raznolikosti, odnosno alfa i beta raznolikosti. Alfa raznolikost može se prikazati Faithovom filogenetičkom raznolikosti, Shannonovim indeksom, *evennes* i *observed* OTUs/ASVs metrikom, a beta raznolikost prikazuje se Jaccard, Bray-Curtis te UniFrac distancom koja može biti težinska (*weighted*) ili netežinska (*unweighted*). Za beta raznolikost QIIME 2 pomoću matrice udaljenosti generira PCoA (engl. *Principal Coordinates Analysis*) - trodimenzionalnu vizualizaciju koja pruža informaciju o sličnosti uzoraka. Također, rarefakcijskom se analizom određuje je li istraživani uzorak sekvenciran do zadovoljavajuće dubine, odnosno jesu li u uzorku identificirane sve prisutne vrste (Hall i Beiko, 2018). Unutar platforme postoji i mogućnost povijesnog prikaza (engl. *provenance*) svih koraka obrade ulaznih i izlaznih datoteka, korištenih naredbi, specifičnih algoritama (računalnih alata) te utrošenog vremena po pojedinom koraku analize.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio diplomskog rada proveden je na Institutu za antropologiju u Zagrebu.

3.1. MATERIJALI

Pribor:

- Plastične čaše s poklopcem za prikupljanje i skladištenje uzoraka
- Vakuum vrećice za pohranu plastičnih čaša s uzorcima
- Metalne špatule
- Automatske pipete
- Falcon kivete
- Staklene boce
- Erlenmeyerove tikvice
- Microseal 'A' filmovi (Bio-Rad, part # MSA-5001) - Labena, Hrvatska
- PCR ploče s 96 jažica (0.2 ml) (Bio-Rad, part # MSP-9601) - Inel, Hrvatska
- Magnetni stalak za kivete
- Posuda s ledom
- Epruvete za mikrocentrifugu

Uređaji:

- Zamrzivač – ThermoFisher Scientific, zastupnik Asolutic, Hrvatska
- Digestor - Thermo Scientific, zastupnik Asolutic, Hrvatska
- Analitička vaga – AXIS ALN, zastupnik Server-mark, Hrvatska
- Elektroforetski uređaj - Electrophoresis Power Supply 150/2000, Elchrom Scientific
- Qubit 3.0 Fluorometer - ThermoFisher Scientific, zastupnik Asolutic, Hrvatska
- Vortex - Thermo Scientific, zastupnik Asolutic, Hrvatska
- Tresilica - Thermo Scientific, zastupnik Asolutic, Hrvatska
- Centrifuga - Thermo Scientific, zastupnik Asolutic, Hrvatska
- Thermal cycler - Thermo Scientific, zastupnik Asolutic, Hrvatska
- Transiluminator
- Illumina MiSeq System SY-410-1003 – Illumina, SAD, zastupnik Kemomed, Hrvatska

Reagensi:

- Qubit dsDNA BR Assay Kit – Thermo Fisher Scientific
- Tris (10 mM, pH = 8.5) – Kefo, Hrvatska
- Amplikon PCR stražnje (engl. *reverse*) početnice (1 μ M) - Illumina, SAD, zastupnik Kemomed, Hrvatska
- Amplikon PCR prednje (engl. *forward*) početnice (1 μ M) - Illumina, SAD, zastupnik Kemomed, Hrvatska
- 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPA Biosystems, part # KK2601) – Roche, Švicarska, zastupnik Kemomed, Hrvatska
- 1 kb DNA Ladder GeneRuler Thermo Scientific
- Agaroza – Sigma Aldrich, USA, zastupnik Kefo, Hrvatska
- TAE pufer - Illumina, SAD, zastupnik Kemomed, Hrvatska
- SYBR Safe DNA gel stain – Invitrogen, zastupnik Biosistemi, Hrvatska
- MiliQ voda (slijepa proba u PCR-u, priprema uzoraka za gel elektroforezu)
- Agencourt Ampure XP 60 ml kit (Beckman Coulter Genomics, part # A63881) - Beckman Coulter, zastupnik Kemomed, Hrvatska
- Nextera XT Index 1 početnice (N7XX) iz Nextera XT Index kit-a - Illumina, SAD, zastupnik Kemomed, Hrvatska
- Nextera XT Index 2 početnice (S5XX) iz Nextera XT Index kit-a - Illumina, SAD, zastupnik Kemomed, Hrvatska
- Etanol (70 %, 80 %) - Kemika, Hrvatska
- Natrijev hidroksid - Kefo, Hrvatska
- HT1 hibridizacijski pufer - Illumina, SAD, zastupnik Kemomed, Hrvatska
- PhiX Control Kit v3 (FC-110-3001) - Illumina, SAD, zastupnik Kemomed, Hrvatska
- MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle) - Illumina, SAD, zastupnik Kemomed, Hrvatska

Uređaj za automatiziranu izolaciju i pročišćavanje DNA:

- QIAamp® PowerFecal® Pro DNA Kit - QIAGEN, Nizozemska

Računalni programi za analizu podataka:

- Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME 2)
- Microsoft Office 2010 - Microsoft, Sjedinjene Američke Države

3.2. METODE

3.2.1. Prikupljanje i skladištenje fekalnih uzoraka

Fekalne uzorke za analizu doniralo je 59 dobrovoljaca u dobi od 18 do 59 godina te su uključena oba spola, 35 osoba ženskog te 24 osobe muškog spola. Uzorci su dogovorno skupljeni u plastične čaše s poklopcima koje su zatim pohranjene u vakuum plastične vrećice, a potom u zamrzivač na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, odmah nakon uzorkovanja. Prikupljeni fekalni uzorci su odmah po dolasku na Institut skladišteni u zamrzivaču na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ te je na taj način spriječeno odumiranje (fakultativnih) anaeroba. Ukupno trajanje skladištenja iznosilo je mjesec dana, ovisno o dinamici prikupljanja uzoraka. Laboratorijske površine i potrebno posuđe dezinficirani su 70 % otopinom etanola prije početka rada u digestoru. Da bi se fekalni uzorci mogli odvajati i vagati, vakuum vrećice za pohranu su na dan izolacije DNA premještene u digestor na sobnu temperaturu kako bi se uzorci odledili.

3.2.2. Izolacija DNA

Odvagnuto je 0,25 g (s dozvoljenim odstupanjima do 0,005 g) od svakog fekalnog uzorka pomoću analitičke vage. Izolacija DNA iz fekalnih uzoraka provedena je pomoću QIAamp® PowerFecal® Pro DNA Kit-a te pripadnog protokola proizvođača. Koncentracija DNA mjerena je Qubit fluorimetrom kako bi se zatim dodavanjem vode izjednačila na 5 ng/ μl u svim uzorcima. Korišteni su gotovi standardi iz Qubit kit-a koji predstavljaju raspon vrijednosti koncentracija. Uzorci izjednačenih koncentracija DNA zatim su stavljeni na vortex, a potom centrifugu te su takvi bili spremni za daljnju obradu - pripremu DNA knjižnice.

3.2.3. Priprema DNA knjižnice i sekvenciranje 16S rRNA gena

Primjenjen je protokol proizvođača Illumina MiSeq platforme (Illumina, 2023) koji opisuje metode pripreme uzoraka za sekvenciranje varijabilnih V3 i V4 regija 16S rRNA gena. PCR sustavom koji koristi početnice specifične za odabrane regije nastaju amplikoni dugi oko 460 bp. Provedena su dva PCR-a, amplikon i indeks. Prvim su umnožene sekvence zajedničke svim mikroorganizmima s ciljem da se iz ukupne izolirane genomske DNA fekalnih uzoraka izostavi humana, odnosno svaka koja nije bakterijskog porijekla. Lokus specifične početnice s ligiranim *overhang* adapterima, koji su kompatibilni s Illumina adapterima za sekvenciranje i imaju sljedeći nukleotidni slijed (podcrtan je slijed nukleotida *overhang* adaptera):

16S amplikon PCR prednja početnica: 5'
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

16S amplikon PCR stražnja početnica: 5'
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTACTAATCC.

Provedeno je 25 ciklusa umnažanja, a u slijepu probu je umjesto DNA dodana voda. Uspješnost umnažanja i veličina PCR produkata (oko 500 bp) potvrđene su vizualizacijom PCR produkata u transiluminatoru nakon elektroforeze u horizontalnom agaroznom gelu (2 %) pripremljenom od agara (1 g), TAE pufera (50 µl) i SYBR Safe DNA gel boje (3 µl). U svaku jažicu gela unesen je volumen od 5 µl (3 µl PCR produkta, 0,4 µl pufera te 1,6 µl vode). Standard je bio Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder. Pročišćavanje DNA provedeno je na magnetnim kuglicama Ampure XP prema protokolu, a na taj su način 16S V3 i V4 ampliconi odvojeni od početnica i njihovih dimera. Tako pročišćeni produkti podvrgnuti su drugoj fazi PCR-a, indeksiranju (barkodiranju) uz uporabu Nextera XT Index Kit-a prema Illumina TruSeq DNA library protokolu. Tim se korakom na prethodno dobivene amplicone kroz 8 ciklusa PCR-a ligiraju dvostruki multipleksirajući indeksi (početnice) duljine 8 nukleotida i Illumina adapteri za sekvenciranje. Zatim je ponovo provedeno pročišćavanje magnetnim kuglicama prema protokolu i time je pripremljena DNA knjižnica željenih fragmenata bakterijskih genoma.

Koraci koji su prethodili samom sekvenciranju Illumina MiSeq platformom uključuju denaturaciju DNA knjižnice natrijevim hidroksidom, razrjeđenje hibridizacijskim puferom (HT1), denaturaciju povišenom temperaturom te podešavanje koncentracija (normalizaciju) denaturirane DNA na konačnu vrijednost od 4 pM. *Paired-end* sekvenciranjem generirani su visokokvalitetni, cjeloviti *read*-ovi V3 i V4 hipervarijabilnih regija dugi 2 x 300 bp. Prema protokolu, korišten je preporučeni MiSeq v3 Reagent Kit (600 ciklusa) uz PhiX kontrolu. MiSeq platforma generira *output* od oko 15 Gb te > 20 milijuna *read*-ova, odnosno > 100 000 *read*-ova po uzorku, što je dovoljno za potpuno pokrivanje bakterijskog sastava fekalnih uzoraka. Rezultat sekvenciranja je klasifikacija na nekoliko taksonomskih razina (carstvo, koljeno, razred, red, porodica, rod i vrsta) prikazana kroz klaster grafikone (prikaz broja sirovih, neporavnatih, dupliciranih klastera te onih nepovezanih s indexima), tablicu uzoraka (obuhvaća rezultat sekvenciranja svakog pojedinog uzorka) i klaster *pie chart* (grafički prikaz klasifikacije svakog pojedinog uzorka). Rezultat je konvertiran u FASTQ datoteke unutar same MiSeq platforme.

3.2.4. Bioinformatička obrada podataka programskim paketom QIIME 2

Instalacija QIIME 2 programskog paketa ovisi o korisničkom operativnom sustavu. Sve upute su dostupne na mrežnoj stranici <https://qiime2.org/>.

Prvi ulazni podatak su FASTQ datoteke koje sadrže sirove podatke, rezultate sekvenciranja odabranih varijabilnih regija 16S rRNA gena GI mikrobioma. Jedna takva datoteka sadrži informaciju o slijedu nukleotida prednjeg (engl. *forward*) načina čitanja sekvenci, a druga datoteka informaciju o slijedu nukleotida stražnjeg (engl. *reverse*) načina čitanja. Ti se sljedovi spajaju u jedinstvenu, cjelovitu sekvencu koja obuhvaća sve sekvencirane fragmente 16S rRNA gena svih uzoraka te se kao takva pohranjuje u jedan dokument sufiksa *qza*. Zatim se odvajaju *read*-ovi pojedinih uzoraka, odnosno provedi se demultipleksiranje obzirom na barkodove. Barkodovi su specifični sljedovi nukleotida prethodno ligirani na krajeve sekvenci kako bismo u ovom trenutku analize prepoznali i razvrstali sve fragmente istog uzorka. U daljnju obradu QIIME 2 alatima ulaze samo slijedovi kojima prvih 8 nukleotida u potpunosti odgovara korištenim barkodovima. *Trimming read*-ova osigurao je uklanjanje početnica i drugih adaptera, konzerviranih regija i nukleotida loše kvalitete. Sljedeći provedeni korak je kontrola kvalitete i *denoising* pomoću DADA 2 programa prilagođenog za ispravljanje grešaka sekvenciranja Illumina platformom. Istovremeno je učinjeno i uparivanje komplemenata budući da je korišteno *paired-end* sekvenciranje. Nakon toga, UCLUST algoritam služi klasteriranju očitanih slijedova svakog uzorka u operacijske taksonomske jedinice (OTU) na razini vrste, što znači najmanju pokrivenost od 97 % i najmanju identičnost od 97 %. Konačni izlazni podatci su tablice svojstava i sekvence koje je potrebno usporediti s onima u bazama podataka, a kojima je taksonomska pripadnost već određena. Uslijedila je taksonomska klasifikacija, poravnanje sekvenci i određivanje filogenije. Izračun filogenetskog drva sekvenci nužan je preduvjet analize metrike (alfa i beta) raznolikosti. QIIME 2 View-om moguće je pristupanje i vizualizacija programski dobivenih rezultata pohranjenih unutar dokumenata sa sufiksom „qzv“ (engl. *Qiime Zipped Visualization*).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je prikazati alfa i beta raznolikosti te odrediti taksonomski sastav, odnosno identificirati ključne mikrobnе vrste gastrointestinalne mikrobiote hrvatske populacije primjenom odabranih molekularnih i bioinformatičkih metoda analize sastava mješovite bakterijske zajednice. Glavni uvjet bio je izolirati mikrobiom, sekvencirati ciljano umnožene specifične fragmente odabranih mikrobnih biomarker gena te optimalnom bioinformatičkom analizom pomoću QIIME 2 platforme obraditi i prikazati rezultate te ih objasniti kroz povezanost s dosadašnjim istraživanjima, generaliziranim fenotipom hrvatske populacije kao i s fenotipom ispitanika istraživanja.

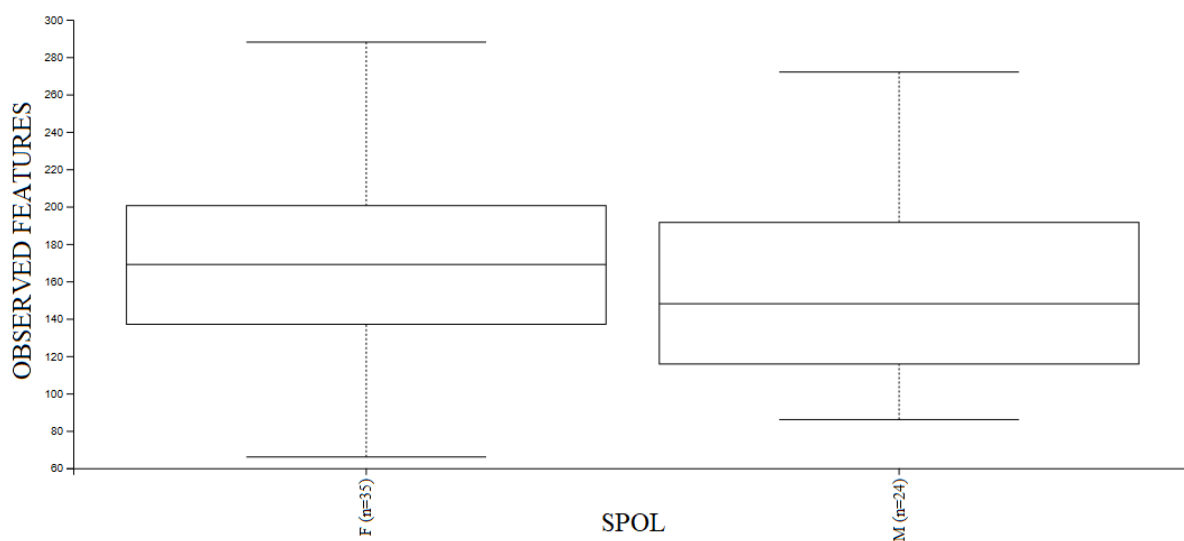
U ovom radu genomički je analizirana i prikazana varijabilnost gastrointestinalne mikrobiote pomoću mjera raznolikosti i taksonomskog sastava mješovitih bakterijskih populacija prisutnih u uzorcima fecesa 59 donora dobi od 18 do 59 godina, od kojih su 35 (> 59 %) osobe ženskog, a 24 (< 41 %) osobe muškog spola. Alfa raznolikost uzoraka analizirana je pomoću *observed OTUs* metrike prikazane u obliku okvirnih (engl. *box and whisker*) dijagrama na temelju spola, dobi, načina prehrane, zdravstvenog stanja, Covid-19 statusa i postojećih alergija. Beta raznolikost uzoraka analizirana je *Principal Coordinate Analysis* metodom, a međusobna udaljenost uzoraka određena je netežinskom i težinskom UniFrac metrikom te prikazana Emperor dijagramima. Identificirani taksonomski sastav crijevne mikrobiote ispitanika prikazan je relativnom zastupljenosti odabranih taksonomskih razina u obliku stupčastih dijagrama i tablice relativnih zastupljenosti ključnih bakterijskih rodova. Ključni rodovi su promatrani kao potencijalni biomarkeri te kroz povezanost s različitim čimbenicima poput spola, dobi, načina prehrane, zdravstvenog stanja i drugih.

U svrhu prikazivanja rezultata bioinformatičke analize kao zadnjeg koraka, korištene su vizualizacije .qzv dokumenata u QIIME 2 View panelu.

4.1. ALFA RAZNOLIKOST

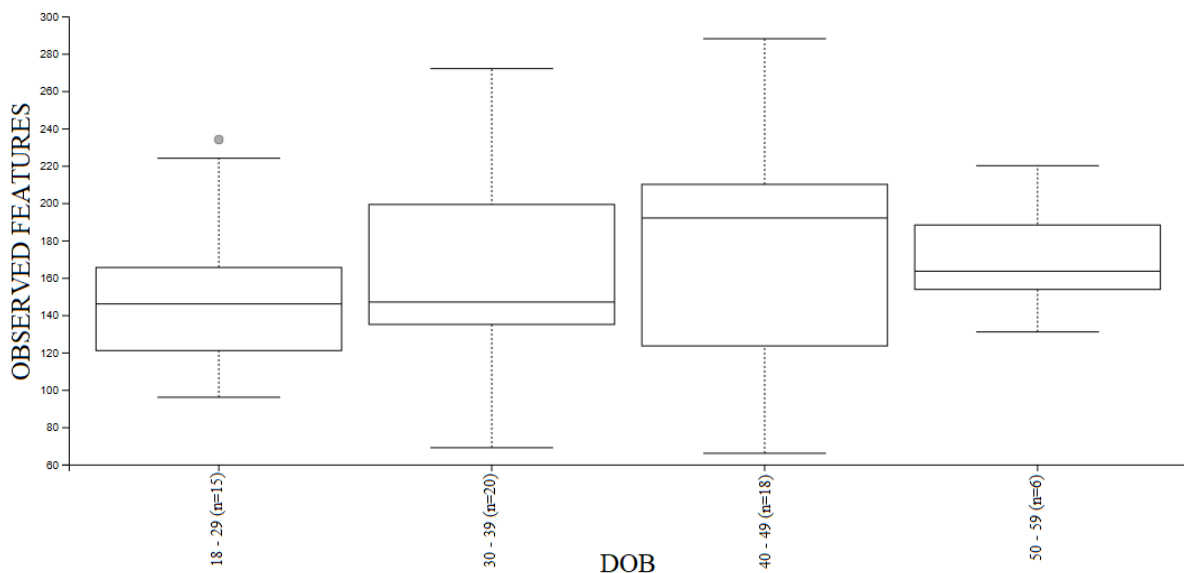
Alfa raznolikost mjera je kojom kvantitativno promatramo raznolikost mikrobiote unutar pojedinih uzoraka. Ona nam daje uvid u broj različitih mikrobnih vrsta identificiranih unutar jednog uzorka. Jedna od metoda određivanja alfa raznolikosti je *observed OTUs* metrika kojom saznajemo koliko je jedinstvenih operacijskih taksonomskih jedinica, odnosno mikroorganizama identificirano unutar uzorka bez informacije o raspodjeli zastupljenosti ili filogenetskoj udaljenosti istih.

Slika 2 prikazuje ovisnost alfa raznolikosti o spolu ispitanika. Vidljiva je veća razina alfa raznolikosti (engl. *observed features*) crijevne mikrobiote ispitanika ženskog spola, no ona nije statistički značajna ($p > 0,05$). To se može objasniti time što su uzorci ujedno i međusobno heterogeniji obzirom na alfa raznolikost, odnosno imaju veći raspon vrijednosti, a to može biti i pod utjecajem broja analiziranih uzoraka, odnosno veličine eksperimentalne skupine (35 ženskih te 24 muška ispitanika). Medijan vrijednosti identificiranih operacijskih taksonomskih jedinica unutar uzoraka prikazan je vodoravnom linijom koja okvirni dijagram (engl. *box and whisker plot*) dijeli na pola. Unutar regije interkvartila nalazi se 50 % uzoraka. Svi analizirani uzorci se obzirom na broj identificiranih operacijskih taksonomskih jedinica nalaze unutar intervala graničnih vrijednosti 66 i 288, što ukazuje na veliku heterogenost uzoraka i značajne interpersonalne razlike već na razini alfa raznolikosti crijevne mikrobiote. Kruskal-Wallis testom određene su H vrijednost koja iznosi 1,2 te p vrijednost (engl. *probability*) jednaka 0,27 (p vrijednost veća od 0,05 predstavlja statistički ne značajnu razliku između eksperimentalnih skupina u odnosu na početnu hipotezu).



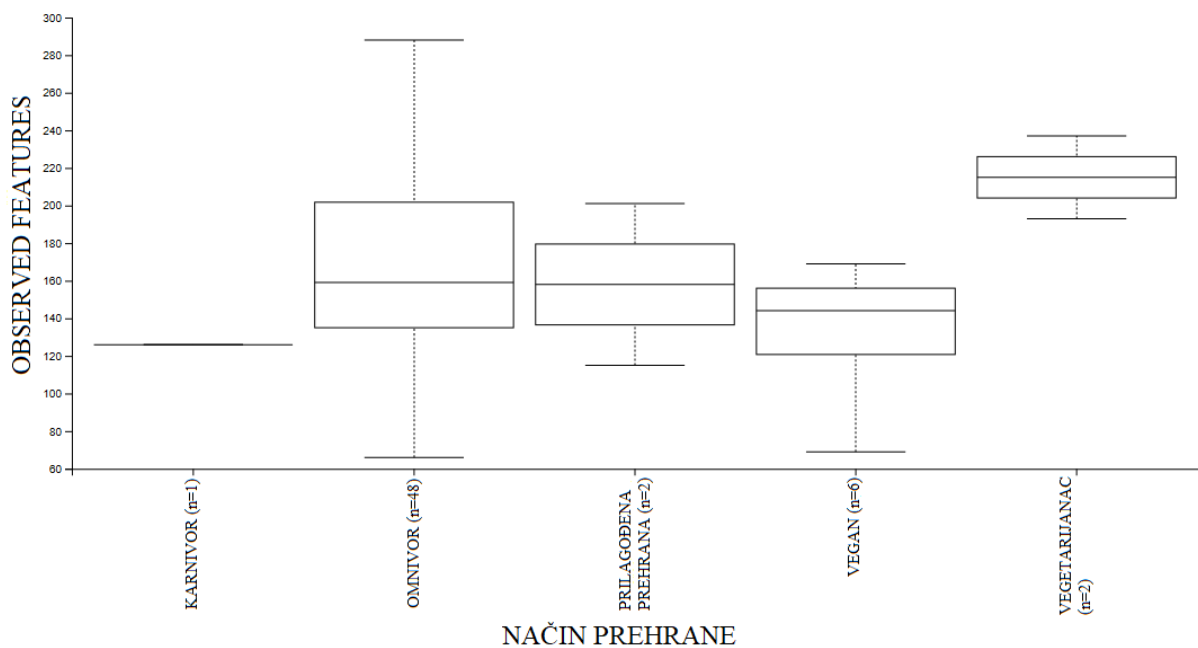
Slika 2. Dijagram ovisnosti alfa raznolikosti (*observed features*) o spolu ($p > 0,05$)

Na slici 3 vidimo prikaz alfa raznolikosti crijevne mikrobiote obzirom na 5 dobnih skupina (18 – 29, 30 - 39, 40 – 49, 50 – 59 godina), gdje je najveća razina alfa raznolikosti prisutna unutar dobne skupine od 40 do 49 godina, što potvrđuje činjenicu da zrelu mikrobiotu odlikuje najveća intrapersonalna raznolikost. Također, vidljivo je kako razina alfa raznolikosti raste s godinama starosti ispitanika te se u konačnici smanjuje kako osoba stari, što su potvrdila i dosadašnja istraživanja (Odamaki i sur., 2016). Rasap vrijednosti najmanji je unutar dobne skupine od 50 do 59 godina, a zatim unutar dobne skupine od 18 do 29 godina. To znači da su interpersonalne razlike u alfa raznolikosti najmanje u ispitanika pripadnika tih dobnih skupina. Najveći rasap vrijednosti uočavamo unutar dobne skupine 40 – 49 godina. H vrijednost iznosi 2,93, a p vrijednost 0,4, što ponovno pokazuje da nije moguće potvrditi statistički značajnu razliku ovisnosti alfa raznolikosti o dobnoj skupini ispitanika.



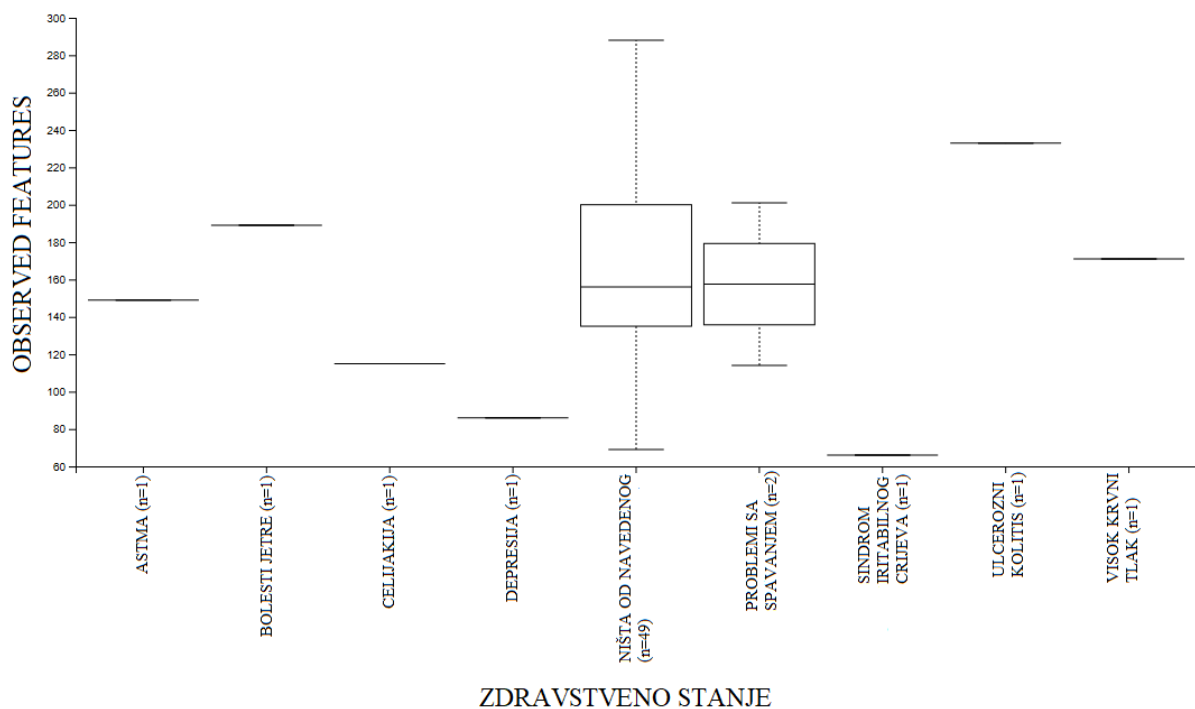
Slika 3. Dijagram ovisnosti alfa raznolikosti (*observed features*) o dobnoj skupini ($p > 0,05$)

Na slici 4 prikazan je dijagram ovisnosti alfa raznolikosti o načinu prehrane (karnivor, omnivor, prehrana prilagođena zdravstvenom stanju, vegan, vegetarijanac). Uočavamo da je najveći broj (maksimalna vrijednost) operacijskih taksonomskih jedinica određen za uzorak fecesa ispitanika omnivora (svejed), što potvrđuje činjenicu da raznolika prehrana pogoduje raznolikosti sastava crijevne mikrobiote (Cresci i Bawden, 2015). Također, ta je prehrambena skupina ujedno i najheterogenija obzirom na alfa raznolikost uzoraka, ali i najbrojnija. Najmanju heterogenost alfa raznolikosti i najveće vrijednosti regije interkvartila uočavamo unutar eksperimentalne skupine vegetarijanaca, što dokazuje povoljan utjecaj unosa biljnih namirnica na crijevnu mikrobiotu. H vrijednost iznosi 4,67, a p vrijednost 0,32, što ne ukazuje na statistički značajnu razliku ovisnosti alfa raznolikosti o načinu prehrane ispitanika. Obzirom na p vrijednosti određene između pojedinih prehrambenih skupina, kao statistički značajna razlika obzirom na alfa raznolikost mogla bi se protumačiti jedino razlika između ispitanika vegana i vegetarijanaca ($p = 0,0455$) i to nakon zaokruživanja 3. decimale.



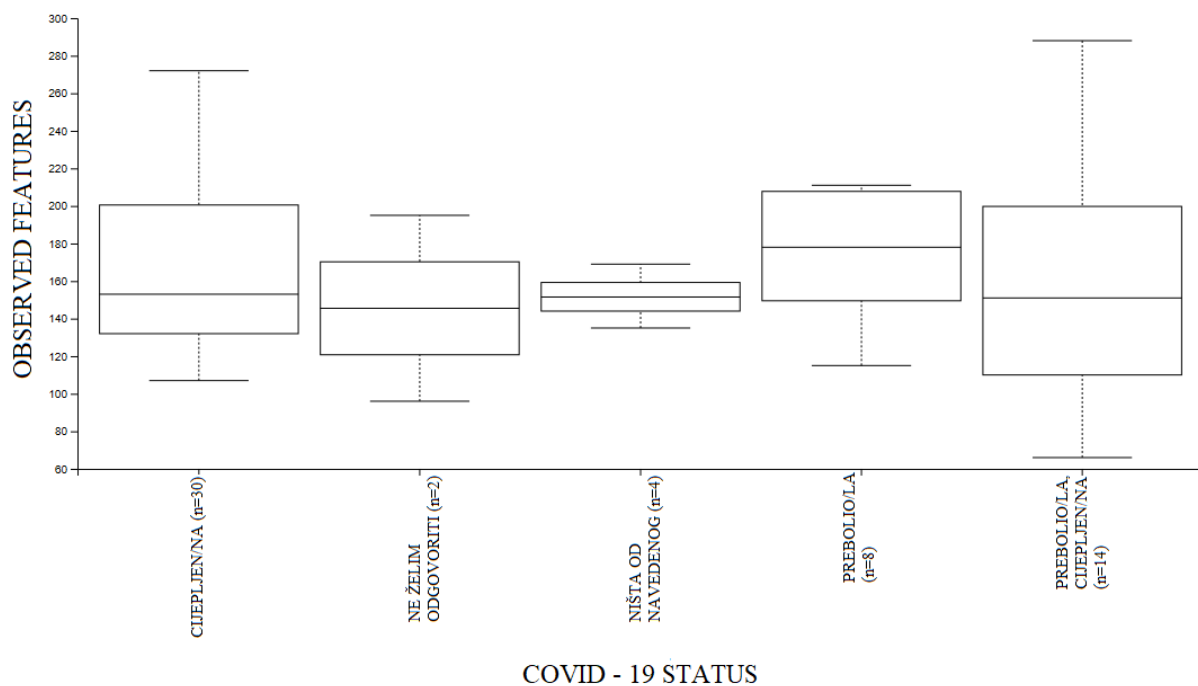
Slika 4. Dijagram ovisnosti alfa raznolikosti (*observed features*) o načinu prehrane ($p > 0,05$)

Slika 5 prikazuje ovisnost alfa raznolikosti i zdravstvenog stanja, pri čemu su ispitanici svrstani unutar jedne od 9 skupina (astma, bolesti jetre, celijakija, depresija, ništa od navedenog, problemi sa spavanjem, sindrom iritabilnog crijeva, ulcerozni kolitis, hipertenzija). Najmanja alfa raznolikost određena je analizom uzorka fecesa ispitanika oboljelog od sindroma iritabilnog crijeva, a najveća u uzorku zdravog ispitanika. Uočavamo da od navedenih zdravstvenih stanja alfa raznolikost najviše narušavaju sindrom iritabilnog crijeva, zatim depresija te celijakija. Sve navedeno potvrđuje znanstvenu literaturu o povezanosti raznolikosti crijevne mikrobiote i zdravstvenog stanja. Analizom uzorka fecesa ispitanika oboljelog od ulceroznog kolitisa nije utvrđena narušena alfa raznolikost. H vrijednost iznosi 8,89, a p vrijednost 0,35. Takvu p vrijednost tumačimo kao statistički neznačajnu razliku alfa raznolikosti promatranih eksperimentalnih skupina ispitanika s različitim dijagnozama, odnosno zaključujemo da zdravstveno stanje nema značajan utjecaj na razinu alfa raznolikosti crijevne mikrobiote unutar promatrane skupine. Statistički je najznačajnija razlika između zdravih ispitanika i onih oboljelih od sindroma iritabilnog crijeva ($p = 0,0894$) koja je statistički značajna.



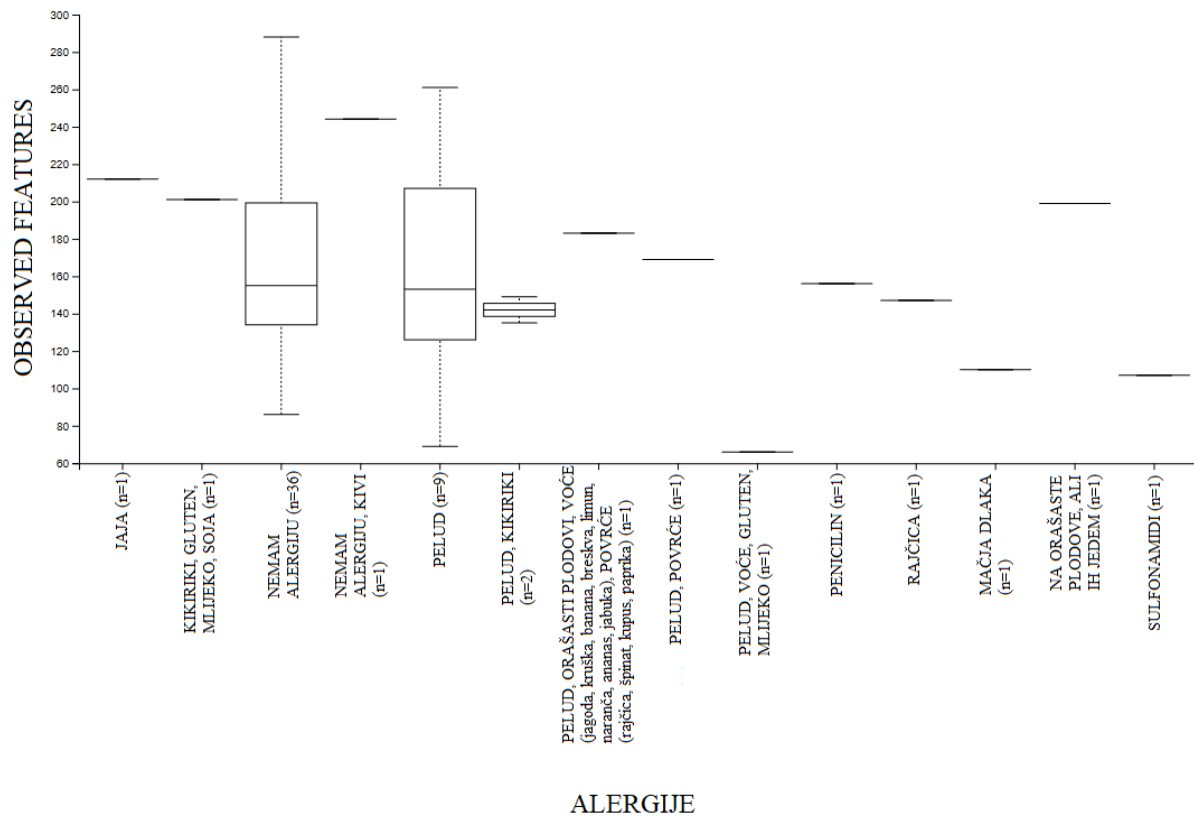
Slika 5. Dijagram ovisnosti alfa raznolikosti (*observed features*) o zdravstvenom stanju ($p > 0,05$)

Na dijagramu ovisnosti alfa raznolikosti o Covid-19 statusu (slika 6) uočavamo kako isti ne utječe značajno na promjene alfa raznolikosti crijevne mikrobiote. Najveće, ali i najmanje razine alfa raznolikosti uočavamo upravo kod ispitanika koji su cijepljeni protiv virusa SARS-CoV-2 te su preboljeli isti. Također, u tih je ispitanika vidljiv i najveći rasap vrijednosti identificiranih operacijskih taksonomskih jedinica. H vrijednosti iznosi 1,35, dok je p vrijednost jednaka 0,85, što potvrđuje statistički neznačajnu razliku alfa raznolikosti promatranih skupina ispitanika.



Slika 6. Dijagram ovisnosti alfa raznolikosti (*observed features*) o Covid-19 statusu ($p > 0,05$)

Iz dijagrama ovisnosti alfa raznolikosti o različitim alergijama (slika 7) možemo potvrditi da je preosjetljivost na određene antigene iz hrane ili okoliša povezana s manjom alfa raznolikosti crijevne mikrobiote. Najveća razina alfa raznolikosti identificirana je u ispitanika koji nemaju nikakve alergije. H vrijednost iznosi 12,54, dok je p vrijednost 0,48 te ju tumačimo kao statistički neznačajnu razliku ovisnosti alfa raznolikosti o postojećim alergijama ispitanika.



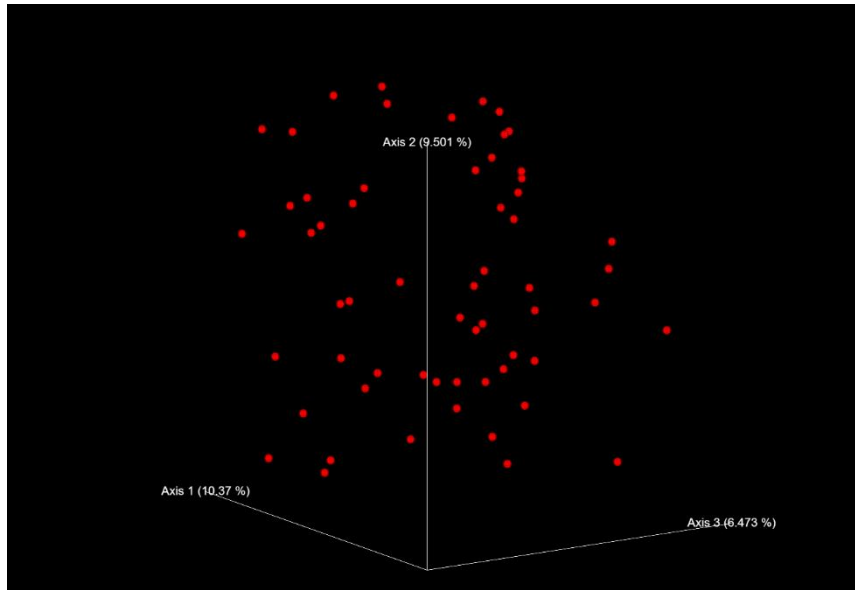
Slika 7. Dijagram ovisnosti alfa raznolikosti (*observed features*) o alergijama ($p > 0,05$)

Usporedbom p vrijednosti, ovisnost alfa raznolikosti o alergijama ($p = 0,48$) manje je značajna nego ovisnost alfa raznolikosti o spolu ($p = 0,27$), načinu prehrane ($p = 0,3$), zdravstvenom stanju ($p = 0,35$) i dobi ($p = 0,4$), no značajnija nego ovisnost o Covid-19 statusu ($p = 0,85$). Dakle, utjecaj na alfa raznolikost crijevne mikrobiote ispitanika raste promatrajući sljedeće čimbenike: Covid-19 status, alergije, dob, zdravstveno stanje, prehrana, spol. Svaki od čimbenika utjecaja ipak pokazuje statistički neznačajnu razliku ovisnosti alfa raznolikosti promatranih eksperimentalnih skupina.

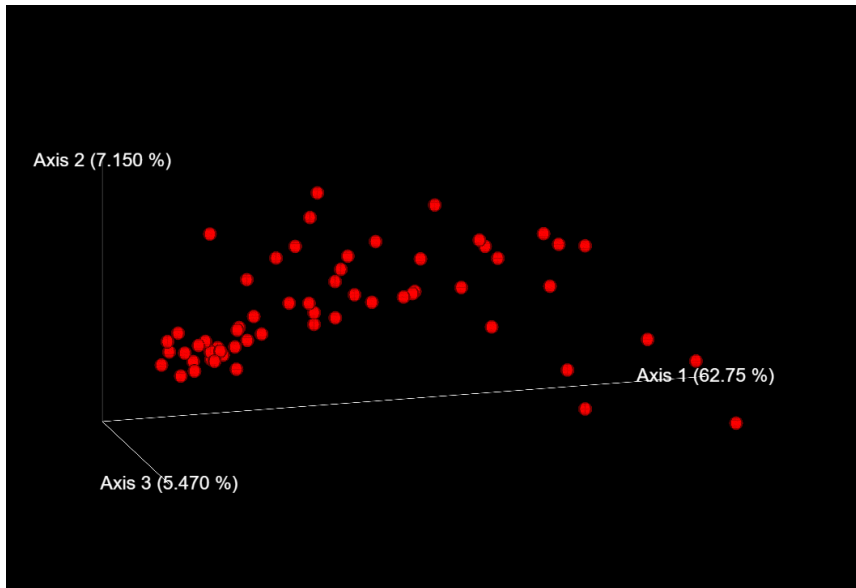
4.2. BETA RAZNOLIKOST

Beta raznolikost je mjera kojom uspoređujemo interpersonalnu raznolikost sastava crijevne mikrobiote. Međusobnu udaljenost, odnosno filogenetičku različitost sastava mikrobiote ispitanika moguće je odrediti UniFrac metrikom. Netežinska (engl. *unweighted*) UniFrac metrika je kvalitativna budući da uzima u obzir samo prisutnost (brojnost) zajedničkih taksonomskih skupina među uzorcima, dok je težinska (engl. *weighted*) kvantitativna jer promatra i sličnosti u relativnim zastupljenostima tih zajedničkih skupina. UniFrac metrikom određene udaljenosti valja prikazati u PCoA (engl. *Principal Coordinate Analysis*) trodimenzionalnom koordinatnom sustavu kako bismo jednostavno vizualizirali rezultate. Tako svaka točka predstavlja jedan analizirani uzorak crijevne mikrobiote, a veća udaljenost točki predstavlja veću beta raznolikost para uzoraka, i obrnuto.

Slika 8 prikazuje trodimenzionalni PCoA *Emperor plot* beta raznolikosti crijevne mikrobiote ispitanika dobiven netežinskom UniFrac metrikom. Vidljivo je da su uzorci razasuti po cijelom koordinatnom sustavu, što potvrđuje postojanje značajnih interpersonalnih varijacija obzirom na broj zajedničkih taksonomskih skupina crijevne mikrobiote, odnosno visoku razinu kvalitativne beta raznolikosti. Ukoliko u istom dijagramu promatramo ovisnost beta raznolikosti o spolu, dobi, načinu prehrane, zdravstvenom stanju, Covid-19 statusu ili alergijama, manju udaljenost točaka, odnosno veću sličnost uzoraka na razini kvalitativne beta raznolikosti možemo uočiti jedino promatrajući dobnu skupinu 50 – 59 godina (s iznimkom jednog ispitanika) te skupinu ispitanika koji nisu cijepljeni niti su preboljeli zarazu virusom SARS-CoV-2. Dakle, ispitanici pripadnici jedne od navedenih eksperimentalnih skupina međusobno dijele značajan broj istih taksonomskih skupina crijevne mikrobiote. Prisjetimo se da smo promatrajući alfa raznolikosti najmanje rasape vrijednosti uočili upravo kod tih dviju skupina.



Slika 8. PCoA dijagram beta raznolikosti određen netežinskom UniFrac metrikom



Slika 9. PCoA dijagram beta raznolikosti određen težinskom UniFrac metrikom

Slika 9 prikazuje trodimenzionalni *Emperor plot* beta raznolikosti crijevne mikrobiote dobiven težinskom UniFrac metrikom. Ovdje kvalitativno, ali i kvantitativno promatramo varijacije raznolikosti sastava crijevne mikrobiote kao i relativnih zastupljenosti zajedničkih taksonomskih skupina između pojedinih uzoraka. Sada je vidljiva i visoka razina kvantitativne beta raznolikosti među uzorcima. Manju beta raznolikost crijevne mikrobiote uočavamo u slučaju ispitanika dobne skupine 50 -59 godina te ispitanika koji nisu cijepljeni niti su preboljeli zarazu virusom SARS-CoV-2. Dakle, osim što ispitanici navedenih skupina imaju slične

vrijednosti alfa raznolikosti unutar skupina, one dijele značajan broj istih taksonomskih skupina te postoje sličnosti i u njihovim relativnim zastupljenostima.

Usporedimo li PCoA dijagrame na slikama 8 i 9, vidljivo je da su točke koordinatnog sustava manje udaljene ukoliko se promatra i kvantitativna beta raznolikost, odnosno može se zaključiti da se određeni mikroorganizam identificiran u više uzoraka u njima pojavljuje s usporedivom relativnom zastupljenošću.

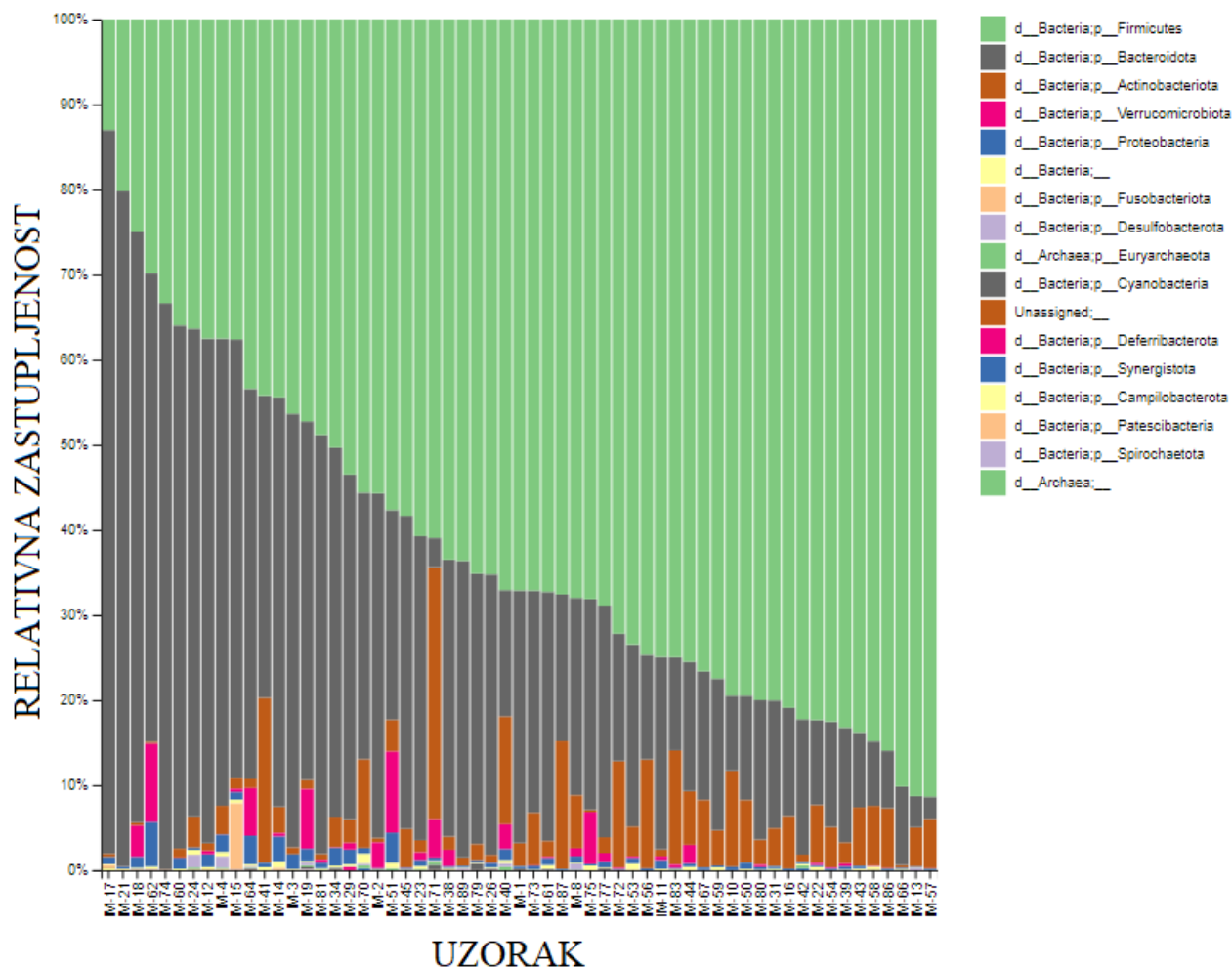
4.3. TAKSONOMSKI SASTAV

Obrada rezultata sekvenciranja QIIME 2 platformom također omogućava uvid u taksonomski sastav crijevne mikrobiote uzoraka do određene dubine, odnosno taksonomske razine, ovisno o kvaliteti provedenog eksperimentalnog rada - od uzorkovanja do sekvenciranja. Određivanje taksonomskog sastava otkriva koliko je kompleksna i jedinstvena te od kojih je specifičnih mikroorganizama, i s kojim udjelom istih, sastavljena crijevna mikrobiota svakog ispitanika. Taksonomski sastav crijevne mikrobiote na željenoj taksonomskoj razini u QIIME 2 View-u promatran je stupčastim dijagramima koji prikazuju relativne zastupljenosti (engl. *Relative Frequency*) mikroorganizama u postocima.

Najviša moguća razina promatranja taksonomskog sastava crijevne mikrobiote u QIIME 2 View-u je razina domene. Genomička analiza temeljena na 16S rRNA genima identificira organizme koji pripadaju domenama *Bacteria* i *Archaea*. Domena *Bacteria* je unutar analiziranih uzoraka prisutna od 99,586 % do 100 %. Dakle, relativna zastupljenost domene *Archaea* u uzorcima iznosi od 0 % do 0,414 % te nije dalje promatrana.

Sljedeća, niža taksonomska razina analize crijevne mikrobiote su bakterijska koljena. Slika 10 prikazuje stupčasti dijagram relativnih zastupljenosti bakterijskih koljena unutar pojedinih uzoraka (uzorci su imenovani IM-xy, gdje je xy nasumično pridružen broj, neovisan o rednom broju uzorka). Detektirano je ukupno 15 bakterijskih koljena od kojih 2 nisu identificirana, a koljena *Firmicutes* (13,006 % - 91,356 %), *Bacteroidota* (2,598 % - 85,025 %), *Actinobacteriota* (0 % - 29,628 %) te *Verrucomicrobiota* (0 % - 9,527 %) su najzastupljenija. Slijedi ih koljeno *Proteobacteria* (0 % - 5,228 %). Takav je poredak relativnih zastupljenosti zabilježen i u literaturi (Gacesa i sur., 2022; Qin i sur., 2010). Koljeno *Firmicutes* dominantno je zastupljeno (> 50 %) u većini uzoraka (> 72 % ispitanika), a slijedi ga koljeno *Bacteroidota* ili *Actinobacteriota*, ovisno o uzorku. U preostalim (> 27 %) ispitanika dominantno je koljeno *Bacteroidota*. Uzorak IM-15 možemo izdvojiti kao specifičan jer sadrži koljeno *Fusobacteriota* kao treće zastupljeno (7,729 %). Analizom ostalih uzoraka gotovo da i nije

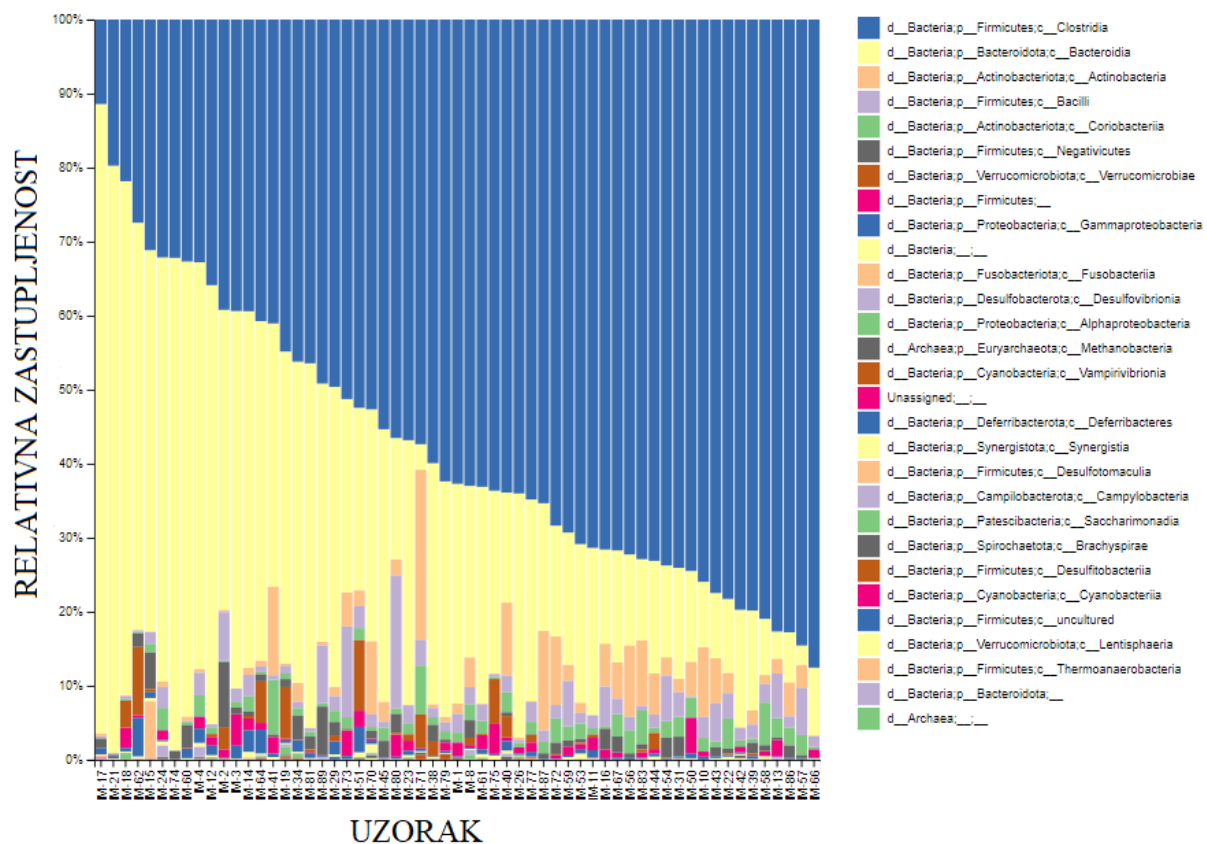
utvrđeno postojanje tog koljena (relativna zastupljenost < 0,3 % u samo 2 uzorka) povezanog s brojnim bolestima (npr. kolorektalnim karcinomom) (Kostic AD i sur., 2012). Povećan omjer koljena *Firmicutes* naspram *Bacteroidota* potencijalni je biomarker pretilosti (Magne i sur., 2020) te je prisutan u > 22 % ispitanika.



Slika 10. Dijagram relativnih zastupljenosti bakterijskih koljena crijevne mikrobiote

Slika 11 prikazuje stupčasti dijagram relativnih zastupljenosti bakterijskih razreda crijevne mikrobiote ispitanika. Detektirano ih je 27 od kojih 1 nije identificiran. Najzastupljeniji razredi su *Clostridia* (11,408 % - 87,557 %) koljena *Firmicutes*, *Bacteroidia* (2,598 % - 85,025 %) koljena *Bacteroidota*, *Actinobacteria* (0 % - 23,006 %) koljena *Actinobacteriota*, *Bacilli* (0 % - 17,932 %) koljena *Firmicutes*, *Coriobacteriia* (0 % - 7,402 %) koljena *Actinobacteriota*, *Negativicutes* (0 % - 8,805 %) koljena *Firmicutes*, *Verrucomicrobiae* (0 % - 9,527 %) koljena *Verrucomicrobiota*, neodređen razred koljena *Firmicutes* (0 % - 4,788 %), *Gammaproteobacteria* (0 % - 5,228%) koljena *Proteobacteria*. Ostala prisutna bakterijska koljena pojavljuju se u samo nekoliko uzoraka te s vrlo niskom relativnom zastupljenosti.

Uzorak IM-15 možemo izdvojiti kao specifičan jer sadrži razred *Fusobacteriia* koljena *Fusobacteriota* kao treći najzastupljeniji bakterijski s relativnom zastupljenosti od > 7 %.



Slika 11. Dijagram relativnih zastupljenosti bakterijskih razreda crijevne mikrobiote

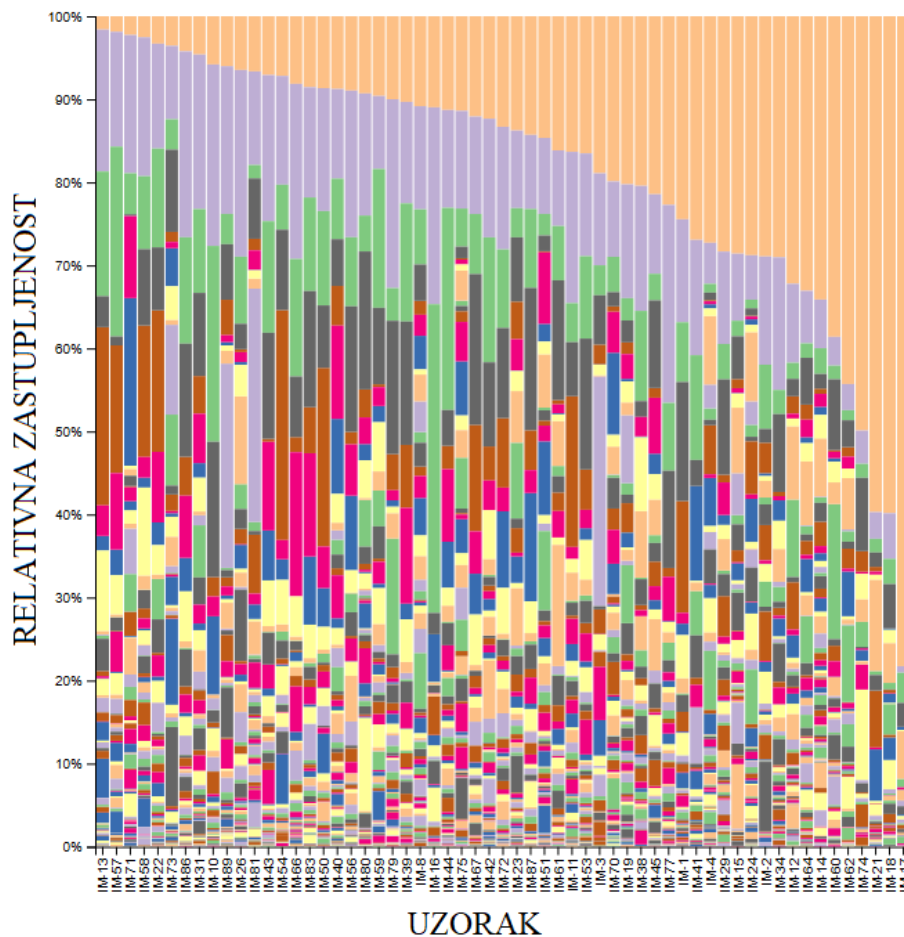
Nakon bakterijskih razreda promatramo relativne zastupljenosti 61 bakterijskog reda detektiranog u uzorcima fecesa ispitanika. Od toga ih 8 nije identificirano, a 1 je okarakteriziran kao nekultiviran. Relativnom zastupljenošću dominiraju sljedeći redovi bakterija: *Lachnospirales* razreda *Clostridia* (6,620 % - 67,355 %), *Bacteroidales* razreda *Bacteroidia* (2,573 % - 85,025 %), *Oscillospirales* razreda *Clostridia* (3,622 % - 38,202 %), red *Bifidobacteriales* razreda *Actinobacteria* (0 % - 20,198 %) prisutan u većine (> 50 %) uzoraka, red *Peptostreptococcales-Tissierellales* razreda *Clostridia* (0 % - 9,229 %, no većina uzoraka ovaj red sadrži udjelom < 2 %), *Coriobacteriales* razreda *Coriobacteriia* (0 % - 7,402%, no većina uzoraka ovaj red sadrži udjelom < 2 %), *Veillonellales-Selenomonadales* razreda *Negativicutes* (0 % - 8,805 %, no većina uzoraka ovaj red sadrži udjelom < 2 %), *Lactobacillales* razreda *Bacilli* (0 % - 16,148 %, no većina uzoraka ovaj red sadrži udjelom < 1 %), *Verrucomicrobiales* razreda *Verrucomicrobiae* (0 % - 9,527 %) koji je identificiran u < 40 % ukupnog broja uzoraka te se u tim uzorcima uglavnom pojavljuje s relativnom zastupljenosti < 2 %, red *Erysipelotrichales* razreda *Bacilli* identificiran je u svim uzorcima s

relativnom zastupljenosti < 6 %, no u većine uzoraka je prisutan udjelom < 1%. Sljedeći prepoznati bakterijski redovi su: *Christensenellales* razreda *Clostridia* prisutan u većine uzoraka (0 % - 7,082 %, no većina uzoraka ovaj red sadrži udjelom < 2 %), *Clostridiales* razreda *Clostridia* prisutan u većine uzoraka (0 % - 2,473 %), *Monoglobales* razreda *Clostridia* prisutan u većine uzoraka (0 % - 2,573%), *Clostridia* UCG-014 razreda *Clostridia* prisutan u većine uzoraka (0 % - 9,530 %), *Burkholderiales* razreda *Gammaproteobacteria* prisutan u većine uzoraka (0 % - 3,825 %). Uzorak IM-15 je specifičan jer red *Fusobacteriales* (razred *Fusobacteriia*) relativno zastupljen udjelom od 7,729 %.

Nakon bakterijskog reda, sljedeća razina na kojoj detaljnije možemo promatrati taksonomski sastav crijevne mikrobiote ispitanika je razina bakterijskih porodica. U 59 analiziranih uzoraka fecesa detektirano je 105 porodica od čega ih je 24 neidentificirano, a 3 su okarakterizirane kao nekultivirane. Dominantne porodice su: *Lachnospiraceae* reda *Lachnospirales* u većine uzoraka zastupljena > 30 % (6,620 % - 67,355 %), *Bacteroidaceae* reda *Bacteroidales* u većine uzoraka zastupljena > 10 % (1,609 % - 78,273 %), *Ruminococcaceae* reda *Oscillospirales* u većine uzoraka zastupljena > 15 % (2,945 % - 32,258 %), *Bifidobacteriaceae* reda *Bifidobacteriales* identificirana u većine (> 86 %) uzoraka (0 % - 20,198 %), *Rikenellaceae* reda *Bacteroidales* u većine uzoraka zastupljena < 2 % (0,099 % - 10,995 %), *Oscillospiraceae* reda *Oscillospirales* u većine uzoraka zastupljena < 3 % (0,205 % - 14,167 %), *Tannerellaceae* reda *Bacteroidales* u većine zastupljena < 2 % (0,282 % - 10,920 %), *Prevotellaceae* reda *Bacteroidales* identificirana u > 37 % uzoraka (0,104 % - 28,475 %), neidentificirana porodica reda *Bacteroidales* detektirana u svim uzorcima (0,047 % - 16,276 %), *Peptostreptococcaceae* reda *Peptostreptococcales-Tissierellales* u većine uzoraka zastupljena < 2 % (0 % - 5,173 %), *Coriobacteriaceae* reda *Coriobacteriales* detektirana u većine (> 74 %) uzoraka (0 % - 6,779 %), *Barnesiellaceae* reda *Bacteroidales* detektirana u većine (> 81 %) uzoraka (0 % - 8,651 %), *Verrucomicrobiaceae* reda *Verrucomicrobiales* detektirana u većine (> 59 %) uzoraka (0 % - 9,527 %), *Erysipelatoclostridiaceae* reda *Erysipelotrichales* (0,077 % - 5,933 %), *Veillonellaceae* reda *Veillonellales-Selenomonadales* detektirana u većine (> 76 %) uzoraka (0 % - 8,389 %).

Budući da taksonomska raznolikost crijevne mikrobiote nije dovoljno detaljno određena na razini bakterijskih vrsta koje su većinom okarakterizirane kao neidentificirane ili nekultivirane vrste, posljednja promatrana taksonomska razina su bakterijski rodovi. Možemo zaključiti da dubina sekvenciranja nije bila dovoljna za identifikaciju taksonomskog sastava na razini vrste i/ili su brojne sekvence važne za identifikaciju bakterijskih vrsta izgubljene tijekom brojnih

koraka bioinformatičke obrade podataka, što otežava karakterizaciju mikroorganizama. Ukupno je detektirano 200 rodova, od čega je čak 46 (23 %) bakterijskih rodova neidentificirano, a 15 (7,5 %) njih su okarakterizirani kao nekultivirani. Slika 12 prikazuje stupčasti dijagram relativnih zastupljenosti bakterijskih rodova crijevne mikrobiote unutar analiziranih uzoraka. Ponovno je vidljivo koliko je crijevna mikrobiota svakog ispitanika jedinstvena i kompleksna.



Slika 12. Dijagram relativnih zastupljenosti bakterijskih rodova crijevne mikrobiote ispitanika

Tablica 1 predstavlja popis ključnih (prisutnih u crijevnoj mikrobioti > 95 % ispitanika), najzastupljenijih bakterijskih rodova te raspone njihovih relativnih zastupljenosti u 59 analiziranih uzoraka. U slučaju neidentificiranog roda, u tablici je napisana najbliža identificirana taksonomska razina. Najviše dominantnih rodova pripada koljenu *Firmicutes*, a zatim *Bacteroidota*. Uočljivo je kako je sastav crijevne mikrobiote visoko varijabilan čak i u slučaju dominantnih rodova, npr. najzastupljeniji rod *Bacteroides* pojavljuje se u uzorcima zastupljen udjelom od 2 – 78 %.

Tablica 1. Najzastupljeniji bakterijski rodovi crijevne mikrobiote ispitanika

Bakterijski rod	Relativna zastupljenost (%)
<i>Bacteroides</i>	2 – 78
Neidentificiran (porodica <i>Lachnospiraceae</i>)	0,8 - 24
<i>Blautia</i>	1 – 37
<i>Faecalibacterium</i>	0 - 18
<i>Agathobacter</i>	0 - 28
<i>Ruminococcus</i> (porodica <i>Ruminococcaceae</i>)	0 - 17
<i>Bifidobacterium</i>	0 - 20
<i>Subdoligranulum</i>	0 -11
<i>Alistipes</i>	0 - 11
Neidentificiran (red <i>Bacteroidales</i>)	0 - 16
<i>Ruminococcus torques</i> (porodica <i>Lachnospiraceae</i>)	0 – 5
<i>Tannerella</i>	0 – 7
Neidentificiran (porodica <i>Peptostreptococcaceae</i>)	0 – 5
UCG-002	0 – 9
<i>Dorea</i>	0 – 4
<i>Roseburia</i>	0 – 15
<i>Collinsella</i>	0 – 7
<i>Barnesiella</i>	0 - 9
<i>Erysipelatoclostridium</i>	0 – 6
<i>Lachnospira</i>	0 – 6
Neidentificiran (koljeno <i>Firmicutes</i>)	0 – 4,8
<i>Parabacteroides</i>	0 – 10,9
<i>Christensenellaceae</i> (R-7)	0 – 7
<i>Colidextribacter</i>	0,2 – 3,8

Rod *Bacteroides* pozitivno korelira s općim zdravljem, važan je u imunološkoj obrani organizma te očuvanju crijevne mukoze, kao i u metabolizmu animalnih proteina i zasićenih masti te alkohola – visoko zastupljenih nutrijenata u prehrani Hrvata, no povećana zastupljenost prisutna je i u nekih bolesti. Također, rod se smatra visoko nasljeđivim (Gacesa i sur., 2022). Prema rezultatima, rod je najmanje zastupljen u ispitanika dobne skupine 50 –

59 godina, u skladu s literaturom (Van Tongeren i sur., 2005), te u vegetarijanaca. Kontradiktorno, u vegana nije uočena manja zastupljenost ovog roda. Veća zastupljenost uočena je i u slučaju ispitanika s celijakijom te sindromom iritabilnog crijeva. Nešto veća zastupljenost i u slučaju ispitanika s ulceroznim kolitisom potvrđuje dosadašnje spoznaje (Mar i sur., 2016).

Neidentificirani rod porodice *Lachnospiraceae*, kojoj pripadaju mnoge probiotičke bakterije i proizvođači SCFA, najmanje je zastupljen u slučaju ispitanika s celijakijom te onog sa sindromom iritabilnog crijeva.

Bakterijski rod *Blautia* također pripada porodici *Lachnospiraceae*. Važan je u metabolizmu ugljikohidrata u koje ubrajamo i prehrambena vlakna. Najveća zastupljenost prisutna je u ispitanika oboljelog od depresije, što nije u skladu s recentnim istraživanjima koje ovaj rod predstavljaju kao negativno koreliran s takvim zdravstvenim stanjem (Zhong i sur., 2022). Poprilično niska zastupljenost prisutna je u ispitanika oboljelog od celijakije, što može biti rezultat smanjenog unosa proizvoda od žitarica s glutenom. Značajan broj ispitanika sa smanjenom zastupljenosti ovog roda izjasnilo se da ima alergiju na pelud.

Četvrti najzastupljeniji bakterijski rod crijevne mikrobiote ispitanika je *Faecalibacterium*. Pokazatelj je dobrog zdravlja, ima važnu ulogu u metabolizmu ugljikohidrata, prehrambenih vlakana, zaštiti crijevne barijere, imunosnoj obrani organizma te pripada butirat-producirajućim bakterijskim rodovima. Kod brojnih je bolesti uočena njegova manja zastupljenost (Gacesa i sur., 2022). Također, otkrivena je anti-upalna molekula kao produkt metabolizma bakterije *Faecalibacterium prausnitzii* (Mohajeri i sur., 2018). Manja relativna zastupljenost ovog roda uočena je u oboljelih od celijakije, sindroma iritabilnog crijeva, ulceroznog kolitisa i depresije. Potonje nije u skladu s recentnim istraživanjima (Zhong i sur., 2022).

Sljedeći po zastupljenosti, rod *Agathobacter* (po staroj nomenklaturi – *Eubacterium*) je butirat-producirajući, u metabolizmu ugljikohidrata i vlakana važan rod. Smanjena zastupljenost u istraživanjima je objašnjena postojanjem bolesti (Gacesa i sur., 2022). Najmanje relativne zastupljenosti utvrđene su analizom uzoraka fecesa ispitanika dobi 50 – 59 godina.

Rod *Ruminococcus* također je butirat-producirajući te sudjeluje u zaštiti crijevne barijere i metabolizmu prehrambenih vlakana. Utvrđena je niska nasljedivost ovog roda čije određene vrste pozitivno koreliraju s općim zdravljem. Neke vrste pozitivno koreliraju s pušenjem, unosom alkohola, ugljikohidrata i proteina. Neke vrste su patogene, a utvrđena je i povećana

zastupljenost ovog roda u nekih bolesti (npr. sindroma iritabilnog crijeva) (Gacesa i sur., 2022). Rezultatima je utvrđena manja relativna zastupljenost ovog roda u ispitanika oboljelog od celijakije, ali i u brojnih zdravih ispitanika. Ispitanik sa sindromom iritabilnog crijeva nema zastupljen ovaj rod u crijevnoj mikrobioti.

Sljedeći po zastupljenosti je rod *Bifidobacterium*, jedan od najčešćih probiotičkih, SCFA- i laktat-producirajućih bakterijskih rodova s ulogom u zaštiti crijevne barijere, zaštiti od upale i patogena, prevenciji srčanih oštećenja, metabolizmu prehrambenih vlakana i dugovječnosti. Brojne bolesti opisane su smanjenom zastupljenosti ovog roda u crijevnoj mikrobioti, kao i prehrana s visokim udjelom masti (Gacesa i sur., 2022). Također, istraživanja ističu manju zastupljenost roda u starijih osoba (Van Tongeren i sur., 2005). Rezultati ne potvrđuju utjecaj dobi na relativnu zastupljenost ovog roda. Također, u mikrobioti mnogih vegetarijanaca i vegana rod nije detektiran, kao ni u uzorku ispitanika oboljelog od celijakije. Vrlo niska zastupljenost roda u osoba s alergijom na mlijeko i mliječne proizvode potvrđuje njegovu ulogu u metabolizmu mlijeka.

Bakterijski rod *Subdoligranulum* sljedeći je po zastupljenosti. Istraživanja su potvrdila pozitivnu korelaciju zastupljenosti roda s unosom biljnih proteina i negativnu korelaciju zastupljenosti roda s mnogim bolestima te ga svrstala na popis rodova pokazatelja dobrog općeg zdravlja (Gacesa i sur., 2022). Rezultati ne ukazuju na veće zastupljenosti roda u mikrobioti ispitanika vegetarijanaca i vegana. Također, relativna zastupljenost ovog roda nije smanjena u oboljelih, s iznimkom ispitanika oboljelog od depresije te oboljelog od sindroma iritabilnog crijeva, kod kojih su detektirane najmanje vrijednosti.

Rod *Alistipes* poznat je po svom nepoželjnom djelovanju u slučaju povećane zastupljenosti te ima potencijalnu ulogu u etiologiji bolesti. Pri niskim relativnim zastupljenostima, rod je pokazatelj dobrog općeg zdravlja (Gacesa i sur., 2022). Također, sudjeluje u metabolizmu masti i proteina. Rezultatima nije potvrđena pozitivna korelacija relativne zastupljenosti ovog roda i depresije (Zhong i sur., 2022) niti je u ispitanika s povećanom zastupljenosti utvrđeno narušeno zdravlje.

Rod *Prevotella* sljedeći je najzastupljeniji (čak do 28 % ukupne mikroflore pojedinih ispitanika), no nije svrstan u tablicu 1 kao ključan rod mikrobiote Hrvata budući da je prisutan u < 32 % uzoraka. Novija istraživanja navode ovaj bakterijski rod crijevne mikrobiote kao novootkriveni (Alemida i sur., 2019). *Prevotella copri* je biomarker dobrog općeg zdravlja, negativno korelira s brojnim bolestima, proizvođač je SCFA te sudjeluje u metabolizmu

ugljikohidrata (Gacesa i sur., 2022). Prema rezultatima, pojavnost, ali i relativna zastupljenost roda je veća u crijevnoj mikrobioti ispitanika muškog roda. Rod je pretežno zastupljen u osoba dobi 40 – 49 godina, a slijedi ih dobna skupina 30 – 39 godina. Način prehrane i zdravstveno stanje nisu pokazali bitan utjecaj na zastupljenost roda *Prevotella*.

Preostali dominantni rodovi (i vrsta *Ruminococcus torques* koja negativno korelira s općim zdravljem te pozitivno s pušenjem, unosom alkohola te animalnih proteina, kao i dijabetesom tipa 2 (Gacesa i sur., 2022)) crijevne mikrobiote hrvatske populacije povezani su s bolestima usne šupljine (rod *Tannerella* čija je jedina kultivabilna vrsta *Tannerella forsythia* (Vartoukian i sur., 2016)) (Nagarajan i sur., 2018), općim zdravljem, proizvodnjom SCFA te unosom alkohola i animalnih proteina (rod *Dorea* najmanje je zastupljen unutar ispitanika 18 – 29 godina te nije prisutan u mikrobioti ispitanika sa sindromom iritabilnog crijeva, što potvrđuje literaturu koja ističe rod kao negativno koreliran s brojnim bolestima (Gacesa i sur., 2022)), zatim rod povezan s metabolizmom ugljikohidrata, proteina, proizvodnjom butirata (rod *Roseburia*, najmanje zastupljen unutar dobne skupine 30 – 39 godina). Rod *Collinsella* smatra se visoko nasljedivim (Gacesa i sur., 2022), a u rezultatima je češće detektiran u ispitanika muškog spola. Okarakteriziran kao nekultiviran, rod iz porodice *Verrucomicrobiaceae* nije ključan bakterijski rod crijevne mikrobiote Hrvata budući da se pojavljuje u crijevnoj mikrobioti < 55 % ispitanika, iako značajnim udjelom do 10 % ukupne mikroflore ispitanika, a najmanje je prisutan unutar dobne skupine 50 – 59 godina te u ispitanika s određenim dijagnozama. Rod *Barnesiella* pozitivno korelira s općim zdravljem i unosom proteina. Rod *Erysipelatoclostridium* pokazao je najveću relativnu zastupljenost u crijevnoj mikrobioti ispitanika koji su preboljeli zarazu virusom SARS-CoV-2 i/ili su cijepljeni. Bakterijski rod *Lachnospira* sudjeluje u metabolizmu vlakana te, prema rezultatima, nije detektiran u oboljelih od celijakije, depresije te sindroma iritabilnog crijeva. Vrste roda *Parabacteroides* istražene su kao visoko nasljedive (Gacesa i sur., 2022).

Osim ključnih, od bakterijskih rodova utvrđenog blagotvornog djelovanja na zdravlje čovjeka, analizom je utvrđena prisutnost probiotičkog, nasljednog roda *Streptococcus* (relativna zastupljenost < 5 % unutar pojedinih uzoraka), butirat-producirajućeg roda *Butyricoccus* (relativna zastupljenost < 2,5 %), probiotičkog roda *Lactobacillus* (detektiran u > 22 % ispitanika sa zanemarivom relativnom zastupljenosti), i drugih. Nasljedni rod izrazito blagotvornog djelovanja te utjecaja na bolji metabolički profil, rod *Akkermansia*, nije detektiran u mikrobioti ispitanika.

Patogene vrste roda *Clostridia* u istraživanjima su povezane s visokim unosom ugljikohidrata, no u našim uzorcima rod nije detektiran značajnom zastupljenosti. Patogeni rod identificiran kao *Escherichia-Shigella* prisutan je u mikrobioti > 35 % ispitanika relativno zastupljen < 1,5 %. Rod *Pseudomonas* indikator je upale i proizvođač toksina te je u većine ispitanika identificiran s relativnom zastupljenosti < 0,2 %.

5. ZAKLJUČCI

1. Na razini alfa raznolikosti crijevne mikrobiote hrvatske populacije velika je heterogenost uzoraka te ni jedan od promatranih čimbenika nije pokazao statistički značajnu razliku alfa raznolikosti u ovisnosti o promatranim čimbenicima skupine ispitanika. Utjecaj na alfa raznolikost raste promatrajući sljedeće čimbenike: Covid-19 status, alergije, dob, zdravstveno stanje, prehrana, spol. Utvrđena je visoka razina kvalitativne i kvantitativne beta raznolikosti crijevne mikrobiote ispitanika, osim u slučaju ispitanika jedne od eksperimentalnih skupina: 50 – 59 godina, nisu cijepljeni niti su preboljeli zarazu virusom SARS-CoV-2.

2. Jedinstvenost i kompleksnost crijevne mikrobiote potvrđena je i taksonomskim sastavom. U 59 uzoraka identificirano je 13 bakterijskih koljena, 26 razreda, 53 redova, 78 porodica te 139 rodova. Potencijalni biomarker pretilosti - povećan omjer koljena *Firmicutes* naspram *Bacteroidota* prisutan je u > 22 % ispitanika. Sastav crijevne mikrobiote visoko je varijabilan čak i u slučaju dominantnih rodova čija je funkcija uglavnom povezana s dobrim zdravljem, imunosnom obranom, očuvanjem crijevne mukoze, metabolizmom ugljikohidrata, prehrambenih vlakana, animalnih proteina i zasićenih masti te alkohola, kao i proizvodnjom kratkolančanih masnih kiselina. Takav sastav mikrobiote odraz je načina prehrane hrvatske populacije. Detektirani nasljedni rodovi su: *Bacteroides*, *Collinsella*, *Parabacteroides*.

3. Disbioza crijevne mikrobiote uglavnom je prisutna u osoba narušenog zdravlja i osoba dobne skupine 50 - 59 godina. Potencijalno patogeni rodovi nisu detektirani značajnom relativnom zastupljenosti. Mikrobiota ispitanika s određenim dijagnozama odlikuje povećanom zastupljenosti bakterijskog roda *Bacteroides* te smanjenom zastupljenosti rodova *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Dorea* i *Lachnospira*, što ih čini potencijalnom metom dijagnostike i liječenja. Rod *Erysipelatoclostridium* pokazuje povezanost s infekcijom virusom SARS-CoV-2 budući da je njegova povećana zastupljenost uočena u ispitanika koji su razvili imunosni odgovor na virus.

4. U budućnosti je potrebno provesti opsežnija istraživanja gastrointestinalne mikrobiote hrvatske populacije obzirom na veći broj čimbenika te na razini svih mikroorganizama i njihovih genskih produkata kroz analize metatranskriptoma i metaboloma (metaproteoma) s ciljem razvoja terapeutika i personalizirane medicine te identifikacije novih mikrobnih vrsta. Također, obrada rezultata sekvenciranja različitim bioinformatičkim platformama može omogućiti veći broj identificiranih rodova na više taksonomskih razina.

6. LITERATURA

Aagard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J (2014) The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* **6**, 237–265. doi: 10.1126/scitranslmed.3008599

Aguirre M, Jonkers DM, Troost FJ, Roeselers G, Venema K (2014) In vitro characterization of the impact of different substrates on metabolite production, energy extraction and composition of gut microbiota from lean and obese subjects. *PLoS One* **9(11)**, e113864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113864>

Almeida A, Mitchell LA, Boland M, Forster CS, Gloor BG, Tarkowska A, i sur. (2019) A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature* **568**, 499-504. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0965-1>

Bäckhed F, Fraser CM, Ringel Y, Sanders ME, Sartor RB, Sherman PM i sur. (2012) Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host Microbe* **12(5)**, 611–22. doi: 10.1016/j.chom.2012.10.012

Bailey MT, Lubach GR, Coe CL (2004) Prenatal stress alters bacterial colonization of the gut in infant monkeys. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **38(4)**, 414–421. doi: 10.1097/00005176-200404000-00009

Barko PC, McMichael MA, Swanson KS, Williams DA (2018) The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *J Vet Intern Med* **32**, 9-25. <https://doi.org/10.1111/jvim.14875>

Barwell LJ, Isaac NJ, Kunin WE (2015) Measuring beta-diversity with species abundance data. *J Anim Ecol* **84(4)**, 1112–22. doi: 10.1111/1365-2656.12362

Bezirtzoglou E (1997) The intestinal microflora during the first weeks of life. *Anaerobe* **3(2–3)**, 173–177. <https://doi.org/10.1006/anae.1997.0102>

Bharti R, Grimm DG (2021) Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis. *Brief Bioinform* **22**, 178-193. doi: 10.1093/bib/bbz155

Biagi E, Franceschi C, Rampelli S, Severgnini M, Ostan R, Turrioni S i sur. (2016) Gut Microbiota and Extreme Longevity. *Curr Biol* **26**, 1480–1485. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.04.016>

Bienenstock J, Kunze W, Forsythe P (2015) Microbiota and the gut-brain axis. *Nutr Rev* **73**, 28–31. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv019>

Björkstén B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M (2001) Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* **108(4)**, 516–20. doi: 10.1067/mai.2001.118130

Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA i sur. (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol* **37**, 852–857. doi:10.1038/s41587-019-0209-9

Bull MJ, Plummer NT (2014) Part 1: The human gut microbiome in health and disease. *Integr Med (Encinitas)* **13(6)**, 17–22. PMID: 26770121

Candela M, Biagi E, Maccaferri S, Turrioni S, Brigidi P (2012) Intestinal microbiota is a plastic factor responding to environmental changes. *Trends Microbiol* **20**, 385–391. doi: 10.1016/j.tim.2012.05.003

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK i sur. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* **7(5)**, 335-6. doi: 10.1038/nmeth.f.303

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ i sur. (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci* **108 (Suppl 1)**, 4516–4522. doi:10.1073/pnas.1000080107

Carmody RN, Turnbaugh PJ (2014) Host-microbial interactions in the metabolism of therapeutic and diet-derived xenobiotics. *J Clin Invest* **124**, 4173–4181. doi: 10.1172/JCI72335

Carruthers LV, Moses A, Adriko M, Faust CL, Tukahebwa EM, Hall LJ i sur. (2019) The impact of storage conditions on human stool 16S rRNA microbiome composition and diversity. *PeerJ* **7**, e8133. doi:10.7717/peerj.8133

Choi HH, Cho Y-S (2016) Fecal microbiota transplantation: Current applications, effectiveness, and future perspectives. *Clin Endosc* **49(3)**, 257–65. doi: 10.5946/ce.2015.117

Choo MJ, Leong LE, Rogers GB (2015) Sample storage conditions significantly influence faecal microbiome profiles. *Sci Rep* **5**, 1-10. doi: 10.1038/srep16350

Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S i sur. (2012) Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* **488**, 178–184. <https://doi.org/10.1038/nature11319>

Clarridge JE (2004) Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* **17**, 840–862. doi:10.1128/CMR.17.4.840-862.2004

Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y i sur. (2014) Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* **42**, D633– D642. doi:10.1093/nar/gkt1244

Collado MC, Rautava S, Isolauri E, Salminen S (2015) Gut microbiota: A source of novel tools to reduce the risk of human disease? *Pediatr Res* **77(1-2)**, 182–88. doi: 10.1038/pr.2014.173

Cox LM, Blaser MJ (2013) Pathways in microbe-induced obesity. *Cell Metab* **17(6)**, 883–894. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.004>

Cresci GA, Bawden E (2015) The Gut Microbiome: What we do and don't know. *Nutr Clin Pract* **30(6)**, 734-746. doi: [10.1177/0884533615609899](https://doi.org/10.1177/0884533615609899)

Dao MC, Everard A, Aron-Wisnewsky J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO i sur. (2016) *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity. Relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut* **65**, 426–436. doi:10.1136/gutjnl-2014-308778

DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K i sur. (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* **72**, 5069–5072. doi:10.1128/AEM.03006-05

DiGiulio DB (2012) Diversity of microbes in amniotic fluid. *Semin Fetal Neonatal Med* **17**, 2–11. doi: 10.1016/j.siny.2011.10.001

Donia MS, Fischbach MA (2015) Small molecules from the human microbiota. *Science* **349**, 1254766. doi: 10.1126/science.1254766

Duchêne S, Holt KE, Weill FX, Le Hello S, Hawkey J, Edwards DJ i sur. (2016) Genome-scale rates of evolutionary change in bacteria. *Microb Genom* **2**, e000094. doi:10.1099/mgen.0.000094

Durack J, Lynch SV (2018) The Gut microbiome: Relationships with disease and opportunities for therapy. *J Exp Med* **216**, 20-40. <https://doi.org/10.1084/jem.20180448>

Evans JM, Morris LS, Marchesi JR (2013) The gut microbiome: the role of a virtual organ in the endocrinology of the host. *J Endocrinol* **218(3)**, R37–47. doi: 10.1530/JOE-13-0131

Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB i sur. (2013) Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci* **110**, 9066–9071. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219451110>

Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, Subramanian S, Seedorf H, Goodman AL i sur. (2013) The long-term stability of the European Journal of Nutrition. *Science* **341(6141)**, 1237439. <https://doi.org/10.1126/science.1237439>

Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, Liu C, Henley KE, Wolcott RD i sur. (2010) Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe* **16**, 444–453. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.06.008>

Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R, White BA (2008) Polysaccharide utilization by gut bacteria: Potential for new insights from genomic analysis. *Nat Rev Microbiol* **6**, 121–131. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1817>

Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH (2012) The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **9(10)**, 577–589. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.156>

Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH (2012) The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **9**(10), 577–589. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.156>

Forster CS, Kumar N, Anonye OB, Almeida A, Viciani E, Stares DM, i sur. (2019) A human gut bacterial genome and culture collection for improved metagenomic analyses. *Nat Biotechnol* **37**, 186-192. <https://doi.org/10.1038/s41587-018-0009-7>

Fujimura KE, Sitarik AR, Havstad S, Lin DL, Levan S, Fadrosch D i sur. (2016) Neonatal gut microbiota associates with childhood multisensitized atopy and T cell differentiation. *Nat Med* **22**, 1187–1191. <https://doi.org/10.1038/nm.4176>

Fung TC, Olson CA, Hsiao EY (2017) Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat Neurosci* **20**, 145–155. <https://doi.org/10.1038/nn.4476>

Gacesa R, Kurilshikov A, Vila AV, Sinha T, Klaassen MAY, Bolte LA, i sur. (2022) Environmental factors shaping the gut microbiome in a Dutch population. *Nature* **604**, 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04567-7>

Galloway-Peña J, Hanson B (2020) Tools for Analysis of the Microbiome. *Dig Dis Sci* **65**, 674–685. doi:10.1007/s10620-020-06091-y

Ganda E, Beck KL, Haiminen N, Silverman JD, Kawas B, Cronk BD i sur. (2021) DNA extraction and host depletion methods significantly impact and potentially bias bacterial detection in a biological fluid. *Msystems* **6**, e0061921. doi:10.1128/mSystems.00619-21

Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, Vázquez-Baeza Y, Van Treuren W, Ren B i sur. (2014) The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn’s disease. *Cell Host Microbe* **15**, 382–392. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.005>

Gibson GR, Scott KP, Rastall RA, Tuohy KM, Hotchkiss A, Dubert-Ferrandon A i sur. (2011) Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Sci Technol Bull: Funct Foods* **7**, 1–19. doi:10.1616/1476-2137.15880

Gloor GB, Macklaim JM, Pawlowsky-Glahn V, Egozcue JJ (2017) Microbiome datasets are compositional: and this is not optional. *Front Microbiol* **8**, 2224. doi:10.3389/fmicb.2017.02224

Green GL, Brostoff J, Hudspith B, Michael M, Mylonaki M, Rayment N i sur. (2006) Molecular characterization of the bacteria adherent to human colorectal mucosa. *J Appl Microbiol* **100**, 460–469. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02783.x

Guo CJ, Chang FY, Wyche TP, Backus KM, Acker TM, Funabashi M i sur. (2017) Discovery of reactive microbiota-derived metabolites that inhibit host proteases. *Cell* **168**, 517–526. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.021>

Guo F, Zhang T (2013) Biases during DNA extraction of activated sludge samples revealed by high throughput sequencing. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 4607–4616. doi:10.1007/s00253-012-4244-4

Hall M, Beiko RG (2018) 16S rRNA Gene Analysis with QIIME 2. *Methods Mol Biol* **1849**, 113-129. doi: 10.1007/978-1-4939-8728-3_8

Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ (2008) Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* **27(2)**, 104–119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x>

Henderson G, Cox F, Kittelmann S, Miri VH, Zethof M, Noel SJ i sur. (2013) Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. *PLoS One* **8**, e74787. doi:10.1371/journal.pone.0074787

Hollister EB, Riehle K, Luna RA, Weidler EM, Rubio-Gonzales M, Mistretta TA i sur. (2015) Structure and function of the healthy pre-adolescent pediatric gut microbiome. *Microbiome* **3**, 36. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0101-x>

Huurre A, Kalliomäki M, Rautava S, Rinne M, Salminen S, Isolauri E (2008) Mode of delivery – Effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology* **93(4)**, 236–40. doi: 10.1159/000111102

Illumina Inc. (2017) An introduction to Next-Generation Sequencing Technology. <https://www.illumina.com/content/dam/illumina->

[marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf](https://www.illumina.com/marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf). Pristupljeno 17. siječnja 2023.

Illumina Inc. (2023) 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. https://emea.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf. Pristupljeno 17. siječnja 2023.

Imhann F, Bonder MJ, Vich Vila A, Fu J, Mujagic Z, Vork L i sur. (2016) Proton pump inhibitors affect the gut microbiome. *Gut* **65(5)**, 740–748. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310376>

Jiménez E, Fernández L, Marín ML, Martín J, Odriozola JM, Nueno-Palop C i sur. (2005) Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol* **51**, 270–274. doi: 10.1007/s00284-005-0020-3

Kelly CJ, Zheng L, Campbell EL, Saeedi B, Scholz CC, Bayless AJ i sur. (2015) Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function. *Cell Host Microbe* **17**, 662–671. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.03.005>

Kim MH, Kang SG, Park JH, Yanagisawa M, Kim CH (2013) Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. *Gastroenterology* **145(2)**, 396–406 e391–310. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.04.056>

Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, Spor A, Laitinen K, Backhed HK i sur. (2012) Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell* **150**, 470–480. doi: 10.1016/j.cell.2012.07.008

Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, Michaud M, Duke F, Earl AM i sur. (2012) Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res* **22(2)**, 292–298. doi: 10.1101/gr.126573.111

Kuczynski J, Lauber CL, Walters WA, Parfrey LW, Clemente JC, Gevers D i sur. (2011) Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat Rev Genet* **13(1)**, 47–58. doi: 10.1038/nrg3129

Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, Oshima T, Toh H, Toyoda A i sur. (2007) Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res* **14**, 169–181. doi: 10.1093/dnares/dsm018

Lamas B, Richard ML, Leducq V, Pham HP, Michel ML, Da Costa G i sur. (2016) CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat Med* **22**, 598–605. <https://doi.org/10.1038/nm.4102>

Leviatan S, Shoer S, Rothschild D, Gorodetski M, Segal E (2022) An expanded reference map of the human gut microbiome reveals hundreds of previously unknown species. *Nat Commun* **13**, 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31502-1>

Li SS, Zhu A, Benes V, Costea PI, Hercog R, Hildebrand F i sur. (2016) Durable coexistence of donor and recipient strains after fecal microbiota transplantation. *Science* **352**, 586–589. doi: 10.1126/science.aad8852

Lloyd-Price J, Mahurkar A, Rahnavard G, Crabtree J, Orvis J, Hall AB i sur. (2017) Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature* **550**, 61–66. <https://doi.org/10.1038/nature23889>

Loftus M, Al-Deen Hassouneh S, Yooseph S (2021) Bacterial associations in the healthy human gut microbiome across populations. *Sci Rep* **11**, 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82449-0>

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

Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pessoa S, Navarrete P, i sur. (2020) The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients?. *Nutrients* **12**, 1-17. <https://doi.org/10.3390/nu12051474>

Mao D-P, Zhou Q, Chen C-Y, Quan Z-X (2012) Coverage evaluation of universal bacterial primers using the metagenomic datasets. *BMC Microbiol* **12**, 66. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-66>

Mar JS, LaMere BJ, Lin DL, Levan S, Nazareth M, Mahadevan U i sur. (2016) Disease severity and immune activity relate to distinct interkingdom gut microbiome states in ethnically distinct Ulcerative Colitis patients. *MBio* **7**, e01072-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01072-16>

Mardis ER (2008) The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet* **24**, 133-41. doi: 10.1016/j.tig.2007.12.007

Marizzoni M, Gurry T, Provasi S, Greub G, Lopizzo N, Ribaldi F, i sur. (2020) Comparison of Bioinformatics Pipelines and Operating Systems for the Analyses of 16S rRNA Gene Amplicon Sequences in Human Fecal Samples. *Front Microbiol* **11**, 1262. doi: 10.3389/fmicb.2020.01262

Maukonen J, Simões C, Saarela M (2012) The currently used commercial DNA-extraction methods give different results of clostridial and actinobacterial populations derived from human fecal samples. *FEMS Microbiol Ecol* **79**, 697–708. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01257.x

McMurdie PJ, Holmes S (2013) phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* **8(4)**, e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217

Mohajeri HM, Brummer JMR, Rastall AR, Weersma KR, Harmsen JMH, Faas M, i sur. (2018) The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. *Eur J Nutr* **57**, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1703-4>

Nagarajan M, Prabhu RV, Kamalakkannan R (2018) Chapter 9 - Metagenomics: Implications in Oral Health and Disease. *Metagenomics* **179-195**. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102268-9.00009-4>

Nakazato T, Ohta T, Bono H (2013) Experimental design-based functional mining and characterization of high-throughput sequencing data in the sequence read archive. *PLoS One* **8(10)**, e77910. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077910>

Neu J, Rushing J (2011) Cesarean versus vaginal delivery: Long-term infant outcomes and the hygiene hypothesis. *Clin Perinatol* **38(2)**, 321–31. doi: [10.1016/j.clp.2011.03.008](https://doi.org/10.1016/j.clp.2011.03.008)

Nyangale EP, Mottram DS, Gibson GR (2012) Gut microbial activity, implications for health and disease: the potential role of metabolite analysis. *J Proteome Res* **11(12)**, 5573–5585. <https://doi.org/10.1021/pr300637d>

Odamaki T, Kato K, Sugahara H, Hashikura N, Takahashi S, Xiao JZ i sur. (2016) Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol* **16**, 90. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0708-5>

Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, Franke A i sur. (2012) Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* **336(6080)**, 489-93. doi: 10.1126/science.1219328

Ouwehand AC, Salminen S, Arvola T, Ruuska T, Isolauri E (2004) Microbiota composition of the intestinal mucosa: Association with fecal microbiota?. *Microbiol Immunol* **48**, 497–500. doi: 10.1111/j.1348-0421.2004.tb03544.x

Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GM, Schütte A i sur. (2014) The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev* **260(1)**, 8-20. doi: 10.1111/imr.12182

Peppercorn MA, Goldman P (1972) The role of intestinal bacteria in the metabolism of salicylazosulfapyridine. *J Pharm Exp Ther* **181**, 555–562. PMID: 4402374

Polz MF, Cavanaugh CM (1998) Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3724–3730. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.10.3724-3730.1998>

Pop M (2012) We are what we eat: how the diet of infants affects their gut microbiome. *Genome Biology* **13**, 152. doi: 10.1186/gb-2012-13-4-152

Portune KJ, Beaumont M, Davila A-M, Tomé D, Blachier F, Sanz Y (2016) Gut microbiota role in dietary protein metabolism and health-related outcomes: The two sides of the coin. *Trends Food Sci Technol* **57**, 213–232. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.08.011>

QIIME 2 (2022) Overview of QIIME 2 Plugin Workflows. <https://qiime2.org/>. Pristupljeno 10. siječnja 2023.

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. doi: 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 webbased tools. *Nucleic Acids Res* **41**, D590–D596. doi:10.1093/nar/gks1219

Quévrain E, Maubert MA, Michon C, Chain F, Marquant R, Tailhades J i sur. (2016) Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* **65**, 415–425. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307649>

Ramirez-Farias C, Slezak K, Fuller Z, Duncan A, Holtrop G, Louis P (2009) Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *Br J Nutr* **101(4)**, 541–550. <https://doi.org/10.1017/S0007114508019880>

Rogall T, Wolters J, Flohr T, Bottge, EC (1990) Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Int J Syst Bacteriol* **40**, 323– 330. doi: 10.1099/00207713-40-4-323

Salazar N, Arboleya S, Valdés L, Stanton C, Ross P, Ruiz L i sur. (2014) The human intestinal microbiome at extreme ages of life. *Frontiers in Genetics* **5**, 1–9. doi: [10.3389/fgene.2014.00406](https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00406)

Salonen A, Nikkilä J, Jalanka-Tuovinen J, Immonen O, Rajilić Stojanović M, Kekkonen RA i sur. (2010) Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *J Microbiol Methods* **81**, 127–134. doi:10.1016/j.mimet.2010.02.007

Sampson TR, Mazmanian SK (2015) Control of brain development, function, and behavior by the microbiome. *Cell Host Microbe* **17(5)**, 565–576. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.011>

Sarbini SR, Rastall RA (2011) Prebiotics: metabolism, structure, and function. *Funct Food Rev* **3**, 93–106. <https://doi.org/10.2310/6180.2011.00004>

Scheperjans F (2016) Gut microbiota, 1013 new pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Curr Opin Neurol* **29(6)**, 773–80. doi: [10.1097/WCO.0000000000000389](https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000389)

Schloss PD, Handelsman J (2004) Status of the microbial census. *Microbiol Mol Biol Rev* **68(4)**, 686–91. doi: [10.1128/MMBR.68.4.686-691.2004](https://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.686-691.2004)

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB i sur. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **75(23)**, 7537-41. doi: [10.1128/AEM.01541-09](https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09)

Sidhu M, van der Poorten D (2017) The gut microbiome. *Aust Fam Physician* **46(4)**, 206-211. PMID: 28376573

Silvester N, Alako B, Amid C, Cerdeño-Tarrága A, Clarke L, Cleland I i sur. (2017) The european nucleotide archive in 2017. *Nucleic Acids Res* **46**, D36–D40. doi: [10.1093/nar/gkx1125](https://doi.org/10.1093/nar/gkx1125)

Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ i sur. (2008) Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci* **105**, 16731–16736. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>

Sommer F, Backhed F (2015) The gut microbiota engages different signaling pathways to induce Duox2 expression in the ileum and colon epithelium. *Mucosal Immunol* **8**, 372–379. doi: [10.1038/mi.2014.74](https://doi.org/10.1038/mi.2014.74)

Sousa T, Paterson R, Moore V, Carlsson A, Abrahamsson B, Basit AW (2008) The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. *Int J Pharm* **363**, 1–25. doi: [10.1016/j.ijpharm.2008.07.009](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.009)

Strati F, Cavalieri D, Albanese D, De Felice C, Donati C, Hayek J i sur. (2017) New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. *Microbiome* **5**, 24. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0242-1>

Tap J, Cools-Portier S, Pavan S, Druésne A, Öhman L, Törnblom H i sur. (2019) Effects of the long-term storage of human fecal microbiota samples collected in RNA later. *Sci Rep* **9**, 601. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36953-5>

The Human Microbiome Project Consortium (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**, 207-214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>

Thomas V, Clark J, Dore J (2015) Fecal Microbiota analysis: an overview of sample collection methods and sequencing strategies. *Future Microbiol* **10**, 1485-1504. doi: 10.2217/fmb.15.87

Ticinesi A, Milani C, Lauretani F, Nouvenne A, Mancabelli L, Lugli GA i sur. (2017) Gut microbiota composition is associated with polypharmacy in elderly hospitalized patients. *Sci Rep* **7**, 11102. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10734-y>

Topping DL, Clifton PM (2001) Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* **81**, 1031–64. doi: 10.1152/physrev.2001.81.3.1031

Tseng CH, Wu CY (2019) The gut microbiome in obesity. *Journal of the Formosan Medical Association* **118**, 53-59. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.07.009>

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

Van Baarlen P, Troost F, van der Meer C, Hooiveld G, Boekschoten M, Brummer RJ i sur. (2011) Human mucosal in vivo transcriptome responses to three lactobacilli indicate how probiotics may modulate human cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci* **108(Suppl 1)**, 4562–4569. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000079107>

Van Tongeren SP, Slaets JPJ, Harmsen HKM, Welling GW (2005) Fecal microbiota composition and frailty. *Appl Environ Microbiol* **71**, 6438–6442. doi: 10.1128/AEM.71.10.6438-6442.2005

Vartoukian SR, Moazzez RV, Paster BJ, Dewhirst FE, Wade WG (2016) First Cultivation of Health-Associated *Tannerella* sp. HOT-286 (BU063). *J Dent Res* **95(11)**, 1308-1313. doi: 10.1177/0022034516651078

Verbeke KA, Boobis AR, Chiodini A, Edwards CA, Franck A, Kleerebezem M i sur. (2015) Towards microbial fermentation metabolites as markers for health benefits of prebiotics. *Nutr Res Rev* **28(1)**, 42–66. <https://doi.org/10.1017/S0954422415000037>

Vetrovsky T, Baldrian P (2013) The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One* **8(2)**, e57923. doi: 10.1371/journal.pone.0057923

Walker AW, Lawley TD (2013) Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. *Pharmacol Res* **69**, 75–86. doi: 10.1016/j.phrs.2012.09.008

Walker AW, Martin JC, Scott P, Parkhill J, Flint HJ, Scott P (2015) 16S rRNA gene-based profiling of the human infant gut microbiota is strongly influenced by sample processing and PCR primer choice. *Microbiome* **3**, 26. doi:10.1186/s40168-015-0087-4

Walters WA, Xu Z, Knight R (2014) Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Lett* **588**, 4223–4233. doi: 10.1016/j.febslet.2014.09.039

Weinroth MD, Belk AD, Dean C, Noyes N, Dittoe DK, Rothrock MJ i sur. (2022) Considerations and best practices in animal science 16S ribosomal RNA gene sequencing microbiome studies. *J Anim Sci* **100(2)**, 1-18. doi: 10.1093/jas/skab346

Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, Schultz PG, Lesley SA, Peters EC i sur. (2009) Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci* **106**, 3698–3703. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812874106>

Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA i sur. (2011) Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* **334**, 105–108. doi: [10.1126/science.1208344](https://doi.org/10.1126/science.1208344)

Wu HJ, Wu E (2012) The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes* **3(1)**, 4–14. <https://doi.org/10.4161/gmic.19320>

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

Yong VB (2017) The Role of the Microbiome in Human Health and Disease: An Introduction for Clinicians. *BMJ* **356**, j831. <https://doi.org/10.1136/bmj.j831>

Zhong QI, Chen JJ, Wang Y, Shao WH, Zhou CJ, Xie Peng (2022) Differential Gut Microbiota Compositions Related With the Severity of Major Depressive Disorder. *Front Cell Infect Microbiol* **12**, 2235-2988. doi: 10.3389/fcimb.2022.907239

Zoetendal EG, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Ben-Amor K, Akkermans ADL, de Vos WM (2002) Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3401– 3407. doi: 10.1128/AEM.68.7.3401-3407.2002

Zupancic ML, Cantarel BL, Liu Z, Drabek EF, Ryan KA, Cirimotich S i sur. (2012) Analysis of the Gut Microbiota in the Old Order Amish and Its Relation to the Metabolic Syndrome. *PLoS ONE* **7**, e43052. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043052>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja BRUNA KRNETA 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