

# Usporedba sastava crijevne mikrobiote u ovisnosti o obrascu prehrane

---

Lač, Hana

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:159:386557>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2023.

Hana Lač

**USPOREDBA SASTAVA CRIJEVNE  
MIKROBIOTE U OVISNOSTI O  
OBRASCU PREHRANE**

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. CRIJEVNA MIKROBIOTA .....	2
2.1.1. Sastav crijevne mikrobiote.....	4
2.1.2. Čimbenici koji utječu na sastav .....	6
2.1.3. Utjecaj crijevne mikrobiote na zdravlje.....	10
2.2. VEGETARIJANSKA I VEGANSKA PREHRANA.....	12
2.2.1. Utjecaj veganske i vegetarijanske prehrane na zdravlje .....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	17
3.1. ISPITANICI .....	17
3.2. METODE RADA .....	17
3.2.1. Dijetetičke metode .....	17
3.2.2. Genomičke metode .....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	19
4.1. ISPITANICI .....	19
4.2. USKLAĐENOST PREHRANE ISPITANIKA S MEDITERANSKOM PREHRANOM .....	20
4.3. TAKSONOMSKA ZASTUPLJENOST MIKROORGANIZAMA U UZORCIMA .....	21
4.3.1. Taksonomska zastupljenost mikroorganizama u uzorku svakog ispitanika .....	23
4.3.2. Taksonomska zastupljenost mikroorganizama obzirom na vrstu prehrane .....	24
4.3.3. Taksonomska zastupljenost mikroorganizama obzirom na indeks tjelesne mase .....	28
4.4. ALFA RAZNOLIKOST.....	29
4.5. BETA RAZNOLIKOST.....	32
5. ZAKLJUČCI.....	37
6. LITERATURA.....	38

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i biokemiju hrane na Zavodu za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Rumora Samarin te uz pomoć izv. prof. dr. sc. Jurice Žučka.

*Zahvaljujem se mentorici izv.prof.dr.sc. Ivani Rumora Samarin na izrazitom strpljenju, stručnosti i opuštenom pristupu. Hvala izv.prof.dr.sc. Jurici Žučku na pomoći pri izradi.*

*Hvala cijeloj obitelji, a posebno mami i tati, na bezuvjetnoj ljubavi i podršci, što nikad nije bilo nijednog pitanja osim možemo li ti ikako pomoći.*

*Zahvalna sam na svima koji su u ovom razdoblju postali moja druga obitelj.*

*Za kraj, najveće hvala Maši, bez koje ovo razdoblje, kao nijedno drugo u životu, ne bi imalo smisla.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda

Laboratorij za kemiju i biokemiju hrane

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

USPOREDBA SASTAVA CRIJEVNE MIKROBIOTE U OVISNOSTI O OBRASCU PREHRANE

*Hana Lač, univ. bacc. nutr., 0058210551*

**Sažetak:** Crijevna mikrobiota definira se kao zajednica mikroorganizama koji koloniziraju gastrointestinalni trakt domaćina. Na sastav crijevne mikrobiote utječu brojni egzogeni i endogeni čimbenici, među kojima je prehrana jedan od ključnih. Prehrana bazirana na namirnicama biljnog podrijetla, koju karakterizira visok unos vlakana, sve je češći odabir zbog pozitivnog utjecaja na zdravlje, a pokazuje i potencijal za modulaciju sastava crijevne mikrobiote. Cilj ovog rada bio je povezati sastav crijevne mikrobiote s vrstom prehrane ispitanika. U istraživanju je sudjelovalo 59 ispitanika oba spola, od kojih 48 svejeda, 6 vegana te 2 vegetarijanca, koji su ispunili opći upitnik o životnim i prehrambenim navikama te upitnik o usklađenosti prehrane s mediteranskom. Sastav crijevne mikrobiote određen je sekvenciranjem varijabilnih regija V3 i V4 gena koji kodira za 16S rRNA. Podaci dobiveni sekvenciranjem obrađeni su u QIIME2 programu. Prema rezultatima ovog rada nije uočena značajna povezanost vrste prehrane i sastava crijevne mikrobiote na promatranoj skupini ispitanika.

**Ključne riječi:** *sastav crijevne mikrobiote, vrsta prehrane, biljna prehrana, zdravlje*

**Rad sadrži:** 46 stranica, 16 slika, 0 tablica, 91 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Ivana Rumora Samarin

**Pomoć pri izradi:** izv. prof. dr. sc. Jurica Žučko

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Jurica Žučko (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Ivana Rumora Samarin (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Irena Keser (član)
4. prof. dr. sc. Zvonimir Šatalić (zamjenski član)

**Datum obrane:** 14. srpnja 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Quality Control  
Laboratory for Food Chemistry and Biochemistry

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Nutrition

**Graduate university study programme:** Nutrition

### COMPARISON OF THE COMPOSITION OF THE GUT MICROBIOTA IN DEPENDENCE ON THE DIETARY TYPE

*Hana Lač, univ. bacc. nutr., 0058210551*

**Abstract:** The gut microbiota is defined as a community of microorganisms that colonize the host's gastrointestinal tract. The composition of the intestinal microbiota is influenced by several exogenous and endogenous factors, among which nutrition is one of the key ones. A plant-based diet, characterized by high fiber intake, is gaining popularity due to its positive impact on health, and shows the potential for modulating the composition of the gut microbiota. The aim of this study was to connect the composition of the microbiota with the subjects' dietary type. The study included 59 subjects of both sexes, of which 48 omnivores, 6 vegans and 2 vegetarians, who completed a general questionnaire on lifestyle and eating habits and a questionnaire on the compliance of diet with the Mediterranean diet. The composition of the gut microbiota was determined by sequencing of variable regions V3 and V4 of the gene coding for 16S rRNA. The data obtained by sequencing was processed using QIIME2. According to the results of this study, there was no significant correlation between the dietary type and the composition of the gut microbiota in the observed group of subjects.

**Keywords:** *gut microbiota composition, dietary type, plant-based nutrition, health*

**Thesis contains:** 46 pages, 16 figures, 0 tables, 91 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Ivana Rumora Samarin, PhD, Associate professor

**Technical support and assistance:** Jurica Žučko, PhD, Associate professor

#### Reviewers:

1. Jurica Žučko, PhD, Associate professor (president)
2. Ivana Rumora Samarin, PhD, Associate professor (mentor)
3. Irena Keser, PhD, Associate professor (member)
4. Zvonimir Šatalić, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** July 14<sup>th</sup> 2023



# 1. UVOD

Crijevna mikrobiota složena je zajednica mikroorganizama nastanjenih u gastrointestinalnom traktu koji su uspostavili blizak simbiotski odnos sa svojim ljudskim domaćinom. Ima ključnu ulogu u održavanju zdravlja, omogućavajući metabolizam neprobavljivih sastojaka hrane i sintezu nekih vitamina, sprječavajući pritom kolonizaciju patogena te doprinoseći sazrijevanju imunološkog sustava (Magne i sur., 2020).

Mikrobiota crijeva razvija se zajedno s domaćinom, što mikrobima osigurava stabilno okruženje, dok mikrobi domaćinu pružaju širok raspon funkcija poput probave složenih prehranbenih makronutrijenata, proizvodnje hranjivih tvari i vitamina, obrane od patogena i održavanja imunološkog sustava. Mikrobiota ima ključnu ulogu u održavanju homeostaze crijevnog epitela i cjelokupnog ljudskog zdravlja. Promjene u sastavu mikrobiote te poremećaji u strukturi debelog crijeva povezani su s raznim bolestima. Nedavne studije otkrile su višestruke promjene u sastavu mikrobiote crijeva kod metaboličkih i imunoloških poremećaja (Hall i sur., 2017).

Prehrana utječe na sastav i metabolizam mikrobiote crijeva, čineći mikrobe vezom između prehrane i različitih fizioloških stanja kroz njihovu sposobnost stvaranja mikrobnih metabolita (Koh i sur., 2016). Prehrana ima i akutni i dugoročni utjecaj na ekosustav crijevne mikrobiote. (Sonnenburg i Bäckhed., 2016). Sve je češći konsenzus da je prehrana temeljena na namirnicama biljnog podrijetla održiv izbor zbog učinkovitije proizvodnje i manjeg utjecaja na okoliš. Prehrana bogata hranom biljnog podrijetla i smanjenim udjelom hrane životinjskog podrijetla bolja je u promicanju zdravlja i ima pozitivniji utjecaj na okoliš u usporedbi s tipičnom zapadnjačkom prehranom (Segovia-Siapco i Sabaté, 2018). Modulacija crijevne mikrobiote putem prehrane temeljene na povrću, mahunarkama, žitaricama, orašastim plodovima i ribi te ukupnim većim unosom hrane biljnog podrijetla u odnosu na hranu životinjskog podrijetla, ima potencijal prevenirati crijevne upalne procese koji su u srži raznih kroničnih bolesti (Bolte i sur., 2021).

Cilj ovoga rada bio je utvrditi povezanost između obrazaca prehrane i sastava crijevne mikrobiote kod ispitanika oba spola različitih dobnih skupina. Uz prehranu su u obzir uzeti i drugi parametri koji utječu na sastav crijevne mikrobiote poput tjelesne mase i konzumiranja probiotika.

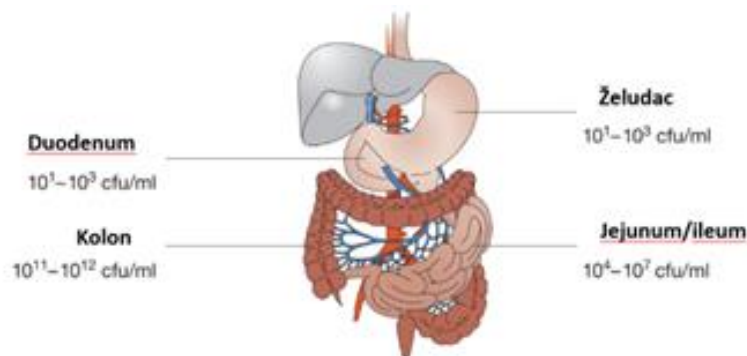
## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. CRIJEVNA MIKROBIOTA

Mikrobiota je pojam koji se odnosi na zajednicu mikroorganizama koja uključuje bakterije, arheje, viruse i neke jednostanične eukariote koji žive u specifičnoj okolini.

Ljudski gastrointestinalni (GI) trakt sadrži zajednice mikroba (bakterije, gljivice, virusi) koji se razlikuju ovisno o anatomskom položaju i utjecaju na ljudsko zdravlje. Mikrobi nastanjuju kožu, usnu šupljinu, gastrointestinalni, respiratorni te genitourinarni trakt čine 1 - 3 % ukupne tjelesne mase u ljudi (O'Hara i Shanahan, 2006; Ruan i sur., 2020).

Struktura i sastav crijevne flore odražavaju prirodnu selekciju na mikrobnoj razini i razini domaćina, što promiče međusobnu suradnju i funkcionalnu stabilnost ovog složenog ekosustava. Iako prevladavaju bakterije, zastupljeni su i arheje i jednostanični eukarioti. Mikrobiota gastrointestinalnog trakta raspoređena je cijelom dužinom probavnog trakta, a raznolikost i gustoća naseljenosti raste od želuca prema debelom crijevu. Probavni trakt kontinuirano je izložen utjecaju vanjskih čimbenika, stoga ima nekoliko sustava zaštite koji uključuju nizak pH u želucu, sloj sluzi koji prekriva cijelu dužinu probavnog sustava, imunosne stanice te prisutnost komenzalnih mikroorganizama koji koloniziraju probavni trakt (Zoetendal i sur., 2008). Lučenje kiseline i žuči ometa kolonizaciju želuca i proksimalnog tankog crijeva od strane većine bakterija. Gustoća bakterija povećava se u distalnom tankom crijevu, a u debelom crijevu raste na procijenjenih  $10^{11}$  -  $10^{12}$  bakterija po gramu sadržaja debelog crijeva (slika 1), što čini 60 % fekalne mase. Uz varijacije u sastavu flore duž osi gastrointestinalnog trakta, omjer anaeroba i aeroba niži je na površinama sluznice nego u lumenu crijeva (O'Hara i Shanahan, 2006). Većina mikrobiote u odraslih nalazi se u crijevima; u debelom crijevu je gustoća mikrobnih stanica veća od  $10^{11}/g$ , što je ekvivalent 1 - 2 kilograma tjelesne mase (D'Argenio i Salvatore, 2015).



**Slika 1.** Gustoća mikrobne populacije duž gastrointestinalnog trakta (prema O'Hara i Shanahan, 2006)

Crijevna mikrobiota čovjeka može se zamisliti kao mikrobni organ smješten unutar organa domaćina. Sastoji se od različitih vrsta s mogućnošću međusobne komunikacije i komunikacije s domaćinom. Crijevna mikrobiota troši, skladišti i preraspodjeljuje energiju, posreduje u fiziološki važnim kemijskim transformacijama te se može održavati i popravljati samorepliciranjem. Mikrobiom crijeva, koji može sadržavati >100 puta veći broj gena od našeg genoma, obogaćuje nas funkcionalnim značajkama koje sami nismo morali razvijati (Bäckhed i sur., 2005).

Mikrobiom predstavlja skup svih genomskih elemenata određene mikrobiote. U posljednje desetljeće sve su češće tvrdnje da čovjek posjeduje dva genoma, jedan naslijeđen od roditelja, a drugi stečen, tj. mikrobiom (Grice i Segre, 2012). Najvažnija razlika između ova dva genoma je u tome što naslijeđeni genom ostaje nepromjenjiv tijekom života, a mikrobiom je izuzetno dinamičan i na njega mogu utjecati brojni čimbenici poput dobi, prehrane, hormonalnih ciklusa, terapije i bolesti. Procijenjeno je da mikrobiom ljudskih crijeva čini više od 5 milijuna različitih gena (D'Argenio i Salvatore, 2015). Zanimljivo je da geni kodirani mikrobiomom sadrže informacije za proteine potrebne za preživljavanje domaćina, ali nisu prisutni u ljudskom genomu, zbog čega se mikrobiom ponekad naziva našim „zaboravljenim organom“ (O'Hara i Shanahan, 2006). Raznolikost među mikrobiomima dviju različitih jedinki vrlo je značajna u usporedbi s njihovom ljudskom genomskom varijacijom; ljudi su oko 99,9 % identični jedni drugima u smislu svog genoma, ali njihov crijevni mikrobiom može biti do 80 - 90 % različit (Turnbaugh i sur., 2009).

Uzorci stolice daju procjenu sastava mikrobiote, a ne potpuni prikaz. Anaerobne vrste često se vežu za crijevnu sluznicu, što otežava identifikaciju svih bakterijskih vrsta prisutnih u debelom crijevu. Veliki nedostatak korištenja uzoraka stolice za određivanje sastava crijevne mikrobiote je činjenica da fekalna mikrobiota predstavlja samo bakterije koje nastanjuju kraj debelog crijeva, što ostavlja druge dijelove gastrointestinalnog sustava, posebice tanko crijevo, neistraženima. Mikrobiota tankog crijeva relativno je neistražena, dijelom zbog nepovoljnih uvjeta za preživljavanje mikroorganizama kao što je ekskrecija probavnih enzima i žuči, a dijelom zbog ograničene dostupnosti tankog crijeva (Zoetendal i sur., 2012).

### 2.1.1. Sastav crijevne mikrobiote

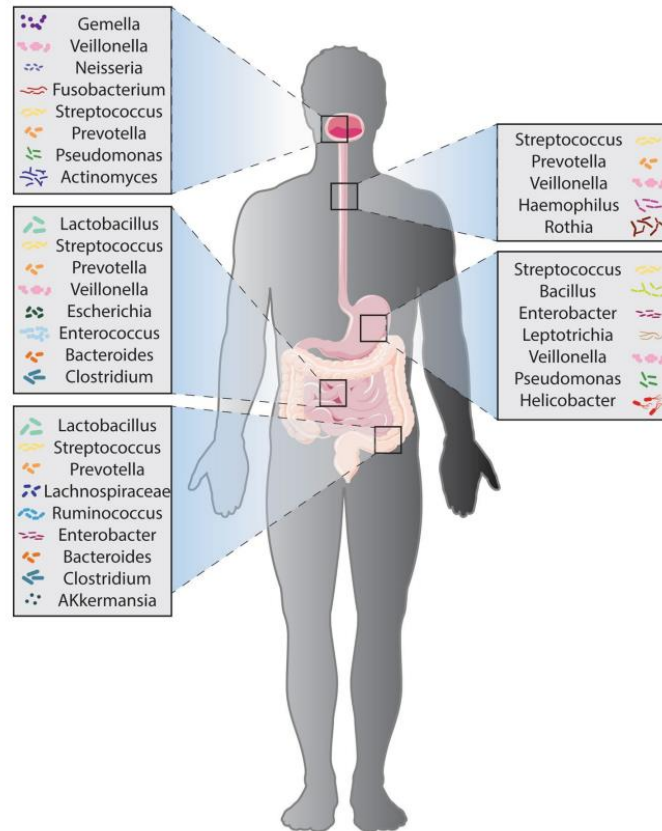
Crijevnoj mikrobioti pripada više od 1000 mikrobnih vrsta, od kojih više od 90 % pripadaju samo dvama koljenima: *Bacteroidetes* i *Firmicutes*, dok ostatak pripada koljenima *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, and *Verrucomicrobia*. Na temelju uzoraka stolice kod ljudi, najprisutniji su rodovi *Bacteroides*, *Prevotella*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Streptococcus* i *Enterobacteriaceae* (slika 2) (Tomova i sur., 2019).

Gram-negativni rodovi bakterija koljena *Bacteroidetes* uključuju *Bacteroides*, *Prevotella*, *Parabacteroides* i *Alistipes*. Detaljna istraživanja pokazuju da ovi organizmi posjeduju sposobnost iskorištavanja vrlo širokog raspona supstrata podrijetlom iz hrane i domaćina (Flint i sur., 2015).

Za iskorištavanje polisaharida roda *Bacteroides* odgovorni su geni organizirani u klastere koji uključuju gene koji kodiraju za hidrolaze i proteine vanjske membrane odgovorne za prvotno vezanje topljivih polisaharida te njihov transport u periplazmatski prostor gdje se odvija većina hidrolize polisaharida kod gram-negativnih bakterija. Ovakva organizacija gena pruža im kompetitivnu prednost unutar vrlo guste mikrobne populacije debelog crijeva (Salyers i sur., 1997).

Koljeno *Firmicutes* uključuje nekoliko vrlo rasprostranjenih vrsta kao što su *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale* i *Eubacterium hallii* koje su dominantni proizvođači butirata u debelom crijevu. Pretvorbom laktata u butirata ili propionat sprječava se nakupljanje laktata i regulira kiselost. Nedavno se pokazalo da vrsta *Ruminococcus bromii* ima ključnu ulogu u razgradnji rezistentnog škroba, budući da pojedinci koji nemaju *Ruminococcus bromii* u svojoj mikrobioti ne mogu razgraditi rezistentni škrob koji se zatim može detektirati u njihovim uzorcima fecesa. Bakterije koljena *Firmicutes* obično nose manje gena za razgradnju polisaharida u usporedbi s bakterijama roda *Bacteroides*, što odražava njihovu manju veličinu genoma i veću specijaliziranost za razgradnju polisaharida (Flint i sur., 2015).

U manjem broju od dominantnih *Bacteroidetes* i *Firmicutes* prisutne su bakterije koljena *Actinobacteria* (koje uključuju *Bifidobacterium spp.*), *Proteobacteria* (uključujući *Escherichia coli*) i *Verrucomicrobia* (uključujući *Akkermansia muciniphila*), koje imaju značajan potencijalni utjecaj na zdravlje domaćina (Flint i sur., 2015).



**Slika 2.** Dominantni rodovi bakterija u gastrointestinalnom traktu (Ruan i sur., 2020)

Postoje dva glavna mehanizma koji će rezultirati promjenom u sastavu mikrobnih vrsta crijevne mikrobiote. Iskorištavanje supstrata određeno je bakterijskim genomom, što u konačnici određuje koja će bakterijska vrsta metabolizirati određeni supstrat, što predstavlja načelo iza manipulacije mikrobiotom pomoću prebiotika. Prebiotici su neprobavljivi sastojci hrane koji korisno djeluju na domaćina pomoću selektivne stimulacije rasta i/ili aktivnosti jedne bakterijske vrste ili ograničenog broja bakterijskih vrsta u debelom crijevu i tako poboljšavaju zdravlje ljudi (Gibson i sur, 2010). Različite bakterijske vrste mogu varirati u svojoj toleranciji na širok raspon čimbenika u crijevnom okolišu, kao što su visoki ili niski pH, visoke koncentracije žučnih soli ili niske koncentracije mikronutrijenata (npr. željezo), koji ograničavaju rast mikroba (Flint i sur., 2015).

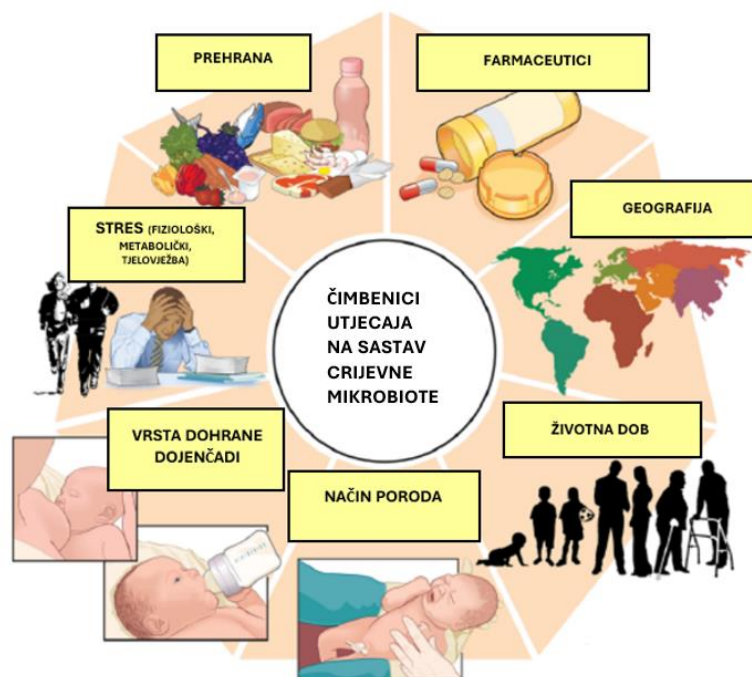
Većina se pojedinaca, obzirom na dominantne rodove bakterija u crijevima, može podijeliti na jedan od tri osnovna enterotipa. Svaki od ova tri enterotipa može se identificirati varijacijama u razinama jednog od tri roda: *Bacteroides* (enterotip 1), *Prevotella* (enterotip 2) i *Ruminococcus* (enterotip 3). Različita raspodjela rodova bakterija ukazuje na različite putove

za stvaranje energije iz fermentirajućih supstrata dostupnih u debelom crijevu. Filogenetske i funkcionalne razlike među enterotipovima odražavaju različite kombinacije metaboličkih puteva iskorištavanja supstrata od strane mikrobiote, s vjerojatnim utjecajem na sinergističke međuodnose s ljudskim domaćinima. Svaka vrsta enterotipa je kompleksna i ne može se dovesti u korelaciju s dobi, spolom, nacionalnosti i indeksom tjelesne mase domaćina (Arumugam i sur., 2011), dok primarni utjecaj na raspodjelu u enterotipove ima prehrana (Wu i sur., 2011). Utjecaj enterotipova na rizik od bolesti treba razjasniti kako bi raspodjela mogla imati kliničku važnost (Sheflin i sur., 2017).

U istraživanju Wu i suradnika (2011), *Bacteroides* enterotip bio je povezan s unosom proteina životinjskog podrijetla, zasićenih masti te širokim rasponom aminokiselina, što je karakteristično za zapadnjačku prehranu. S druge strane, *Prevotella* enterotip bio je povezan s unosom ugljikohidrata i jednostavnih šećera. Kod vegetarijanaca i vegana bio je zastupljen enterotip *Prevotella* (Jain i sur., 2018; Wu i sur., 2011).

#### 2.1.2. Čimbenici koji utječu na sastav

Promjene u sastavu mikrobiote mogu biti uzrokovane razlikama u bakterijama koje se izravno konzumiraju hranom, razlikama u konzumiranim supstratima, varijacijama u vremenu prolaska kroz gastrointestinalni sustav, razlikama u pH-u te regulacijom ekspresije gena samog domaćina i/ili njegove/njezine mikrobiote (Tomova i sur., 2019). Relativna brojnost bakterija koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* varira među subjektima iz iste populacije, vjerojatno zbog mnogih čimbenika povezanih s načinom života (slika 3), uključujući prehranu, tjelesnu aktivnost, unos prehrambenih aditiva i kontaminanata, konzumaciju antibiotika i tjelesnu aktivnost (Magne i sur., 2020).



**Slika 3.** Čimbenici koji utječu na crijevnu mikrobiotu (prema Gail i Bawden, 2015)

### 2.1.2.1 Prehrana

Postignut je veliki napredak u definiranju nekih od dominantnih sojeva mikrobne zajednice u debelom crijevu zdravih pojedinaca i u identificiranju njihove uloge u metabolizmu. Nadalje, postalo je jasno da prehrana može imati veliki utjecaj na sastav crijevne mikrobiote i kratkoročno i dugoročno, što otvara nove mogućnosti prevencije i intervencije određenih zdravstvenih stanja prehranom. Iako su određene dominantne bakterijske vrste kod većine zdravih odraslih osoba, postoje značajne međuindividualne varijacije u sastavu crijevne mikrobiote, što vjerojatno utječe na pojedinačne odgovore na primjenu lijekova i manipulaciju prehranom (Flint i sur., 2012). Obrasci prehrane temeljeni na cjelovitim namirnicama mogli bi povećati protuupalni kapacitet hranjivih tvari kroz sinergijske učinke na mikrobiom crijeva (Bolte i sur., 2021). Bakterije koljena *Bacteroidetes* i *Actinobacteria* pokazale su pozitivnu korelaciju s unosom masti te negativnu korelaciju s unosom vlakana, dok su bakterije koljena *Firmicutes* i *Proteobacteria* pokazale suprotne korelacije. Bakterije nižih taksonomskih razina nisu u pravilu pokazale navedene korelacije s unosom masti i vlakana.

Bakterije roda *Bacteroides* pokazuju pozitivnu korelaciju s prehranom bogatom proteinima životinjskog podrijetla i zasićenim masnim kiselinama upravo zbog njihove sposobnosti

tolerancije žuči koja se pojačano luči kod takvog tipa prehrane (Ridlon i sur., 2014; Tomova i sur., 2019). Bakterije roda *Ruminococcus* zastupljenije su kod pojedinaca kod kojih je u prehrani u velikom stupnju zastupljen unos voća i povrća. Bakterijske vrste roda *Ruminococcus* imaju sposobnost razgradnje složenih ugljikohidrata poput celuloze i rezistentnog škroba koji se nalaze u hrani biljnog podrijetla. Razgradnjom vlakana proizvode butirat, koji pokazuje protuupalna svojstva. Također, povezuju se s nižim indeksom tjelesne mase i boljim lipidnim profilom domaćina. Na brojnost bakterija ovog roda, uz prehranu biljnog podrijetla, utječe i prehrana sa zastupljenim namirnicama životinjskog podrijetla zbog uloge bakterija u pretvorbi kolina u trimetilamin (Tomova i sur., 2019).

Glavna komponenta hrane koja utječe na crijevnu mikrobiotu, sastav i aktivnost svakako su prehrambena vlakna (Ercolini i Fogliano, 2018). Raznolika prehrana bogata različitim izvorima vlakana (npr. celuloza, hemiceluloza, pektini, fruktani itd.) i otpornim škrobom, koji sadrže niz monosaharidnih jedinica i  $\alpha$  i  $\beta$ -veza, više podržava raznoliku gastrointestinalnu mikrobiotu u usporedbi s prehranom bogatom rafiniranim proizvodima (Holscher, 2017).

Prehrana bogata proteinima životinjskog podrijetla, rafiniranim ugljikohidratima i zasićenim masnim kiselinama povezana je sa smanjenom raznolikosti crijevnih bakterija, smanjenom proizvodnjom kratkolančanih masnih kiselina te povećanom proizvodnjom sekundarnih žučnih kiselina. Kombinacija ovih promjena potiče upalne procese, oslabljuje imunitet i povećava propusnost crijeva, što je zajedničko kod patogeneze brojnih bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti, različite karcinome i upalne bolesti crijeva. Štetni učinci zapadnjačke prehrane nisu važni samo kod razvoja karcinoma, već utječu i na liječenje i rizik od toksičnosti povezane s liječenjem (McQuade i sur., 2019). Visokoproteinska dijeta često ograničava unos ugljikohidrata što može dovesti do smanjenog broja bakterija koje proizvode butirat, što povećava rizik za razvoj kolorektalnog karcinoma (David i sur., 2014).

#### 2.1.2.2. Ostali čimbenici

Raznolikost mikrobiote mijenja se s godinama, povećavajući se od djetinjstva do odrasle dobi te smanjujući se u starijih osoba. Mikrobiota crijeva relativno je stabilna tijekom odrasle dobi, ali s procesom starenja dolazi do poremećaja potaknutih egzogenim čimbenicima poput upotrebe antibiotika i prehrane te endogenih čimbenika poput staničnog stresa. Starenje je popraćeno značajnim fiziološkim promjenama na razini mikrobnog sastava, što može dovesti do raznih upalnih stanja i autoimunih poremećaja u gastrointestinalnom sustavu. Uobičajena



dobna granica za definiranje starijih osoba je 63 do 76 godina, a oko te dobi crijevna mikrobiota gubi svoju relativnu stabilnost (Vemuri i sur., 2018). Matijašić i sur. (2014) uočili su smanjenje broja bakterija roda *Bifidobacterium* s dobi ispitanika.

Nekoliko je studija potvrdilo prisutnost nekih bakterijskih vrsta u amnijskoj tekućini u maternici, ali je utvrđeno da su broj i raznolikost preniski da bi imali učinak na kolonizaciju crijeva dojenčadi. Dojenčad rođenu vaginalnim putem koloniziraju mikrobne zajednice karakteristične za vaginalnu mikrobiotu majki, poput rodova *Lactobacillus*, *Prevotella* i *Sneathia*. S druge strane, kod dojenčadi rođene carskim rezom pronađena je mikrobiota karakteristična za kožu s dominantnim rodovima *Staphylococcus*, *Propionibacterium* i *Corynebacterium* te velik broj *Clostridium difficile* i *Escherichia coli* (Clemente i sur., 2012; Cresci i Bawden, 2015).

Dojenje ima značajnu ulogu u oblikovanju sastava crijevne mikrobiote u dojenčadi s dugoročnim učincima na sam sastav te posljedično i na imunosni i gastrointestinalni sustav. Dominantne bakterijske vrste u dojenčadi su *Bifidobacterium* i *Bacteroides*. Za razliku od mikrobiote dojenčadi i djece, u odraslih je sastav mikrobiote stabilniji i više ga oblikuje okoliš nego genetika. Kako ljudi stare, mikrobna raznolikost stalno se povećava kod zdravih osoba, dok se smanjena mikrobna raznolikost povezuje s različitim bolestima (Ruan i sur., 2020).

Disbioza uzrokovana terapijom antibioticima karakterizirana je gubitkom raznolikosti bakterija, gubitkom specifičnih rodova bakterija te posljedičnim metaboličkim promjenama koje dovode do smanjene otpornosti na kolonizaciju crijevnih patogena, primjerice *Clostridium difficile* koji se povezuje s upotrebom antibiotika širokog spektra (Palleja i sur., 2018). Već nakon nekoliko dana terapije, dolazi do smanjene raznolikosti bakterija koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, posebice bakterija roda *Bifidobacterium*, što je često popraćeno prerastanjem bakterija porodice *Enterobacteriaceae* (Jernberg i sur., 2007). Kod primjene antibiotika širokog spektra također može doći do povećanja omjera koljena bakterija *Bacteroidetes/Firmicutes* (Panda i sur., 2014). Čak i kratkotrajna uporaba, posebice u prve dvije godine života, može dovesti do dugotrajnih promjena u sastavu mikrobiote crijeva. Disbioza potiče horizontalni prijenos gena antibiotske rezistencije što omogućuje evoluciju otpornih patogena i širenje otpornosti na antibiotike (Ramirez i sur., 2020; Lange i sur., 2016).

Probiotici se definiraju kao živi mikroorganizmi koji, kada se primjenjuju u odgovarajućim količinama, pozitivno djeluju na zdravlje domaćina na siguran i učinkovit način (WHO/FAO, 2002). Predloženi mehanizmi kojima probiotici mogu pozitivno utjecati na zdravlje uključuju

poboljšanje funkcije crijevne barijere kroz učinke na epitel i mukozu, proizvodnju antimikrobnih tvari, regulaciju luminalne kiselosti te kompeticiju s patogenim bakterijama (Kristensen i sur., 2016). Najčešće konzumirani probiotici pripadaju rodu *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (Conlon i Bird, 2015). Kod slučajeva disbioze crijevne mikrobiote, postoje dokazi o restorativnom ili zaštitnom učinku određenih sojeva probiotika, kako na samu fekalnu mikrobnu zajednicu, tako i na fiziologiju domaćina, npr. ublažavanje gastrointestinalnih simptoma (Kristensen i sur., 2016). Sinbiotikom se naziva kombinacija probiotika s prebiotikom. Sinbiotici imaju potencijal značajnije utjecati na crijevnu mikrobiotu i zdravlje domaćina u usporedbi s izoliranim unosom prebiotika ili probiotika jer prebiotička komponenta potiče preživljavanje i rast probiotičkih bakterija u gastrointestinalnom traktu (Davis, 2016).

Pušenje je povezano sa smanjenom brojnosti bakterija koljena *Firmicutes* i *Actinobacteria* te povećanom brojnosti bakterija koljena *Bacteroidetes* i *Proteobacteria*. Istraživanje Biedermann i suradnika (2013) pokazalo je da prestankom pušenja dolazi do povećanja broja bakterija koljena *Firmicutes* i *Actinobacteria* uz istovremeno smanjenje brojnosti *Bacteroidetes* i *Proteobacteria*. Točan mehanizam utjecaja pušenja cigareta na mikrobiotu aktivno je područje istraživanja; može biti povezan s promjenama intestinalnog epitela, imunološkom signalizacijom i/ili proizvodnjom mucina. Ostaje nejasno posreduju li te promjene u crijevnoj mikrobioti nekim od štetnih učinaka pušenja (Dong i Gupta, 2019).

Postoji više gena povezanih s pretilošću koji pojedinačno imaju minimalni utjecaj na apetit i unos hrane. Međutim, kombinacija jednog ili više gena s disbiozom uzrokovanom pretilošću može utjecati ne samo na apetit i unos hrane, nego i na iskorištavanje energije, taloženje masti i upalne procese u organizmu (Bell, 2015). Pretilost se povezuje s manjim udjelom bakterijskih vrsta *Christensenella minuta*, *Akkermansia muciniphila*, and *Methanobrevibacter smithii* te povećanom koncentracijom bakterija koljena *Firmicutes*, osobito roda *Blautia* (Ruan i sur., 2020; Ley i sur., 2005). Dosadašnja istraživanja ukazuju da je mikrobiota tipična za stanje pretilosti povezana s unosom hrane, odnosno da disbioza mikrobiote nije uzrok nego posljedica pretilosti (Bell, 2015).

### 2.1.3. Utjecaj crijevne mikrobiote na zdravlje

Jedna od značajki zdravog mikrobioma je njegova otpornost, sposobnost povratka u ravnotežno stanje i otpornost na perturbacije. Značajne interindividualne razlike u raznolikosti mikrobiote otežavaju definiranje idealne zajednice mikroba u crijevima (Tuddenham i Sears, 2015).

Disbioza crijevne mikrobiote povezana je s različitim patološkim stanjima koja utječu na gastrointestinalni trakt (proljev, sindrom iritabilnog crijeva), imunološki sustav (alergije, multipla skleroza, dijabetes tipa 1, upalne bolesti crijeva, reumatoidni artritis), središnji živčani sustav (Alzheimerova i Parkinsonova bolest, autizam), kao i energetske metabolizam domaćina (pretilost, dijabetes tipa 2, ateroskleroza), iako još uvijek nije jasno jesu li promjene u crijevnoj mikrobioti uzrok ili posljedica navedenih poremećaja. Odnos između dva dominantna koljena bakterija, izražen kao omjer bakterija koljena *Firmicutes/Bacteroidetes*, povezan je s raznim patoloških stanjima te se crijevna mikrobiota nameće kao obećavajući cilj za prehranbenu ili terapijsku prevenciju i liječenje ovih bolesti (Magne i sur., 2020).

Rezultati nedavnih istraživanja ukazuju da promjene u crijevnoj mikrobioti imaju značajan utjecaj na poremećaje gastrointestinalnog sustava, što je posebno izraženo kod sindroma iritabilnog crijeva i Chronove bolesti. Upalni procesi koji se javljaju u crijevima uzrokuju promjene u crijevnoj mikrobioti što može imati ulogu u komunikaciji između crijevne mikrobiote i mozga (Greenwood-Van Meerveld, 2017). Komunikacija između crijevne mikrobiote i mozga je dvosmjerna te uključuje neurološke, endokrine i imunološke mehanizme, a poremećaj u komunikaciji povezuje se s razvojem neurodegenerativnih bolesti (Rogers i sur., 2016).

Kratkolančane masne kiseline proizvod su mikrobnog metabolizma u intestinalnom traktu, nastaju fermentacijom neprobavljivih ugljikohidrata (prebiotika) i snižavaju intestinalni pH što inhibira rast prisutnih patogenih mikroorganizama. One reguliraju rast, staničnu diferencijaciju i transportne procese crijevnih epitelnih stanica i sudjeluju u kontroli metabolizma lipida i ugljikohidrata u jetri. Najbrojnije i najbolje proučene kratkolančane masne kiseline su acetat, propionat i butirat. Intestinalni sastav kratkolančanih masnih kiselina ovisi o sastavu crijevne mikrobiote, prehrani i intestinalnom pH. Epitelne stanice domaćina apsorbiraju kratkolančane masne kiseline stoga se njihova koncentracija smanjuje od proksimalnog do distalnog kolona. Osim u epitelnim stanicama, transporteri se nalaze na imunološkim, enteroendokrinim, bubrežnim i moždanim stanicama, što odražava različite učinke kratkolančanih masnih kiselina na fiziologiju domaćina (Ruan i sur., 2020). Proizvodnja kratkolančanih masnih kiselina stvara blago kisele uvjete s pH vrijednostima između 5,5 i 6,5, što ne podržava rast patogenih bakterija (Furusawa i sur., 2013). Različite bakterijske vrste proizvode različite kratkolančane masne kiseline; bakterije rodova *Akkermansia*, *Bifidobacterium*, *Prevotella* i *Bacteroides* proizvode propionat, dok *Coprococcus* proizvodi butirat (Morrison i Preston, 2016).

Vitamini menankion (K2), folat, kobalamin i riboflavin produkti su crijevne mikrobiote što ju čini ključnom za odgovarajuću koncentraciju vitamina u tijelu. Različiti rodovi bakterija imaju mogućnost biosinteze različitih vitamina, primjerice bakterije roda *Bifidobacterium* sintetiziraju vitamin K, vitamin B<sub>12</sub>, biotin, folat i tiamin, bakterijske vrste *Bacillus subtilis* i *E. coli* sintetiziraju riboflavin, dok bakterije roda *Lactobacillus* imaju sposobnost sinteze kobalamina i ostalih vitamina B skupine (Tomova i sur., 2019).

Trimetilamin-N-oksid (TMAO) produkt je bakterijskog metabolizma kojeg se povezuje s kardiovaskularnim i neurološkim poremećajima. Karnitin i kolin prekursori su sinteze trimetilamin-N-oksida te se primarno nalaze u hrani životinjskog podrijetla, najviše u crvenom mesu i jajima, a u manjoj količini u ribi i grahu (Tomova i sur., 2019). TMAO je uključen u patogenezu kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa i zatajenja bubrega. Vegetarijanci, zbog različitog sastava crijevne mikrobiote, imaju manju sposobnost sinteze trimetilamina (TMA) koji je prekursor u sintezi TMAO. Primijećena je slična koncentracija TMAO u plazmi kod vegana i lakto-ovo-vegetarijanaca, a smanjenje koncentracije TMAO može se postići većim pridržavanjem mediteranske prehrane, osobito vegetarijanske prehrane bogate voćem i povrćem, što može rezultirati smanjenim rizikom za kardiovaskularne bolesti (Obeid i sur., 2017).

## **2.2. VEGETARIJANSKA I VEGANSKA PREHRANA**

Vegetarijanstvo obuhvaća spektar obrazaca prehrane, od prehrane koja izostavlja sve životinjske proizvode (veganska prehrana), prehrane koja uključuje jaja (ovo-vegetarijanci), mlijeko i mliječne proizvode (lakto-vegetarijanci), i jaja i mlijeko i mliječne proizvode (lakto-ovo-vegetarijanci), do prehrane koja uz mlijeko, mliječne proizvode i jaja uključuje ribu i morske plodove (pesco-vegetarijanci) (Tonstad, 2009). Lakto-ovo-vegetarijanstvo najrasprostranjeniji je oblik vegetarijanske prehrane. Fleksitarijanstvo, odnosno povremeno uključivanje male količine mesa u prehranu na biljnoj bazi, relativno je novi pojam koji može proširiti dostupnost vegetarijanske prehrane široj javnosti (Segovia-Siapco i Sabaté, 2018). Vegetarijanski obrasci prehrane povezuju se s mnogim pozitivnim učincima na zdravlje zbog većeg unosa vlakana, folne kiseline, vitamina C i E, kalija, magnezija, fitokemikalija te zastupljenosti nezasićenih masnih kiselina (Clarys i sur., 2014). Ranije zabrinutosti oko vegetarijanske prehrane temeljile su se na neadekvatnosti povezanoj s biljnim proteinima, ali sada je znanstveno utvrđeno da dobro planirana vegetarijanska prehrana može biti nutritivno

adekvatna i može spriječiti i liječiti određene bolesti te se također smatra prikladnom za sve faze životnog ciklusa (Melina i sur., 2016).

Veganska prehrana isključuje svu hranu životinjskog podrijetla, kao što su meso, riba, mliječni proizvodi i jaja, a bazira se na konzumaciji voća, povrća, žitarica, mahunarki, orašastih plodova i sjemenki. Prijelaz na vegansku prehranu obično je rezultat etičkih načela pojedinca koja se odnose na prava i dobrobit životinja, no može biti i zbog religioznih i moralnih vrijednosti, socioekonomskih razmatranja i/ili ekoloških razloga (Sakkas i sur., 2020). Često se uzima u obzir i upotreba antibiotika i stimulansa rasta za uzgoj životinja i bolesti koje se prenose životinjama. Osim toga, alergija na mliječne proizvode i intolerancija na laktozu potaknuli su popularnost mliječnih zamjena na bazi soje (Craig, 2009). Veganska prehrana popularnija je kod mladih, posebice kod žena (Worsley i Skrzypiec, 1998). Veganska prehrana potencijalno je deficitarna u unosu vitamina B<sub>12</sub>, vitamina D, cinka i  $\omega$ -3 masnih kiselina, stoga prehrana mora biti pomno isplanirana i prema potrebi uključivati dodatke prehrani (Losno i sur., 2021, Sakkas i sur., 2020).

Cilj studije koju su proveli Clarys i suradnici bio je na temelju upitnika o učestalosti konzumiranja hrane, procijeniti prehranu te usporediti kvalitetu i komponente vegetarijanskih obrazaca prehrane i prehrane svejeda. Veganska prehrana, koja predstavlja najrestriktivniji obrazac vegetarijanske prehrane, imala je najmanji ukupni unos energije i proteina, bolji profil unesenih masti te najviši unos prehrambenih vlakana. Unos kalcija bio je najniži kod vegana, a ujedno i ispod nacionalnih prehrambenih preporuka. Veganska prehrana dobila je najviše vrijednosti Indeksa pravilne prehrane (eng. *Healthy Eating Indeks*, HEI) i Skora mediteranske prehrane (eng. *Mediterranean diet score*, MDS), dok je prehrana svejeda dobila najniže vrijednosti (Clarys i sur., 2014).

### 2.2.1. Utjecaj veganske i vegetarijanske prehrane na zdravlje

Hrana biljnog podrijetla povezana je smanjenjem upalnih procesa u crijevima, poboljšanom osjetljivosti na inzulin, poboljšanim lipidnim profilom, smanjenom proizvodnjom toksina i smanjenim rizikom od infekcija te nekih vrsta raka. Mnoge zdravstvene dobrobiti biljne prehrane dijelom su posredovane crijevnom mikrobiotom, ne samo zbog veće relativne zastupljenosti bakterija za koje se smatra da imaju pozitivan učinak na zdravlje domaćina, nego i zbog postbiotičkih i epigenetskih učinaka na različite čimbenike rizika za kronične upale i kronične degenerativne bolesti (Tomova i sur., 2019).

EPIC-Oxford i Adventist Health Study-2 najveće su prospektivne studije koje su još u tijeku, a uključuju visok udio vegetarijanaca. Ovim dvjema studijama prethodile su Adventist Health Study-1, koja je pratila kohortu od 34 198 članova sastavljenih od adventista sedmog dana u Kaliforniji tijekom 6 godina (1977. – 1982.), i Oxford Vegetarian Study, koja je pratila 11 000 članova od 1980. do 1984. godine. Rezultati tih epidemioloških studija pokazali su povoljan utjecaj vegetarijanske prehrane na dugovječnost, cjelokupno zdravlje i kvalitetu života (Segovia Siapco i Sabaté, 2018).

Veganska prehrana povezana je s nižim indeksom tjelesne mase, nižim LDL kolesterolom, nižom koncentracijom glukoze u krvi natašte, inzulinom, krvnim tlakom, trigliceridima i općenito poboljšanim kardiovaskularnim zdravljem. Razlozi blagotvornog djelovanja vegetarijanstva i veganstva na ukupni i LDL-kolesterol su različiti i uglavnom se temelje na nižem unosu ukupnih masti i zasićenih masnih kiselina, ali i povećanoj konzumaciji namirnica za koje je dokazan pozitivan utjecaj na navedene parametre, kao što su soja, mahunarke, orašasti plodovi i biljna ulja. Glavno otkriće Adventist Health Study-2 (AHS-2), provedene na gotovo 61 000 ispitanika, bilo je gotovo 50 %-tno smanjenje rizika od dijabetesa tipa 2 kod vegana i lakto-ovo-vegetarijanaca u usporedbi s ne-vegetarijancima (Fraser, 2009).

AHS-2 ukazala je na povezanost između smanjenja udjela namirnica životinjskog podrijetla u prehrani i smanjenja indeksa tjelesne mase, i to sljedećim redom: svejedi (28,3 kg/m<sup>2</sup>), semi-vegetarijanci (27,0 kg/m<sup>2</sup>), pesco-vegetarijanci (25,7 kg /m<sup>2</sup>), lakto-ovo-vegetarijanci (25,5 kg/m<sup>2</sup>) i vegani (23,1 kg/m<sup>2</sup>) (Fraser, 2009). Niži indeks tjelesne mase kod vegetarijanaca i vegana očekivan je jer je povezan s nižim unosom energije kojeg prijavljuju, što je pokazao velik broj istraživanja (Dinu i sur., 2017).

U usporedbi s ne-vegetarijancima, vegetarijanci i vegani imaju 11 – 19 % niži rizik od incidencije raka; vegani i lakto-ovo vegetarijanci u AHS-2 imali su značajno smanjen rizik za određene vrste raka u usporedbi s ne-vegetarijancima: 16 % smanjen rizik od svih vrsta raka za vegane i 42 % smanjen rizik od raka debelog crijeva za lakto- ovo-vegetarijance. Lakto-ovo vegetarijanci i vegani u AHS-2 imaju 43 % odnosno 63 % značajno manji rizik od hipertenzije u usporedbi s ne-vegetarijancima. Značajno niži krvni tlak ili prevalencija hipertenzije među vegetarijancima i veganima pripisuju se njihovom nižem indeksu tjelesne mase. Vegani i lakto-ovo vegetarijanci su također imali nižu prevalenciju metaboličkog sindroma i divertikularnih bolesti (Segovia-Siapco i Sabaté, 2018).

Rezultati meta-analize pokazuju da vegetarijanci i vegani pokazuju značajno niže razine najrelevantnijih čimbenika rizika za kronične bolesti kao što su indeks tjelesne mase, koncentracije lipida i glukoze natašte u usporedbi s ne-vegetarijancima i ne-veganima (Segovia-Siapco i Sabaté, 2018).

Analiza kohortnih prospektivnih studija pokazala je 25 %-tno smanjenje rizika od incidencije ishemijske bolesti srca i incidencije karcinoma (-8 %) kod vegetarijanaca. Slično, iako u vrlo ograničenom broju studija, veganska prehrana pokazala je značajnu povezanost sa smanjenim rizikom od ukupne incidencije raka (-15 %). Ukupna analiza među prospektivnim kohortnim studijama dokumentirala je 25 %-tno smanjenje incidencije i/ili mortaliteta od ishemijske bolesti srca, ali ne i incidencije i/ili mortaliteta od ukupnih kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti te 8 %-tno smanjenje incidencije ukupnog raka, ali ne i smrtnosti od raka kada se vegetarijanci uspoređuju s ne-vegetarijancima. Ovi rezultati mogu se objasniti činjenicom da su incidencija i mortalitet dva vrlo različita ishoda, pri čemu na smrtnost od kardiovaskularnih bolesti i raka uvelike utječu pristupi liječenju (Segovia-Siapco i Sabaté, 2018).

### 2.2.2 Crijevna mikrobiota kod prehrane biljnog podrijetla

Biljna prehrana prirodno je nisko masna što pogoduje bakterijama roda *Bifidobacterium*. Masti koje se unose kod vegetarijanske i/ili veganske prehrane pretežito su mononezasićene i polinezasićene, što povećava omjer koljena *Bacteroidetes/Firmicutes* te povećava brojnost bakterija rodova *Bifidobacterium* i *Akkermansia* i bakterija mliječne kiseline (Singh i sur., 2017).

U usporedbi s prehranom svejeda, vegani unose veću količinu vlakana, a manju količinu zasićenih masnih kiselina i proteina. Upravo veći unos vlakana i polifenola povezuje se s većom raznolikosti i brojnosti bakterija s povoljnim utjecajem na zdravlje domaćina. Vlakna, odnosno neprobavljivi ugljikohidrati, koja se nalaze isključivo u hrani biljnog podrijetla, najdosljednije povećavaju broj bakterija rodova *Ruminococcus*, *Eubacterium* i *Roseburia*, koje pripadaju bakterijama mliječne kiseline. Također, unos vlakana povezan je sa smanjenim brojem bakterija roda *Clostridium* i *Enterococcus* te većim brojem bakterijskih vrsta koje fermentiraju vlakna u kratkolančane masne kiseline. Osim hranjivih tvari, biljke sadrže brojne fitokemikalije, koje iako nemaju dodatnu nutritivnu vrijednost, mogu utjecati na različite metaboličke puteve u tijelu, rezultirajući višestrukim zdravstvenim koristima (Sakkas i sur., 2020).

Polifenoli, koji se također nalaze u hrani biljnog podrijetla, povećavaju brojnost bakterija rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* koji pokazuju protuupalne učinke na ljudsko zdravlje (Losno i sur., 2021). Interakcija polifenola i crijevne mikrobiote dvostrana je; bakterije koriste polifenole za proizvodnju mikrobnih metabolita, koje zatim koriste kao prebiotike. Urolitini su primjer mikrobnih metabolita koje koriste bakterije roda *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. Polifenolima su bogati voće, povrće, sjemenke, kakao, čaj i vino (Cardona i sur., 2013). Povećan unos orašastih plodova, posebice oraha, povećava brojnost bakterija porodica *Ruminococcaceae* i *Bifidobacteriae* (Bamberger i sur., 2018).



## **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **3.1. ISPITANICI**

Istraživanje je provedeno u sklopu pilot projekta naziva „Crijevna mikrobiota radno-aktivne populacije u RH“ koji se provodi u suradnji Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu s Institutom za antropologiju u vremenskom razdoblju od 2021. do 2022. godine.

Regrutacija ispitanika provedena je interno, oglašavanjem unutar Instituta za antropologiju i Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta. U istraživanju je sudjelovalo 59 ispitanika oba spola u dobi od 18 do 59 godina starosti, od čega 48 svezjeda, 6 vegana te 2 vegetarijanca.

Svi ispitanici dobrovoljno su sudjelovali u istraživanju te su prije samog početka detaljno upućeni u protokol i ciljeve istraživanja. Svaki ispitanik potpisao je informirani pristanak za sudjelovanje u projektu, ispunio online upitnik o prehranbenim i životnim navikama te dostavio uzorak stolice istraživačima. Istraživanje se provodilo u skladu sa svim smjericama propisanim Općom uredbom o zaštiti podataka – GDPR (Zakon, 2018) te Helsinškom deklaracijom. Svi prikupljeni podaci u istraživanju, kao i identitet ispitanika šifrirani su te je identitet ispitanika poznat samo određenim istraživačima iz tima zaduženog za dostavljanje osobnog izvješća o sastavu mikrobiote. Istraživanje je prije početka provedbe Projekta odobreno pozitivnim rješenjem Etičkog povjerenstva Instituta za antropologiju.

### **3.2. METODE RADA**

Metode koje su se koristile u istraživanju mogu se podijeliti na dijetetičke i genomičke.

#### **3.2.1. Dijetetičke metode**

Ispitanici su popunjavali upitnik koji je sadržavao opća pitanja o životnim i prehranbenim navikama te pitanja o usklađenosti s mediteranskim načinom prehrane. Upitnik se popunjavao preko Google forms platforme te je sadržavao ukupno 65 pitanja, od kojih se posljednjih 14 odnosilo na usklađenost s mediteranskim načinom prehrane. Upitnik je sadržavao pitanja vezana uz opće podatke o ispitanicima (spol, dob, bračni status, obrazovanje), antropometrijske podatke (visina i tjelesna masa), podatke o načinu života (tjelesna aktivnost, spavanje, pušenje) te pitanja o prehranbenim navikama (učestalost konzumacije određenih namirnica, raspored obroka u danu, konzumiranje dodataka prehrani, probiotika).

Upitnik je sadržavao i dva dana 24-satnog prisjećanja unosa hrane i pića u kojima se od ispitanika tražilo da navedu svu konzumiranu hranu i pića u proteklih 48 sati. Posljednjih 14 pitanja zapravo su vrednovani upitnik za procjenu usklađenosti prehrane ispitanika s mediteranskom prehranom preuzet iz istraživanja kojeg su proveli Martínez-González i suradnici (2012). Upitnik je preveden na hrvatski jezik za potrebe istraživanja. Satija i suradnici (2016) koristili su sličan pristup kao i Martínez-González i suradnici, pozitivno bodujući hranu biljnog podrijetla, a negativno hranu životinjskog podrijetla, stoga se korišteni upitnik može koristiti za procjenu usklađenosti prehrane s vegetarijanskim obrascima prehrane.

### 3.2.2. Genomičke metode

Za izolaciju DNA korišten je QIAamp® PowerFecal® DNA set kemikalija (kit) prema protokolu Quick-Start. Uzorci stolice, prethodno čuvani u zamrzivaču na -80°C, otopljeni su na sobnoj temperaturi i homogenizirani prije daljnjih koraka obrade uzoraka. Za izolaciju je korišteno 0,25 g uzorka stolice prema uputama proizvođača.

Sekvenciranje je provedeno u Institutu za antropologiju (Zagreb, Hrvatska) korištenjem platforme Illumina MiSeq i protokola za sekvenciranje spojenih krajeva (eng. *paired-end sequencing*). Varijabilne regije V3 i V4 gena koji kodira za 16S rRNA umnožene su pomoću početnica 341F/806R korištenjem lančane reakcije polimeraze u 30 ciklusa. Nakon umnažanja fragmenta gena, PCR produkti provjereni su na 2 %-om agaroznom gelu te su pročišćeni korištenjem Ampure XP kuglica. Pročišćeni PCR produkti korišteni su za izradu DNA knjižica upotrebom Illumina TruSeq DNA library protokola te su sekvencionirani Illumina MiSeq platformom.

Sirovi podaci sekvenciranja fragmenta gena 16S rRNA preuzeti su s Illumina MiSeq uređaja u obliku Fastq datoteka. Sirove DNA sekvence učitane su u QIIME2 bioinformatičku platformu (<https://qiime2.org/>) kroz koju su kvalitativno provjerene i filtrirane, uklonjene kimerične sekvence i izračunate su umnožene varijante sekvenci (engl. *amplicon sequence variant, ASV*) korištenjem DADA2 algoritma. Indeksi alfa i beta raznolikosti izračunati su korištenjem q2-diversity metode QIIME2 platforme na uzorcima razrijeđenim (engl. *rarefied*) na 20 000 očitanih sekvenci DNA po uzorku.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je povezati obrazac prehrane ispitanika s utjecajem na sastav crijevne mikrobiote. Pojam zdrave crijevne mikrobiote teško je precizno definirati, no neke od značajki su veća bioraznolikost te prisutnost određenih rodova i vrsta bakterija s poželjnim utjecajem na zdravlje domaćina (Magne i sur., 2020). Prehrana je jedan od najznačajnijih egzogenih faktora koji utječu na sastav i promjenu crijevne mikrobiote. Pretežito biljna prehrana s visokim udjelom vlakana rezultira povećanom bakterijskom raznolikosti u crijevima te većom proizvodnjom kratkolančanih masnih kiselina koje imaju pozitivan učinak na zdravlje domaćina. Osobe čija se prehrana bazira na namirnicama životinjskog podrijetla imaju veći udio bakterija roda *Bacteroides*, dok je povećana brojnost bakterija koljena *Firmicutes* te bakterija roda *Prevotella* i *Ruminococcus* u korelaciji s većom konzumacijom hrane biljnog podrijetla što je karakteristika vegetarijanskih obrazaca prehrane (De Filippo i sur., 2010; David i sur., 2014).

Analiza prehrane ispitanika provedena je putem *Google forms* ankete. Ispitanici su svrstani u tri kategorije obzirom na obrazac prehrane (svejadi, vegetarijanci i vegani) te se promatrao sastav njihove crijevne mikrobiote dobiven izolacijom DNA iz uzoraka stolice. Također se promatrao utjecaj odabranih endogenih (indeks tjelesne mase) i egzogenih (konzumacija probiotika) faktora potencijalnog utjecaja na sastav crijevne mikrobiote ispitanika.

Rezultati rada prikazani su u obliku 13 slika, od kojih se prvi dio odnosi na usklađenost prehrane ispitanika s mediteranskim načinom prehrane te učestalost konzumacije karakterističnih skupina namirnica (poglavlje 4.2.), a drugi dio na raznolikost crijevne mikrobiote u ovisnosti o vrsti prehrane te odabranih čimbenika (poglavlja 4.3. – 4.5.).

### 4.1. ISPITANICI

U istraživanju je sudjelovalo ukupno 59 ispitanika, od čega 35 ispitanika ženskog (60 %) te 24 ispitanika (40 %) muškog spola. Starosnoj skupini 18 - 29 godina pripada 15 ispitanika (25,4 %), 20 ispitanika (33,9 %) skupini 30 - 39 godina, 18 ispitanika (30,5 %) skupini 40 - 49 godina te 6 ispitanika (10,2 %) skupini 50 - 59 godina starosti.

Svoju prehranu 48 ispitanika (81,4 %) opisuje kao prehranu svejeda, 6 ispitanika (10,2 %) izabire vegansku prehranu, 2 ispitanika (3,4 %) vegetarijansku prehranu, 2 ispitanika (3,4 %) opisuje svoju prehranu kao onu za posebne prehrambene potrebe (dijabetička prehrana,

prehrana za bubrežne bolesnike, srčane bolesnike itd.), dok 1 ispitanik opisuje svoju prehranu kao izrazito mesnu s vrlo malim udjelom povrća bez konzumacije voća. Analizom odgovora prikupljenih upitnikom vidljivo je da su osobe s prehranom za posebne prehrambene potrebe također svejedi, dok su oba vegetarijanca pesco-vegetarijanci.

Prema izračunatom indeksu tjelesne mase, 33 ispitanika (55,9 %) je adekvatne tjelesne mase (18,5 – 24,9 kg/m<sup>2</sup>), dok je preostalih 26 ispitanika (44,1 %) prekomjerne tjelesne mase (25 – 29,9 kg/m<sup>2</sup>), od kojih su 25 svejedi i 1 vegan.

Većina je ispitanika tjelesno aktivna, čak njih 47 (88,7 %) te većina navodi hodanje, trčanje i fitness kao najčešći oblik tjelesne aktivnosti. Nepušači su 42 ispitanika (71,2 %), 5 ispitanika (8,5 %) su bivši pušači, dok je 12 ispitanika (20,3 %) aktivni pušači.

Neku vrstu dodataka prehrani koristi 37 ispitanika (62,7 %), većinom multivitaminske pripravke, dok 22 ispitanika (37,3 %) uopće ne koristi dodatke prehrani. Većina ispitanika (35; 59,3 %) ne koristi probiotike kao dodatke prehrani, niti konzumira prehrambene proizvode s dodacima probiotičkih kultura, 15 ispitanika (25,4 %) konzumira probiotičke jogurte, dok 9 ispitanika (15,3 %) koristi probiotike kao dodatke prehrani.

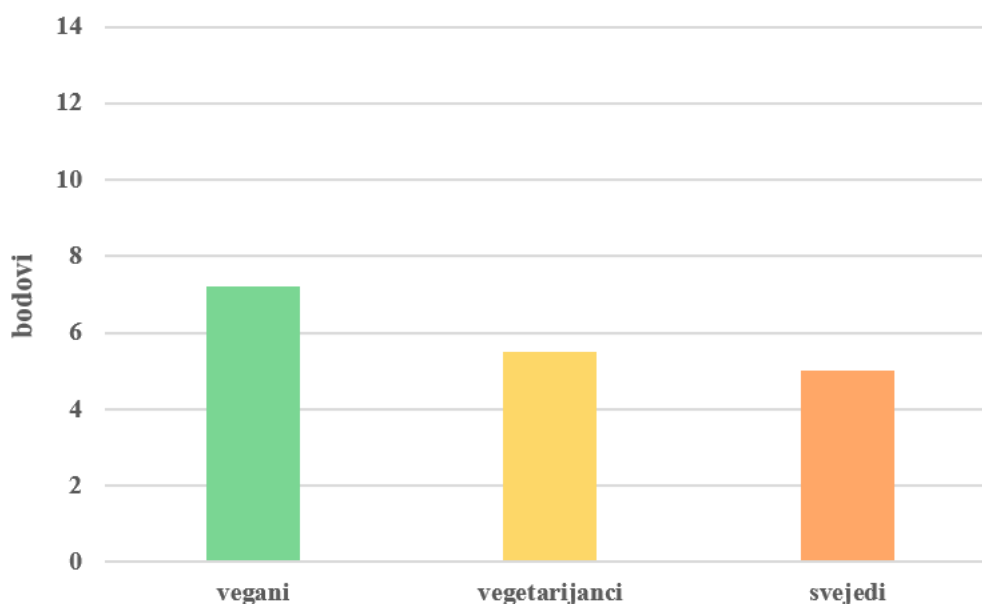
Antibiotik je koristilo 8 ispitanika (13,6 %) (klavocin, sumamed, ninur i augmentin) unazad tri mjeseca od dana uključivanja u istraživanje. Probleme s nadutošću nema 8 ispitanika (13,6 %), 15 ispitanika (25,4 %) pati od nadutosti jednom mjesečno, 17 ispitanika (28,8 %) 2 - 3 puta mjesečno, 8 ispitanika (13,6 %) jednom tjedno, 7 ispitanika (11,9 %) 2-3 puta tjedno, dok svakodnevne probleme s nadutošću ima 4 ispitanika (6,8 %).

## **4.2. USKLAĐENOST PREHRANE ISPITANIKA S MEDITERANSKOM**

### **PREHRANOM**

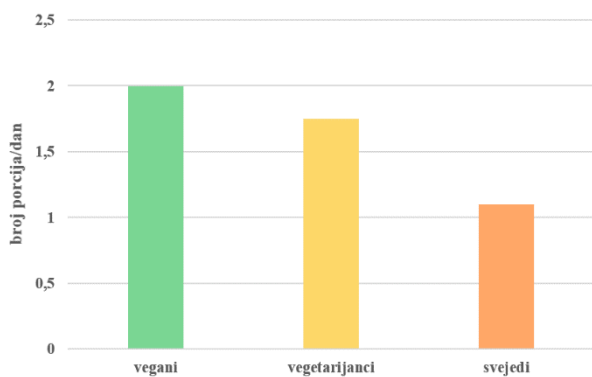
Za procjenu usklađenosti mediteranske prehrane korišten je vrednovani upitnik od 14 pitanja koja se odnose na učestalost konzumacije namirnica koje se povezuju s mediteranskim načinom prehrane, primjerice maslinovo ulje, povrće, voće, mahunarke, orašasti plodovi, riba te umak od rajčice. Pitanja se boduju s jednim ili nula bodova, ovisno o kriteriju za svako pojedino pitanje. Veći broj serviranja namirnica povezanih s mediteranskim načinom prehrane boduje se s jednim bodom, dok se povećana učestalost konzumacije namirnica koje nisu u skladu s mediteranskom prehranom, poput crvenog mesa, prerađenih mesnih proizvoda, maslaca, zaslađenih gaziranih pića te slatkiša, boduje se s nula bodova. Ukupan broj bodova  $\leq 5$  smatra

se niskom usklađenosti, ukupan broj bodova 6 - 9 srednjom usklađenosti, dok se ukupan broj bodova  $\geq 10$  smatra visokom usklađenosti prehrane s mediteranskim načinom prehrane. Ispitanici su podijeljeni u 3 skupine ovisno o vlastitoj vrsti prehrane te je izračunat prosječni broj bodova za svaku skupinu (slika 4). Prosječni broj bodova kod vegana iznosi 7,2, kod vegetarijanaca 5,5, a kod svejeda 5 bodova. Rezultati su u skladu s istraživanjem Clarys i suradnika (2014), koji su također utvrdili najviše vrijednosti skora mediteranske prehrane kod vegana, a najniže vrijednosti kod svejeda.

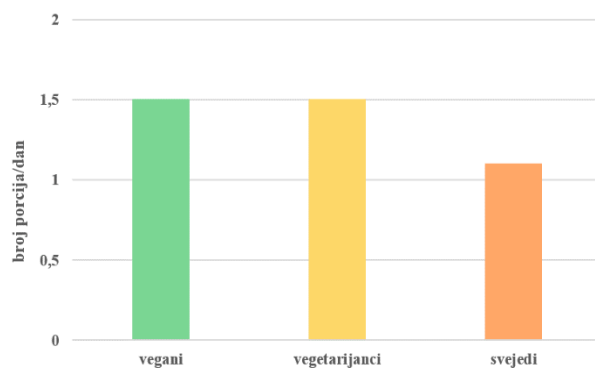


**Slika 4.** Skor mediteranske prehrane ovisno o vrsti prehrane ispitanika

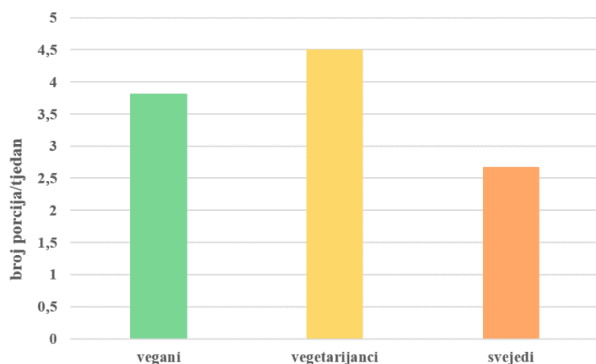
Pitanja unutar upitnika uključivala su učestalost konzumacije povrća, voća, orašastih plodova i mahunarki, odnosno skupina koje su temelj prehrane biljnog podrijetla. Također, navedene skupine namirnica važan su izvor prehrambenih vlakana koji su potencijalni modulatori sastava crijevne mikrobiote. Na slici 5 prikazana je učestalost konzumacije navedenih namirnica po skupinama ispitanika ovisno o vrsti prehrane. Kod vegana je uočena najveća prosječna učestalost konzumacije povrća (2 porcije/dan) i mahunarki (4,2 porcije/tjedan), dok je kod vegetarijanaca uočena najveća prosječna učestalost konzumacije orašastih plodova (4,5 porcije/tjedan). Učestalost konzumacije voća jednaka je kod vegana i vegetarijanaca te u prosjeku iznosi 1,5 porciju dnevno. Svejedi su pokazali najmanju prosječnu učestalost konzumacije svih navedenih skupina.



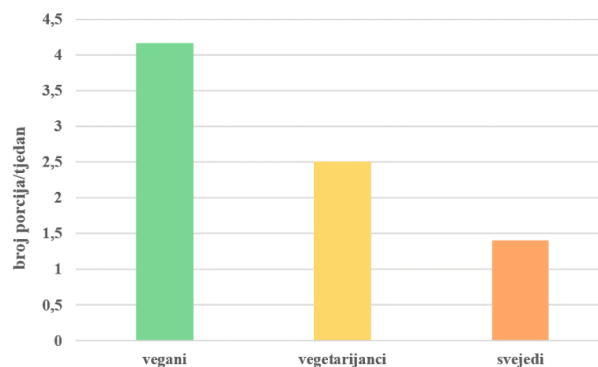
a)



b)



c)



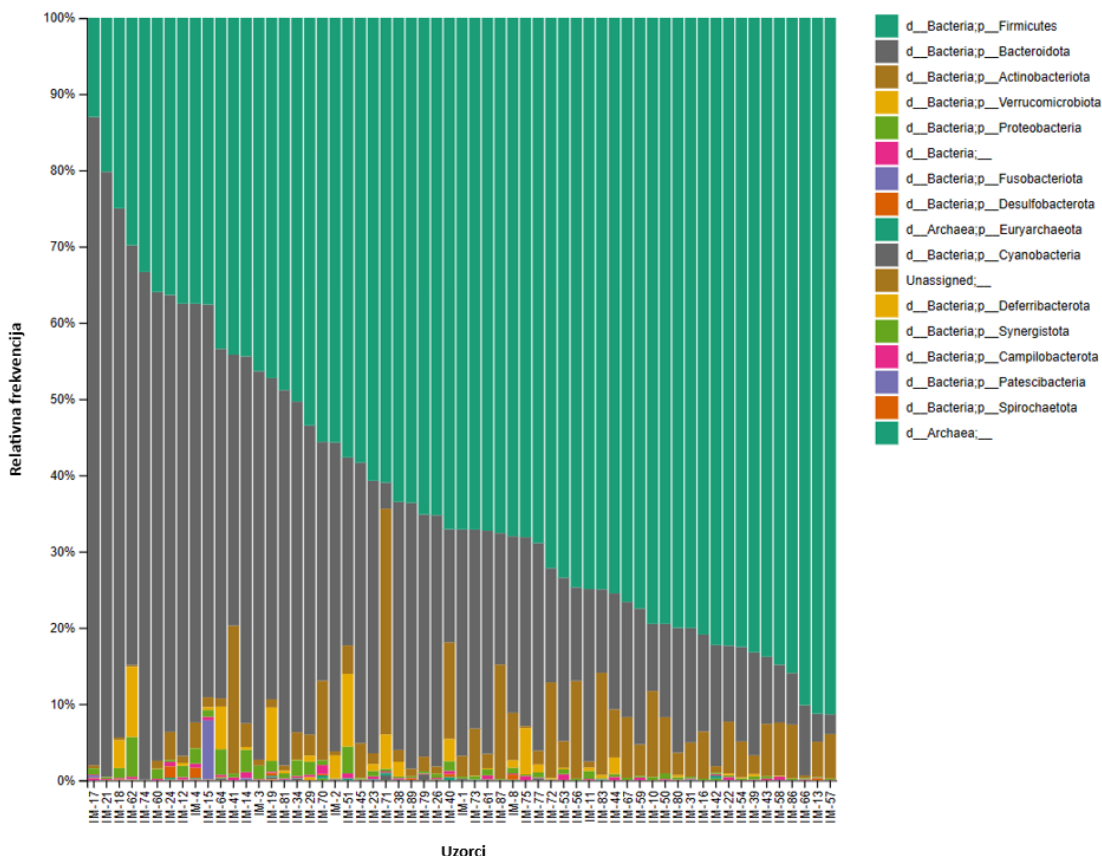
d)

**Slika 5.** Učestalost konzumacija skupina namirnica karakterističnih za prehranu biljnog podrijetla: (a) Učestalost konzumacije povrća (broj porcija/dan; porcija iznosi 150 g); (b) Učestalost konzumacije voća (broj porcija/dan; porcija iznosi 200 g; u porciju su uključeni i voćni sokovi); (c) Učestalost konzumacije orašastih plodova (broj porcija/tjedan; porcija iznosi 30 g); (d) Učestalost konzumacije mahunarki (broj porcija/tjedan; porcija iznosi 150 g).

### 4.3. TAKSONOMSKA ZASTUPLJENOST MIKROORGANIZAMA U UZORCIMA

#### 4.3.1. Taksonomska zastupljenost mikroorganizama u uzorku svakog ispitanika

Vizualni prikazi dobiveni su provođenjem podataka dobivenih izolacijom DNA iz uzoraka kroz QIIME2 program (slika 6). Uzorci su poredani od najmanje do najveće po zastupljenosti bakterija koljena *Firmicutes*.



**Slika 6.** Taksonomska zastupljenost bakterija na razini koljena u uzorku mikrobiote svakog pojedinog ispitanika

Najmanja zastupljenost bakterija koljena *Firmicutes* (13 %) uočena je kod ispitanika pod šifrom IM-17 koji je ženskog spola dobne skupine od 40 do 49 godina. Hrani se prehranom svejeda te joj indeks tjelesne mase iznosi 27,1 kg/m<sup>2</sup>, što se klasificira kao prekomjerna tjelesna masa. Boluje od sindroma iritabilnog crijeva, unazad 3 mjeseca od ispitivanja koristila antibiotik augmentin te koristi probiotike kao dodatke prehrani. Ispitanica ima najveću zastupljenost bakterija koljena *Bacteroidetes* koja iznosi 85 %.

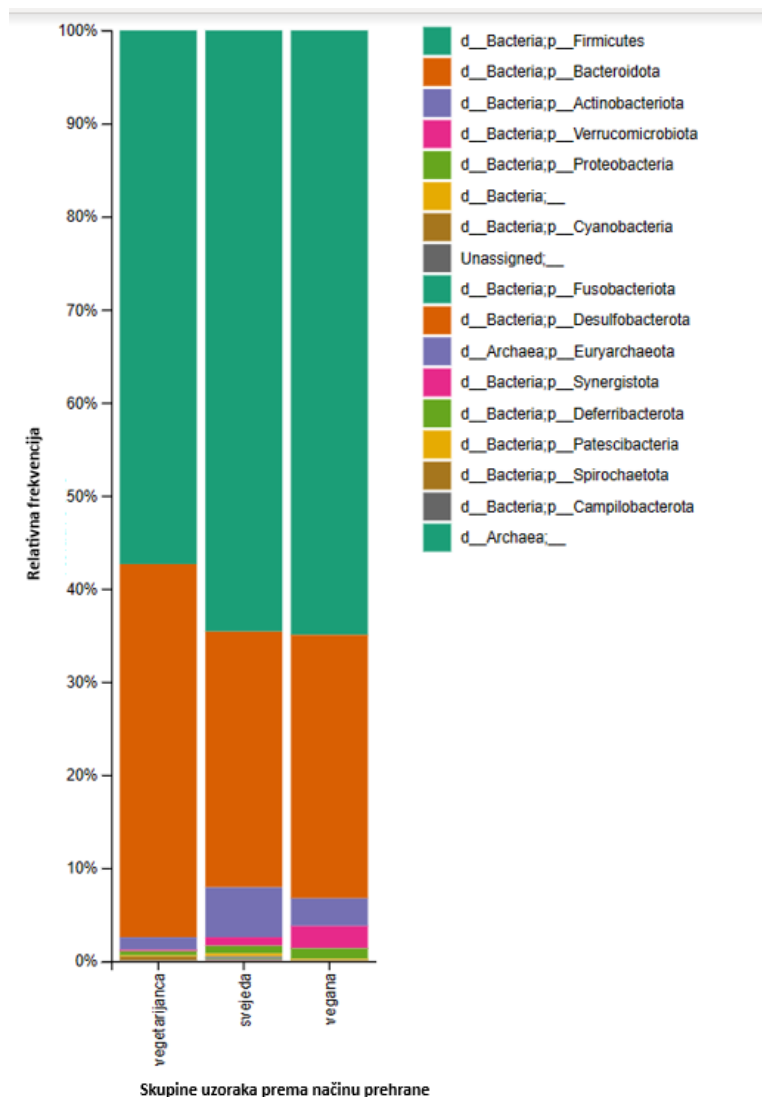
Najveća zastupljenost bakterija koljena *Firmicutes* (91,4 %) uočena je kod ispitanika pod šifrom IM-57 koji je ženskog spola dobre skupine od 30 do 39 godina. Ispitanica se također hrani prehranom svejeda i koristi probiotike kao dodatke prehrani. Indeks tjelesne mase ispitanice iznosi 22,3 kg/m<sup>2</sup>, odnosno adekvatne je tjelesne mase. Kod ispitanice je uočena najmanja zastupljenost bakterija koljena *Bacteroidetes* (2,6 %).

Vrlo niska zastupljenost bakterija koljena *Bacteroidetes* primijećena je kod ispitanika IM-71, koji ima značajno veću zastupljenost bakterija koljena *Actinobacteriota* (29,6 %), čime odskāče od ostatka ispitanika. Ispitanik je ženskog spola dobne skupine od 30 do 39 godina, indeksa tjelesne mase 24,5 kg/m<sup>2</sup> (adekvatna tjelesna masa) te se hrani prehranom svejeda. Također je koristila antibiotik augmentin 3 mjeseca unazad provođenja istraživanja i ne koristi probiotike kao dodatke prehrani. Najveća zastupljenost bakterija koljena *Verrucomicrobiota* u odnosu na druge ispitanika uočena je kod ispitanika IM-51 (9,5 %) i IM-62 (9,2 %). Ispitanik IM-51 muškog je spola dobne skupine od 40 do 49 godina, svejed je te mu indeks tjelesne mase iznosi 26,4 kg/m<sup>2</sup> (adekvatna tjelesna masa). Ispitanik IM-62 osoba je ženskog spola dobne skupine 18 do 29 godina, veganka je te joj indeks tjelesne mase iznosi 23,6 kg/m<sup>2</sup>, odnosno adekvatne je tjelesne mase. Niti jedan ne koristi probiotike kao dodatke prehrani. Ispitanik IM-15, u usporedbi s ostalim ispitanicima, ima značajno veću zastupljenost bakterija koljena *Fusobacteriota* koja iznosi 7,7 %. Ispitanik je muškog spola, pripada dobnoj skupini od 30 do 39 godina, svejed je, indeksa tjelesne mase 27,1kg/ m<sup>2</sup> (prekomjerna tjelesna masa) te ne koristi probiotike kao dodatke prehrani.

#### 4.3.2. Taksonomska zastupljenost mikroorganizama obzirom na vrstu prehrane

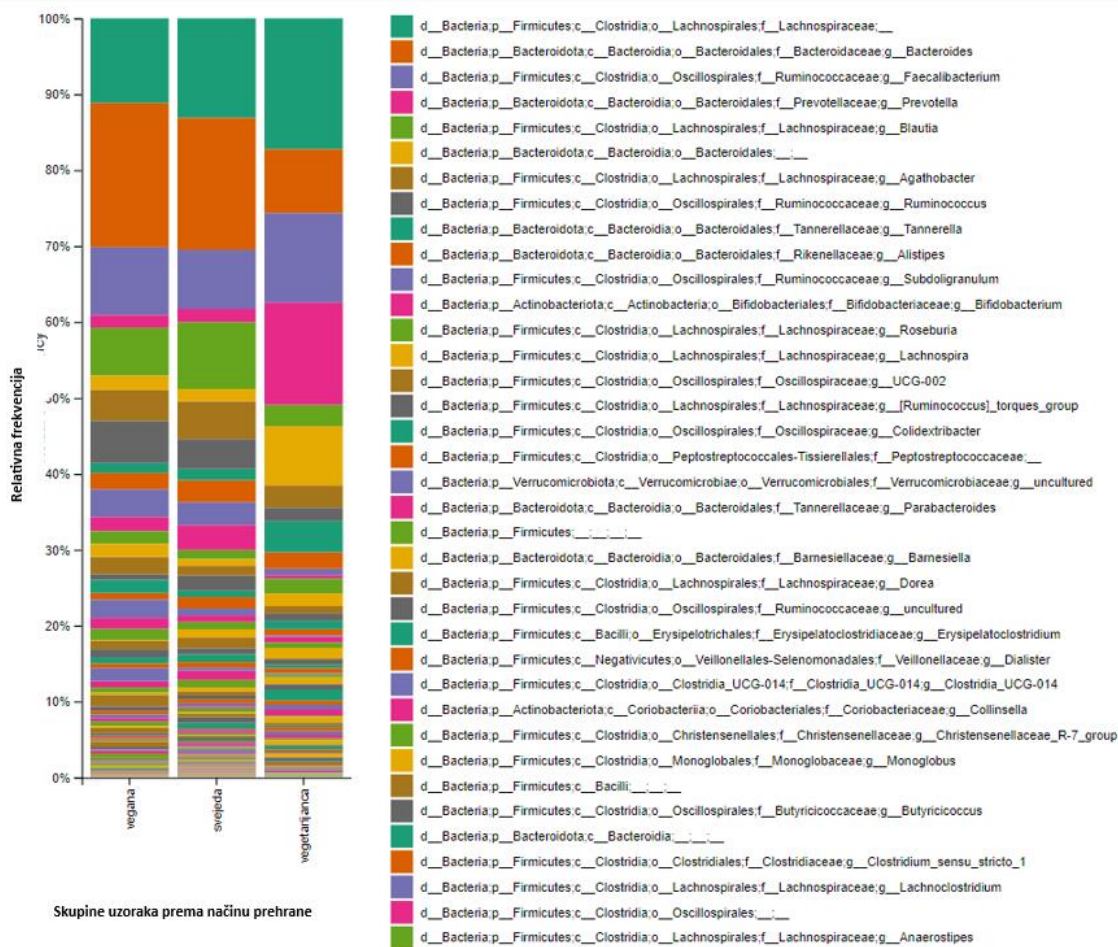
Slika 7 prikazuje sastav mikrobiote kod pojedinih skupina obzirom na vrstu prehrane – vegani, vegetarijanci i svejedi.





**Slika 7.** Taksonomska zastupljenost pojedinih bakterija na razini koljena u skupinama uzoraka prema načinu prehrane

Iz rezultata je vidljivo da je najveća zastupljenost bakterija koljena *Firmicutes* kod vegana te iznosi 65 %. Vrlo blizu je skupina svejeda sa zastupljenosti od 64,6 % te naposljetku skupina vegetarijanaca sa zastupljenosti od 57,3 %. Zastupljenost bakterija koljena *Bacteroidetes* kod vegetarijanaca iznosi 40,1 %, kod vegana 28,3 %, a kod svejeda 27,5 %. Skupina svejeda ima najveću zastupljenost bakterija koljena *Actinobacteriota* koja iznosi 5,4 %. Bakterije koljena *Verrucomicrobiota* najprisutnije su kod vegana (2,4 %), dok je u preostale dvije skupine zastupljenost niža od 1 %. Prilikom interpretacije rezultata važno je naglasiti da raspodjela ispitanika nije ravnomjerna; skupini svejeda pripada 51 ispitanik, skupini vegana 6 ispitanika, dok skupini vegetarijanaca pripadaju samo 2 ispitanika.



**Slika 8.** Taksonomska zastupljenost pojedinih bakterija na razini roda u skupinama uzoraka prema načinu prehrane

Na slici 8 prikazana je taksonomska zastupljenost pojedinih bakterija na razini roda. Iako se u literaturi bakterije roda *Bacteroides* povezuju s prehranom bogatom hranom životinjskog podrijetla, u ovom istraživanju najzastupljenije su kod vegana (19 %), zatim kod svejedca (17,4 %) te naposljetku kod vegetarijanca (8,4 %). Bakterije roda *Prevotella* očekivano imaju najveću zastupljenost kod skupine vegetarijanca (13,5 %), dok je kod preostalih skupina uzoraka zastupljenost znatno manja (vegani 1,6 %, svejedci 1,7 %). Bakterija roda *Ruminococcus* imaju najveću zastupljenost kod vegana (5,5 %), zatim kod svejedca (3,9 %) te naposljetku kod vegetarijanca (1,8 %). Zastupljenost bakterija roda *Roseburia* veća je kod vegana (1,7 %) i vegetarijanca (1,9 %) nego kod svejedca (1,2 %). Zastupljenost bakterija roda *Faecalibacterium* također je veća kod vegana (9 %) i vegetarijanca (11,8 %) u usporedbi sa svejedima (7,8 %). Svejedci imaju veću zastupljenost bakterija roda *Blautia* (8,8 %) u usporedbi s veganima (6,3 %) i vegetarijancima (2,8 %).

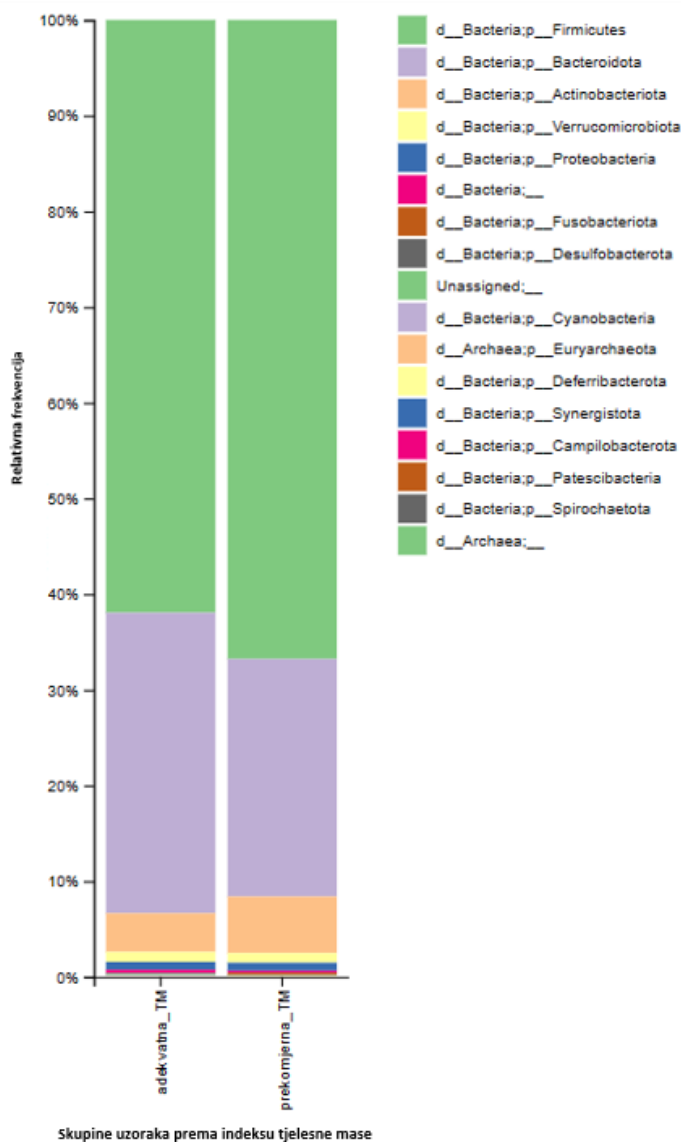
Istraživanje Matijašić i suradnika (2014) provedeno je na slovenskoj populaciji uspoređujući crijevnu mikrobiotu svejeda, vegana i lakto-vegetarijanaca sa svrhom otkrivanja razlika u sastavu crijevne mikrobiote potaknutih dugoročnim obrascima prehrane (najmanje godinu dana). Vegetarijanska prehrana bila je povezana s većim omjerom bakterija rodova *Bacteroides/Prevotella*, većom koncentracijom vrsta *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Clostridium clostridioforme* i *Faecalibacterium prausnitzii* te nižom koncentracijom *Clostridium klaster XIVa*, čija se povećana koncentracija povezuje s prehranbenim unosom masti i povećanim izlučivanjem sekundarnih žučnih kiselina.

De Fillipo i suradnici (2010) usporedili su fekalnu mikrobiotu zdrave djece iz Firenze, čija je prehrana okarakterizirana kao zapadnjačka i djece iz ruralnog područja Burkine Faso, gdje je prehrana bogata vlaknima slična prehrani afričkog ruralnog stanovništva nakon poljoprivredne revolucije. Mikrobiotom djece iz Burkine Faso dominiraju rodovi *Prevotella* i *Xylanibacter*. Yatsunenکو i suradnici (2012) također su uspoređivali mikrobiotu ispitanika ruralnih područja (djeca i odrasli iz amazonskog dijela Venezuele i Malezije) s ispitanicima koji se hrane tipičnom zapadnjačkom prehranom (djeca i odrasli iz SAD-a) te je utvrđena veća zastupljenost bakterija rodova *Prevotella*, *Succiniubrio* i *Treponema* kod ispitanika koji su provodili tradicionalne obrasce prehrane. Do istog su zaključka došli Schnorr i suradnici (2014). Liszt i suradnici (2009) uspoređivali su sastav crijevne mikrobiote vegetarijanaca i svejeda te ustanovili veću zastupljenost bakterija koljena *Bacteroidetes* kod vegetarijanaca te nižu koncentraciju *Clostridium klaster IV*. Uspoređujući sastav crijevne mikrobiote vegetarijanaca i svejeda Tajlandana, Ruengsomwong i suradnici (2016) uočili su znatno veću zastupljenost bakterija roda *Prevotella* u vegetarijanaca. Zimmer i suradnici (2014) zaključili su da vegetarijanci imaju nižu zastupljenost bakterija rodova *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Escherichia* i *Enterobacteriaceae* u usporedbi sa svejedima te da vegani imaju niži pH stolice u usporedbi s vegetarijancima. U istraživanju kojeg su proveli Kabeerdoss i suradnici (2012) uspoređivana je crijevna mikrobiota Indijki ruralnih područja s tradicionalnom vegetarijanskom prehranom s Indijkama koje se hrane zapadnjačkom prehranom. Kod vegetarijanki uočena je veća zastupljenost bakterija roda *Faecalibacterium* te manja zastupljenost *Clostridium klaster XIVa* i bakterija roda *Roseburia*. S druge strane, Wu i suradnici (2016) nisu pronašli značajne razlike u mikrobioti vegetarijanaca i svejeda.

Rezultati ovog istraživačkog rada djelomično su sukladni sa navedenim istraživanjima. Kod interpretacije rezultata važno je uzeti u obzir malu zastupljenost vegana i vegetarijanaca u ovom istraživanju, stoga se te skupine ispitanika ne mogu promatrati kao referentne te se ne može

donijeti konačan zaključak. Potrebno je provesti istraživanja na većem broju ispitanika koji se hrane ovakvim vrstama prehrane.

#### 4.3.3. Taksonomska zastupljenost mikroorganizama obzirom na indeks tjelesne mase



**Slika 9.** Taksonomska zastupljenost pojedinih bakterija na razini koljena u skupinama uzoraka prema indeksu tjelesne mase

Na slici 9 prikazana je taksonomska zastupljenost na razini koljena u skupinama uzoraka obzirom na indeks tjelesne mase (adekvatna i prekomjerna tjelesna masa). Vidljivo je da ispitanici s prekomjernom tjelesnom masom imaju veću zastupljenost bakterija koljena *Firmicutes* (66,8 %) u odnosu na ispitanike s adekvatnom tjelesnom masom (62 %).

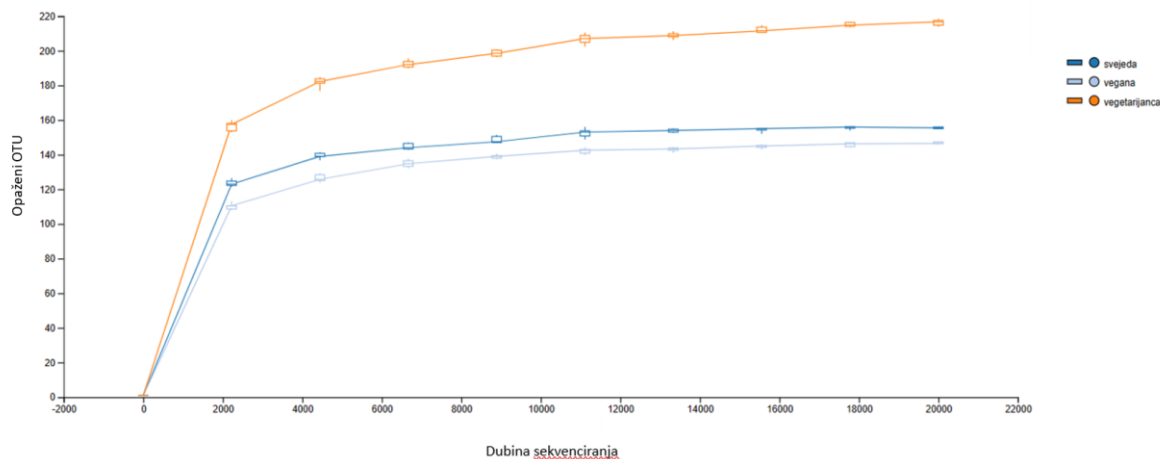
Posljedično, ispitanici s prekomjernom tjelesnom masom imaju manju zastupljenost bakterija koljena *Bacteroidetes* (24,8 %) u usporedbi sa ispitanicima adekvatne tjelesne mase (31,4 %). U istraživanju kojeg su proveli Ley i suradnici (2006), pretili ispitanici imali su veću brojnost bakterija koljena *Firmicutes* te manju brojnost bakterija koljena *Bacteroidetes* u odnosu na ispitanike adekvatne tjelesne mase. Također, nakon dodijeljene niskokalorične dijeta (s niskim udjelom masti ili ugljikohidrata), porast bakterija koljena *Bacteroidetes* i smanjenje bakterija koljena *Firmicutes* korelirao je s postotkom izgubljene tjelesne mase. U radu Hanžić i Samodol (2018) uočen je veći omjer koljena *Firmicutes/Bacteroidetes* u pretilih ispitanika (prosječna vrijednost omjera=3,08) u odnosu na pothranjene ispitanike (prosječna vrijednost omjera=1,66).

Davis (2016) je također primijetio znatno veću zastupljenost bakterija koljena *Firmicutes* u pretilih pojedinaca. S druge strane, Wan i suradnici (2020) nisu uočili značajne razlike u ukupnoj taksonomskoj zastupljenosti bakterija među pretelim, pothranjenim i ispitanicima adekvatne tjelesne mase.

Iako je prehrana jedan od glavnih čimbenika koji utječu na sastav crijevne mikrobiote, rezultati dosadašnjih istraživanja oprečni su te ukazuju kako je prehrana samo jedan od mnogih čimbenika utjecaja. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se sa sigurnošću mogla utvrditi povezanost obrazaca prehrane sa sastavom crijevne mikrobiote (Leeming i sur., 2021; Magne i sur., 2020).

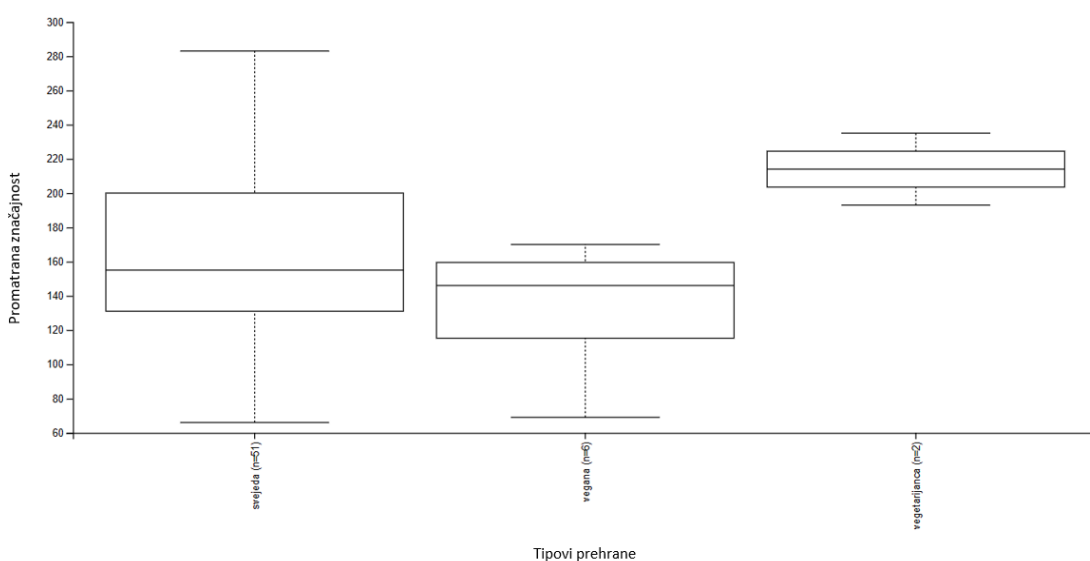
#### **4.4. ALFA RAZNOLIKOST**

Alfa raznolikost daje procjenu raznolikosti unutar uzorka. Pomoću QIIME programa odrede se ASV-ovi u uzorku te se primjenom raznih metrika računa alfa raznolikost uzorka – u našem slučaju je korištena metrika koja prikazuje procijenjen broj vrsta (opaženi OTU). Za prikaz rezultata alfa raznolikosti koriste se grafovi s regresijskim krivuljama te svaka krivulja prikazuje procijenjeni broj OTU-a. Na x-osi prikazana je dubina sekvenciranja (engl. *sequencing depth*), a na y-osi broj opaženih OTU-a.



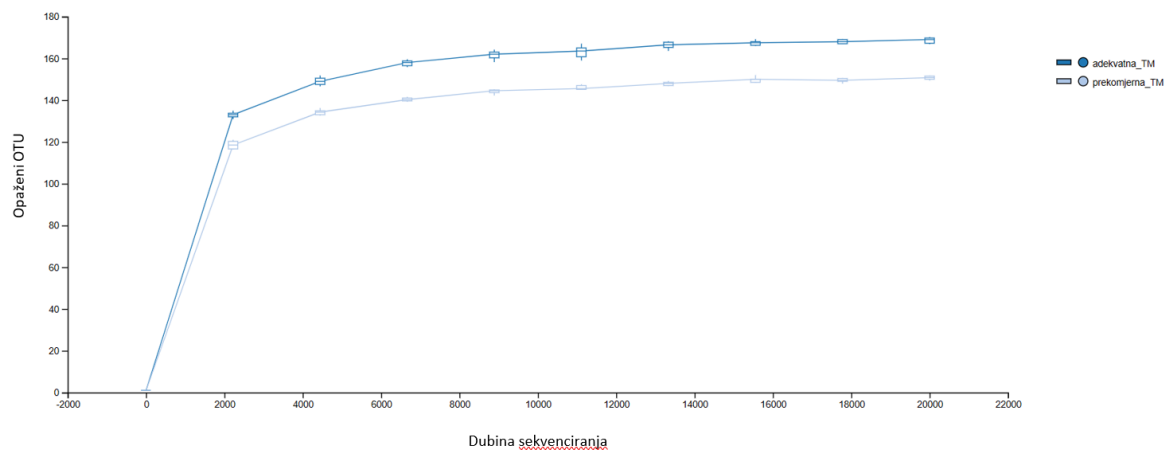
**Slika 10.** Alfa raznolikost grupe uzoraka prema tipu prehrane prikazana observed\_otus metrikom

Iz slike 10 vidljivo je da najveću alfa raznolikost imaju vegetarijanci, zatim svezjedi pa naposljetku vegani. U istraživanju koje su proveli Losasso i suradnici (2018) promatran je sastav i raznolikost mikrobiote kod vegana, vegetarijanca i svezjeda te su utvrdili da su vegani i vegetarijanci pokazali znatno veću alfa raznolikost od svezjeda. Do istog su zaključka došli Sun i suradnici (2023) uspoređujući mikrobiotu vegetarijanaca i svezjeda. Wu i suradnici (2016) i Wu i suradnici (2022) nisu pronašli razliku u alfa raznolikosti uspoređujući skupine vegana i svezjeda, odnosno vegetarijanaca i svezjeda.



**Slika 11.** Analiza značajnosti alfa raznolikosti po skupinama obzirom na tip prehrane

Provedena je i analiza značajnosti alfa raznolikosti po skupinama obzirom na tip prehrane (slika 11) iz koje se može zaključiti da nema značajne razlike u raznolikosti mikrobiote s obzirom na tip prehrane. U skupini vegetarijanaca nalaze se samo dva ispitanika, a u skupini vegana šest ispitanika, što se ne može promatrati kao referentne skupine na temelju kojih bi se mogao donijeti takav zaključak. Potrebno je provesti daljnja istraživanja s većim brojem ispitanika koji se hrane vegetarijanskim obrascima prehrane.



**Slika 12.** Alfa raznolikost grupe uzoraka prema indeksu tjelesne mase prikazana observed\_otus metrikom

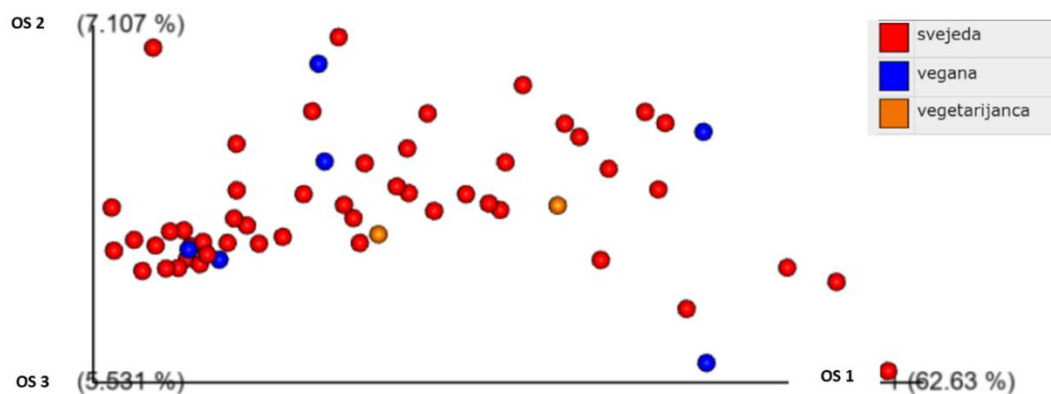
Iz slike 12 vidljivo je da ispitanici s adekvatnom tjelesnom masom imaju veću alfa raznolikost od ispitanika s prekomjernom tjelesnom masom.

Klimenko i suradnici (2018) također su primijetili negativnu korelaciju između alfa raznolikosti i indeksa tjelesne mase (Klimenko i sur., 2018). U istraživanju Wan i suradnika (2020) pretili pojedinci također su imali manju alfa raznolikost u usporedbi sa ispitanicima adekvatne tjelesne mase. Gao i suradnici (2018) uočili su značajno veću alfa raznolikost kod pothranjenih ispitanika u odnosu na ispitanike adekvatne i prekomjerne tjelesne mase. Također su zaključili da indeks tjelesne mase ima značajniji utjecaj na mikrobiotu kod žena nego kod muškaraca. Turnbaugh i suradnici (2009) uspoređivali su crijevnu mikrobiotu blizanaca kod pretelih pojedinaca i pojedinaca adekvatne tjelesne mase te je kod pretelih pojedinaca također uočena manja alfa raznolikost.

#### 4.5. BETA RAZNOLIKOST

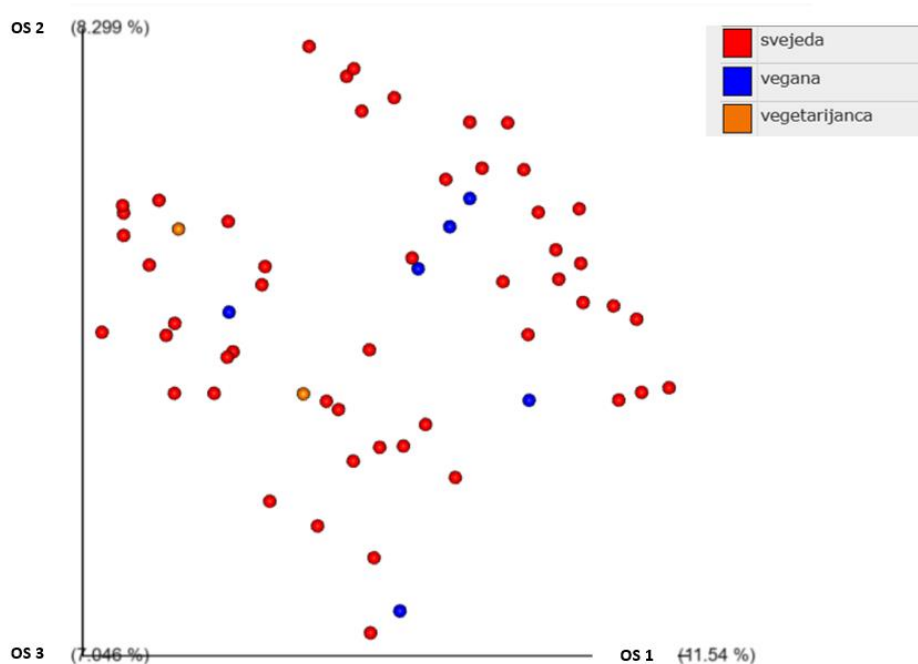
Beta raznolikost predstavlja raznolikost između uzoraka u analizi, odnosno daje mjeru sličnosti crijevne mikrobiote između uzoraka. Za vizualizaciju beta raznolikosti korištena je osnovna koordinatna analiza (engl. *Principal Coordinates Analysis*, PCoA), odnosno osnovna koordinatna analiza koja uzorke smješta u trodimenzionalni okvir na temelju udaljenosti između uzoraka određene UniFrac metrikom. UniFrac metrika može biti težinska (engl. *weighted*) i netežinska (engl. *unweighted*); težinski prikaz uzima u obzir i prisutnost i zastupljenost taksonomskih grupa, dok netežinski uzima u obzir samo prisutnost taksonomskih grupa u uzorcima. Uzorci su sličniji što su točke na grafu bliže.

Slika 13 prikazuje težinski prikaz beta raznolikosti s obzirom na vrstu prehrane ispitanika, dok slika 14 prikazuje netežinsku beta raznolikost.



**Slika 13.** Težinski UniFrac prikaz beta raznolikosti obzirom na vrstu prehrane ispitanika



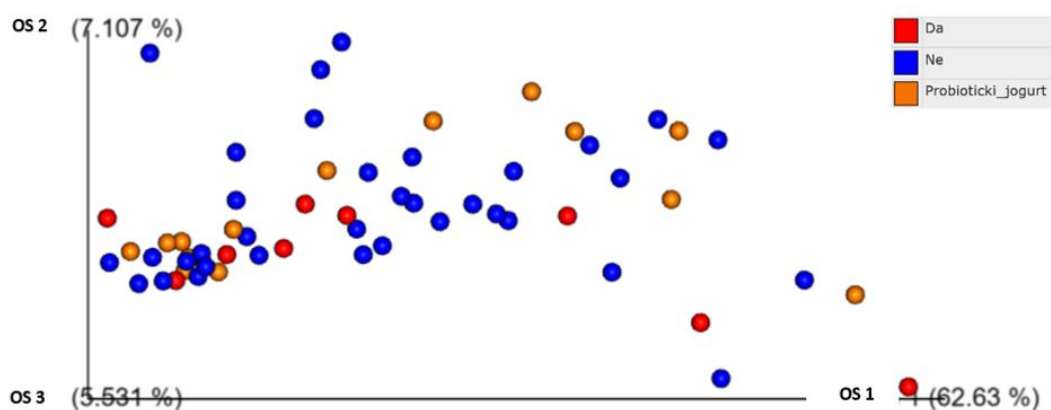


**Slika 14.** Netežinski UniFrac prikaz beta raznolikosti obzirom na vrstu prehrane ispitanika

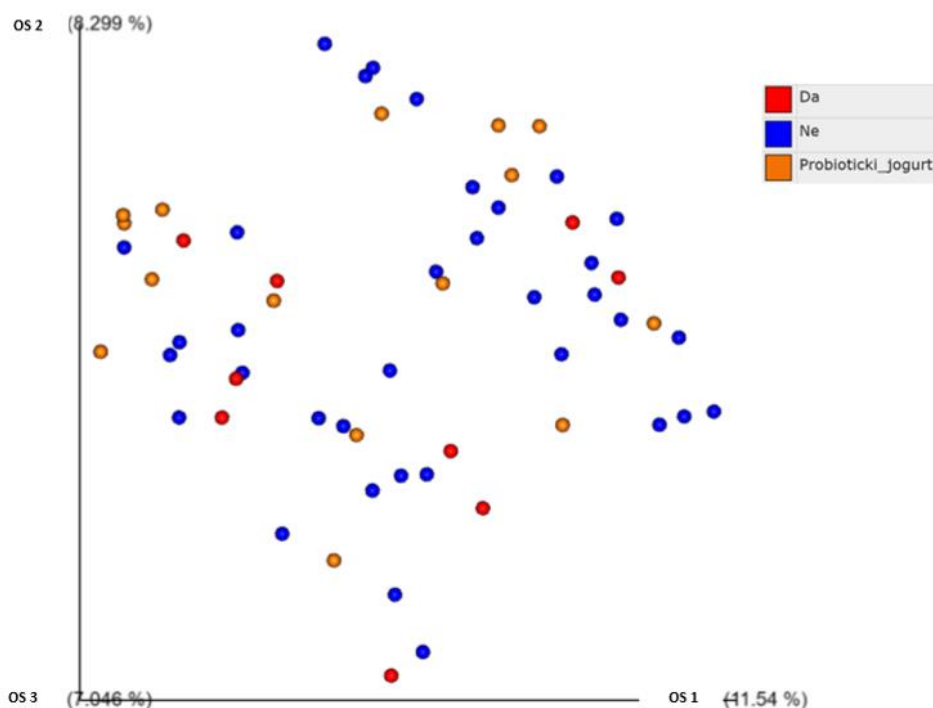
Kao što je vidljivo na slikama 13 i 14, nije došlo do grupiranja uzoraka u promatranim skupinama.

U istraživanju kojeg su proveli Losasso i suradnici (2018) nije pronađena razlika u beta raznolikosti između vegana, vegetarijanaca i svejeda. Barrett i suradnici (2018) promatrali su sastav crijevne mikrobiote u trudnica u ranoj fazi trudnoće (do 16 tjedana) te su uvidjeli manju beta raznolikost na razini roda u vegetarijanki u usporedbi sa svejedima. Promatrana razlika nije bila vidljiva na razini porodica bakterija. Nakon prelaska na vegetarijansku prehranu u razdoblju od 3 mjeseca, beta raznolikost na razini roda i vrste značajno se smanjila u usporedbi s rezultatima prije intervencije prehranom u istraživanju kojeg su proveli Zhang i suradnici (2018). U istraživanju Kohnert i suradnika (2021) nije uočena razlika u beta raznolikosti između pojedinaca koji su provodili vegansku prehranu i pojedinaca koji su provodili izrazito mesnu prehranu nakon četverotjedne intervencije veganskom ili izrazito mesnom prehranom u zdravih pojedinaca.

Promatrana je i beta raznolikost uzoraka ovisno o konzumaciji probiotika (koristi probiotike kao dodatke prehrani, ne koristi probiotike kao dodatke prehrani i konzumira probiotičke jogurte). Slika 15 prikazuje težinski UniFrac prikaz beta raznolikosti s obzirom na konzumaciju probiotika, dok slika 16 prikazuje netežinsku UniFrac udaljenost.



**Slika 15.** Težinski UniFrac prikaz beta raznolikosti obzirom na konzumaciju probiotika



**Slika 16.** Netežinski UniFrac prikaz beta raznolikosti obzirom na konzumaciju probiotika

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

U istraživanju koje su proveli Ferrario i suradnici (2014), težinski prikaze beta raznolikosti pokazao je da je intervencija probiotikom značajno promijenila ukupni fekalni sastav mikrobiote interventne skupine u odnosu na placebo skupinu. Reininghaus i suradnici (2020) primijetili su značajnu razliku u beta raznolikosti nakon 28 dana u skupini koja je konzumirala probiotike. Intervencija probiotikom kod pojedinaca sa dijagnosticiranom depresijom nije pokazala razliku u beta raznolikosti između interventne i kontrolne grupe (Chahwan i sur., 2019). Bjerg i suradnici (2015) i Tian i suradnici (2022) također nisu pronašli razliku u beta raznolikosti između interventne i kontrolne skupine.

Prednost ovog istraživanja je populacija vegetarijanaca i vegana na kojoj je proveden mali broj istraživanja ovog tipa. Obzirom da je prehrana jedan od glavnih modulatora crijevne mikrobiote, dovođenje sastava crijevne mikrobiote u korelaciju s obrascima prehrane pokazuje vrlo perspektivne rezultate. S druge strane, nedostaci istraživanja su neadekvatna raspodjela ispitanika obzirom na obrazac prehrane, općenito mali broj ispitanika te dijetetičke metode. Također je potrebno uključiti nutricioniste koji bi ispunjavali upitnik o prehrambenim navikama zajedno s ispitanicima kako bi se smanjila mogućnost zabune i davanja pogrešnih odgovora.

## 5. ZAKLJUČCI

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

1. Usporedbom skora mediteranske prehrane između skupina s obzirom na vrstu prehrane (vegani, vegetarijanci i svejedi), najveća usklađenost s mediteranskim načinom prehrane uočena je kod vegana. Vegani i vegetarijanci imaju veću prosječnu učestalost konzumacije skupina namirnica karakterističnih za prehranu biljnog podrijetla u usporedbi sa svejedima.
2. Usporedbom taksonomske zastupljenosti mikroorganizama u skupinama s obzirom na vrstu prehrane ispitanika (vegani, vegetarijanci i svejedi) nisu uočene značajne razlike u sastavu crijevne mikrobiote, zastupljenosti koljena *Bacteroidetes* i *Firmicutes*, njihovog međusobnog omjera niti zastupljenosti ostalih bakterija nižih taksonomskih razina.
3. Analizom alfa raznolikosti nije uočena značajna povezanost između raznolikosti i bogatstva sastava mikrobiote i vrste prehrane ispitanika. Također, nije uočena povezanost između raznolikosti sastava crijevne mikrobiote i indeksa tjelesne mase ispitanika.
4. Analizom beta raznolikosti prikazanim težinskim i netežinskim metrikama nije uočena grupacija uzoraka s obzirom na vrstu prehrane ispitanika, kao ni s obzirom na konzumaciju probiotika.

Potrebno je provesti daljnja istraživanja s većim brojem ispitanika i boljom zastupljenosti po vrsti prehrane kako bi mogli utvrditi utjecaj vrste prehrane na sastav crijevne mikrobiote.

## 6. LITERATURA

Amon P, Sanderson I (2017) What is the microbiome?. *Arch Dis Child Educ Pract Ed* **102**, 257-260. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-311643>

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/nature09944a>

Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* **307**, 1915-1920. <https://doi.org/10.1126/science.1104816>

Bamberger C, Rossmeier A, Lechner K, Wu L, Waldmann E, Fischer S, i sur. (2018) A Walnut-Enriched Diet Affects Gut Microbiome in Healthy Caucasian Subjects: A Randomized, Controlled Trial. *Nutrients* **10**, 244. <https://doi.org/10.3390/nu10020244>

Barrett HL, Gomez-Arango LF, Wilkinson SA, McIntyre HD, Callaway LK, Morrison M, Dekker Nitert M (2018) A Vegetarian Diet Is a Major Determinant of Gut Microbiota Composition in Early Pregnancy. *Nutrients* **10**, 890. <https://doi.org/10.3390/nu10070890>

Bell DS (2015) Changes seen in gut bacteria content and distribution with obesity: causation or association? *Postgrad Med* **127**, 863-868. <https://doi.org/10.1080/00325481.2015.1098519>

Biedermann L, Zeitz J, Mwinyi J, Sutter-Minder E, Rehman A, Ott SJ, i sur. (2013) Smoking cessation induces profound changes in the composition of the intestinal microbiota in humans. *PLoS One* **8**, e59260. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059260>

Bjerg AT, Sørensen MB, Krych L, Hansen LH, Astrup A, Kristensen M, Nielsen DS. (2015) The effect of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* L. casei W8® on blood levels of triacylglycerol is independent of colonisation. *Benef Microbes* **6**, 263-269. <https://doi.org/10.3920/BM2014.0033>

Bolte LA, Vich Vila A, Imhann F, Collij V, Gacesa R, Peters V, i sur. (2021) Long-term dietary patterns are associated with pro-inflammatory and anti-inflammatory features of the gut microbiome. *Gut* **70**, 1287-1298. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322670>

Cardona F, Andrés-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI (2013) Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J Nutr Biochem* **24**, 1415–1422. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001>

- Chahwan B, Kwan S, Isik A, van Hemert S, Burke C, Roberts L (2019) Gut feelings: A randomised, triple-blind, placebo-controlled trial of probiotics for depressive symptoms. *J Affect Disord* **253**, 317-326. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.04.097>
- Clarys P, Deliens T, Huybrechts I, Deriemaeker P, Vanaelst B, De Keyzer W, Hebbelinck M, Mullie P. (2014) Comparison of nutritional quality of the vegan, vegetarian, semi-vegetarian, pesco-vegetarian and omnivorous diet. *Nutrients* **6**, 1318-1332. <https://doi.org/10.3390/nu6031318>
- Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R (2012) The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* **148**, 1258-1270. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035>
- Conlon, MA, Bird AR (2015) The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients*. **7**, 17-44. <https://doi.org/10.3390/nu7010017>
- Craig WJ (2009) Health effects of vegan diets. *Am J Clin Nutr* **89**, 1627S-1633S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.26736N>
- Cresci GA i Bawden E (2015) Gut Microbiome: What We Do and Don't Know. *Nutr Clin Pract* **30**, 734-746. <https://doi.org/10.1177/0884533615609899>
- D'Argenio V, Salvatore F (2015) The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clin Chim Acta* **451**, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.01.003>
- David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, i sur. (2014) Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* **505**, 559-563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
- Davis CD (2016) The Gut Microbiome and Its Role in Obesity. *Nutr Today* **51**, 167-174. <https://doi.org/10.1097/NT.0000000000000167>
- De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, i sur. (2010) Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 14691-14696. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>
- Dinu M, Abbate R, Gensini GF, Casini A, Sofi F (2017) Vegetarian, vegan diets and multiple health outcomes: A systematic review with meta-analysis of observational studies. *Crit Rev Food Sci Nutr*. **57**, 3640-3649. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1138447>

- Dong TS i Gupta A (2019) Influence of Early Life, Diet, and the Environment on the Microbiome. *Clin Gastroenterol Hepatol* **17**, 231-242. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.08.067>
- Ercolini, D., Fogliano, V. (2018) Food design to feed the human gut microbiota. *J.Agr.Food Chem.* **66**, 3754-3758. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00456>
- Ferrario C, Taverniti V, Milani C, Fiore W, Laureati M, De Noni I, i sur. (2014) Modulation of fecal Clostridiales bacteria and butyrate by probiotic intervention with *Lactobacillus paracasei* DG varies among healthy adults. *J Nutr.* **144**, 1787-1796. <https://doi.org/10.3945/jn.114.197723>
- Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH (2012) The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **9**, 577-589. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.156>
- Flint HJ, Duncan SH, Scott KP, Louis P (2015) Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proc Nutr Soc* **74**, 13-22. <https://doi.org/10.1017/S0029665114001463>
- Fraser GE (2009) Vegetarian diets: what do we know of their effects on common chronic diseases? *Am J Clin Nutr* **89**, 1607-1612.
- Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, i sur. (2013) Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* **504**, 446-450. <https://doi.org/10.1038/nature12721>
- Gao X, Zhang M, Xue J, Huang J, Zhuang R, Zhou X, i sur. (2018) Body Mass Index Differences in the Gut Microbiota Are Gender Specific. *Front Microbiol* **9**, 1250. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01250>
- Gibson GR, Scott KP, Rastall RA, Tuohy KM, Hotchkiss A, Dubert-Ferrandon A, i sur. (2010) Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Sci Technol Bull Funct Food* **7**, 1–19. <https://doi.org/10.1616/1476-2137.15880c>
- Greenwood-Van Meerveld B, Johnson AC, Grundy D (2017) Gastrointestinal Physiology and Function. U: Greenwood-Van Meerveld (ured.) Gastrointestinal Pharmacology, Springer, Oklahoma, 1-16. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-56360-2>
- Grice EA, Segre JA (2012) The human microbiome: our second genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* **13**, 151-170. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-090711-163814>



Hall AB, Tolonen AC, Xavier RJ (2017) Human genetic variation and the gut microbiome in disease. *Nat Rev Genet* **18**, 690-699. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.63>

Hanžić I i Samodol A (2018) Analiza sastava crijevne mikrobiote i unosa makronutrijenata s obzirom na stupanj uhranjenosti, Prehrambeno-bioteknološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Holscher HD (2017) Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes* **8**, 172-184. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1290756>

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**, 104-116. [prehttps://doi.org/10.1186/s13568-018-0632-1](https://doi.org/10.1186/s13568-018-0632-1)

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>

Kabeerdoss J, Devi RS, Mary RR, Ramakrishna BS (2012) Faecal microbiota composition in vegetarians: comparison with omnivores in a cohort of young women in southern India. *Br J Nutr* **108**, 953-957. <https://doi.org/10.1017/S0007114511006362>

Klimenko NS, Tyakht AV, Popenko AS, Vasiliev AS, Altukhov IA, Ischenko DS, i sur. (2018) Microbiome Responses to an Uncontrolled Short-Term Diet Intervention in the Frame of the Citizen Science Project. *Nutrients* **10**, 576-594. <https://doi.org/10.3390/nu10050576>

Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F (2016) From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell* **165**, 1332-1345. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041>

Kristensen NB, Bryrup T, Allin KH, Nielsen T, Hansen TH, Pedersen O (2016) Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials. *Genome Med* **8**, 52. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0300-5>

Kohnert E, Kreutz C, Binder N, Hannibal L, Gorkiewicz G, Müller A (2021) Changes in Gut Microbiota after a Four-Week Intervention with Vegan vs. Meat-Rich Diets in Healthy Participants: A Randomized Controlled Trial. *Microorganisms* **9**, 727. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040727>

Lange K, Buerger M, Stallmach A, Bruns T (2016) Effects of Antibiotics on Gut Microbiota. *Dig Dis* **34**, 260-268. <https://doi.org/10.1159/000443360>.

Leeming ER, Louca P, Gibson R, Menni C, Spector TD, Roy CI (2021) The complexities of the diet-microbiome relationship: advances and perspectives. *Genome Med* **13**, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00813-7>

Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 11070-11075. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504978102>

Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**, 1022-1023. <https://doi.org/10.1038/4441022a>

Liszt K, Zwielehner J, Handschur M, Hippe B, Thaler R, Haslberger AG (2009) Characterization of bacteria, clostridia and Bacteroides in faeces of vegetarians using qPCR and PCR-DGGE fingerprinting. *Ann Nutr Metab* **54**, 253-257. <https://doi.org/10.1159/000229505>

Losno EA, Sieferle K, Perez-Cueto FJA, Ritz C (2021) Vegan Diet and the Gut Microbiota Composition in Healthy Adults. *Nutrients* **13**, 2402-2416. <https://doi.org/10.3390/nu13072402>

Losasso C, Eckert EM, Mastrorilli E, Villiger J, Mancin M, Patuzzi I, i sur. (2018) Assessing the Influence of Vegan, Vegetarian and Omnivore Oriented Westernized Dietary Styles on Human Gut Microbiota: A Cross Sectional Study. *Front Microbiol* **9**, 317. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00317>

Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pessoa S, Navarrete P, Balamurugan R. (2020) The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients* **12**,1474. <https://doi.org/10.3390/nu12051474>

Martínez-González MA, García-Arellano A, Toledo E, Salas-Salvadó J, Buil-Cosiales P, Corella D, i sur. (2012) A 14-item Mediterranean diet assessment tool and obesity indexes among high-risk subjects: the PREDIMED trial. *PLoS One* **7**, e43134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043134>

Matijašič BB, Obermajer T, Lipoglavšek L, Grabnar I, Avguštin G, Rogelj I (2014) Association of dietary type with fecal microbiota in vegetarians and omnivores in Slovenia. *Eur J Nutr.* **53**, 1051-1064. <https://doi.org/10.1007/s00394-013-0607-6>

- McQuade JL, Daniel CR, Helmink BA, Wargo JA (2019) Modulating the microbiome to improve therapeutic response in cancer. *Lancet Oncol* **20**, e77-e91. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30952-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30952-5)
- Melina V, Craig W, Levin S (2016) Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Vegetarian Diets. *J Acad Nutr Diet* **116**, 1970-1980. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2016.09.025>.
- Morrison DJ i Preston T (2016) Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* **7**, 189-200. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.113408>
- Obeid R, Awwad HM, Keller M, Geisel J (2017) Trimethylamine-N-oxide and its biological variations in vegetarians. *Eur J Nutr* **56**, 2599-2609. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1295-9>
- O'Hara AM i Shanahan F (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* **7**, 688-693. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400731>
- Palleja A, Mikkelsen KH, Forslund SK, Kashani A, Allin KH, Nielsen T, i sur. (2018) Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. *Nat Microbiol* **3**, 1255-1265. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0257-9>
- Panda S, El khader I, Casellas F, López Vivancos J, García Cors M, Santiago A, i sur. (2014) Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota. *PLoS One* **9**, e95476. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095476>
- Ramirez J, Guarner F, Bustos Fernandez L, Maruy A, Sdepanian VL, Cohen H (2020) Antibiotics as Major Disruptors of Gut Microbiota. *Front Cell Infect* **10**, 572912. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.572912>
- Reininghaus EZ, Platzer M, Kohlhammer-Dohr A, Hamm C, Mörkl S, Bengesser SA, i sur. (2020) PROVIT: Supplementary Probiotic Treatment and Vitamin B7 in Depression-A Randomized Controlled Trial. *Nutrients* **12**, 3422. <https://doi.org/10.3390/nu12113422>
- Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB, Bajaj JS (2014) Bile acids and the gut microbiome. *Curr Opin Gastroenterol* **30**, 332-338. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000057>

Rogers GB, Keating DJ, Young RL, Wong ML, Licinio J, Wesselingh S (2016) From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: mechanisms and pathways. *Mol Psychiatry* **21**, 738-748. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.50>

Ruan W, Engevik MA, Spinler JK, Versalovic J (2020) Healthy Human Gastrointestinal Microbiome: Composition and Function After a Decade of Exploration. *Dig Dis Sci.* **65**, 695-705. <https://doi:10.1007/s10620-020-06118-4>

Ruengsomwong S, La-Ongkham O, Jiang J, Wannissorn B, Nakayama J, Nitisinprasert S (2016) Microbial Community of Healthy Thai Vegetarians and Non-Vegetarians, Their Core Gut Microbiota, and Pathogen Risk. *J Microbiol Biotechnol* **26**, 1723-1735. <https://doi.org/10.4014/jmb.1603.03057>

Sakkas H, Bozidis P, Touzios C, Kolios D, Athanasiou G, Athanasopoulou E, i sur. (2020) Nutritional Status and the Influence of the Vegan Diet on the Gut Microbiota and Human Health. *Medicina (Kaunas)* **56**, 88. doi: 10.3390/medicina56020088

Salyers AA, Vercellotti JR, West SE, Wilkins TD (1977) Fermentation of mucin and plant polysaccharides by strains of *Bacteroides* from the human colon. *Appl Environ Microbiol* **33**, 319–322. <https://doi.org/10.1128/aem.33.2.319-322.1977>.

Satija A, Bhupathiraju SN, Rimm EB, Spiegelman D, Chiuve SE, Borgi L, i sur. (2016) Plant-Based Dietary Patterns and Incidence of Type 2 Diabetes in US Men and Women: Results from Three Prospective Cohort Studies. *PLoS Med* **13**, e1002039. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002039>

Schnorr SL, Candela M, Rampelli S, Centanni M, Consolandi C, Basaglia G (2014) Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat Commun* **5**, 3654. <https://doi.org/10.1038/ncomms4654>

Segovia-Siapco G, Sabaté J (2019) Health and sustainability outcomes of vegetarian dietary patterns: a revisit of the EPIC-Oxford and the Adventist Health Study-2 cohorts. *Eur J Clin Nutr.* **72**, 60-70. <https://doi.org/10.1038/s41430-018-0310-z>

Sheflin AM, Melby CL, Carbonero F, Weir TL (2017) Linking dietary patterns with gut microbial composition and function. *Gut Microbes* **8**, 113-129. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1270809>

Singh RK, Chang HW, Yan D, Lee KM, Ucmak D, Wong K, i sur. (2017) Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med* **15**, 73. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1175-y>

Sonnenburg JL, Bäckhed F (2016) Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature* **535**, 56-64. <https://doi.org/10.1038/nature18846>

Sun C, Li A, Xu C, Ma J, Wang H, Jiang Z, Hou J (2023) Comparative Analysis of Fecal Microbiota in Vegetarians and Omnivores. *Nutrients* **15**, 2358. <https://doi.org/10.3390/nu15102358>

Tian P, Chen Y, Zhu H, Wang L, Qian X, Zou R, i sur. (2022) Bifidobacterium breve CCFM1025 attenuates major depression disorder via regulating gut microbiome and tryptophan metabolism: A randomized clinical trial. *Brain Behav Immun* **100**, 233-241. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.11.023>

Tomova A, Bukovsky I, Rembert E, Yonas W, Alwarith J, Barnard ND, Kahleova H (2019) The Effects of Vegetarian and Vegan Diets on Gut Microbiota. *Front Nutr*. 2019 **6**, 47. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00047>

Tonstad S, Butler T, Yan R, Fraser GE (2009) Type of vegetarian diet, body weight, and prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes Care* **32**, 791-796. <https://doi.org/10.2337/dc08-1886>

Tuddenham S i Sears CL (2015) The intestinal microbiome and health. *Curr Opin Infect Dis* **28**, 464–470. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000196>

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

Vemuri R, Gundamaraju R, Shastri MD, Shukla SD, Kalpurath K, Ball M, i sur. (2018) Gut Microbial Changes, Interactions, and Their Implications on Human Lifecycle: An Ageing Perspective. *Biomed Res Int*. **2018**, 4178607. <https://doi.org/10.1155/2018/4178607>

Wan Y, Yuan J, Li J, Li H, Yin K, Wang F, Li D (2020) Overweight and underweight status are linked to specific gut microbiota and intestinal tricarboxylic acid cycle intermediates. *Clin Nutr* **39**, 3189-3198. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.02.014>

WHO/FAO (2002) Report of a joint FAO/WHO expert consultation on guidelines for the evaluation of probiotics in food. WHO/FAO - World Health Organization i Food and Agriculture Organization of the United Nations

Worsley A, Skrzypiec G (1998) Teenage vegetarianism: prevalence, social and cognitive contexts. *Appetite* **30**, 151-170. <https://doi.org/10.1006/appe.1997.0118>.

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**, 105-108. <https://doi.org/10.1126/science.1208344>

Wu GD, Compher C, Chen EZ, Smith SA, Shah RD, Bittinger K, i sur. (2016) Comparative metabolomics in vegans and omnivores reveal constraints on diet-dependent gut microbiota metabolite production. *Gut* **65**, 63-72. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308209>

Wu YT, Shen SJ, Liao KF, Huang CY (2022) Dietary Plant and Animal Protein Sources Oppositely Modulate Fecal *Bifidobacteria* and *Lachnospirillum* in Vegetarians and Omnivores. *Microbiol Spectr* **10**, e0204721. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02047-2>.

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

Zhang C, Björkman A, Cai K, Liu G, Wang C, Li Y, i sur. (2018) Impact of a 3-Months Vegetarian Diet on the Gut Microbiota and Immune Repertoire. *Front Immunol* **9**, 908. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00908>

Zimmer J, Lange B, Frick JS, Sauer H, Zimmermann K, Schwartz A, i sur. (2012) A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *Eur J Clin Nutr* **66**, 53-60. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2011.141>.

Zoetendal EG, Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM (2008) High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut* **57** 1605-1615. <https://doi.org/10.1136/gut.2007>

Zoetendal EG, Raes J, van den Bogert B, Arumugam M, Booijink CC, Troost FJ, i sur. (2012) The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. *ISME J* **6**, 1415-1426. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.212>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja HANA LAČ 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