

Istraživanje utjecaja suplementacije prebiotika na sastav mikrobioma sportaša

Renko, Ira

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:159:648853>

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, rujan 2023.

Ira Renko

**ISTRAŽIVANJE UTJECAJA
SUPLEMENTACIJE PREBIOTIKA
NA SASTAV MIKROBIOMA
SPORTAŠA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za bioinformatiku na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Antonia Starčevića, te uz pomoć izv. prof. dr. sc. Jurice Žučka, dr.sc. Damira Orosa i bacc.inf. Pabla Romàna- Escrivà (Sveučilište u Valenciji)

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

ISTRAŽIVANJE UTJECAJA SUPLEMENTACIJE PREBIOTIKA NA SASTAV MIKROBIOMA SPORTAŠA

Ira Renko, univ.bacc.ing.techn.aliment
0058209153

Sažetak: Crijevna mikrobiota dinamičan je sustav, podložan promjenama pod utjecajem vanjskih i unutarnjih čimbenika. Ima važnu ulogu u zdravlju domaćina jer je putem krvi povezana sa svim dijelovima organizma. U ovom radu analiziran je utjecaj konzumacije prebiotika u periodu od četiri tjedna na sastav mikrobioma košarkaša. Genetički materijal izoliran je iz uzoraka fecesa 18 ispitanika pri čemu je polovica ispitanika predstavljala kontrolnu skupinu. Rezultati sekvenciranja obrađeni su QIIME2 računalnim alatom i prikazani na taksonomskim razinama domena, koljeno, razred, red, porodica, rod i vrsta. ANCOM analiza pokazala je kako na taksonomskim razinama roda i vrste postoji statistički značajna razlika između sportaša koji su konzumirali prebiotike i koji ih nisu konzumirali. Izračunom alfa i beta raznolikosti utvrđeno je kako ne postoji statistički značajna razlika između sportaša koji su konzumirali prebiotike i koji ih nisu konzumirali. Međutim, ustanovljena je statistički značajna razlika među svim ispitanicima, bez obzira na konzumaciju prebiotika.

Gljučne riječi: *analiza crijevne mikrobiote, mikrobiota, bioinformatička analiza, prebiotici, taksonomija.*

Rad sadrži: 44 stranica, 11 slika, 80 literaturnih navoda, 4 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
Damir Oros, dr.sc.

Pablo Romàn- Escrivà, bacc.inf. (Sveučilište u Valenciji)

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof.dr.sc. Anita Slavica (predsjednik)
2. prof.dr.sc. Antonio Starčević (mentor)
3. prof.dr.sc. Igor Slivac (član)
4. izv.prof.dr.sc. Jurica Žučko (zamjenski član)

Datum obrane: 05, rujan 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

RESEARCH OF THE INFLUENCE OF PREBIOTIC SUPPLEMENTATION ON THE MICROBIAL COMPOSITION OF ATHLETES

Ira Renko, univ. bacc. ing. techn. aliment
0058209153

Abstract: Intestinal microbiota is a dynamic system, subjected to changes under the influence of external and internal factors. It plays an important role in the host's health because it is connected to all parts of the body through the blood. This thesis analyses the influence of the consumption of prebiotics in a period of four weeks on the microbial composition of basketball players. Genetic material was isolated from the feces samples of 18 subjects, half of which represented the control group. Sequencing results were processed with the QIIME2 computer tool and displayed at the taxonomic levels of domain, genus, class, order, family, genus and species. ANCOM analysis showed that at the taxonomic levels of genus and species, there is a statistically significant difference between athletes who consumed prebiotics, and those who did not. By calculating the alpha and beta diversity, no statistically significant difference between athletes who consumed prebiotics and those who did not was found. However, there is a statistically significant difference among all respondents regardless of the prebiotics consumption.

Keywords: *intestinal microbiota analysis, microbiota, bioinformatics analysis, prebiotics, taxonomy.*

Thesis contains: 44 pages, 11 figures, 80 references, 4 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

Pablo, Romàn- Escrivà, BSc (University of Valencia)

Reviewers:

1. Anita Slavica, PhD, Full professor (president)
2. Antonio Starčević, PhD, Full professor (mentor)
3. Igor Slivac, PhD, Full professor (member)
4. Jurica Žučko, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: September 5th, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. MIKROBIOTA GASTROINTESTINALNOG TRAKTA	2
2.1.1. Parametri koji utječu na sastav gastrointestinalne mikrobiote	3
2.1.2. Utjecaj prebiotika na sastav gastrointestinalne mikrobiote	5
2.1.3. Dominantne vrste bakterija humanog gastrointestinalnog trakta	6
2.1.4. Utjecaj gastrointestinalne mikrobiote na cjelokupno zdravlje domaćina	7
2.2. ANALIZA GASTROINTESTINALNE MIKROBIOTE	8
2.2.1. Priprema uzoraka i izolacija genetskog materijala	8
2.2.2. Sekvenciranje nove generacije u istraživanju gastrointestinalne mikrobiote	9
2.2.3. Bioinformatička analiza	10
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. MATERIJALI	13
3.2. UZORAK ISTRAŽIVANJA	14
3.3. SUPLEMENTACIJA	14
3.4. METODE	15
3.4.1. Izolacija DNA	15
3.4.2. Fluorometrijsko određivanje koncentracije DNA mikrobne kulture u uzorcima	16
3.4.3. Sekvenciranje uzoraka i obrada rezultata	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1. REZULTATI	18
4.1.1. Analiza rezultata pojedinih mikrobnih vrsta u uzorcima	18
4.1.2. Analiza rezultata ANCOM testa	28
4.1.3. Analiza rezultata alfa i beta raznolikosti	30
4.2. RASPRAVA	33
5. ZAKLJUČCI	36
6. LITERATURA	37
PRILOZI	

1. UVOD

Ljudska mikrobiota je heterogena zajednica s više od 4 milijuna različitih mikroorganizama. Najveći broj se nalazi u gastrointestinalnom (GI) sustavu, u crijevima zbog optimalnih uvjeta za rast. Od ukupno prisutnih mikroorganizama, dvije trećine čine bakterije koje se mogu taksonomski klasificirati prema jedinicama domena, koljeno, razred, red, porodica, rod i vrsta (Wegierska i sur., 2022; Qin i sur., 2010; O'Hara i Shanahan, 2006).

Njihova zastupljenost i sastav ovise o više čimbenika koji započinju oblikovanje crijevne mikrobiote već po rođenju. Način prehrane, stil života, konzumacija antibiotika, prebiotika ili drugih dodataka prehrani neki su od faktora koji utječu na održavanje optimalnog stanja crijevne mikrobiote (Zhang, 2022; Guerin-Derumaux i sur., 2019, Rodríguez i sur., 2015). Na prisutne mikrobne vrste ne utječu samo vanjski čimbenici već i komunikacija među vrstama u crijevima i izmjena metabolita. U tom kontekstu govorimo o crijevnom mikrobiomu, a ne mikrobioti jer on uključuje ne samo prisutne mikrobne vrste već i njihovu aktivnost, sve mobilne genetičke elemente i metabolite koje ti mikroorganizmi proizvode (Markus i sur., 2023; Lederberg i McCray, 2001). Metaboliti bakterija GI sustava krvlju dopiru do svih dijelova tijela i tako utječu na cjelokupno zdravlje domaćina. Zbog velikog interesa za istraživanjem povezanosti crijevne mikrobiote i prevencije/progresije bolesti, počele su se razvijati metode za analizu sastava crijevne mikrobiote (Illumina, 2015; Jandhyala, 2015).

Prvotne metode analize crijevne mikrobiote temeljile su se na kultivaciji. Međutim, nedavno su se razvile brojne tehnike neovisne o kulturi, uglavnom metode temeljene na PCR-u, za kvalitativnu i kvantitativnu identifikaciju mikroorganizama. Jedna od najefikasnijih metoda je 16S rRNA sekvenciranje kojoj je primjena porasla zbog podjednake zastupljenosti 16S gena među bakterijama, zbog čega je jednostavno pratiti zastupljenosti između vrsta. Razvojem bioinformatičkih alata kao što je QIIME2 omogućena je analiza dobivenih podataka sekvenciranja, a dodacima implementiranim u softver utvrđivanje postojanje različitosti unutar uzoraka i između uzoraka (Wills, 2019; Caporaso i sur., 2010; Bray i Curtis, 1957).

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi postojanje razlike u sastavu crijevne mikrobiote između ispitanika koji su konzumirali prebiotike i koji nisu. U tu svrhu su na uzorku od 18 ispitanika prikupljeni u periodu od četiri tjedna uzorci fecesa iz kojih je eksperimentalnim putem izoliran genetički materijal. Izolirana DNA je potom sekvencirana i provedena je bioinformatička analize QIIME2 računalnim alatom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MIKROBIOTA GASTROINTESTINALNOG TRAKTA

Mikrobiota predstavlja zajednicu živih mikroorganizama koji su prisutni u određenom okolišu (Marchesi i Ravel, 2015). U kontekstu ljudskog organizma, može se reći kako svaki dio tijela ima vlastitu mikrobiotu i predstavlja značajno različitu ekološku nišu (Kennedy i Chang, 2020). U ljudskom organizmu, mikroorganizmi su prisutni na koži, u respiratornom, gastrointestinalnom i ženskom reproduktivnom sustavu. Zbog različitih okolišnih uvjeta pojedinih sustava, ljudska mikrobiota je vrlo heterogena i različita između pojedinih niša. Ispostavilo se kako je sličniji mikrobni sastav gastrointestinalnog sustava dvojice pojedinaca, negoli kože i gastrointestinalnog sustava iste jedinice (Kennedy i Chang, 2020).

S više od 4 milijuna različitih vrsta, u gastrointestinalnom sustavu obitava najveći dio mikroorganizama (Wegierska i sur., 2022). Dvije trećine prisutnih mikroorganizama čine bakterije zbog čega se prilikom osvrtnja na gastrointestinalnu mikrobiotu komentiraju uglavnom bakterije, a ne u tolikoj mjeri pripadnici eukariota i *Archaea*. Od početnog do završnog dijela gastrointestinalnog (GI) trakta smanjuje se razina kisika, debljina sluzi varira, a pH opada u želucu i raste distalno od tamo zbog čega se u istom smjeru GI trakta povećava mikrobna raznolikost i zastupljenost (Kennedy i Chang, 2020).

Najveći broj bakterija GI trakta, zahvaljujući optimalnim okolišnim uvjetima kao što su anaerobno okruženje, debljina mukusa (sluzi), razina žučne kiseline i sporo vrijeme prolaska hrane, najviše je prisutan u debelom crijevu ($10^{10} - 10^{13}$ CFU/ml) (Qin i sur., 2010; O'Hara i Shanahan, 2006). Sporo vrijeme prolaska hrane kroz debelo crijevo omogućuje bakterijama dovoljno vremena za razmnožavanje i kolonizaciju. Osim toga, debelo crijevo pruža niz različitih niša u kojima mogu obitavati različite mikrobne zajednice.

Taksonomski, bakterije gastrointestinalnog trakta mogu se okarakterizirati prema jedinicama koljeno, razred, red, porodica, rod, vrsta. Najdominantnija koljena su *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* i *Verrucomicrobia*, pri čemu koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* predstavljaju više od 90 % od crijevne mikrobiote.

Za normalno funkcioniranje cjelokupnog ljudskog organizma neophodna je mješovita i bogata mikrobna zajednica. Niz znanstvenih istraživanja potvrdio je međusobnu povezanost sastava crijevnog mikrobioma i zdravstvenog stanja domaćina (Afzaal i sur., 2022; Liu i sur., Tenchov, 2022).

U tome kontekstu neophodno je gledati ne samo mikroorganizme, odnosno mikrobiotu određene niše, već i interakciju između njih, metabolite koje proizvode, odnosno mikrobiom. U literaturi se navodi više definicija mikrobioma, no svima je zajedničko da pojam mikrobiom ne uključuje samo mikrobnu zajednicu na nekom prostoru, odnosno mikrobiotu. On uključuje njihovu aktivnost, sve mobilne genetičke elemente, metabolite koje ti mikroorganizmi proizvode (signalne molekule, toksine i druge molekule) i njihove strukturne elemente (nukleinske kiseline, protein, lipide, polisaharide) (Lederberg i McCray, 2001; Whipps i sur., 1988). Izmjena tih metabolita uzajamnim prihranjivanjem (eng. cross feeding) može se odvijati između mikroorganizama i domaćina, ali i između samih mikroorganizama međusobno, a ključna je za uspostavljanje stabilnog crijevnog mikrobioma, otpornog na promjene vanjskih uvjeta i patogene. Primjerice, *Bifidobacterium* vrste proizvode laktat kao krajnji produkt metabolizma koje druge vrste mogu konvertirati u kratkolančane masne kiseline izmjenom metabolita. Osim toga, navedeni metaboliti mogu sniziti crijevni pH, što može inhibirati rast patogena, a vjeruje se da utječe na obogaćivanje sastava mikrobne zajednice (Besten i sur., 2013). Neki od metabolita, kao što su vitamini, neophodni su domaćinu jer ih ne može samostalno sintetizirati. Jedan od primjera je vitamin B12 koji je nužan za prevenciju kardiovaskularnih i neuroloških poremećaja, stvaranje crvenih krvnih stanica i normalno funkcioniranje živčanog sustava, a proizvodi ga *Lactobacillus* kao sekundarni metabolit (Kumari i sur., 2021.; Nielsen i sur., 2012).

Drugi vrlo važan mehanizam za komunikaciju među mikroorganizmima GI trakta uključuje signalne molekule, a naziva se stanično signaliziranje (eng. quorum sensing). Neke bakterije otpuštaju signalne molekule i time prenose informacije o okolišu u kojem se nalaze drugim pripadnicima njihove vrste, ali i drugim vrstama bakterija. Inhibicija ovog mehanizma komunikacije pokazala se uzročnikom disbioze (poremećaja ravnoteže crijevne mikroflore). Quorum sensingom bakterijske vrste reguliraju ekspresiju gena, odnosno mikrobnu aktivnost na temelju njihove rasprostranjenosti i zastupljenosti (Markus i sur., 2023).

2.1.1. Parametri koji utječu na sastav gastrointestinalne mikrobiote

Na rasprostranjenost i sastav crijevne mikroflore utječe više čimbenika koji se mogu podijeliti na uvjete prvih godina života i vanjske čimbenike.

Ljudski organizam stječe mikrobiotu po rođenju te se ona može modificirati u prve tri godine života pod utjecajem vanjskih čimbenika nakon čega postaje uglavnom stabilna (Rodríguez i sur., 2015). Brojna istraživanja pokazala su kako već način i vrijeme poroda, utječe na

raznolikost mikrobiote. Primjerice, prijevremeno rođena djeca pokazala su nisku mikrobnu raznolikost i visoki rizik od kolonizacije patogenim bakterijama kao što su *Enterobacteriaceae* i smanjene razine *Bifidobacterium* vrsta koje imaju važnu ulogu u formiranju i održavanju imunskog sustava domaćina (Arbolea i sur., 2012; Butel i sur., 2007). Formiranju raznolikog i stabilnog crijevnog mikrobioma djeteta doprinosi i način ishrane u prvim mjesecima života. Majčino mlijeko osim što je izvor nutrijenata, sadrži i probiotike i prebiotike koji utječu na kolonizaciju djetetovog crijevnog mikrobioma uzajamnim prihranjivanjem (eng. cross-feeding) putem kratkolančanih masnih kiselina (Li i sur., 2022). Zanimljivo je kako neke kliničke studije ističu važnost uvjeta za vrijeme trudnoće na budući crijevni mikrobiom djeteta. Naime, bakterijski metaboliti majčinog probavnog sustava prenose se na fetus krvlju preko placente i pripremaju njegov imunski sustav i crijeva na kolonizaciju bakterijama nakon rođenja (Miko i sur., 2022). Potrebno je spomenuti kako i genetika ima utjecaj na crijevni mikrobiom u smislu sličnosti sastava među članovima uže obitelji (npr. između sestara), no njezin utjecaj postaje nevažan promjenom okoline (Xie i sur., 2016). S tim je usko povezan utjecaj sredine, odnosno mjesta obitavanja na crijevni mikrobiom. Crijevni mikrobiom ljudi koji žive u ruralnom području pokazao se znatno drugačijim od onih koji žive u gradu. Ali tu se dovode u vezu zapravo drugi čimbenici koji mijenjaju crijevni mikrobiom kao što su kvaliteta hrane, izloženost stresu, manjak zelenih površina i kontakta s životinjama te fizička aktivnost. Ako se uzme u obzir utjecaj geografske pripadnosti na sastav crijevne mikrobiote, evidentno je kako je sastav drugačiji kod ljudi koji žive na različitim kontinentima.

Crijevna mikrobiota se nastavlja razvijati i nakon djetinjstva, a tu najveći utjecaj imaju način prehrane i uvjeti života. Generalno, prehrana koja se temelji na visokom unosu namirnica biljnog podrijetla i vlakana te smanjenom unosu procesirane hrane povezuje se s raznolikim i uravnoteženim crijevnim mikrobiomom (Zhang, 2022). Za prehranu koja se temelji na namirnicama biljnog podrijetla karakterističan je visoki udio *Bacteroidetes* vrsta koje pretežno koriste ugljikohidrate kao supstrat. S druge strane, prehrana namirnicama animalnog podrijetla povezuje se s povećanim udjelom *Firmicutes* vrsta čiji su supstrati proteini i masti (Rosas-Plaza i sur., 2022, Jain i sur., 2018; Gupta i sur., 2017). Čak i kratkoročne promjene režima prehrane pokazale su utjecaj na promjenu sastava crijevne mikrobiote. Osim tipa prehrane, na sastav crijevnog mikrobioma utječe i konzumacija dodataka prehrani. Konzumacija nekih vitamina u velikim dozama pokazala je pozitivan utjecaj na uspostavljanje stanja normobioze (normalne ravnoteže različitih vrsta mikroorganizama u crijevima) kroz održavanje i povećanje mikrobne raznolikosti (vitamini A, B2, B3, C, K) ili neizravno moduliranjem imunskog odgovora crijeva (vitamini A i D) (Markus i sur., 2023; Pham i sur., 2021). Pregledom

literaturnih podataka evidentno je kako na uspostavljanje stanja normobioze veliki utjecaj ima primjena probiotičkih pripravaka. Uglavnom se radi o sojevima *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* koji pozitivno djeluju na sastav kroz proizvodnju kratkolančanih masnih kiselina (SCF-a) i sekreciju mukusa, smanjivanje propusnosti crijeva, stimuliranje proizvodnje IgA protutijela i povećanje broja makrofaga i dendritičkih stanica u lamini propriji (Wang i sur., 2021).

Primjena antibiotika ima dvojaku ulogu. Dok s jedne strane uništava patogene bakterije, uništava sve prisutne poželjne mikrobne vrste i dovodi crijevni mikrobiom u dugotrajno stanje disbioze (Jernberg i sur., 2007).

Osim antibiotika, stres ima izrazito negativan utjecaj na crijevni mikrobiom. Međuodnos crijeva i stresa se ostvaruje kroz neurotransmitere i hormone. Također, stres utječe na propusnost i pokretljivost crijeva, apsorpciju hranjivih tvari i lučenje citokina koji reguliraju odgovor imunskog sustava (Oligschlaeger i sur., 2019; Mittal i sur., 2017).

Iznenaduje činjenica kako preintenzivna fizička aktivnost ima sličan efekt na crijevni mikrobiom kao izlaganje stresu. Istraživanje na miševima pokazalo je kako je kod miševa koji su se bavili umjerenom i redovitom fizičkom aktivnošću u odnosu na one koje nisu zamijećena povišena razina imunoglobulina A (IgA) te smanjeni broj B i T-CD4 stanica što sugerira da umjerena fizička aktivnost jača mikrobiotu i time doprinosi zaštiti od infekcija (Pant i sur., 2020; Matsumoto i sur., 2008). No, u slučaju preintenzivne fizičke aktivnosti zamijećen je obrnuti učinak. Povećan je oksidativni stres i propusnost crijeva, zamijećene su povišene razine *Haemophilus* vrsta koje potiču rast patogena te su smanjene *Bacteroides* vrste za 69 % u odnosu na period prije intenzivne fizičke aktivnosti (Wegierska i sur., 2022; Grosicki i sur., 2019).

2.1.2. Utjecaj prebiotika na sastav gastrointestinalne mikrobiote

Kao jedan od najvažnijih vanjskih čimbenika koji utječe na održavanje homeostaze crijevne mikrobiote ističu se prehrambena vlakna. Zbog svojeg sastava (mogu biti topljiva, ali i netopljiva) nije ih moguće razgraditi ili apsorbirati u gornjim dijelovima GI trakta zbog čega se fermentiraju u nižim dijelovima (Umu i sur., 2017).

Prebiotici su subgrupa topljivih prehrambenih vlakna čija je glavna karakteristika selektivna stimulacija rasta i/ili aktivnosti crijevnih bakterija (Gibson i sur., 2004). U neke od najučestalije korištenih prebiotika ubrajaju se inulin, fruktooligosaharidi, galaktooligosaharidi i oligosaharidi majčinog mlijeka. Još uvijek nije poznato da li prebiotici stimuliraju ili bi trebali stimulirati samo jednu bakterijsku vrstu ili određeni broj vrsta, ali je potvrđeno kako

povećavaju aktivnost i zastupljenost *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* vrsta (Wang i sur., 2020). Proizvođači laktat, acetat, kratkolančane masne kiseline (uglavnom butirat, acetat i propionat) određene bakterijske vrste uzajamnim prihranjivanjem stimuliraju rast drugih benefičijalnih bakterija gastrointestinalnog trakta (Umu i sur., 2017). Primjerice, fermentacijom prebiotičkog vlakna komercijalnog imena "Nutriose" (ROQUETTE) bakterijske vrste *Lactobacillus* proizvode kratkolančane masne kiseline i time snižavaju pH crijeva te smanjuju zastupljenost patogenih vrsta *Clostridium perfringens* (Guerin-Derumaux, 2019).

2.1.3. Dominantne vrste bakterija humanog gastrointestinalnog trakta

Humani gastrointestinalni trakt predstavlja dinamičan heterogeni sustav čiji se sastav značajno razlikuje u sustavu i zastupljenosti od početnog do završnog dijela. Najmanji broj bakterija GI trakta se nalazi u želucu zbog izrazito kiselog pH okruženja, a najzastupljenije vrste su *Lactobacillus*, *Candida*, *Streptococcus* i *Helicobacter pylori*.

Zbog povoljnog pH okruženja najveći broj bakterija GI trakta obitava u crijevima i gotovo sve su obligatni anaerobi jer sav dostupan kisik koristi *E.coli*. Prosječni pojedinac sadrži oko 150 bakterijskih i dvije *Archaea* vrsta u crijevima koje se mogu grupirati u 8 koljena, 23 razreda, 38 redova, 18 porodica, 59 rodova i 109 vrsta (King i sur., 2019). Prema Američkom nacionalnom institutu za zdravlje (eng. US National Institutes of Health, NIH) u ljudskim je crijevima detektirano oko 2,000 vrsta i više od 500 je klasificirano u 12 koljena od kojih je 93,5 % pripadalo koljenu *Pseudomonadota* (*Proteobacteria*), dok su ostala dominantna koljena bila *Actinomycetota* (sinonim *Actinobacteria*), *Bacteroidota* (sinonim *Bacteroidetes*) i *Bacillota* (sinonim *Firmicutes*). Druga znanstvena istraživanja kao najdominantnija bakterijska koljena ispitivanih uzoraka ističu *Firmicutes* i *Bacteroidetes* (Wegierska i sur., 2022; King i sur., 2019). Na nižim taksonomskim razinama, kao dominantni razredi izdvajaju su *Clostridia* (20,3 %), zatim *Bacteroidia* (18,5 %) i redovi *Bifidobacteriales* (16,6 %), *Enterobacterales* (14 %) i *Lactobacillales* (14 %). Na razini roda, koljeno *Firmicutes* se raščlanjuje na više od 200 različitih rodova kao što su *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* i *Ruminococcus*. Rod *Clostridium* predstavlja 95 % *Firmicutes* koljena. *Bacteroidetes* se uglavnom sastoji od rodova kao što su *Bacteroides* i *Prevotella* koji su uz *Firmicutes* najdominantniji bakterijski rodovi. Koljeno *Actinobacteria* načelno je manje zastupljeno i sačinjeno je pretežito od bakterija roda *Bifidobacterium* (King i sur., 2019; Arumugam i sur., 2011). Osim navedenih ističu se rodovi *Faecalibacterium*, *Blautia* i *Clostridium*. Teško je izdvojiti najdominantniju bakterijsku vrstu na razini cijele populacije. Najveći broj

okarakteriziranih vrsta pripada rodu *Blautia*, dok najveći broj vrsta zastupljenih u svim uzorcima vrsti rodova *Faecalibacterium* i *Bifidobacterium*, primjerice *Bifidobacterium longum* (Piquer-Esteban i sur., 2021; King i sur, 2019).

2.1.4. Utjecaj gastrointestinalne mikrobiote na cjelokupno zdravlje domaćina

Spomenute bakterijske vrste u crijevima komuniciraju s ostalim organima putem metabolita koji krvlju dopiru do svih dijelova tijela te na taj način utječu na razvoj i prevenciju nekih od najučestalijih bolesti modernog društva kao što su kardiovaskularne bolesti, dijabetes, demencija, rak, depresija i upalne bolesti crijeva (Afzaal i sur., 2022). Može se reći kako crijevni mikrobiom ima svojevrsnu funkciju endokrinog organa. Od navedenih bolesti, najviše fascinira utjecaj kvalitete mikroflore crijeva na poremećaje centralnog živčanog sustava poput anksioznosti, depresije, shizofrenije i autizma. Bakterijske vrste poput *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* proizvode Gamma aminobutiričnu kiselinu (GABA) koja vezom crijeva mozak vagus živcem signalizira centralnom živčanom sustavu ako se gastrointestinalni sustav nalazi u stanju disbioze ili eubioze (optimalnog stanja crijevne mikrobiote) (Tenchov, 2022). Ispitivanjem učinkovitosti probiotika na depresiju pokazalo se kako probiotici imaju pozitivan učinak na redukciju simptoma depresije u odnosu na placebo skupinu (Zhang i sur., 2023). Kod dojenčadi, zamijećeno je kako se *Bifidobacterium* fermentacijom mliječnih oligosaharida smanjuje rizik od razvoja alergije, infekcije mokraćnih i respiratornih puteva te drugih upalnih bolesti kod djece (Wiciński i sur., 2020). Ovaj podatak ne iznenađuje jer se upravo u crijevima nalazi 80 % stanica imunskog sustava čiji metaboliti pojačavaju proizvodnju antimikrobnih peptida i sluzi od strane specijaliziranih crijevnih epitelnih stanica te stimuliraju sazrijevanje i širenje regulatornih T stanica debelog crijeva (Schnupf i sur., 2018). Osim toga, mikroorganizmi crijeva utječu na regulaciju razine hormona i oksidativnog stresa u organizmu lučenjem enzima i signalnih molekula. Bakterije sekrecijom β -glukuronidaze konvertiraju estrogen u neaktivni oblik čija razina ima presudnu ulogu u bolestima ženskog reproduktivnog sustava.

Potrebno je spomenuti kako crijevna mikrobiota može djelovati i na progresiju bolesti. Disbioza crijevne mikrobiote pokazala se glavnim uzročnikom dijabetesa. Znanstvena istraživanja pokazala su kako neuravnoteženost crijevne mikrobiote dovodi do stanja kronične upale zbog prekomjerne aktivacije imunskog sustava. Posljedično dolazi do povećanog lučenja proupalnih citokina, imunskih čimbenika koji remete funkciju inzulinskih receptora zbog čega stanice ne mogu iskorištavati glukozu iz krvi kao izvor energije (He i Li, 2020).

Poremećaj metabolizma glukoze usko je povezan i s pretilošću za koju je karakterističan povišen omjer *Firmicutes/Bacteroidetes* (Liu i sur., 2021). Zbog sveukupne važnosti utjecaja crijevne mikrobiote na progresiju bolesti, kao nova metode liječenja pojavila se fekalna transplantacija. Iako je metoda obećavajuća jer omogućava uspostavljanje uravnotežene mikroflore, rizici od alergijske reakcije nisu zanemarivi (Laws, 2022).

2.2. ANALIZA GASTROINTESTINALNE MIKROBIOTE

Radi velikog interesa utjecaja crijevne mikrobiote na sveukupno zdravlje čovjeka krajem prošlog stoljeća počele su se razvijati metode za analizu mikrobiote čovjeka. Prvotne metode bile su ovisne o vremenu, temeljile su se pretežito na kultivaciji mikrobnih vrsta i izolaciji pojedinih mikroorganizama popraćeno fenotipskom i genotipskom analizom. Nisu pokazale pretjerane rezultate zbog financijske neisplativosti i mogućnosti kultivacije tek 10-25 % mikroorganizama crijeva (Illumina, 2015; Jandhyala, 2015).

S razvojem metoda sekvenciranja znanstvenicima je omogućen uvid u sastav crijevne mikrobiote iz šire perspektive i definiranje mikrobne zajednice unutar čak samo jednog uzorka. Za proučavanja nekultiviranih mikrobnih zajednica crijevne mikrobiote i davanja uvida u ne samo prisutne mikrobne vrste, već i njihovu aktivnost kao najefikasnije metode pokazali su se Sangerovo sekvenciranje rRNA gena, sekvenciranje druge generacije (NGS) i metagenomsko sekvenciranje. NGS metode osim što omogućuju znanstvenicima identifikaciju i klasifikaciju složenih mikrobnih zajednica bez kultiviranja, pokazale su se financijski i vremenski najisplativije. Nakon uspješne izolacije nukleinske kiseline iz uzorka, unutar dva tjedna daju rezultate sekvenciranja koji se potom analiziraju uz pomoć bioinformatičkih alata. Ono što je najznačajnije, ove metode mogu u kratkom vremenu omogućiti otkrivanje novih vrsta u uzorcima mikrobioma i olakšati otkrivanje gena virulencije i antimikrobne otpornosti (Illumina, 2015).

2.2.1. Priprema uzoraka i izolacija genetskog materijala

Kod sekvenciranja nove generacije vrlo je važno na adekvatan način prikupiti dovoljnu količinu uzorka crijevne mikrobiote. Idealna metoda za prikupljanje uzorka trebala bi biti neinvazivna i zahtijevati što manju pripremu ispitanika prije uzorkovanja. Pored toga, trebala bi pružati mogućnost uzimanja uzorka s različitih mjesta uz minimalno prisutnu kontaminaciju.

Trenutne tehnologije koriste uzorke prikupljene iz fecesa, crijevne tekućine ili biopsije crijeva. Premda su znanstvena istraživanja pokazala kako uzorak iz fecesa nije reprezentativan za cijeli GI trakt, iz pragmatičnih razloga i lake ponovljivosti uzorkovanja, upravo se on najčešće koristi u analizi mikrobiote GI trakta (Tang i sur., 2020). Nakon uzimanja uzorka, u većini istraživanja uzorak se ne može odmah obraditi zbog čega je izuzetno važno adekvatno skladištenje. U literaturi se kao “zlatni standard” za određivanje profila crijevne mikrobiote navodi trenutno zamrzavanje na -80 °C (Fouhy i sur., 2015). U situacijama kada to nije izvedivo, skladištenje na sobnoj temperaturi 24 sata ili tjedan dana na -20 °C omogućava zadržavanje mikrobnog integriteta bez konzervansa (Tedjo i sur., 2015; Carroll i sur., 2012). Dodatak konzervansa kao RNAprotect® Bacteria Reagent, te mješavine 95 % etanola i acetona pokazali su povećanje stabilnosti uzorka tijekom skladištenja (Kumar i Bhadury, 2022).

Danas na tržištu postoje puferi kao primjerice PB puffer koji omogućavaju stabilnost uzoraka na sobnoj temperature dulji vremenski period i predstavljaju odličnu alternativu brzom zamrzavanju na -80 °C (Wu i sur., 2021). Kako bi u kasnijim koracima sekvenciranja bilo moguće adekvatno pripremiti knjižnicu gena potrebno je izolirati odgovarajuću koncentraciju DNA. U tu svrhu kako bi izolacija bila što uspješnija stanice se liziraju. Liziranje je moguće provesti mehaničkim, kemijskim i enzimskim metodama pri čemu su mehaničke metode razbijanjem stanica ponovljenim udaranjem kuglica pokazale najbolje rezultate izolacije DNA arheja i nekih bakterija (Salonen i sur., 2010). Nakon uspješnog liziranja izolacija se provodi korištenjem nekih od komercijalno dostupnih pribora za uzimanje uzorka kao što je QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit kompanije QIAGEN (Hadžić i sur., 2022).

2.2.2. Sekvenciranje nove generacije u istraživanju gastrointestinalne mikrobiote

U proučavanju filogenije i taksonomije uglavnom se koriste metode sekvenciranja druge generacije (NGS) zbog mogućnosti detekcije nekultiviranih mikrobnih vrsta, određivanje njihove funkcije i paralelnog sekvenciranja većeg broja uzoraka. Jedna od najčešćih NGS metoda za identifikaciju i karakterizaciju bakterija je amplikon sekvenciranje koje se temelji na umnožavanju genetskog materijala lančanom reakcijom polimerazom (engl. polymerase chain reaction, od. PCR) istim setom specifičnih primera i sekvenciranjem umnoženog produkta. Ciljana regija za umnažanje su uglavnom 16S ribosomalni RNA (rRNA) geni zbog čega se ova metoda i naziva 16S rRNA amplikon sekvenciranje. Navedeni geni su podjednako distribuirani i više zastupljeni u odnosu na druge bakterijske gene, zbog čega je jednostavnije pratiti sa njima povezane zastupljenosti između vrsta (Wensel i sur., 2022; Schlunzen, 2000).

Nadalje, sastoje od visoko konzerviranih regija koje su ključne za amplifikaciju i hipervarijabilnih regija koje čine razliku između vrsta mikroorganizama (Eurofins, 2023; Illumina, 2015).

Prvi protokoli za NGS sekvenciranje zahtijevali su provođenje nasumične fragmentacije DNA ili RNA uzorka, gel elektroforezu, ligaciju oligonukleotida specifičnih za određenu platformu, PCR amplifikaciju s jednog kraja fragmenta (eng. single-read) i pročišćavanje DNA. Uvođenjem sekvenciranja s oba kraja fragmenta (engl. paired-end) dobiven je duplo veći broj sekvenci prilikom pripreme knjižnice i postignuto je znatno preciznije poravnanje u odnosu na single-read sekvenciranje.

S razvojem Illumina platforme trajanje pripreme knjižnice drastično se smanjilo te se povećao raspon kao i fleksibilnost izlaznih podataka u rasponu od 1,8 Gb za ciljana istraživanja do gotovo 6 Tb za istraživanja na razini populacije. Također, pojavili su se pribori koji omogućuju provođenje sekvenciranja bez potrebe za provođenjem PCR reakcije i gel elektroforeze. Ekonomičnosti i efikasnosti sekvenciranja velikog broja uzoraka pridonijelo je multipleksiranje podataka. Multipleksiranje omogućava simultano sekvenciranje velikog broja uzoraka uz ispravno identificiranje i sortiranje uzoraka prije analize rezultata (Menon, 2023.; Illumina, 2015). Međutim, ako su za sekvenciranje korišteni pribori koji ne uključuju provođenje PCR reakcije, multipleksirani izlazni podaci neće biti precizni stoga je potrebno unaprijed odrediti faktor kojim će se skratiti vrijeme sekvenciranja.

2.2.3. Bioinformatička analiza

Zahvaljujući 16S rRNA sekvenciranju, kao i sekvenciranju cjelokupnog genoma generiran je veliki broj metagenomskih baza podataka. Baze podataka, primjerice Ribosomal Database Project i bioinformatički alati kao što je Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) omogućavaju analizu podataka dobivenih sekvenciranjem. Na temelju QIIME bioinformatičke platforme razvijen je QIIME2 softver koji omogućava analizu podataka o različitim mikrobiomima generiranih Illumina ili sličnim sekvencerima i uspoređivanje s javno dostupnim podacima (Caporaso i sur., 2010). Podaci dobiveni sekvenciranjem su u većini slučajeva multipleksirani zbog čega ih je prije analize potrebno demultipleksirati. Demultipleksiranje se provodi s obzirom na specifične sljedove nukleotida koji su ligirani na krajeve sekvenci multipleksiranjem (barkodove) kako bi fragmenti bili razvrstani prema pripadajućim uzorcima. Kako bi rezultati analize bili vjerodostojni, potrebno je provjeriti kvalitetu kontrole sekvenci. Tradicionalno, kvaliteta kontrole provodila se skraćivanjem i

filtriranjem sekvenci na temelju njihovih rezultata kvalitete pri čemu je slijedilo grupiranje u Operativne taksonomske jedinice (OTU) na temelju unaprijed definirane razine sličnosti i kvantificiranja. Razina od 97 % identičnosti sekvence često se birala kao reprezentativna za vrstu, a 95 % za rod (Bokulich i sur., 2018; Illumina, 2015). Modernije varijante ispravljanja amplikona temelje se na grupiranju koje se može otkloniti QIIME2 dodacima DADA2 (q2-dada2) i Deblur (q2-deblur), a za razliku od tradicionalne metode uspješno rješavaju razlike od samo jednog nukleotida. Prednost DADA2 nad Deblur-om je što ne zahtijeva spajanje sekvenci od strane korisnika prije ispravka, a što jako olakšava analizu ako je željeno spajanje pair-end sekvenci (Estaki i sur., 2020).

Za utvrđivanje prisutnih vrsta mikroorganizama, QIIME2 posjeduje dodatke za predviđanje najvjerojatnije taksonomske pripadnosti kao što je q2-feature-classifier. To uključuje metode konsenzusa temeljene na poravnanju i Naivne Bayesove metode. Nevezano koji klasifikator se koristi, on mora biti podešen na taksonomski definiranim referentnim sekvencama koje pokrivaju regiju od interesa kao što su Silva i Greengenes baze podataka (Bokulich i sur., 2018). Rad s više različitih uzoraka ponekad iziskuje potrebu za utvrđivanjem razlike između grupa. S obzirom na tip podataka o mikrobiomu moguće je utvrditi razlike na dvije razine. Alfa raznolikost daje uvid u razlike unutar uzorka pri čemu uzima u obzir strukturu mikrobne zajednice s obzirom na broj taksonomskih grupa, raspodjelu ili oboje. Druga razina koja se naziva beta raznolikost daje uvid u razlike između uzoraka uzimajući u obzir prisutnost/odsutnost određenih sekvenci ili njihovu zastupljenost. Obje razine mogu se prikazati različitim metrikama kao što su Shannon indeks za alfa raznolikost i Bray–Curtis (BC) različitost za beta raznolikost (Wills, 2019; Bray i Curtis, 1957).

Za utvrđivanje specifičnih vrsta mikroorganizama po kojima se statistički razlikuju skupine uzoraka QIIME2 u sklopu dodataka posjeduje statistički alat “Analiza sastava mikrobioma” (eng. analysis of composition of microbiomes, ANCOM). ANCOM, što je kratica za Analysis of Composition of Microbiomes, statistička je metoda koja se koristi za identifikaciju značajki (npr. bakterijskih rodova) koje su različito zastupljene među različitim skupinama u podacima mikrobioma, kao što su sekvenciranje 16S rRNA ili podaci prikupljeni kroz metagenomsko sekvenciranje. Osobito je koristan kada se radi o podacima o sastavu kao što je najčešće korištena relativna zastupljenost različitih vrsta ili rodova u uzorku mikrobioma. ANCOM je osmišljen kako bi se pozabavio problemima koji proizlaze iz same prirode podataka o mikrobiomu, gdje je zbroj relativnih udjela konstantan unutar svakog uzorka. Tradicionalne statističke metode poput t-testova ili ANOVA nisu prikladne za podatke o sastavu zbog svojih temeljnih pretpostavki. U QIIME2 programskom paketu, rezultati

ANCOM analize mogu se vizualizirati pomoću različitih alata za vizualizaciju dostupnih na ovoj platformi. Postoji mogućnost prikaza u vidu tzv. dijagrama vulkana (eng. volcano plot), toplinske mape (eng. Heatmap), interaktivno i u vidu grafike kvartila. Dijagram vulkana često je korištena vizualizacija u diferencijalnoj analizi obilja (eng. abundance). U QIIME 2, ovaj grafikon prikazuje logaritamsku promjenu (veličina učinka) na x-osi i negativni logaritam prilagođene p-vrijednosti (ili druge statističke mjere) na y-osi za svaki takson. Svi ovi dijagrami pomažu identificirati koje vrste ili rodovi imaju značajno različite zastupljenosti. Ove vizualizacije koriste se za bolje razumijevanje i tumačenje nalaza analize mikrobiote. (Mandal i sur., 2015).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

U sklopu istraživanja korišteni su:

a) Laboratorijski pribor

- Automatske pipete (20, 200, 1000 μ L)
- pipetni nastavci
- staklene čaše
- laboratorijske žlice

b) Tehnička oprema

- Centrifuga Universal 320 R, Hettich, Njemačka
- Analitička vaga model Eclipse EBL 314i, Adam, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Vorteks uniTEXER, LLG Labware, Njemačka
- Quantus FLUOROMETER, Promega, Njemačka
- Homogenizator Tehnica MillMix20, Železniki, Slovenija
- Zamrzivač Forma 900 (-86 °C), Thermo scientific, Njemačka

c) Kemikalije

- QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit, QIAGEN, Njemačka
- etanol 70 %
- QuantiFluor ONE dsDNA System, Promega, Njemačka

d) biološki uzorak

Za analizu su korišteni uzorci fecesa košarkaša od kojih je devet konzumiralo Nutriozu (eksperimentalna skupina, "prebiotici"), a devet Maltodextrin (kontrolna skupina, "placebo"). Uzorke su davali u periodu od četiri tjedna (svaki tjedan jedan uzorak) te su uzorci po primitku smrznuti na -80 °C do analize. Analiza je provedena na sveukupno 72 uzorka.

3.2. UZORAK ISTRAŽIVANJA

U istraživanju je sudjelovalo osamnaest zdravih profesionalnih košarkaša iz istog košarkaškog tima. Prosječna godina igrača je bila $18,44 \pm 0,70$ godina, visina $193,6 \pm 6,35$ cm i težina $85,28 \pm 7,65$ kg. Ispitanici koji su konzumirali antibiotike u periodu od tri mjeseca ili manje i druge ergonegene agense mjesec dana prije istraživanja isključeni su iz istraživanja. Također, ispitanici s dijabetesom tipa 1 i 2 isključeni su iz istraživanja. Ispitanici su imali točno određen režim treninga bez mogućnosti dodatnih treninga ili promjene režima za vrijeme trajanja istraživanja. Radi očuvanja privatnosti i zaštite podataka svi ispitanici su se vodili u šiframa. Ispitanici koji su konzumirali prebiotike su bili: LS, JB, FB, JG, SJ, MJ, JM, AH, LB. Ispitanici koji su bili dio kontrolne skupine su bili: LK, GA, GB, TR, MK, MV, DG, NB, NS.

3.3. SUPLEMENTACIJA

U ovom istraživanju kao prebiotik je korištena Nutrioza. Topljivo je vlakno dobiveno iz kukuruza zbog čega načelno ne izaziva alergije i dobro je podnošljivo. Na 10 g sadrži manje od 0,3 % proteina, 0 g masti, manje od 15 % mono i disaharida, manje od 0,5 % sulfatnog pepela (R.O.I.) i 8,5 g dekstrina (Anonymus, 2020). Eksperimentalna skupina (devet ispitanika) je konzumirala 20 g Nutrioze dnevno raspodijeljeno u dvije doze tijekom četiri tjedna.

Kontrolna skupina (devet ispitanika) je konzumirala Maltodextrin koji je jedan od najčešće korištenih kontrolnih pripravaka u ispitivanju prebiotičkog efekta (Birkeland i sur., 2021). Ima gotovo jednaku topljivost, okus i konzistenciju kao i Nutrioza. Obje skupine ispitanika su konzumirale pripravke nakon svakog treninga (imali su dva treninga dnevno) u prisustvu glavnog istraživača koji nije bio upućen u sastav suplemenata. U slučaju slobodnog dana ili dijela dana ispitanike se savjetovalo da konzumiraju suplemente i kao dokaz konzumacije pošalju sliku. Trajanje istraživanja je određeno na 4 tjedna kako bi se minimizirale šanse od prekida sudjelovanja uslijed Covid-19 pandemije i na temelju već postojećeg istraživanja utjecaja vlakna na sportsku izvedbu (Sugiyama i sur., 2017).

3.4. METODE^{1, 2, 3}

3.4.1. Izolacija DNA

Izolacija i pročišćavanje DNA mikrobiote iz uzorka ljudskog fecesa provedeno je prema Quick Start protokolu proizvođača u dva koraka. Prije samog procesa prazne “PowerBead Pro Tube” su centrifugirane pri brzini okretaja od 15000 g/min 1,5 minutu.

I) Uzorci fecesa, koji su se čuvali na temperaturi od -80 °C, izvađeni su iz zamrzivača kako bi se otopili na sobnoj temperaturi. U prethodno centrifugirane “PowerBead Pro Tube” laboratorijskom žlicom je preneseno i izvavano analitičkom vagom između 230 i 250 mg uzorka fecesa⁴. U svaku “PowerBead Pro Tube” sa uzorkom je potom dodano 800 µL CD1 reagensa nakon čega su uzorci vorteksirani 5-10 sekundi. Razbijanje stanica uzorka je provedeno na Institutu Ruđer Bošković, u Zavodu za kemiju materijala, Laboratoriju za biotehnologiju u akvakulturi pomoću homogenizatora Tehtnica MillMix20⁵.

II) Homogenizirani uzorci su centrifugirani pri brzini okretaja 15000 g/min 1,5 minutu. Zatim je preneseno do 700 µL supernatanta u “Microcentrifuge tube” od 2 mL. Dodano je 200 µL CD2 reagensa te su uzorci vorteksirani u trajanju od 5 sekundi i potom centrifugirani pri prethodno navedenim parametrima.

Preneseno je do 700 µL supernatanta u čiste “Microcentrifuge tubes” od 2 mL. Dodano je 600 µL CD3 reagensa i provedeno vorteksiranje 5 sekundi. Zatim je 650 µL lizata je prebačeno u “MB Spin Column” i centrifugirano pri prethodno navedenim parametrima. Odbačen je permeat i ponovljen je postupak dodavanja lizata i centrifugiranja. Permeat je ponovno odbačen te je ponovljen postupak centrifugiranja. “MB spin column” su stavljene u nove “Collection tube” od 2mL nakon čega je u njih dodano 500 µL EA reagensa. Uzorci su centrifugirani te je zatim odbačen permeat iz “Collection tube”. Ponovljen je postupak centrifugiranja nakon čega su “MB spin column” stavljene u čiste “Collection tube”. Dodano je 500 µL C5 reagensa u “MB spin column” te je provedeno centrifugiranje pri istim

¹ Sve korištene kemikalije i tubice dobivene su u QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit-u.

² Sav dobiveni otpad je najprije uronjen u 70% etanol te je potom zbrinut u skladu s propisima.

³ Kompletni protokol se nalazi na stranici: www.qiagen.com/KB-2560.

⁴ Za uzorak ŠJ4 stavljeno je 156 mg, MV3 252 mg i DG2 350 mg.

⁵ Razbijanje stanica uzoraka MK4, TR3, TR1, AH3, MK3, MV3, GB3, JB1, LB4, JB4, JM4, DG2, JG4, GA4, TR4 je provedeno vorteksiranjem 20 minuta pri maksimalnoj brzini.

parametrima. Iz “Collection tube” je odbačen permeat nakon čega je ponovno provedeno centrifugiranje s istom “Collection tube”. Potom su “MB spin column” prebačene u “Elution tube” od 1,5 mL. Dodano je 50 µL C6 reagensa u središte filter membrane “MB spin column”, nakon čega je provedeno centrifugiranje pri brzini okretaja od 15000 g/min. Postupak je ponovljen s istom količinom C6 reagensa⁶. “MB spin column” su odbačena, a “Collection tube” s izoliranom DNA korištene u fluorometrijskom određivanju koncentracije.

3.4.2. Fluorometrijsko određivanje koncentracije DNA mikrobne kulture u uzorcima^{7,8}

Za fluorometrijsko određivanje DNA korišteni su reagensi iz QuantiFluor ONE dsDNA System tvrtke Promega. Prije samog fluorometrijskog određivanja koncentracije DNA u uzorcima pripremljeni su standard i slijepa proba prema protokolu Promega. Slijepa proba je pripremljena tako da se u PCR epice od 0,5 mL dodalo 200 µL QuantiFluor ONE dsDNA boje i 2 µL TE pufera. Standard je pripremljen tako da je 1 µL QuatiFluor ONE Lambda DNA standarda dodano u 200 µL QuantiFluor ONE dsDNA boje u PCR epicu od 0,5 mL. PCR epica sa standardom je vorteksirana i stavljena u mrak na 5 minuta. Uzorci su isto tako pripremljeni u PCR epicama od 0,5 mL tako da je uzeto 2 µL uzorka izolirane DNA i dodano u 200 µL QuantiFluor ONE dsDNA boje. Zatim su vorteksirani i stavljeni u mrak na 5 minuta. Nakon isteklog vremena prvo je fluorometar kalibriran sa slijepom probom i standardom, nakon čega su izmjerene koncentracije uzoraka. Uzorci su se pokazali zadovoljavajući ako je izmjerena koncentracija DNA u uzorcima bila veća od 20 ng/mL. Nakon mjerenja koncentracije 25 µL svih uzoraka je prebačeno u PCR epice od 1,5 mL. Epice su zapečaćene parafinom za slanje na sekvencioniranje.

3.4.3. Sekvenciranje uzoraka i obrada rezultata

Sekvenciranje DNA provedeno je u Molecular Research (MRDNA) u Texasu, SAD-u. Amplikon pair-end sekvenciranjem sekvencirane su regije 3 i 4 16S rRNA gena sa setom primera 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') i 806R (5'-GGACTACNNGGTATCTAAT-3'). Za sekvenciranje je korišten Illumina sekvencer.

⁶ Uzorcima MK4, TR3, TR1, AH3, MK3, MV3, GB3, JB1, LB4, JB4, JM4, DG2, JG4, GA4, TR4 dodano je samo jednom 50 µL C6 reagensa.

⁷ Sve otopine potrebne za određivanje koncentracije DNA dobivene su u QuantiFluor ONE dsDNA System-u.

⁸ Kompletan protokol nalazi se na stranici: www.promega.com/protocols/.

Podaci sekvenciranja preuzeti su s “Illumina’s BaseSpace Sequence Hub” u formi paired-end, multipleksirane fastq datoteke. Za obradu podataka sekvenciranja korišten je 'Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2'⁹ (QIIME2) softver verzije 2020.6. Prije obrade softverom datoteke su demultipleksirane sabre alatom i unesene u formi manifest datoteke. Unesene sekvence su filtrirane i obrađene alatima trimming, denoising DADA2 programom. Nakon toga je uslijedilo spajanje jer je korišteno pair-end sekvenciranje i kontrola potencijalne prisutnosti kimera. Za taksonomsko određivanje korišten je Naive Bayes classifier QIIME2 feature-classifier alatom. Naive Bayes classifier je podešen na SILVA bazi podataka, verziji 138 pri čemu su sekvence grupirane na temelju 99 % sličnosti. Za kalkulaciju alfa i beta raznolikosti uzoraka generirano je filogenetsko stablo q2-phylogeny alatom. Za izračun alfa raznolikosti korišten je Shannon indeks, a za beta raznolikost Bray–Curtis metrika (Kers i Saccenti, 2021; Kim i sur., 2017). Za utvrđivanje raznolikosti na taksonomskoj razini između dviju skupina korišten je ANCOM alat implementiran u QIIME2 softver. Usporedba je provedena na taksonomskim razinama i prije svakog izračuna je tablici za odabranu taksonomsku razinu dodan pseudocount, jer je alat osjetljiv na vrijednosti 0 u tablici frekvencije. Rezultati su prikazani dijagramom vulkana na kojem se za vrste s visokom W vrijednosti smatralo da se statistički značajno razlikuju između kontrolne skupine i skupine koja je konzumirala prebiotik (Mandal i sur., 2015). Dobiveni izlazni podaci svih korištenih alata su vizualizirani QIIME2 programom za vizualizaciju QIIME 2 View.

Za izradu grafičkih prikaza zastupljenosti mikrobnih vrsta s obzirom na taksonomsku razinu korišten je Python programski jezik, verzija 3.8.8 u Pycharm integriranom razvojnom okruženju. Za izradu grafika korištene su csv datoteke taksonomije preuzete s QIIME 2 View, a rezultati su spremljeni u formi png.

⁹ Kompletan protokol za instalaciju softver nalazi se na stranici: <https://qiime2.org/>.

4. REZULTATI I RASPRAVA

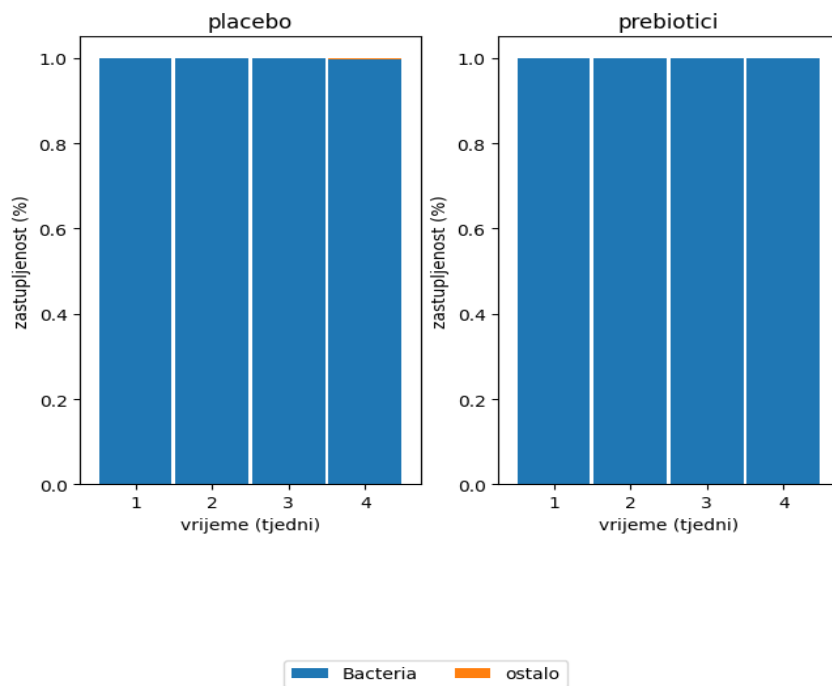
4.1. REZULTATI

4.1.1. Analiza rezultata pojedinih mikrobnih vrsta u uzorcima

Analizom rezultata sekvenciranja DNA uzoraka fecesa iz grafičkih prikaza dobivenih vizualizacijom rezultata QIIME 2 softvera identificirana je 351 mikrobnna vrsta kod 18 ispitanika. Za svakog ispitanika analiza je provedena na četiri uzorka koji su uzimani u razmacima od tjedan dana. Rezultati su analizirani na filogenetskim razinama domena, koljeno, razred, red, porodica, rod i vrsta. Radi preglednosti grafičkog prikaza vrste koje nisu bile zastupljene u barem jednom uzorku ispitanika svrstane su u kategoriju “ostalo”.

a) Analiza rezultata sekvenciranja na razini domene

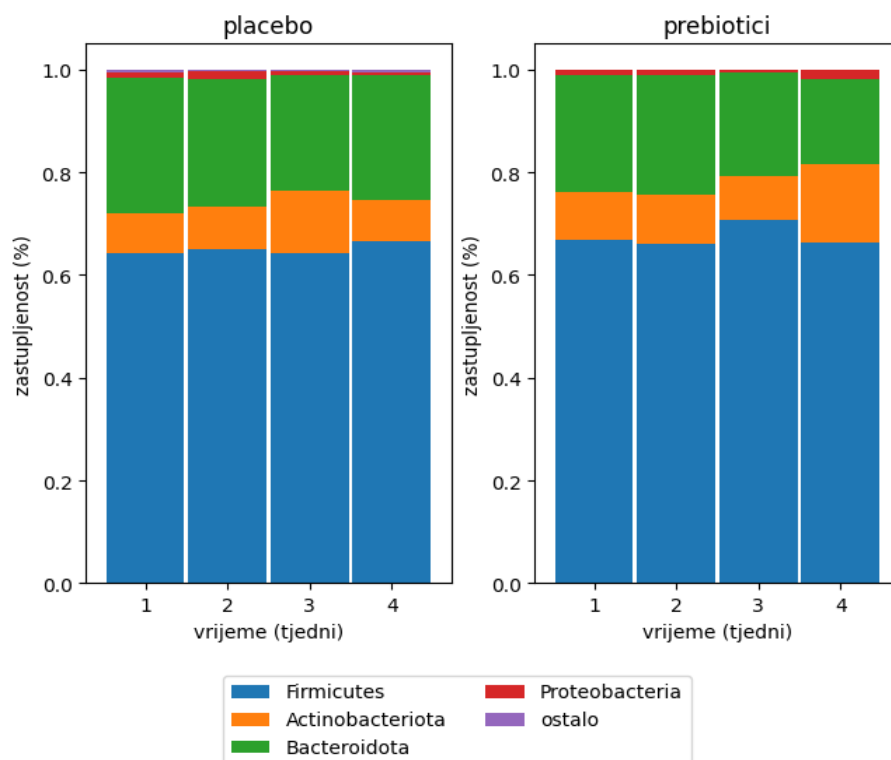
Iz slike 1 vidljivo je kako na razini domene, u ispitivanoj i kontrolnoj skupini, gotovo svi prisutni mikroorganizmi pripadaju bakterijskim vrstama, dok su *Archaea* zastupljene u nekim uzorcima u udjelu manjem od 1 %. (uzorci NS1, NS4, GA4, GA2, GB1, GA1, NS1, FB3, GB2, GB3, FB4). Od toga odstupaju uzorci I4, u kojem su *Archaea* bile prisutne u udjelu od 2,5 % i S4 u kojem su bile prisutne u udjelu od 1,01 % (prilog 1).



Slika 1. Zastupljenost mikroorganizama u ispitivanim uzorcima na razini domene

b) Analiza rezultata sekvenciranja na razini koljena

Ako se analizira bakterijska zastupljenost na razini koljena može se zamijetiti kako su u kontrolnoj skupini (“placebo“) i ispitivanim uzorcima (“prebiotici“) najzastupljenija bakterijska koljena: *Firmicutes*, nešto manje *Bacteroidota* te *Actinobacteriota*.



Slika 2. Zastupljenost pojedinih bakterijskih koljena u ispitivanim uzorcima

Udjeli pojedinih bakterijskih koljena u ispitivanim uzorcima prikazani su na slici 2. Koljeno *Firmicutes* je generalno zastupljeno u ispitivanoj i kontrolnoj skupini u sličnim udjelima (66 %) kroz ispitivani vremenski period. U “prebiotici” skupini udio navedenog koljena je porastao u trećem tjednu za 6 % nakon čega je uslijedio pad na prvotnu vrijednost, dok je u kontrolnoj skupini udio s početne vrijednosti 64 % porastao na 66 % (slika 2).

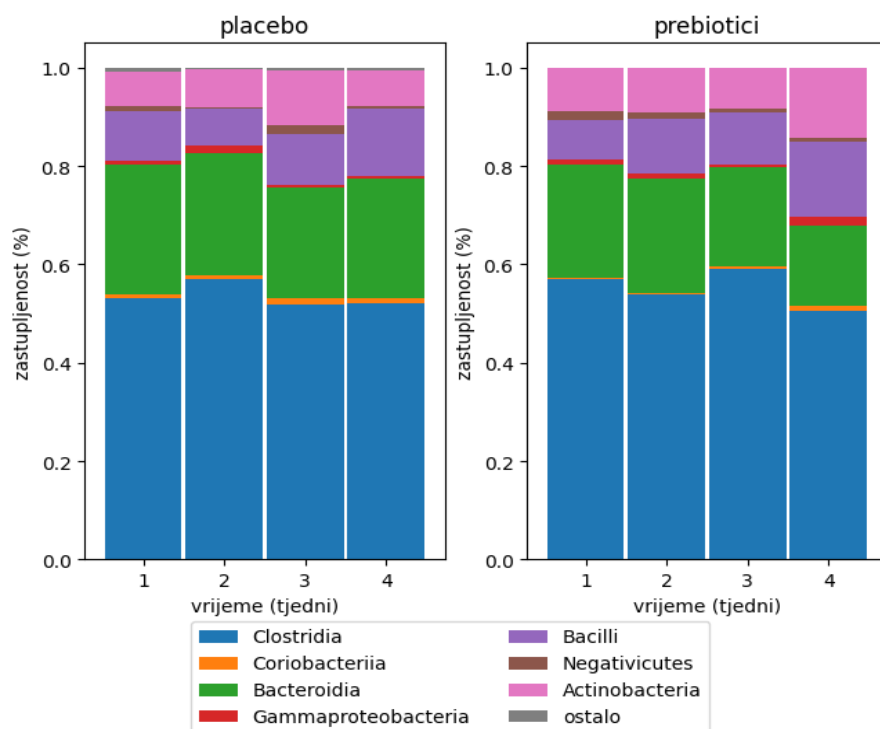
Udio koljena *Bacteroidota* u obje skupine smanjio se kroz ispitivani vremenski period pri čemu se nešto značajnije smanjio u slučaju ispitivane skupine.

Iz slike 2 evidentan je porast koljena *Actionobacteriota* u skupini “prebiotici” s 9 % na 15 %. Porast navedenog koljena bio je prisutan i u kontrolnoj skupini, međutim, u završnom tjednu vrijednost se spustila i bila je jednaka početnoj.

U analiziranim uzorcima najmanje zastupljeno bakterijsko koljeno je bilo koljeno *Proteobacteria*. Premda u obje skupine ne zauzima više od 2 % ukupnih mikroorganizama, u slučaju skupine koja je konzumirala prebiotike udio bakterija se povećao za 100 %, dok se u kontrolnoj skupini smanjio za 44 % (slika 2).

c) Analiza rezultata sekvenciranja na razini razreda

Od navedenih koljena, u analiziranim uzorcima prevladavaju razredi *Clostridia* koljena *Firmicutes*, *Bacteroidia* koljena *Bacteroidota*, *Bacilli* koljena *Firmicutes* i *Actinobacteria* koljena *Actinobacteriota*.



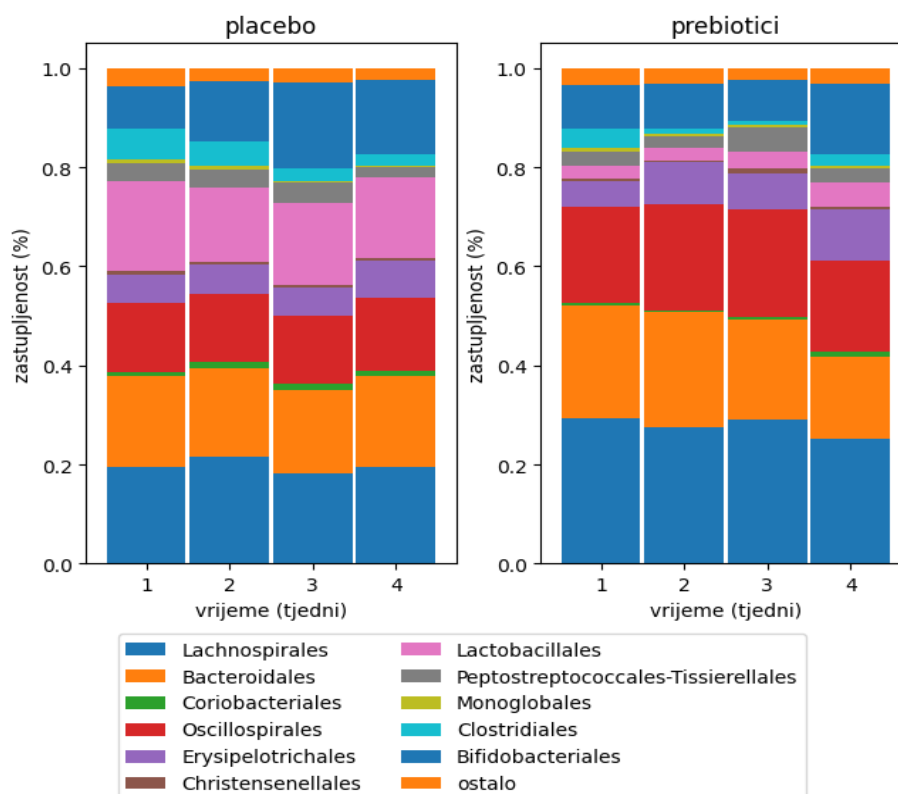
Slika 3. Zastupljenost pojedinih bakterijskih razreda u ispitivanim uzorcima

Zastupljenost pojedinog razreda u ispitivanim uzorcima vidljiva je na slici 3. Zastupljenost razred *Clostridia* se u “placebo” skupini u drugom tjednu povećala za 8 % nakon čega je pala na 52 % i nije se mijenjala. U slučaju skupine koja je konzumirala prebiotike promjene zastupljenosti je pratio pad za 5 %, rast za gotovo za 10 % i zatim pad za 15 %. Smanjenje zastupljenosti evidentno je i u slučaju razred *Bacteroidia* čiji se udio smanjio kroz ispitivani period za 26 % u “prebiotici” skupini i nešto manje (8 %) u kontrolnoj skupini. Iznenađujuća je činjenica kako se udio razred *Bacilli* koljena *Firmicutes* duplo povećao kod ispitanika koji su konzumirali prebiotike, za razliku od “placebo” skupine gdje je porast bio manji (slika 3). U slučaju razred *Actinobacteria* zastupljenost skupine “prebiotici” porasla je sa 9 % na 14 %, dok kod kontrolne skupine nije zamijećena značajna promjena.

Iz slike 3 vidljivo je kako su u obje skupine najmanje bili zastupljeni razredi *Coriobacteriia* koljena *Actinobacteri*, *Gammaproteobacteria* koljena *Proteobacteria* i *Negativicutes* koljena *Firmicutes*. U skupini “prebiotici” razreda *Coriobacteriia* evidentno je utrostručenje udjela u odnosu na prvotnu vrijednost. Jednako toliko smanjenje vidljivo je kod bakterija razreda *Negativicutes*. U slučaju kontrolnih skupina spomenutih razreda primijećene su slične promjene bakterijske zastupljenosti kao i kod skupina koje su konzumirale prebiotike. Zastupljenost razreda *Coriobacteriia* porasla je sa 0,6 % na 0,9 %, a *Negativicutes* se smanjila sa 0,9 % na 0,7 % (slika 3). Osim navedenog, u kontrolnoj skupini smanjila se i zastupljenost razreda *Gammaproteobacteria* čiji se udio kod skupine “prebiotici” nakon pada u trećem tjednu vratio na približno prvotnu vrijednost.

d) Analiza rezultata sekvenciranja na razini reda

Ako se razmatra raznolikost mikroorganizama na razini reda, mikrobnjoj raznolikosti najviše doprinose redovi *Lachnospirales* i *Oscillospirales* razreda *Clostridia*.



Slika 4. Zastupljenost pojedinih bakterijskih redova u ispitivanim uzorcima

Iz slike 4 može se zamijetiti kako udio reda *Lachnospirales* u obje skupine varira, no suprotnim trendovima. Dok u slučaju kontrolne skupine udio prvo raste, u slučaju skupine koja je konzumirala prebiotike prvotno pada pa raste te se takvo ponašanje ponavlja u predstojećim vremenskim periodima. U slučaju redova *Oscillospirales* i *Bacteroidales* razreda *Bacteroidia*, vidljive su gotovo jednake promjene zastupljenosti u slučaju kontrolne i ispitivane skupine. Potrebno je istaknuti kako su puno veće promjene udjela u slučaju skupine “prebiotici” nego “placebo”. Udio reda *Oscillospirales* skupine “prebiotici” se kroz prva tri tjedna povećao za 13 % i zatim smanjio za 16 %. U slučaju kontrolne skupine, udio istoimenog reda pada do zadnjeg tjedna u kojem se povećava za 8 %. U slučaju reda *Bacteroidales* skupine “prebiotici”, prvotni rast nije bio značajan (2 %), ali je nakon njega uslijedio pad za 29 % (slika 4). Zastupljenost spomenutog reda kontrolne skupine mijenjala se za isti udio kao i kontrolne skupine reda *Oscillospirales*.

Od prisutnih redova, najveća razlika između “prebiotici” i “placebo” skupine je primijećena u redu *Erysipelotrichales* čija se zastupljenost povećala za 61 % više kod “prebiotici” skupine nego kod “placebo”.

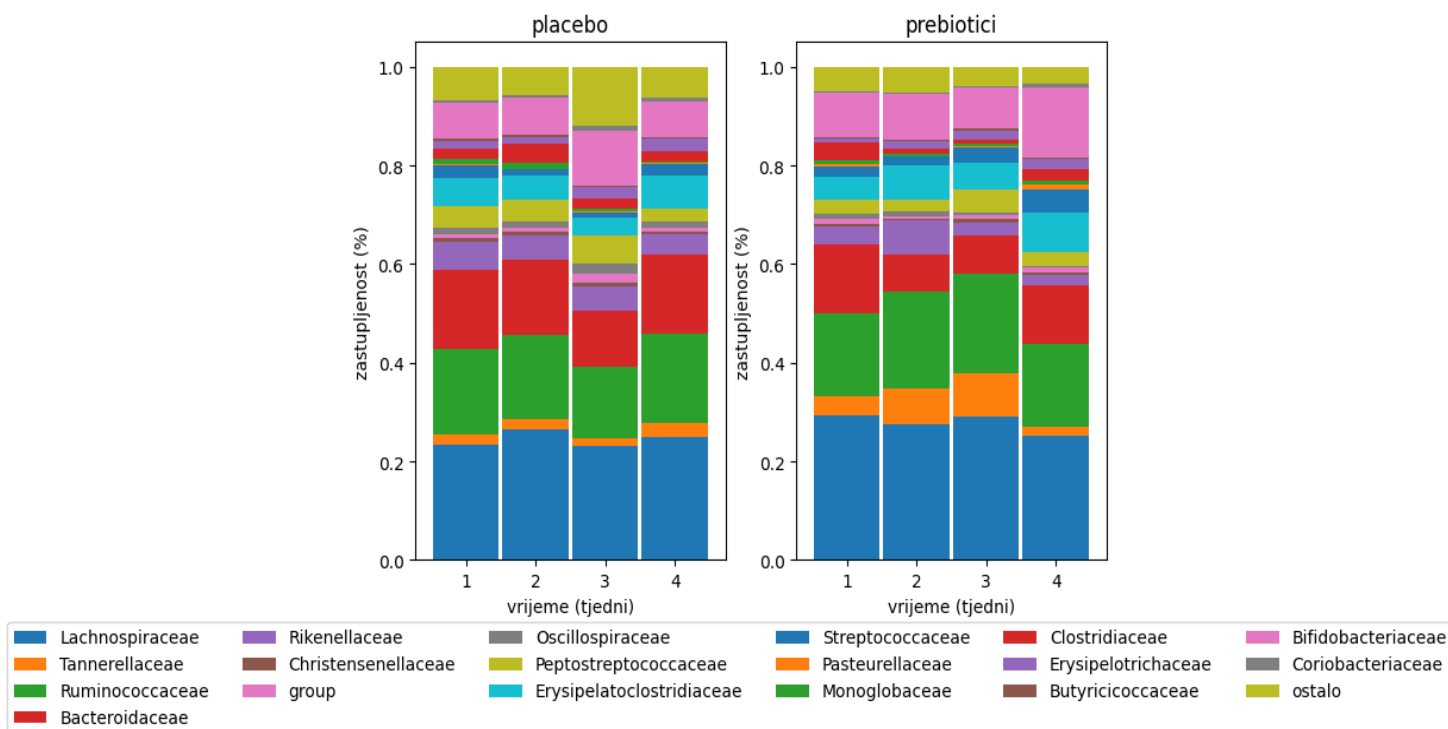
Ako se promotri grafički prikaz slike 4, može se zamijetiti kako su u svim ispitivanim uzorcima najmanje bili zastupljeni redovi *Coriobacteriales* razreda *Coriobacteriia*, *Monoglobales* i *Christensenellales* razreda *Clostridia*.

Promjena zastupljenosti *Coriobacteriales* bila je jednaka u obje grupe, dok se udio *Monoglobales* skupine “prebiotici” nakon početnog smanjenja povećao, pritom je u skupini “placebo” zastupljenost bila promjenjiva sa smanjenjem do četvrtog tjedna.

Zanimljive su promjene reda *Christensenellales* kod kojeg se u kontrolnoj skupini udio bakterija smanjio za 29 % u odnosu na početnu vrijednost. U “prebiotici” skupini udio reda *Christensenellales* je tijekom cijelog ispitivanog perioda bio promjenjiv (slika 4). Ono što je isto tako zanimljivo je vidno veća zastupljenost udijela reda *Lactobacillales* razreda *Bacili* u kontrolnoj skupini nasuprot ispitivanoj.

e) Analiza rezultata sekvenciranja na razini porodice

Uvidom u grafički prikaz *Qiime 2* računalnog alata vidljivo je kako su od navedenih redova u ispitivanim uzorcima najzastupljenije porodice *Bacteroidaceae* reda *Bacteroidales*, *Lachnospiraceae* reda *Lachnospirales* i *Ruminococcaceae* reda *Oscillospirales*.



Slika 5. Zastupljenost pojedinih bakterijskih porodica u ispitivanim uzorcima

Porodica *Lachnospiraceae* je od navedenih porodica najzastupljenija u obje skupine sa zastupljenošću preko 20 % i to u obje skupine. Više je zastupljena u “prebiotici” skupini gdje predstavlja 29 % ukupne mikroflore. Iz slike 5 vidljiva je oprečna promjena udjela navedene porodice između kontrolne i prebiotic skupine. Dok se u slučaju “placebo” skupine udio prvotno povećao za 13 %, u “prebiotici” skupini se smanjio za 7 %. Približno duplo manje u odnosu na porodicu *Lachnospiraceae*, uzorci sadrže porodicu *Bacteroidaceae* (između 8 i 16 %). U obje skupine zastupljenost prvotno opada te u zadnjem tjednu raste s jedinom značajnom razlikom puno izraženijeg pada i rasta u skupini koja je konzumirala prebiotike (slika 5).

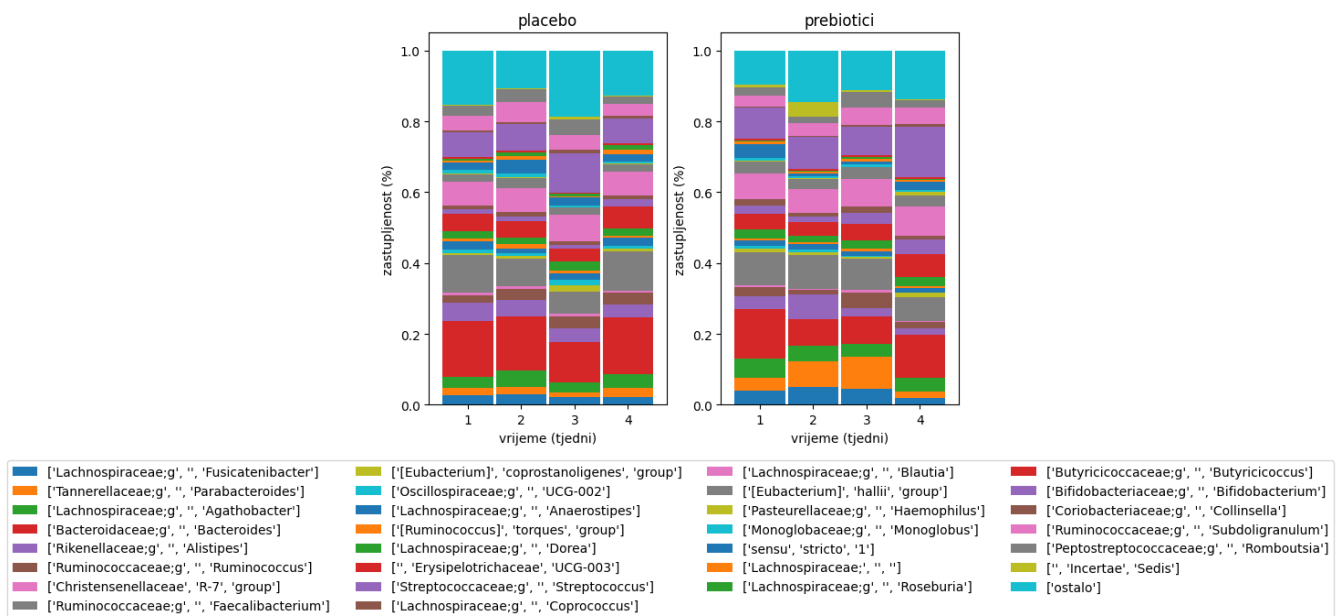
Zastupljenost porodice *Ruminococcaceae* ne mijenja se drastično u uzorcima. Iz grafičkog prikaza slike 5 evidentno je kako se udio navedene porodice u trećem tjednu u kontrolnoj skupini smanjio za 16 % i zatim porastao na gotovo prvotnu vrijednost, dok je u ispitivanoj skupini u drugom tjednu počeo rasti do 20 % i zatim u finalnom tjednu se smanjio za 18 % (slika 5). Najveća razlika promjene zastupljenosti između dvije skupina vidljiva je u slučaju porodice *Pasteurellaceae* reda *Pasteurellales*. Udio navedene porodice se u slučaju “placebo” skupine prvo smanjio za 64 % i potom porastao za 122 %. U slučaju “prebiotici” skupine udio se smanjio za 81 % nakon čega je uslijedio porast za 1329 % (prilog 2).

Među svim uzorcima najmanje su bile zastupljene porodice [*Eubacterium*]*_coprostanoligenes_group* (u grafičkom prikazu obilježeno kao “group”) i

Oscillospiraceae reda *Oscillospirales*. U skupini “placebo” prve navedene porodice vidljiv je porast od 157 % nakon kojeg je uslijedio pad za 96 % (prilog 2). Udio navedene porodice se u slučaju ”prebiotici” prvo smanjio za 33 % i zatim povećao za 83 %. Zanimljivo je kako se zastupljenost porodice *Oscillospiraceae* jednako mijenjala u obje skupine. Samo u slučaju skupine koja je konzumirala prebiotike vidljivo je 20 %-tno smanjenje. Iz slike 5 vidljivo je kako je smanjenje udjela porodice *Oscillospiraceae* praćeno porastom udjela porodice Bifidobacteriaceae reda *Bifidobacteriales* u slučaju “prebiotici” skupine za 61 %. Zastupljenost iste porodice “placebo” skupine se kroz prva tri tjedna povećala za 28 % i potom smanjila na prvotnu vrijednost (7 %).

f) Analiza rezultata sekvenciranja na razini roda

Proširi li se analiza na razinu roda, iz grafičkog prikaza QIIME2 računalnog alata evidentno je kako su tri najzastupljenija roda u ispitivanim uzorcima: rod *Bacteroides* porodice *Bacteroidaceae*, rod *Blautia* porodice *Lachnospiraceae* i rod *Faecalibacterium* porodice *Ruminococcaceae*.



Slika 6. Zastupljenost pojedinih bakterijskih rodova u ispitivanim uzorcima

Slika 6 prikazuje zastupljenost mikrobnih vrsta u ispitivanim uzorcima na razini roda. Vidljivo je kako se udio roda *Bacteroides* u kontrolnoj skupini prvotno povećava sa 16 % na

18 %, zatim smanjuje na 11 % i ponovno povećava do 16 %. U skupini koja je konzumirala prebiotike udio navedenog roda prvotno opada za skoro 50 % i zatim raste do vrijednosti od 12 % ukupnih mikroorganizama. U slučaju roda *Faealibacterium* skupine “prebiotici” udio bakterija prvo raste sa 9 % na 10 % i zatim se smanjuje na 7 %. Udio istoimenog roda u skupini “placebo” smanjuje se sa 11 % na 6 % i zatim raste na prvotnu vrijednost (slika 6). Udio roda *Blautia* u obje skupine kreće se oko 7 % i gotovo se ne mijenja tijekom ispitivanog perioda.

Od ukupno navedenih mikrobni rodova na slici 6 najmanje zastupljeni pokazali su se rodovi *Colinsella* porodice *Coriobacteriaceae*, *Butyricoccus* porodice *Butyricoccaceae* i *Roseburia* porodice *Lachnospiraceae*. U slučaju kontrolne skupine udio *Colinsella* se u drugom tjednu smanjio za 17 %, zatim porastao za 80 % i u zadnjem tjednu smanjio za 22 %. Zastupljenost navedenog roda se u skupini koja je konzumirala prebiotike prvotno smanjila za 33 % i zatim povećala za 250 % (slika 6).

Zastupljenost *Butyricoccus* se oprečno mijenjala u ispitivanim skupinama. U “placebo” skupini broj bakterija se u početku smanjio za 25 % i zatim porastao za istu vrijednost, dok je u “prebiotici” skupini broj prvo porastao za 25 % i potom se smanjio za jednaku vrijednost. Suprotne promjene zastupljenosti bile su prisutne i kod roda *Roseburia*. Udio navedenog roda “placebo” skupine je rastao sa 0,5 % do 1 %, zatim da bi se zatim ponovno smanjio na 0,7 % i ponovno porastao do 1,3 %. Kod “prebiotici” skupine zastupljenost se prvo smanjila sa 0,4 % na 0,2 %, porasla do 0,5 % te se potom smanjila na 0,4 %.

Ono što iznenađuje su promjene zastupljenosti rodova *Ruminococcus* porodice *Ruminococcaceae* te *[Eubacterium]_coprostanoligenes_group* porodice *[Eubacterium]_coprostanoligenes_group*. Iz priloga 3 vidljivo je kako se zastupljenost roda *Ruminococcus* “prebiotici” skupine nije mijenjala nakon početnog pada od 50 %. Zastupljenost spomenutog roda “prebiotici” skupine se u prvom tjednu smanjila sa 2,5 % na 1 %, zatim porasla na 4 % i smanjila se na 1,6 % (prilog 3). Udio roda *[Eubacterium]_coprostanoligenes_group* je kod “placebo” skupine porastao za 157 % i potom se smanjio za 55 %. S druge strane, zastupljenost *[Eubacterium]_coprostanoligenes_group* se u “prebiotici” skupini smanjila za 33 % i do kraja vremena intervencije povećala za 66 % (slika 6).

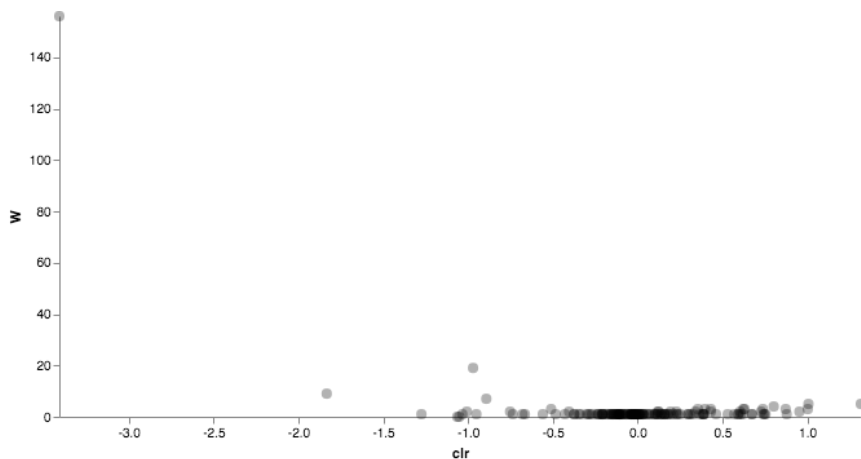
porasla sa 0,4 % na 0,9 %, zatim se smanjila na 0,3 % i u zadnjem tjednu porasla na 1 %. U slučaju skupine koja je konzumirala prebiotike vidljive su oprečne promjene zastupljenosti. Nakon pada sa 0,7 % na 0,4 % u trećem tjednu je uslijedio ponovni rast na prvotnu vrijednost i zatim ponovno pad na 0,3 %. Iz slike 7 vidljivo je kako se zastupljenost neidentificirane vrste roda *Butyricoccus* nije mijenjala tijekom ispitivanog perioda kod kontrolne skupine, dok je u jednakom udjelu bila prisutna u skupini "prebiotici" (0,3 %), uz iznimku kratkotrajnog rasta u predzadnjem tjednu na vrijednost 0,4 %. Zastupljenost neidentificirane vrste roda označenog kao *Incertae_Sedis* jednako se mijenjala u obje skupine za slične vrijednosti. Od ostalih prisutnih mikrobnih vrsta u uzorcima ističu se neidentificirana vrsta roda *[Eubacterium]_hallii_group*, nekultivirane vrste roda *Monoglobus* i neidentificirana vrsta roda *[Ruminococcus]_torques_group*.

Udio prve vrste u kontrolnoj skupini prvo se povećao za 50 % i zatim smanjio za isti postotak. U slučaju skupine koja je konzumirala prebiotike udio se prvo smanjio za 6 %, zatim povećao za 13 % i potom smanjio za 8 % (slika 7). Smanjenje zastupljenosti nekultivirane vrste roda *Monoglobus* u kontrolnoj skupini pratilo je duplo manje povećanje u "prebiotici" skupini. Jednako ponašanje zamijećeno je i kod neidentificirane vrsta roda *[Ruminococcus]_torques_group* u kojoj je porast u "prebiotici" skupini bio samo 13 % manji u odnosu na pad udjela skupine "placebo" (slika 7).

4.1.2. Analiza rezultata ANCOM testa

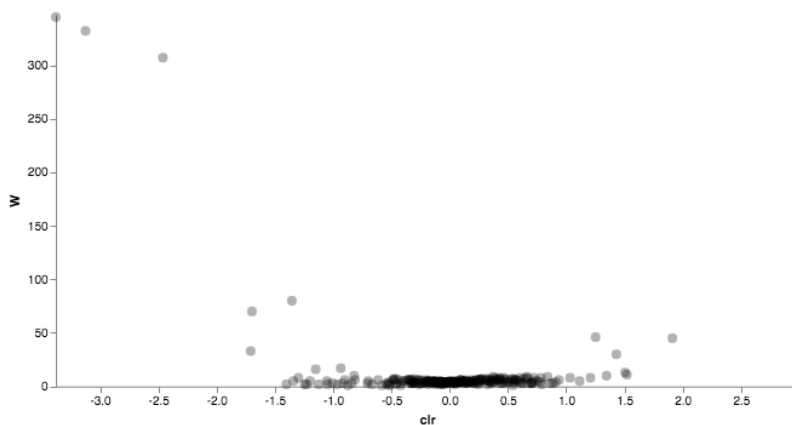
S ciljem utvrđivanja statistički najznačajnije razlike u promjeni zastupljenosti mikrobnih vrsta skupine koja je konzumirala i koja nije konzumirala prebiotike provedena je ANCOM analiza (Analysis of Composition of Microbiomes).

Vizualizacijom dobivenih rezultata Qiime2view alatom za vizualizaciju nije zamijećena statistički značajna razlika u sastavu crijevnog mikrobioma između kontrolne skupine i skupine koja je konzumirala prebiotike na taksonomskim razinama nižim od roda.



Slika 8. Vizualni prikaz rezultata ANCOM analize na razini roda

Iz slike 8 vidljivo je kako na razini roda postoji statistički značajna razlika u jednom bakterijskom rodu. Analizom dobivenog grafičkog prikaza u Qiime2view alatu ustanovljeno je kako se radi o neidentificiranom bakterijskom rodu porodice *Ruminococcaceae*.



Slika 9. Vizualni prikaz rezultata ANCOM analize na razini vrste

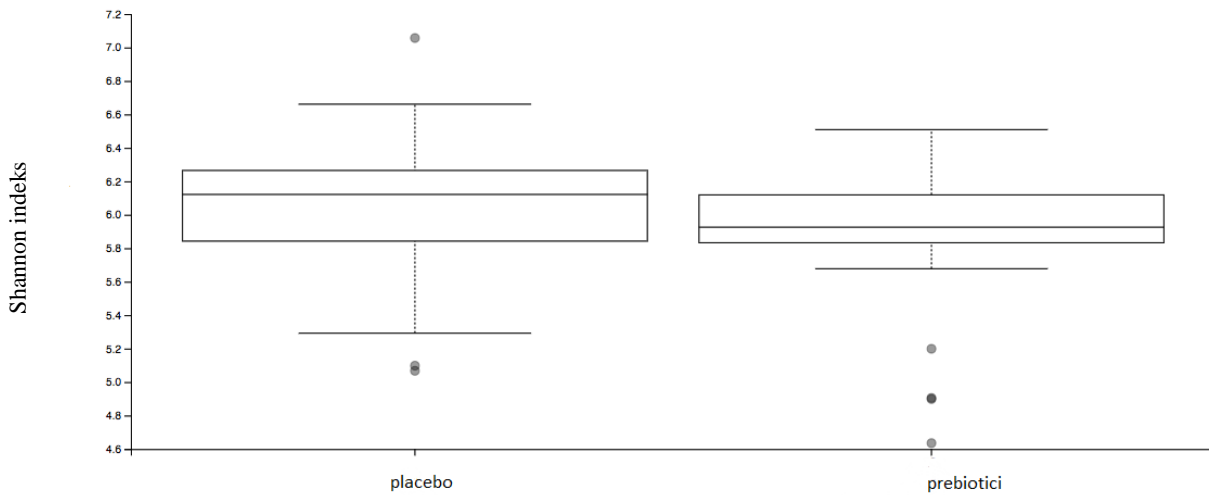
Daljnjom analizom na razini vrste utvrđena je statistički značajna razlika između dviju skupina u tri bakterijske vrste. Iz ANCOM statističkih rezultata utvrđeno je kako se radi o (gledano s lijeva na desno) neidentificiranoj vrsti porodice *Ruminococcaceae*, neidentificiranoj vrsti *metagenome* roda *Faecalibacterium* i neidentificiranoj vrsti *gut_metagenome* roda *[Eubacterium]_coprostanoligenes_group* (slika 9). Dvije grupe se statistički najviše razlikuju u zastupljenosti neidentificirane vrste porodice *Ruminococcaceae*. Nakon navedene vrste, najveća je razlika u neidentificiranoj vrsti *metagenome* roda *Faecalibacterium* i zatim

neidentificiranoj vrsti *gut_metagenome* roda *[Eubacterium]_coprostanoligenes_group* (slika 9).

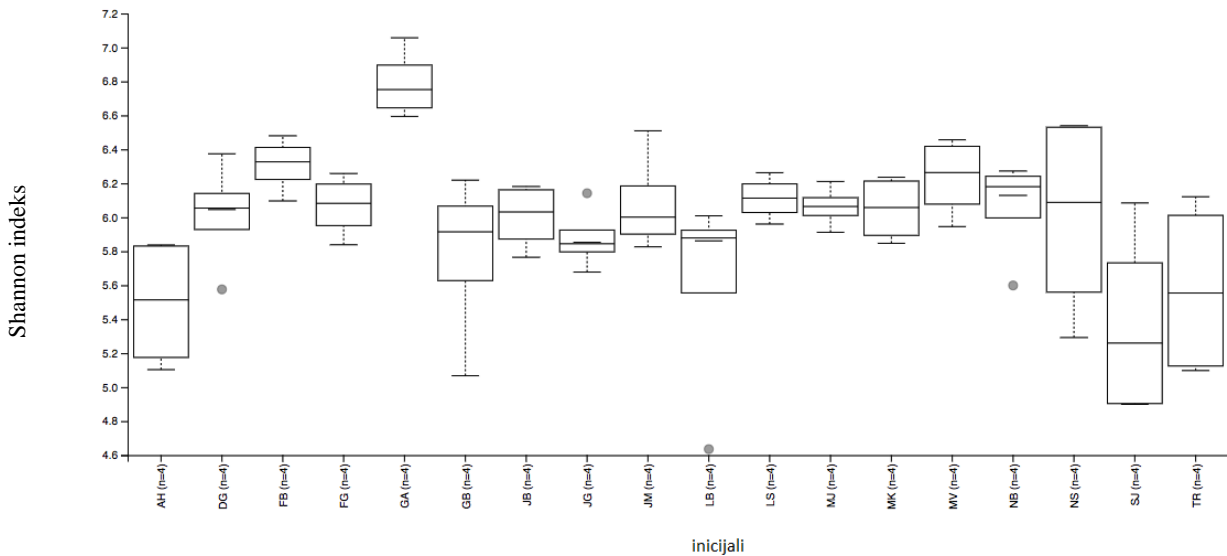
4.1.3. Analiza rezultata alfa i beta raznolikosti

S ciljem uspoređivanja raznolikosti unutar uzorka i između uzoraka izračunate su alfa i beta raznolikosti Qiime2 računalnim alatom, a rezultati vizualizirani Qiime2view računalnim alatom.

a)



b)

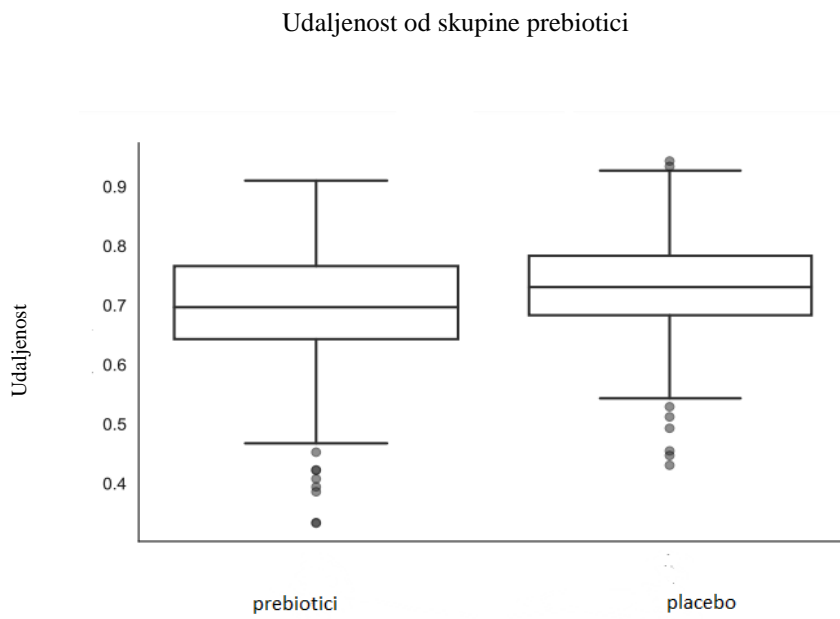


Slika 10. Grafički prikaz rezultata alfa raznolikosti a) s obzirom na konzumaciju prebiotika i b) s obzirom na ispitanike

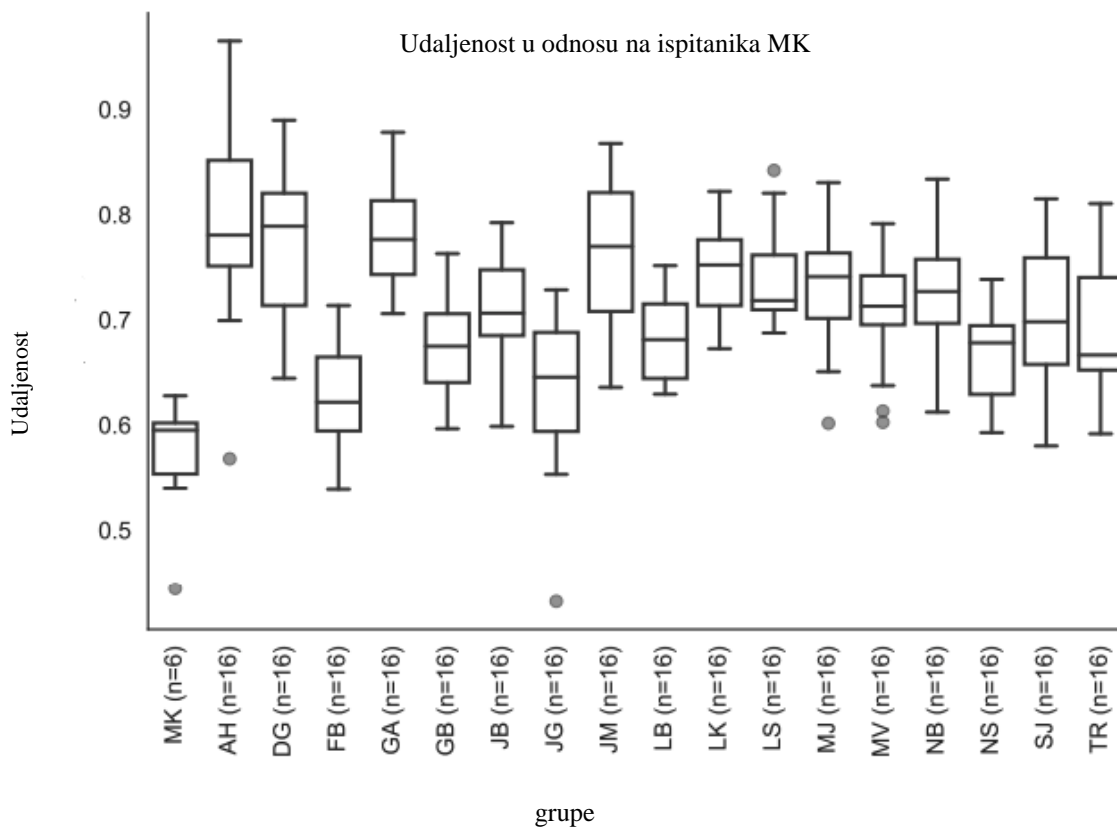
Iz rezultata vizualizacije alfa raznolikosti vidljivo je kako postoji statistički značajna razlika u alfa raznolikosti unutar uzorka ako se uzorci promatraju na razini svakog pojedinca ($p < 0,05$). No, ako se kao uzorak promatraju skupine "placebo" i "prebiotici" vidljivo je kako ne postoji statistički značajna razlika unutar uzorka ($p = 0,126$). Iz slike 10 b može se zamijetiti da je Shannon index veći u uzorcima GA, FB, FG, DG u odnosu na ostale ispitanike što upućuje na to da uzorci GA, FB, FG, DG imaju ravnomjerniju distribuciju mikrobne raznolikosti unutar svoja četiri uzorka. Nadalje, u usporedbi s kontrolnom skupinom ispitanici koji su konzumirali prebiotike (SJ i AH) imaju smanjenu alfa raznolikost.

Pri promatranju uzoraka kod skupine koja je konzumirala i nije konzumirala prebiotike zamijećena je smanjena alfa raznolikosti u skupini "prebiotici" (slika 10 a). Drugim riječima, evidentno je kako ispitanici koji nisu konzumirali prebiotike imaju bogatiji i ravnomjernije distribuiranu mikrobnu raznolikost unutar uzorka.

a)



b)



Slika 11. Grafički prikaz rezultata beta raznolikosti a) s obzirom na konzumaciju prebiotika i b) za ispitanika MK s obzirom na ostale ispitanike

Permanova (PERmutational Multivariate ANalysis of VAriance) testom beta raznolikost grupe koja je konzumirala i koja nije konzumirala prebiotike pokazalo se kako se mikrobnii sastav ne razlikuje između ispitanika koji su konzumirali prebiotike i ispitanika koji nisu, izuzev par vrijednosti koje odskakuju od prosjeka (slika 11 a). Analizom beta raznolikost s obzirom na pojedine ispitanike na primjeru ispitanika MK utvrđeno je kako postoji razlika u sličnosti između sastava crijevne mikrobiote ispitanika koji su konzumirali prebiotike i onih koji nisu. Iz slike 11 b vidljivo je kako je generalno sastav ispitanika AH koji je konzumirao prebiotike sličniji ispitaniku MK nego što je sastav ispitanika GA koji nije konzumirao. Međutim, to nije vidljivo na primjeru svih ispitanika koji su konzumirali prebiotike (LS, Jb, FB, JG, SJ, MJ, JM, AH, LB) zbog čega se ne može zaključiti da li je došlo do promjene beta raznolikosti.

4.2. RASPRAVA

Usporede li se dobiveni rezultati analize zastupljenosti pojedinih bakterijskih koljena u ispitivanim uzorcima s istraživanjem Gacesa i suradnika (2022) evidentno je kako su prisutna ista bakterijska koljena, no u drugačijoj zastupljenosti (slika 2). Naime, rezultati provedene analize u ovom diplomskom radu pokazali su kako je najzastupljenije koljeno *Firmicutes* (67 %), dok su rezultati istih autora (Gacesa i sur., 2022) istaknuli koljeno *Bacteroidota* kao najviše zastupljeno. Razlog tome može se pripisati okolišu ispitanika i uvjetima kojima su bili izloženi u ranom djetinjstvu. Nadalje, usporede li se rezultati sekvenciranja na razini porodice (slika 5) s najčešćim bakterijskim porodicama ispitanika koji su živjeli u urbanoj sredini vidljivo je kako su jedne od najzastupljenijih porodica *Bacteroidaceae* i *Lachnospiraceae* prisutne u visokim udjelima kod pripadnika urbane sredine (Rosas- Plaza i sur., 2022, Gupta i sur., 2017). Proširi li se utjecaj prebivališta na geografsku pripadnost, koljeno *Firmicutes* koje je najzastupljenije koljeno kod uzoraka iz ovog diplomskog rada, također se navodi kao visoko zastupljeno kod Europske djece (Gupta i sur., 2017).

Razmotri li se za koju su prehranu tipične bakterije navedenih ispitanika, pregledom literaturnih podataka, vidljivo je da se najdominantnije vrste povezuju sa prehranom bogatom životinjskim mastima i proteinima (Rosas- Plaza i sur., 2022, Gupta i sur., 2017). Uz to, povećan omjer *Firmicutes* u odnosu na *Bacteroidota* u ispitivanim uzorcima sugerira kako su se ispitanici uglavnom hranili “zapadnjačkom” prehranom u kojoj dominira procesirana hrana (Beam i sur., 2021).

Osim prehrane, kao važan faktor koji utječe na sastav crijevnog mikrobioma se pokazao stres. Geng i suradnici (2020) su ispitivanjem učinka psihološkog stresa na promjene u crijevnom mikrobiomu došli do zaključka kako je izlaganje psihološkom stresu dovelo do povećanja zastupljenost rodova *Allisonella*, *Globicatella*, *Odoribacter* što je zamijećeno i kod ispitanika AH, JM, GA, FB, JB, MJ, DG. No, nisu svi ispitanici bili dio ciljne skupine zbog čega se konzumacija prebiotika Nutrioze ne može dovesti u korelaciju s vezom crijeva-mozak. Literaturni podaci navode kako vježbanje generalno povećava bakterijsku raznolikost i zastupljenost, poglavito vrsta koje proizvode butirat kao što je porodica *Lachnospiraceae*, najzastupljenija porodica u obje skupine ispitivanih uzoraka (Torquati i sur., 2023). Osim toga, Torquati i suradnici (2023) ističu kao karakteristiku osoba koje su se kontrolirano bavile fizičkom aktivnošću veliki omjer koljena *Firmicutes* i *Bacteroidota*, što je i vidljivo u rezultatima ovog eksperimentalnog rada jer su se svi ispitanici aktivno bavili sportom. Zanimljivo je da neka istraživanja navode kako promjene u sastavu crijevne mikrobiote utječu na komponente sportske izvedbe kao što su apsorpcija nutrijenata iz hrane i oporavak mišića (Miranda- Comas i sur., 2022). S druge strane, istraživanje Hadžića i suradnika (2022) pokazalo je kako konzumacija prebiotika Nutrioze nije utjecala na sportsku izvedbu ispitanika, stoga se povezanost mikrobnog sastava i kvalitete sportske izvedbe ne može uzeti sa sigurnošću.

Pregledom literaturnih podataka o učinku konzumacije prebiotika Nutrioze na sastav crijevne mikrobiote, zamijećeno je da se kao posljedica konzumacije navodi porast *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* vrsta. Usporedi li se zastupljenost *Bifidobacterium* u analiziranim uzorcima može se primijetiti kako ispitanici koji su konzumirali prebiotike (LS, JB, FB, JG, ŠJ, MJ, JM, AH, LB) imaju veći udio navedenog bakterijskog roda u odnosu na one koji nisu. Štoviše, gledano na pojedinačne rezultate, evidentno je kako je veći udio bakterija bio prisutan u uzorcima pred kraj istraživanja, nego onima uzetim na početku. Nadalje, literaturni podaci navode porast rodova *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Coprococcus* i *Lachnospira* kod ispitanika koji su konzumirali Nutriozu (Thirion i sur., 2022; Berard i sur., 2009). Iz grafičkog prikaza analize rezultata sekvenciranja na razini roda (slika 6) može se primijetiti kako kod niti jednog od navedenih rodova iz literature u ispitivanim uzorcima nije bio prisutan konstanti rast zastupljenosti. Udio *Bacteroides* naprije se smanjio, a zatim povećao. Udio roda *Parabacteroides* u uzorcima skupine "prebiotici" mijenjao se suprotno u odnosu na rod *Bacteroides* (prvo je rasla zastupljenost i u zadnjem tjednu se smanjila). Zastupljenost roda *Coprococcus* mijenjala se iz tjedan u tjedan, počevši s padom kojeg su pratili rast i zatim pad zastupljenosti. Međutim, promatranje utjecaja prebiotika na sastav

crijevne mikrobiote ne može se ograničiti samo na vrste koje koriste Nutriozu kao supstrat. Fermentacijom Nutrioze *Lactobacillus* vrste bakterija proizvode kratkolančane masne kiseline koje bakterije roda *Faecalibacterium* koriste kao supstrat (Rivière i sur., 2016).

Kod ispitanika koji su sudjelovali u ovom istraživanju, primijećen je porast udjela *Faecalibacterium* nakon prvog tjedna kod skupine koja je konzumirala prebiotike. No, zbog promjena zastupljenosti prisutnih u preostalim tjednima te placebo skupini taj porast se ne može pripisati konzumaciji prebiotika. Fermentacijom Nutrioze *Lactobacillus* vrste proizvode kratkolančane masne kiseline i snižavaju pH u crijevima (Guerin-Derumaux i sur., 2019). Kiselijski uvjeti u crijevima reduciraju proliferaciju bakterija koljena *Bacteroides*, što je vidljivo i u rezultatima ovog rada (Duncan i sur., 2009).

Literaturni podaci nisu usuglašeni glede alfa raznolikost crijevne mikrobiote kod ispitanika koji su konzumirali prebiotike. Jedni izvori ističu kako konzumacija prebiotika nema utjecaja na alfa raznolikost (Tims i sur., 2016), dok drugi navode kako je zamijećena smanjena alfa raznolikost skupine koja je konzumirala prebiotike u odnosu na kontrolnu skupinu (Nettleton i sur., 2021). Rezultati ovog istraživanja pokazuju kako se konzumacijom Nutrioze smanjila alfa raznolikost unutar uzorka. Smanjenje nije bilo prisutno kod svih ispitanika koji su konzumirali prebiotike zbog čega se ne može zaključiti da konzumacija prebiotika rezultira smanjenjem alfa raznolikosti (slika 10 a i b). Rezultati beta raznolikosti (slika 11 a i b) pokazuju kako jednako kao i u rezultatima Nettletona i suradnika (2021) nije došlo do promjene beta raznolikosti uslijed konzumacije prebiotika.

Utjecaj Nutrioze na cjelokupnu crijevnju mikrobiotu najbolje se vidi iz rezultata ANCOM analize. Na taksonomskoj razini roda (slika 8) rezultati su pokazali kako se dvije skupine razlikuju u neidentificiranom rodu porodice *Ruminococcaceae*, što je vidljivo i u rezultatima Tran i suradnika (2019). Uzmu li se u obzir rezultati ANCOM analize na razini vrste (slika 9), uz vrstu porodice *Ruminococcaceae* razlika je prisutna i u vrsti roda *Faecalibacterium* kojeg istraživanja navode da je više zastupljeno kod ispitanika koji su konzumirali prebiotike (Rosas-Plaza i sur., 2022; Gupta i sur., 2017; Rogers i sur., 2013).

5. ZAKLJUČCI

1. Nije došlo do promjene alfa i beta raznolikosti u ispitivanim uzorcima kao rezultat konzumacije Nutrioze (prebiotika).
2. U ispitivanim uzorcima, u obje skupine tijekom ispitivanog razdoblja bio je prisutan visoki omjer *Firmicutes/Bacteroides*. Najzastupljenije bakterijsko koljeno u ispitivanim uzorcima bilo je koljeno *Firmicutes* što ukazuje da se prehrana ispitanika temeljila na “zapadnjačkoj” prehrani s visokim udjelom namirnica životinjskog porijekla.
3. Između ispitanika koji su konzumirali prebiotike i koji nisu, na taksonomskim razinama domena, koljeno, razred, red i porodica nije utvrđena statistički značajna razlika u sastavu. Skupine koje su konzumirale prebiotike i koje nisu razlikuju se na taksonomskoj razini rod u neidentificiranom bakterijskom rodu porodice *Ruminococcaceae*. Na razini vrste, kontrolna skupina i skupina koja je konzumirala prebiotike razlikuju se u neidentificiranoj vrsti porodice *Ruminococcaceae*, neidentificiranoj vrsti metagenome roda *Faecalibacterium* i neidentificiranoj vrsti *gut_metagenome* roda *[Eubacterium]_coprostanoligenes_group*. Najveća razlika je prisutna u neidentificiranoj vrsti porodice *Ruminococcaceae*.
4. Kratki vremenski period konzumacije prebiotika, utjecaj velikog broja vanjskih čimbenika, ponajviše prehrane i načina života imali su utjecaj na dobivene rezultate istraživanja.
5. Duži vremenski period konzumacije prebiotika Nutrioze mogao bi doprinijeti većim razlikama u rezultatima mikrobnog sastava.

6. LITERATURA

Afzaal M, Saeed F, Shah YA, Hussain M, Rabail R, Socol CT, Hassoun A, Pateiro M, Lorenzo JM, Rusu AV, Aadil RM (2022) Human gut microbiota in health and disease: Unveiling the relationship. *Front Microbiol* **13**, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.999001>

Anonymus (2023) NUTRIOSE® FM 10 | Soluble fiber. ROQUETE, <https://www.roquette.com/innovation-hub/food/product-profile/nutriose-fm-10>. Pristupljeno 20. travnja 2023.

Arbolea S, Binetti A, Salazar N, Fernández N, Solís G, Hernández-Barranco A, Margolles A, de Los Reyes-Gavilán CG, Gueimonde M (2012) Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiol Ecol* **79**, 763–772. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01261.x>

Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR i sur. (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**, 174-180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>

Beam A, Clinger E, Hao L (2021) Effect of Diet and Dietary Components on the Composition of the Gut Microbiota. *Nutrients* **13**(8), 1-15. <https://doi.org/10.3390/nu13082795>

Berard M, Deremaux L, Lefranc-Millot C, Lefranc-Millot M, Lefranc-Millot V (2009) Prebiotic effects of NUTRIOSE®: a review. <https://www.roquette.com/>, Pristupljeno 01. lipnja 2023.

Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM (2013) The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res* **54**(9), 2325-2340. <https://doi.org/10.1194/jlr.R036012>

Birkeland E, Gharagozlian S, Birkeland KI, Holm OKS, Thorsby PM, Aas A-M (2021) Effect of inulin-type fructans on appetite in patients with type 2 diabetes: a randomised controlled crossover trial. *J Nutr Sci* **10**, 1-11. <https://doi.org/10.1017/jns.2021.70>

Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, Dillon M, Bolyen E, Knight R i sur. (2018) Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome* **6**(1), 1-17. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>

Bray JR, Curtis JT (1957) An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin *Ecol Monogr* **27**(4), 325–349. <https://doi.org/10.2307/1942268>

Butel MJ, Suau A, Campeotto F, Magne F, Aires J, Ferraris L i sur. (2007) Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: A prospective analysis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **44**, 577–582. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3180406b20>

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK i sur. (2010) QIIME allows analysis of highthroughput community sequencing data. *Nat Methods* **7**, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>

Carroll IM., Ringel-Kulka T, Siddle JP, Klaenhammer TR, Ringel Y (2012) Characterization of the fecal microbiota using high-throughput sequencing reveals a stable microbial community during storage. *PLoS ONE* **7**(10), 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046953>

Duncan SH, Louis P, Thomson JM, Flint HJ (2009) The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environ Microbiol* **11**(8), 2112-2122. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01931.x>

Estaki M, Jiang L, Bokulich NA, McDonald D, González A, Kosciolk T i sur. (2020) QIIME 2 enables comprehensive end-to-end analysis of diverse microbiome data and comparative studies with publicly available data. <https://curr-protoc-bioinformatics.qiime2.org/#comprehensive-end-to-end-microbiome-analysis-using-qiime-2>.
Pristupljeno 10. lipnja 2023.

Eurofins (2023) Next Generation Sequencing. <https://www.eurofins.com/>. Pristupljeno 01. lipnja 2023.

Fouhy F, Deane J, Rea MC, O'Sullivan Ó, Ross RP, O'Callaghan G i sur. (2015) The effects of freezing on faecal microbiota as determined using MiSeq sequencing and culture-based investigations. *PLoS ONE* **10**(3), 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119355>

Gacesa R, Kurilshikov A, Vich Vila A, Sinha T, Klaassen MAY, Bolte LA i sur. (2022) Environmental factors shaping the gut microbiome in a Dutch population. *Nature* **604**, 732–739. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04567-7>

Geng S, Yang L, Cheng F, Zhang Z, Li J, Liu W i sur. (2020) Gut Microbiota Are Associated With Psychological Stress-Induced Defections in Intestinal and Blood-Brain Barriers. *Front Microbiol* **10**, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03067>

Gibson RG, Probert HM, Van LJ, Rastall RA, Roberfroid MB (2004) Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* **17**, 259–275. <https://doi.org/10.1079/NRR200479>

- Grosicki GJ, Durk RP, Bagley JR (2019) Rapid gut microbiome changes in a world-class ultramarathon runner. *Physiol Rep* **7**(24), 1-7. <https://doi.org/10.14814/phy2.14313>
- Guerin-Derumaux L, Hobden MR, Zhang C, Neut C, Thabuis C, Vazhappilly R i sur. (2019) NUTRIOSE® Soluble Fiber Selectively Modulates Gut Microbiota Composition in Healthy Volunteers. <https://www.roquette.com/> Pristupljeno 20. travnja 2023.
- Gupta VK, Paul S, Dutta C (2017) Geography, Ethnicity or Subsistence-Specific Variations in Human Microbiome Composition and Diversity. *Front Microbiol* **8**, 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01162>
- Hadžić E, Starčević A, Rupčić T, Žučko J, Diminić J, Oros D i sur. (2022) Effects of Prebiotic Supplementation on Exercise Performance and Perception of Fatigue in Young Basketball Players. *Frontiers* (in review)
- He F, Li Y (2020) Role of gut microbiota in the development of insulin resistance and the mechanism underlying polycystic ovary syndrome: a review. *Journal of Ovarian Research* **13**(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13048-020-00670-3>
- Illumina (2015) An introduction to Next-Generation Sequencing Technology. www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html. Pristupljeno 15. svibnja 2023.
- Jain A, Li XH, Chen WN (2018) Similarities and differences in gut microbiome composition correlate with dietary patterns of Indian and Chinese adults. *AMB Express* **8**(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0632-1>
- Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D (2015) Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* **21**(29), 8787-8803. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
- Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK (2007) Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J* **1**, 56-66. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.3>
- Kennedy MS, Chang EB (2020) The microbiome: Composition and locations. *Prog Mol Biol Transl Sci* **176**, 1-42. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2020.08.013>
- Kers JG, Saccenti E (2022) The Power of Microbiome Studies: Some Considerations on Which Alpha and Beta Metrics to Use and How to Report Results. *Front Microbiol* **12**, 1-18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.796025>

Kim BR, Shin J, Guevarra R, Lee JH, Kim DW, Seol K- H i sur. (2017) Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *J Microbiol Biotechnol* **27**(12), 2089–2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>

King CH, Desai H, Sylvetsky AC, LoTempio J, Ayanyan S, Carrie J i sur. (2019) Baseline human gut microbiota profile in healthy people and standard reporting template. *PLoS One* **14** (9), 1-25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206484>

Kumar G, Bhadury P (2022) Effect of different fixatives on yield of DNA from human fecal samples. *IOPSciNotes* **3**, 1-7. <https://doi.org/10.1088/2633-1357/ac6d2e>

Kumari M, Bhushan B, Kokkiligadda A, Kumar V, Behare P, Tomar SK (2021) Vitamin B12 biofortification of soymilk through optimized fermentation with extracellular B12 producing *Lactobacillus* isolates of human fecal origin. *Curr Res Food Sci* **4**, 646-654. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.09.003>

Laws L (2022) FDA’s approval of first fecal microbiota product, Rebyota, hailed an ‘enormous step forward’ for the field. LABIOTECH. <https://www.labiotech.eu/trends-news/fda-approval-of-first-fecal-microbiota-product-rebyota-hailed-fantastic/>. Pristupljeno 01. svibnja 2023.

Lederberg J, McCray AT](2001) ‘Ome sweet ‘omics - a genealogical treasury of words. *Scientist* **15**(7). National Library of Medicine. <https://lhncbc.nlm.nih.gov/LHC-publications/pubs/OmeSweetOmicsAGenealogicalTreasuryofWords.html>. Pristupljeno 02. svibnja 2023.

Li Y, Ren L, Wang Y, Li J, Zhou Q, Peng C i sur. (2022) The Effect of Breast Milk Microbiota on the Composition of Infant Gut Microbiota: A Cohort Study. *Nutrients* **14**, 1-13. <https://doi.org/10.3390/nu14245397>

Liu BN, Liu XT, Liang ZH, Wang JH (2021) Gut microbiota in obesity. *World J Gastroenterol* **27**(25), 3837-3850. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i25.3837>

Marchesi JR, Ravel J (2015) The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* **3**, 1-3. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>

Markus V, Paul AA, Teralı K, Özer N, Marks, RS, Golberg K i sur. (2023) Conversations in the Gut: The Role of Quorum Sensing in Normobiosis. *Int J Mol Sci* **24**(4), 1-22. <https://doi.org/10.3390/ijms24043722>

Mandal S, Van Treuren W, White RA, Eggesbø M, Knight R, Peddada SD (2015) Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microb Ecol Health Dis* **26**, 1-7. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.27663>

- Matsumoto M, Inoue R, Tsukahara T, Ushida K, Chiji H, Matsubara N i sur. (2008) Voluntary running exercise alters microbiota composition and increases n-butyrate concentration in the rat cecum. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**(2), 572-576. <https://doi.org/10.1271/bbb.70474>
- Menon S (2023) Multiplexing High Throughput Sequencing Samples. Bioinformatics Workbook. <https://bioinformaticsworkbook.org/about.html#gsc.tab=0>. Pristupljeno 13. lipnja 2023.
- Miko E, Csaszar A, Bodis J, Kovacs K (2022) The Maternal–Fetal Gut Microbiota Axis: Physiological Changes, Dietary Influence, and Modulation Possibilities. *Life* **12**, 1-20. <https://doi.org/10.3390/life12030424>
- Miranda-Comas G, Petering RC, Zaman N, Chang R (2022) Implications of the Gut Microbiome in Sports. *Sports Health* **14**(6), 894-898. <https://doi.org/10.1177/19417381211060006>
- Mittal R, Debs LH, Patel AP, Nguyen D, Patel K, O'Connor G i sur. (2017) Neurotransmitters: The Critical Modulators Regulating Gut-Brain Axis. *J Cell Physiol* **232**(9), 2359-2372. <https://doi.org/10.1002/jcp.25518>
- Nettleton JE, Klancic T, Schick A, Choo AC, Cheng N, Shearer J i sur. (2021) Prebiotic, Probiotic, and Synbiotic Consumption Alter Behavioral Variables and Intestinal Permeability and Microbiota in BTBR Mice. *Microorganisms* **9**, 1-16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091833>
- Nielsen MJ, Rasmussen MR, Andersen CB, Nexø E, Moestrup SK (2012) Vitamin B12 transport from food to the body's cells—a sophisticated, multistep pathway. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **9**(6), 345-354. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.76>
- O'Hara AM, Shanahan F (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* **7**(7), 688–693. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400731>
- Oligschlaeger Y, Yadati T, Houben T, Condello Oliván CM, Shiri-Sverdlov R (2019) Inflammatory bowel disease: a stressed “gut/feeling.” *Cells* **8**(7), 1-26. <https://doi.org/10.3390/cells8070659>
- Pant K, Peixoto E, Richard S, Gradilone SA (2020) Role of histone deacetylases in carcinogenesis: potential role in cholangiocarcinoma. *Cells* **9**(3), 1-14. <https://doi.org/10.3390/cells9030780>

- Pham VT, Dold S, Rehman A, Bird JK, Steinert RE (2021) Vitamins, the gut microbiome and gastrointestinal health in humans. *Nutr Res* **95**, 35-53. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2021.09.001>
- Piquer-Esteban S, Ruiz-Ruiz S, Arnau V, Diaz W, Moya A (2021) Exploring the universal healthy human gut microbiota around the World. *Comput Struct Biotechnol J* **20**, 421-433. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.12.035>
- 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**(7285), 59-65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Rivière A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L (2016) Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Front Microbiol* **7**, 1-21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00979>
- Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N i sur. (2015) The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis* **26**, 1-17. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26050>
- Rogers TE, Pudlo NA, Koropatkin NM, Bell JSK, Moya Balasch M, Jasker K i sur. (2013) Dynamic responses of *Bacteroides thetaiotaomicron* during growth on glycan mixtures. *Mol Microbiol* **88**(5), 876–890. <https://doi.org/10.1111/mmi.12228>
- Rosas-Plaza S, Hernández-Terán A, Navarro-Díaz M, Escalante AE, Morales-Espinosa R, Cerritos R (2022) Human Gut Microbiome Across Different Lifestyles: From Hunter-Gatherers to Urban Populations. *Front Microbiol* **13**, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.843170>
- 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. *Journal of Microbiological Methods* **81**(2), 127-134. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.007>
- Schluenzen F, Tocilj A, Zarivach R, Harms J, Gluehmann M, Janell D i sur. (2000) Structure of Functionally Activated Small Ribosomal Subunit at 3.3 Å Resolution. *Cell* **102**(5), 615-623. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00084-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00084-2)

- Schnupf P, Gaboriau-Routhiau V, Cerf-Bensussan N (2018) Modulation of the gut microbiota to improve innate resistance. *Curr Opin Immunol* **54**, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.08.003>
- Sugiyama F, Yamaguchi T, Hu A, Kobayashi A, Kobayashi H (2017) Effects of Fiber Supplementation for Four Weeks on Athletic Performance in Japanese College Athletes: A Case Study—Measurement of the Athletic Performance, Salivary Biomarkers of Stress, and Mood, Affect Balance. *Health (Irvine Calif)* **9**, 556–567. <https://doi.org/10.4236/health.2017.93039>
- Tang Q, Jin G, Wang G, Liu T, Liu X i sur. (2020) Current Sampling Methods for Gut Microbiota: A Call for More Precise Devices. *Front Cell Infect Microbiol* **10**, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00151>
- Tedjo DI, Jonkers DMAE, Savelkoul PH, Masclee AA, van Best N, Pierik MJ i sur. (2015) The effect of sampling and storage on the fecal microbiota composition in healthy and diseased subjects *PLoS ONE* **10**, 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126685>
- Tenchov R (2022) How Your Gut Microbiome is Linked to Depression and Anxiety. *CAS*. <https://www.cas.org/>. Pristupljeno 15.svibnja 2023.
- Thirion F, Da Silva K, Plaza Oñate F, Alvarez AS, Thabuis C, Pons N i sur. (2022) Diet Supplementation with NUTRIOSE, a Resistant Dextrin, Increases the Abundance of *Parabacteroides distasonis* in the Human Gut. *Mol Nutr Food Res* **66**(11), 1-9. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202101091>
- Torquati L, Gajanand T, Cox ER, Willis CRG, Zaugg J, Keating SE i sur. (2023) Effects of exercise intensity on gut microbiome composition and function in people with type 2 diabetes. *Eur J Sport Sci* **23**(4), 530-541. <https://doi.org/10.1080/17461391.2022.2035436>
- Umu ÖCO, Rudi K, Diep DB (2017) Modulation of the gut microbiota by prebiotic fibres and bacteriocins. *Microb Ecol Health Dis* **28**(1), 1-11. <https://doi.org/10.1080/16512235.2017.1348886>
- Wang S, Xiao Y, Tian F, Zhao J, Zhang H, Zhai Q i sur. (2020) Rational use of prebiotics for gut microbiota alterations: Specific bacterial phylotypes and related mechanisms. *Journal of Functional Foods* **66**, 1-22. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103838>
- Wang X, Zhang P, Zhang X (2021) Probiotics Regulate Gut Microbiota: An Effective Method to Improve Immunity. *Molecules* **26**(19), 1-15. <https://doi.org/10.3390/molecules26196076>

- Wegierska AE, Charitos IA, Topi S, Potenza MA, Montagnani M, Santacroce L (2022) The Connection Between Physical Exercise and Gut Microbiota: Implications for Competitive Sports Athletes. *Sports Med* **52**, 2355–2369. [https://doi.org/ 10.1007/s40279-022-01696-x](https://doi.org/10.1007/s40279-022-01696-x)
- Wensel CR, Pluznick JL, Salzberg SL, Sears CL (2022) Next-generation sequencing: insights to advance clinical investigations of the microbiome. *J Clin Invest* **132**(7), 1-12. [https://doi.org/ 10.1172/JCI154944](https://doi.org/10.1172/JCI154944)
- Whipps J, Lewis K, Cooke R (1988) Mycoparasitism and plant disease control. U: Burge M (ured.) Fungi Biol Control Syst, Manchester University Press, str. 161-187.
- Wiciński M, Sawicka E, Gębalski J, Kubiak K, Malinowski B (2020) Human Milk Oligosaccharides: Health Benefits, Potential Applications in Infant Formulas, and Pharmacology. *Nutrients* **12**(1), 1-14. [https://doi.org/ 10.3390/nu12010266](https://doi.org/10.3390/nu12010266)
- Willis AD (2019) Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics. *Front Microbiol* **10**, 1-5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02407>
- Wu C, Chen T, Xu W, Zhang T, Pei Y, Yang Y i sur. (2021) The maintenance of microbial community in human fecal samples by a cost effective preservation buffer. *Sci Rep* **11**(1). [https://doi.org/ 10.1038/s41598-021-92869-7](https://doi.org/10.1038/s41598-021-92869-7)
- Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA i sur. (2011) Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* **334**(6052), 105-108. [10.1126/science.1208344](https://doi.org/10.1126/science.1208344)
- Xie H, Guo R, Zhong H, Feng Q, Lan Z, Qin B. i sur. (2016) Shotgun Metagenomics of 250 Adult Twins Reveals Genetic and Environmental Impacts on the Gut Microbiome. *Cell Syst* **3**, 572–584. [https://doi.org/ 10.1016/j.cels.2016.10.004](https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.10.004)
- Zhang P (2022) Influence of Foods and Nutrition on the Gut Microbiome and Implications for Intestinal Health. *Int J Mol Sci* **23**, 1-20. [https://doi.org/ 10.3390/ijms23179588](https://doi.org/10.3390/ijms23179588)
- Zhang Q, Chen B, Zhang J, Dong J, Ma J, Zhang Y i sur. (2023) Effect of prebiotics, probiotics, synbiotics on depression: results from a meta-analysis. *BMC Psychiatry* **23**(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12888-023-04963-xđ>

PRILOZI

Prilog 1. Zastupljenost bakterijskih vrsta u ispitivanim uzorcima na razini domene

tjedan	grupa	d_Bacteria	ostalo
1	placebo	0.998534	0.001466
2	placebo	0.998802	0.001198
3	placebo	0.999751	0.000249
4	placebo	0.995558	0.004442
1	prebiotici	1.000000	0.000000
2	prebiotici	1.000000	0.000000
3	prebiotici	0.999763	0.000237
4	prebiotici	0.999901	0.000099

	c i																			
2	p r e b i o t i c i	0.274389	0.073328	0.195534	0.075447	0.069605	0.003668	0.006165	0.009684	0.02262	0.069309	0.017501	0.001971	0.004836	0.009572	0.015074	0.004328	0.091305	0.00236	0 .0 5 3 3 0 4
3	p r e b i o t i c i	0.290174	0.088388	0.201547	0.078162	0.0248	0.008677	0.00722	0.004656	0.04648 6	0.054414	0.033034	0.000744	0.005789	0.008755	0.017768	0.005512	0.081132	0.003843	0 .0 3 3 8 9
4	p r e b i o t i c i	0.25297	0.018368	0.16584	0.121002	0.019302	0.004622	0.010868	0.003515	0.02736 5	0.080855	0.046932	0.010506	0.006456	0.022695	0.021525	0.0038	0.142641	0.006968	0 .0 3 3 7 7 3

Prilog 3. Zastupljenost bakterijskih vrsta u ispitivanim uzorcima na razini roda

tjedan	grupa	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Fusicatenibacter	d__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Tannerellaceae;g__Parabacteroides	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Agathobacter	d__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Bacteroides	d__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Rikenellaceae;g__Alistipes	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__Christensenellaceae;g__Ruminococcaceae;g__Ruminococcus	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__Ruminococcaceae;g__Faecalibacterium	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__[Eubacterium]_coprostanoligenes_group	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__Oscillospiraceae;g__Urethrobacter	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Aerostipes	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Dorea	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Dorea	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Dorea	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Dorea	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Dorea	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Dorea	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Dorea	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Dorea	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Dorea
1	placebo	0.027565	0.020997	0.031436	0.157829	0.04985	0.020159	0.008968	0.10574	0.006689	0.008308	0.023319	0.009531	0.018866	0.050471	0.012433	0.010776	0.065723	0.022938	0.002573
2	placebo	0.030479	0.019142	0.046845	0.152677	0.046553	0.032019	0.007338	0.077154	0.007537	0.008967	0.01307	0.011375	0.01915	0.047303	0.011456	0.013856	0.066283	0.029013	0.001283
3	placebo	0.020782	0.014432	0.027819	0.114147	0.039178	0.034212	0.007624	0.061603	0.018115	0.014426	0.017959	0.007952	0.027177	0.035217	0.009735	0.010587	0.074728	0.021393	0.000923
4	placebo	0.021177	0.027878	0.037872	0.160193	0.035996	0.032615	0.007007	0.11081	0.007629	0.007906	0.021631	0.007454	0.019612	0.062183	0.020383	0.010262	0.066694	0.022207	0.002315
1	prebiotici	0.040026	0.03735	0.05446	0.138502	0.036998	0.025141	0.00552	0.093705	0.009015	0.00708	0.017605	0.004755	0.024106	0.045233	0.021774	0.018998	0.0739	0.031501	0.003774
2	prebiotici	0.050243	0.073328	0.04363	0.075447	0.069284	0.011566	0.003668	0.096577	0.006165	0.007614	0.016722	0.004277	0.018209	0.038888	0.016013	0.01091	0.065153	0.030085	0.001971
3	prebiotici	0.046335	0.088388	0.036085	0.078162	0.024562	0.042113	0.008677	0.087042	0.00722	0.002038	0.012844	0.006501	0.023845	0.047303	0.031633	0.017525	0.077019	0.034124	0.000744
4	prebiotici	0.020323	0.018368	0.037879	0.121002	0.019238	0.015944	0.004622	0.067723	0.010868	0.00142	0.01124	0.006097	0.026982	0.063105	0.041285	0.011111	0.082181	0.030708	0.010506

Prilog 3 (nastavak tablice)

tj e d a n	g r u p a	d__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Pasteurellales;f__Pasteurellaceae;g__Haemophilus	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Monoglobales;f__Monoglobaceae;g__Monoglobus	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Clostridiaceae;g__Clostridium_sensu_stricto_1	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Roseburia	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__Butyricicoccae;g__Butyricoccus	d__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Actinobacteriota;o__Bifidobacteriales;f__Bifidobacteriaceae;g__Bifidobacterium	d__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales;f__Coriobacteriaceae;g__Collinella	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__Ruminococcaeae;g__Subdoligranulum	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__Peptostreptococcaeae;g__Romboutsia	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__Ruminococcaeae;g__Incertae_Sedis	o s t a l o	
1	pl c e b o	0.002573	0.009572	0.021393	0.003518	0.005696	0.004078	0.071512	0.005511	0.04136	0.026799	0.002464	0. 1 5 3 9 2 2 4
2	pl c e b o	0.001283	0.011664	0.039458	0.008703	0.011595	0.004216	0.075542	0.005074	0.056212	0.035733	0.004432	0. 1 0 5 8 7 2
3	pl c e b o	0.000923	0.005652	0.021702	0.002677	0.007786	0.003421	0.11077	0.009725	0.042347	0.04359	0.006473	0. 1 8 7 8 4 8
4	pl c e b o	0.002315	0.004924	0.020643	0.012178	0.013773	0.004284	0.071217	0.007692	0.032399	0.020276	0.003452	0. 1 2 7 3 3 4
1	pr e b i o t i c i	0.003774	0.008081	0.037317	0.007414	0.004064	0.004202	0.088141	0.002736	0.03092	0.02382	0.007781	0. 0 9 6 0 8 1
2	pr e b i o t i c i	0.001971	0.004836	0.009572	0.003959	0.002349	0.004328	0.091305	0.00236	0.037245	0.018465	0.039845	0. 1 4 5 9 8 4
3	pr e	0.000744	0.005789	0.008755	0.007405	0.004895	0.005512	0.081132	0.003843	0.049939	0.042408	0.007357	0. 1 1 1

	b i o t i c i												0 8 0 5
4	p r e b i o t i c i	0.010506	0.006456	0.022695	0.004551	0.004245	0.0038	0.142641	0.006968	0.046603	0.020455	0.003169	0. 1 3 7 8 1 7

	i o t i c i																			
3	p r e b i o t i c i	0.045569	0.068912	0.035303	0.010684	0.065962	0.006408	0.012844	0.006073	0.00466	0.047303	0.024691	0.075989	0.018664	0.034124	0.005789	0.005452	0.00166	0.007405	0.004895
4	p r e b i o t i c i	0.020323	0.009408	0.037171	0.011379	0.049399	0.013251	0.01124	0.006035	0.005135	0.063105	0.030184	0.081887	0.020826	0.030708	0.006456	0.003566	0.001006	0.004551	0.004034

Prilog 4. (nastavak tablice)

t j e d a n	g r u p a	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__Butyrivococcus;g__Copro	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Copro	d__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Actinobacteriota;o__Bifidobacteriales;g__Bifidobacterium_adolescentis	d__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Coriobacteriales;f__Coriobacteriaceae;g__Collinsella;g__	d__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Actinobacteriales;f__Bifidobacteriaceae;g__Bifidobacterium_longum	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__Ruminococcaceae;g__Subdoligranulum;g__	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Peptostreptococcales;f__Tissierella;g__Romboutsia;g__	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Clostridiaceae;g__Clostridium_sensu_stricto_1;g__	d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Bacteroides_s__Bacteroides_uniformis	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__Ruminococcaceae;g__Incertae_Sedis;g__	d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__Ruminococcaceae;g__Subdoligranulum;s__uncultured_bacterium	d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidales;f__Tannerellales;g__Parabacteroides;s__Parabacteroides_merdae	o s t a l o
1	placcibo	0.003511	0.008957	0.035957	0.005511	0.01257	0.020547	0.026799	0.008813	0.05356	0.00209	0.020813	0.017624	0 .3 5 8 6 6 1
2	placcibo	0.003828	0.012058	0.031723	0.005074	0.01554	0.028059	0.035733	0.017995	0.038656	0.004126	0.028153	0.014405	0 .3 2 0 8 2 4
3	placcibo	0.003421	0.007792	0.074592	0.009725	0.026359	0.020688	0.04359	0.008543	0.024743	0.006242	0.021659	0.008061	0 .3 8 3 8 0 3
4	placcibo	0.003592	0.007369	0.042621	0.007692	0.014063	0.016046	0.020276	0.007213	0.019685	0.002816	0.016353	0.02029	0 .3 5 2 5 8 4
1	prebitioctici	0.003469	0.015967	0.057336	0.002736	0.010116	0.021408	0.02382	0.020076	0.028142	0.007717	0.009513	0.022679	0 .3 4 8 7 2 8
2	preb	0.003042	0.009011	0.074609	0.00236	0.009034	0.017761	0.018465	0.002814	0.022552	0.039478	0.019484	0.04127	0 .3 3

	i o t i c i													6 4 3 2
3	p r e b i o t i c i	0.003713	0.013376	0.061965	0.003843	0.011131	0.024663	0.042408	0.002372	0.018919	0.007087	0.025276	0.018956	0 . 2 8 3 9 0 3
4	p r e b i o t i c i	0.003141	0.009415	0.106707	0.006968	0.014387	0.019554	0.020455	0.012056	0.028806	0.003036	0.027049	0.007996	0 . 3 3 0 7 6 6

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja (IRA RENKO) 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