

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Petra Pešić

818/N

**INDIVIDUALIZACIJA PREHRANE  
PRETILE OSOBE DODATKOM  
PREBIOTIKA *NUTRIOSE*® FB06**

Rad je izrađen u Kabinetu za bioinformatiku na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Jurice Žučka, prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć dr.sc. Ivane Rumora Samarin, poslijedoktorandice.

*Hvala od srca mom dragom mentoru, doc. dr. sc. Jurici Žučku na velikom strpljenju i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada. Hvala, profesore, na uvijek pozitivnom stavu i vedrom duhu.*

*Također, ogromno hvala dragoj dr.sc. Ivani Rumora-Samarin na konstruktivnim savjetima za vrijeme pisanja rada. Hvala Vam na velikoj podršci, i sve to kroz šalu i Vaš dovitljiv duh.*

*Najveće hvala mojoj mami, tati i bratu na bezuvjetnoj ljubavi i požrtvovnosti. Samo ljubav prema vama me drži ustrajnom i samo vi činite sve vrijednim.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

### INDIVIDUALIZACIJA PREHRANE PRETILE OSOBE DODATKOM PREBIOTIKA *NUTRIOSE®* FB06

*Petra Pešić, 818/N*

#### Sažetak:

Crijevnoj mikrobioti pridaje je sve veći značaj za dobrobit domaćina te se dovodi u vezu s mnoštvom stanja, od gastrointestinalnih do imunoloških i metaboličkih bolesti. Smatra se da ima važnu ulogu u nastanku, razvoju i liječenju pretilosti, pri čemu mehanizmi djelovanja još nisu razjašnjeni. Prehrana, posebice unos prehrambenih vlakana (prebiotika), jedan je od glavnih čimbenika koji pozitivno utječu na mikrobiotu. Ispitali smo koncept moduliranja sastava mikrobiote pomoću prebiotika kod umjereno tjelesno aktivnog pretilog muškarca. Prehrambeni unos i unos vlakana procijenjeni su upitnikom o učestalosti konzumacije hrane i pića, 24-satnim prisjećanjem o unosu hrane i pića i dnevnikom prehrane. Intervencija se sastojala od suplementacije komercijalnim prebiotikom *NUTRIOSE®* FB06, u dozi od 14 g/dan, tijekom 30 dana uz adekvatnu korekciju prehrane, bez restrikcije ukupnog dnevnog energetskog unosa (kcal/dan). Uzorci stolice uzimani su na početku, nakon 15 i 30 dana intervencije kada su provedena i antropometrijska mjerenja. Konačan rezultat pokazao je smanjenje tjelesne mase za 4,8%, ukupnog udjela masnoga tkiva za 12,2% te smanjenje stupnja visceralne masnoće za 2 jedinice. Sastav mikrobiote pokazao je deseterostruko povećanje blagotvornog bakterijskog roda *Bifidobacterium*.

**Ključne riječi:** mikrobiota, pretilost, prebiotici, dodaci prehrani

**Rad sadrži:** 56 stranica, 10 slika, 5 tablica, 111 literaturnih navoda, 2 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** *doc.dr.sc. Jurica Žučko*

**Pomoć pri izradi:** *dr.sc. Ivana Rumora Samarin, poslijedoktorandica*

#### **Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc.dr.sc. *Janko Diminić*
2. Doc.dr.sc. *Jurica Žučko*
3. Doc.dr.sc. *Ksenija Uroić*
4. Doc.dr.sc. *Andreja Leboš Pavunc* (zamjena)

**Datum obrane:** 28. rujna 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Nutrition

### FIBERT INTAKE AS A TOOL FOR MANIPULATING GUT MICROBIOTA IN OBESE INDIVIDUAL

*Petra Pesic, 818/N*

#### **Abstract:**

Microbiota plays an increasingly important role for the wellbeing of the host. It has been correlated with a plethora of conditions ranging from gastrointestinal to immunological and metabolic diseases. It is believed microbiota plays an important role in the onset, development and treatment of obesity with exact mechanisms still unclear. Diet is one of the major factors affecting microbiota - especially intake of dietary fibers (prebiotics) which are believed to positively affect microbiota composition. We had tested the concept of modulating microbiota composition using prebiotics in a moderately physically active obese male. Dietary intake and fiber intake were assessed at the beginning using a food frequency questionnaire (FFQ, 24-hour dietary recall and 3-day food record. Intervention consisted of daily supplementation with commercial prebiotic NUTRIOSE® FB06 till recommended daily intake of fiber was achieved. No major change of dietary style and calorie intake was recommended. Intervention was carried out for 30 days and body height, weight and composition were measured and stool samples were taken at the beginning, after 15 days and after 30 days of intervention. Anthropometric parameters showed 4.8% decrease in body weight with a significant reduction of body fat (12.2%) and a decrease in visceral fat rating from 15 to 13. Microbiota composition showed a significant increase in the beneficial bacterial genus *Bifidobacterium* which increased tenfold during intervention.

**Keywords:** microbiota, obesity, prebiotics, dietary supplements

**Thesis contains:** 56 pages, 10 figures, 5 tables, 111 references, 2 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *PhD. Jurica Žučko*

**Technical support and assistance:** *Ivana Rumora Samarin, PhD*

#### **Reviewers:**

1. PhD. *Janko Diminić*, Assistant professor
2. PhD. *Jurica Žučko*, Assistant professor
3. PhD. *Ksenija Uroić*, Assistant professor
4. PhD. *Andreja Leboš Pavunc*, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** 28 September 2017

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
2.1. PRETILOST.....	3
2.1.1. Globalni problem.....	4
2.1.2. Zdravstveni rizik.....	5
2.2. CRIJEVNA MIKROBIOTA.....	7
2.2.1. Bioraznolikost crijevne mikrobiote.....	8
2.2.2. Sastav i karakteristike crijevne mikrobiote pretile osobe.....	9
2.2.3. Čimbenici koji utječu na sastav crijevne mikrobiote.....	11
2.2.4. Uloga crijevne mikrobiote i utjecaj na razvoj pretilosti.....	14
2.3. UTJECAJ PREHRANE NA CRIJEVNU MIKROBIOTU.....	17
2.3.1. Prehrambena vlakna.....	18
2.4. PREHRAMBENE INTERVENCIJE U REGULACIJI PRETILOSTI.....	20
2.4.1. Probiotici.....	21
2.4.2. Prebiotici.....	21
2.4.2.1. <i>NUTRIOSE</i> ®FB06.....	22
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>24</b>
3.1. ISPITANIK.....	24
3.2. METODE RADA.....	24
3.2.1. Opći upitnik.....	24
3.2.2. Dijetetičke metode.....	25
3.2.2.1. Upitnik o učestalosti konzumacije hrane i pića (FFQ).....	26
3.2.2.2. Dnevnik prehrane.....	27
3.2.2.3. 24-satno prisjećanje unosa hrane i pića.....	27
3.2.3. Antropometrijske metode.....	28
3.2.4. Modifikacija prehrane suvremenim dijetetičkim metodama.....	29
3.2.4.1. Planiranje prehrane.....	30
3.2.5. Analiza uzoraka stolice.....	32
3.2.5.1. Prikupljanje uzoraka stolice.....	32
3.2.5.2. Automatizirana izolacija DNA i sekvenciranje 16S rRNA gena.....	33
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>34</b>
4.1. Rezultati upitnika o učestalosti konzumacije hrane i pića (FFQ).....	35
4.2. Rezultati 3-dnevnog dnevnika prehrane.....	35
4.3. Rezultati 24-satnog prisjećanja unosa hrane i pića.....	37
4.4. Rezultati 30-dnevnog dnevnika prehrane.....	38
4.5. Rezultati antropometrijskih mjerenja i sastava tijela na temelju bioelektrične impedancije.....	40
4.6. Rezultati sekvencioniranja crijevnog mikrobioma.....	41
4.6.1. Beta raznolikost.....	43
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>45</b>

**6. LITERATURA.....46**

**7. PRILOZI**

7.1. Opći upitnik

7.2. Upitnik o učestalosti konzumacije hrane i pića (FFQ)

7.3. Preporučeni jelovnici



# 1. UVOD

*“Ono što je jednom čovjeku hrana, drugome može biti otrov”.*

Tit Lukrecije Kar (98. – 55. p.n.e.)

Rastuća epidemija pretilosti i povezanih komplikacija, poput kardiovaskularnih bolesti, hiperlipidemije, nealkoholne bolesti jetre i dijabetesa, predstavlja i rastući teret za zdravstvene sustave diljem svijeta (Di Cesare i sur., 2016). Naime, od 1980. godine, prevalencija pretilosti porasla je za 75% (Ogden i sur., 2007; Swinburn i sur., 2011) uz procjenu da je 2014. godine približno 375 milijuna žena te 255 milijuna muškaraca diljem svijeta okarakterizirano kao pretilo (Di Cesare i sur., 2016). Kada bismo pojednostavili stvari, zaključili bismo da je pretilost rezultat neravnoteže unosa i potrošnje energije. U stvarnosti, razvitak pretilosti rezultat je iznimno kompleksne interakcije genetičkih, okolišnih, kulturoloških, bihevioralnih i mikrobioloških čimbenika (Vrhovec i sur., 2008).

Mnogi čimbenici doprinose povećanju tjelesne mase čovjeka kao i razvoju brojnih metaboličkih nepravilnosti usko povezanih s pretilošću. Posljednjih godina, crijevna mikrobiota predstavlja jedan od glavnih predmeta interesa znanstvenika diljem svijeta; poglavito radi svog potencijalno vrlo značajnog utjecaja na zdravlje čovjeka. Naime, brojna istraživanja na životinjama i ljudima doprinijela su shvaćanju delikatne simbioze između velikog broja mikroba koji nastanjuju ljudsko tijelo i organizma domaćina. Pretpostavlja se da svako ometanje ove simbioze i uzajamne tolerancije, bilo intrinzičnim ili ekstrinzičnim putem, može imati značajnu ulogu u modulaciji fiziologije čovjeka. Tako brojni ekstrinzični čimbenici poput izloženosti raznim utjecajima iz okoliša, načina prehrane i stila života mogu značajno utjecati na sastav crijevne mikrobiote, odnosno mogu dovesti do disbioze. Disbioza je pak termin kojim se označava promjena normalne ravnoteže crijevne mikrobiote (Hawrelak i Myers, 2004) koja posljedično može dovesti do povećanja adipoznog tkiva, odnosno do pretilosti, djelovanjem brojnih mehanizama. Sposobnost crijevne mikrobiote da regulira transport i skladištenje masti, metabolizam i imunološku funkciju organizma čini ju privlačnom metom za postojani gubitak tjelesne mase.

Crijevna mikrobiota predstavlja širok i raznolik spektar mikroorganizama, uključujući bakterije, arheje, gljive i viruse koji koloniziraju gastrointestinalni (GI) sustav (Backhed, 2005; Neish, 2009). Pri normalnim uvjetima homeostaze, fizičko-kemijska barijera, sačinjena od mukusa, epitelnog tkiva i regulatornih komponenti urođenog i adaptivnog imunološkog sustava, održava trajnu dvosmjernu komunikaciju između mikroba i domaćina, što rezultira uzajamnom koristi. Ometanje mikrobne komunikacije može dovesti do narušavanja

intestinalne barijere, disregulacije imunološkog sustava i promjena u metabolizmu, što su ujedno i mehanizmi koji se smatraju potencijalnim uzrocima razvoja pretilosti.

Stoga, danas je vrlo aktualna rasprava o čimbenicima koji određuju sastav crijevne mikrobiote, predloženim mehanizmima koji povezuju crijevnu mikrobiotu s razvojem pretilosti i potencijalnim načinima borbe s pretilošću putem manipulacije crijevne mikrobiote. Prehrana se smatra jednim od glavnih modulatora crijevne mikrobiote (Turnbaugh i sur., 2008). Štoviše, pojedine komponente hrane poput vlakana smatraju se ključnim faktorima u održavanju normalne/zdrave crijevne mikrobiote.

Cilj ovog rada bio je procijeniti kakvoću prehrane s posebnim naglaskom na procjenu unosa prehrambenih vlakana, odrediti početni sastav crijevne mikrobiote pretila osobe te odrediti da li individualizirani unos komercijalnog prebiotika *NUTRIOSE*® FB06 može dovesti do gubitka tjelesne mase i ukupnog udjela masnog tkiva ispitanika bez značajnije modifikacije prehrane i ograničavanja unosa energije. Smatra se da prebiotici djeluju tako da povećavaju zastupljenost bakterijskih rodova, prvenstveno *Lactobacillus* i *Bifidobacteria*, koje pozitivno djeluju na domaćina. Sastav mikrobiote je određivan sekvencioniranjem 16S rRNA marker gena iz uzoraka fecesa ispitanika uzetih prije, nakon 2 tjedna, i po završetku 30-dnevne prehrambene intervencije dok su podaci o tjelesnoj masi i ukupnom udjelu masnog tkiva ispitanika dobiveni primjenom antropometrijskih mjerenja.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. PRETILOST

*“Zdravlje je najveće bogatstvo.”*

Cicero

Pretilost (lat. *obesitas*) je definirana kao endokrino-metabolička bolest koju karakterizira prekomjerno nakupljanje suvišne energije u masnom tkivu što uzrokuje njegovu disfunkciju s posljedičnim komplikacijama od strane drugih organa (Jelčić i sur., 2010). Normalan udio masnog tkiva u žena iznosi 20 do 25%, a u muškaraca 15 do 20% ukupne tjelesne mase, dok se pretilom osobom smatra osoba čiji je indeks tjelesne mase (eng. Body Mass Index, BMI) veći od  $30 \text{ kg/m}^2$ . Naime, premda ne i najtočnija, danas najzastupljenija metoda za procjenu stanja uhranjenosti jest metoda izračuna indeksa tjelesne mase (ITM) koji dobro korelira s masom masnog tkiva. Izračunava se na način da se tjelesna masa u kilogramima podijeli s kvadratom tjelesne visine izražene u metrima ( $\text{kg/m}^2$ ). Prema Svjetskoj Zdravstvenoj Organizaciji (eng. World Health Organization, WHO), normalno stanje uhranjenosti (adekvatna tjelesna masa) iznosi 18,5-24,9  $\text{kg/m}^2$ , ITM od 25 do 29,9  $\text{kg/m}^2$  definira se kao prekomjerna tjelesna masa ili preuhranjenost, a ITM veći od  $30 \text{ kg/m}^2$  smatra se debljinom ili pretilošću i može se dodatno podijeliti u tri stupnja. Pretilost prvog stupnja predstavlja ITM u rasponu od 30 do 34,9  $\text{kg/m}^2$ , ITM u rasponu od 35 do 39,9  $\text{kg/m}^2$  predstavlja pretilost drugog stupnja, a ITM iznad 40  $\text{kg/m}^2$  ukazuje na pretilost trećeg stupnja koja se još naziva i morbidna ili ekstremna pretilost (WHO, 2017). Međutim, ITM iskazuje i značajna ograničenja jer omjer koji predstavlja ne uključuje komponentu tjelesnoga sastava pa su u ekstremnim slučajevima moguće zablude koje proizlaze iz nekritičke primjene ITM-a. Tako, na primjer tipična pretila osoba sa značajno povećanim udjelom ukupnog masnog tkiva može imati istu tjelesnu masu i visinu, stoga i isti ITM, kao i osoba bez značajno povećanoga udjela ukupnog masnog tkiva, ali s natprosječno razvijenom skeletnom mišićnom masom (Janssen i sur., 2004; Metelko i Harambašić, 1999).

Uzroci pretilosti u ljudi su multikauzalni i vrlo kompleksni. U osnovi, energetska neravnoteža, s unosom većim od potrošnje dovodi do porasta tjelesne mase. Međutim, povrh toga, danas je opće prihvaćeno stajalište da pretilost u svom konačnom kliničkom obliku nastaje varijabilnom individualnom integracijom socijalnih, bihevioralnih, kulturnih, psiholoških, metaboličkih i genetskih faktora (Vrhovec i sur., 2008), što jasno ukazuje da je

patofiziologija debljine mnogo kompleksnija od jednostavne paradigme o energetske neravnoteži. Uz to, vrlo je važno razumjeti kako je potreba za hranom primarna biotička potreba, dok je proces regulacije hrane vrlo kompliciran. Također, na gotovo svakom ljudskom kromosomu pronađeni su lokusi povezani s predispozicijom za pretili fenotip (ITM, abdominalna mast, udio masnog tkiva ili ekstremna pretilost) (Albuquerque i sur. 2015). Štoviše, kao rezultat brojnih istraživanja na ljudskom genomu razvijena je i teorija takozvanih štedljivih gena (*engl. thrifty gene*). Naime, genetičar James Neel je 60-tih godina prošloga stoljeća iznio pretpostavku da su ljudi tijekom prošlosti razvili gene za pohranu masti kako bi sačuvali energiju tijekom razdoblja gladovanja te tako preživjeli. Međutim, danas, u vremenu velike dostupnosti hrane i pretežito sjedilačkog načina života čovjek više nema potrebu za takvim skladištenjem masti odnosno ovaj mehanizam postaje beskoristan. Ipak, svi ljudi i dalje posjeduju "thrifty gene" - no nisu svi i pretili, što sugerira kako moraju postojati i brojni drugi čimbenici i mehanizmi koji utječu na pojavnost pretilosti (Wang i Speakman, 2016).

#### 2.1.1. Pretilost kao globalni problem

Prema američkom Centru za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC) iz 2014. godine, oko 78 milijuna odraslih i 12 milijuna djece u Sjedinjenim Američkim Državama je pretilo. Pretilost je, također, u stalnom porastu i u Europi te ovaj zabrinjavajući trend predstavlja veliki globalni problem današnjice. Statistike Svjetske Zdravstvene Organizacije (WHO) pokazuju da je opseg problema poprimio epidemijske razmjere te je brojka pretilih u svijetu dosegla 700 milijuna (WHO, 2014).

Naime, u Sjedinjenim Američkim Državama 65% stanovnika ima prekomjernu tjelesnu masu, a 31% stanovnika je pretilo. U Europi preko 40% odraslih ljudi ima prekomjernu tjelesnu masu, a oko 20% ih je pretilo. Debljina, kao bolest, ali i kao vodeći rizik za razvoj danas vodećih kroničnih nezaraznih bolesti u stalnom je porastu i u Hrvatskoj. Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, 63% muškaraca i 54% žena u Hrvatskoj ima prekomjernu tjelesnu masu, a pretilo je 20,37% odraslog stanovništva, i to 20,14% muškaraca te 20,60% žena, od čega u dobi od 45 do 54 godine 27,85% muškaraca i 32,82% žena. Hrvatska se ubraja u "debele nacije" te na ljestvici "debelih" država u Europi Hrvatska zauzima peto mjesto. Po prekomjernoj tjelesnoj masi prema spolu, Hrvatice su na trećem, a Hrvati na četvrtom mjestu u Europi. U cijelome svijetu, pak, između 194 obrađene zemlje svijeta, Hrvatska zauzima 71. mjesto. U odrasloj populaciji u Hrvatskoj među osobama s pozitivnom anamnezom moždanog udara prekomjernu tjelesnu masu ima 66% muškaraca i

75% žena, među osobama s povišenim krvnim tlakom 78% muškaraca i 74% žena, a među osobama sa dijabetesom tip 2 79% muškaraca i 84% žena (Musić Milanović, 2010). Visoka prevalencija prekomjerne tjelesne mase i ljudi koji imaju zdravstvenih poteškoća je očigledna, te su iste u uskoj vezi s hipokinezijom, odnosno nedostatkom tjelesne aktivnosti. Naime, prema podacima državnog zavoda za statistiku iz 2006. god. u Hrvatskoj je svega 6% aktivnih sportaša od ukupnog broja stanovništva, a tjelesno je neaktivno 83% muškaraca i 95% žena (HZJZ, 2014). Konačno, prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) oko 3,4 milijuna odraslih osoba godišnje umire zbog posljedica prekomjerne tjelesne mase ili pretilosti (WHO, 2014).

### 2.1.2. Zdravstveni rizik

Prekomjerna uhranjenost odnosno pretilost je najslabije kontroliran javnozdravstveni problem (European guidelines on cardiovascular disease prevention, 2007). Na razini patofizioloških zbivanja, pretilost je usko povezana s cijelim nizom mehanizama koji presudno utječu na razvoj mnogih poremećaja, što onda progresijom i međudjelovanjem, preko vrlo kompleksnih patoloških stanja i bolesti, dovodi do prijevremene smrti (Kremers i sur., 2009). Iz tog razloga uvidjela se potreba za novim metodama otkrivanja mogućih uzroka pretilosti kroz suvremena znanstvena područja istraživanja kao što je ispitivanje gena povezanih s pretilošću, utjecaj okoliša te međudjelovanje genetskih i okolišnih čimbenika s namjerom formiranja personalizirane medicine i prehrane.

Zdravstveno značenje pretilosti pak proizlazi iz činjenice što ona jasno povećava rizik od razvoja niza bolesti i poremećaja. Osim već spomenutih bolesti koje definiraju metabolički sindrom (arterijska hipertenzija, dislipidemija, dijabetes tip 2 i kardiovaskularne bolesti), pretilost je povezana i s bolestima žučnjaka, osteoartritisom, apnejom u snu, različitim poremećajima respiracije, kao i zloćudnim bolestima maternice, dojke, prostate i debeloga crijeva (Kremers i sur., 2009; Wolf i Woodworth, 2009).

Nadalje, suvremena su istraživanja nedvojbeno potvrdila kako postoje značajne razlike u sastavu i metaboličkoj aktivnosti tjelesnih masnih nakupina u ovisnosti o njihovu smještaju (Geer i Shen, 2009). Smatra se da su masne nakupine u trbušnoj šupljini, smještene između pojedinih visceralnih organa, metabolički aktivnije i predstavljaju daleko veću opasnost za ukupno zdravlje od potkožnih nakupina. Naime, visceralni adipociti luče različite čimbenike i upalne citokine tzv. adipokine koji imaju važne uloge u patogenezi inzulinske rezistencije i metaboličkog sindroma (Blüher, 2009; Geer i Shen, 2009).

Do sada je tijekom 60-ak istraživanja koja se bave otkrivanjem arhitekture gena i bolesti, identificirano 253 različitih dijelova DNA koji se povezuju s pretilosti (Obesity gene map). Također, sve je više istraživanja koja pokazuju da postoji jasna povezanost između stresa i debljine. Međutim, prehrana se ipak smatra jednim od glavnih krivaca prekomjerne tjelesne mase.

Proteklog desetljeća, publiciran je znanstveno-istraživački rad koji je po prvi put sugerirao kako u razvitku pretilosti značajnu ulogu ima crijevna mikrobiota. Naime, na mišjem modelu je otkriveno da odrasle jedinke bez mikroorganizama (eng. germ-free mice) povećavaju postotak masnog tkiva za 60% kada ih se kolonizira mikroorganizmima prisutnim u slijepom crijevu normalnog miša. Smatra se da su za mehanizam povećanja tjelesne masnoće odgovorni mikroorganizmi, tj. mikrobiota koja može regulirati količinu energije koja se može dobiti iz hrane i time povećati ukupnu energiju domaćina. Znanstvena istraživanja koja su uslijedila potvrđuju utjecaj crijevne mikrobiote na pretilost te ukazuju na kompleksnu interakciju između mikrobiote i ljudskog tijela (Backhed, 2004).

Štoviše, znanstvenici sugeriraju kako je mikrobiološki genetski materijal koji čovjek nosi u svojim crijevima zapravo produžetak čovjekovog genoma ili tzv. 'meta-genom' (Virgin i Todd, 2011). Stoga, crijevni mikrobiom predstavlja ozbiljnog kandidata koji doprinosi porastu stope pretilosti i to prvenstveno zbog njegovog utjecaja na raspoloživost i apsorpciju hranjivih tvari te regulaciju energetske ravnoteže organizma.

## 2.2. CRIJEVNA MIKROBIOTA

*“Sve bolesti počinju u crijevima.”*

Hipokrat

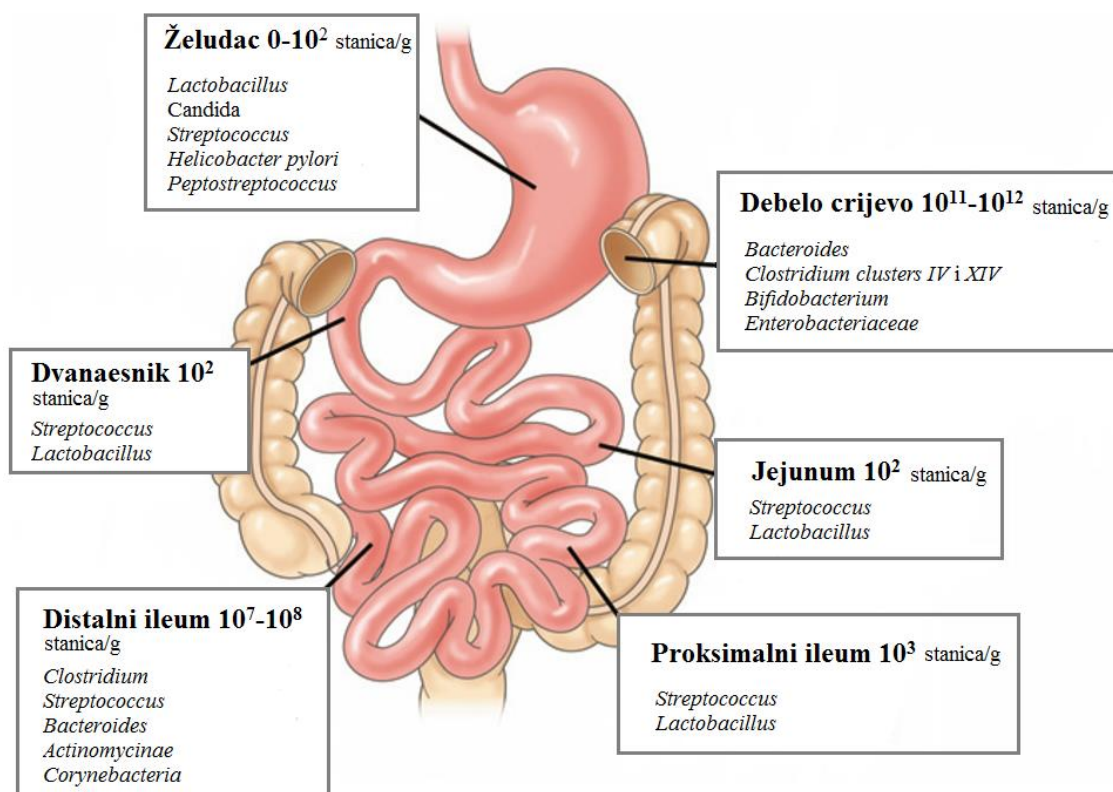
Glavna je uloga probavnog trakta osigurati organizmu neprekidnu opskrbu vodom, elektrolitima i hranjivim sastojcima. Da bi se to postiglo, hrana se mora kretati kroz probavni trakt brzinom koja omogućuje odvijanje probavnih i apsorpcijskih procesa. Jedna od najvažnijih značajki probavnog trakta svakako jest bezbroj autoregulacijskih procesa u crijevima koji osiguravaju kretanje hrane prikladnom brzinom, dovoljno malom da se mogu dovršiti probava i apsorpcija, a opet dovoljno velikom da se organizam može opskrbiti potrebnim hranjivim sastojcima (Guyton, 1981). Tijekom prosječnog životnog vijeka, oko 60 tona hrane prođe kroz ljudski probavni trakt, zajedno s obiljem mikroorganizama iz okoline koji predstavljaju potencijalnu prijetnju integritetu crijeva (Bengmark, 1998). Skupni naziv za nevidljivi ekosustav mikroorganizama koji kolonizira probavni trakt, a koji se sastoji od velikog broja komenzalnih, simbiotskih i patogenih mikroorganizama, jest crijevna mikrobiota, dok se područje molekularnih istraživanja koja, između ostalog, proučavaju i složenost sveukupnog genetičkog materijala određene mikrobiote, tzv. mikrobioma, naziva metagenomika (D'Argenio i Salvatore, 2015). Pojam 'mikrobiom' je prvi put predložio i upotrijebio američki molekularni biolog Joshua Lederberg, želeći naglasiti važnost ukupnosti genetskog materijala zajednice simbiotskih, komenzalnih i patogenih mikroorganizama (Lederberg i McCray, 2001). Naime, određeni geni crijevne mikrobiote kodiraju za proteine bitne za preživljavanje domaćina, a koji nisu prisutni u genomu domaćin te je upravo ovo saznanje navelo znanstvenike na definiranje crijevne mikrobiote kao "našeg zaboravljenog organa" (D'Argenio i Salvatore, 2015).

Razvojem sofisticiranijih metoda profiliranja i karakteriziranja složenog sustava crijevne mikrobiote, njena uloga u razvoju brojnih crijevnih bolesti i bolesti metabolizma postaje sve eočiglednija (Gerard, 2016). Općenito, crijevna mikrobiota osigurava brojne blagodati za ljudsko zdravlje kroz niz fizioloških funkcija kao što su jačanje crijevnog epitela (Natividad i Verdu, 2013), iskorištavanje energije (den Besten i sur, 2013), zaštita protiv patogena (Baumler i Sperandio, 2016) te regulacija imuniteta domaćina (Gensollen i sur, 2016). Međutim, postoji vjerojatnost da se navedene funkcije naruše kao rezultat izmijenjenog sastava crijevne mikrobiote, što posljedično dovodi do promjene normalne ravnoteže crijevne mikrobiote poznatije pod nazivom disbioza (Hawrelak i Myers, 2004).

Mehanizmi putem kojih crijevna mikrobiota utječe na pretilost kod ljudi su vrlo kompleksni i uglavnom nedovoljno poznati, no smatra se da su neki od uzroka: visoke razine fermentiranih kratkolančanih masnih kiselina koji potiču adipogenezu, pretjerano oslobađanje energije u tijelu, ekspresija gena vezanih uz pretilost i povećana proizvodnja endotoksina odnosno plazmatskih lipopolisaharida (LPS) koji uzrokuju pretilost i upalne procese u organizmu (Chen i sur., 2014).

### 2.2.1. Bioraznolikost crijevne mikrobiote

Od ukupno 55 poznatih bakterijskih koljena u crijevnoj mikrobioti su zastupljene bakterije iz samo 7 koljena (lat. *phyla*) i to: 1) *Firmicutes* (64%) - većinom iz razreda *Clostridia* uključujući rodove *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Roseburia* i *Lactobacillus*, 2) *Bacteroidetes* (23 %) - većinom iz roda *Bacteroides* sp., glavni predstavnik *Bacteroides thetaiotaomicron*, 3) *Proteobacteria* (8%) - *Enterobacteriaceae* i sulfito-reducirajuće bakterije, 4) *Actinobacteria* (3%) – *Bifidobacterium*, 5) *Verrucomicrobia* (manje od 1%), 6) *Cianobacteria* (manje od 1%), te 7) *Fusobacteria* (manje od 1%) (Eckburg i sur., 2005).



Slika 1. Sastav i koncentracije dominantnih mikrobnih vrsta u različitim dijelovima gastrointestinalnog trakta (prema Sartor, 2008).



Broj bakterija se povećava prema distalnom dijelu probavnog sustava, tako da želudac i dvanaesnik nastanjuje mali broj mikroorganizama, manje od  $10^3$  stanica po gramu crijevnog sadržaja (eng. number of colony-forming units, CFU), za razliku od broja bakterija u distalnom dijelu debelog crijeva gdje koncentracija mikrobnih stanica može iznositi i do  $10^{12}$  stanica/g sadržaja (slika 1) što je ekvivalentno masi od 1-2 kg (Walker i sur., 2014). Razlog tome je taj što kiselina, žuč i probavni enzimi nepogodno djeluju na bakterije u proksimalnom dijelu probavnog sustava te je smanjena mogućnost njihovog prijanjanja za epitel.

Nadalje, nedavna istraživanja su pokazala da se na temelju mikrobiote ljudi mogu kategorizirati u jedan od tri osnovna enterotipa neovisno o dobi, spolu, geografskom podrijetlu i/ili tjelesnoj masi. Enterotipovi se međusobno razlikuju po sastavu i dominantnoj ulozi pojedinih bakterijskih vrsta i uključuju - *Bacteroides*, *Prevotella* i *Ruminococcus* (Arumugam i sur., 2011). Nedvojbeno, ovakvo kategoriziranje crijevnog mikrobioma u tri jednostavne skupine omogućilo bi bolje razumijevanje različitih reakcija ljudi na prehranu i lijekove, no za sad ovakva podjela ima slabu statističku pozadinu (Knights i sur., 2014) i nije se nastavila koristiti u velikoj mjeri u novijim istraživanjima.

### 2.2.2. Sastav i karakteristike crijevne mikrobiote pretile osobe

Glavne razlike u zastupljenosti bakterijskih rodova, smanjenje bakterijske raznolikosti i promjene u ekspresiji bakterijskih gena, stoga i metaboličkoj funkciji distalnog debelog crijeva, povezane su s brojnim stanjima i bolestima, uključujući i pretilost. Na temelju posljednjih metagenomskih istraživanja, 75% mikrobnih gena povezanih s pretilošću pripada koljenu *Actinobacteria* i 25% *Firmicutes*, dok 42% gena povezanih s mršavošću pripada koljenu *Bacteroidetes* (Turnbaugh i sur, 2009).

Tablica 1. Razlika u sastavu i rasprostranjenosti crijevne mikrobiote zdrave i pretile osobe (prema Chakraborti, 2015)

Mikrobiota zdrave osobe	Mikrobiota pretile osobe
<b>Koljeno <i>Firmicutes</i></b>	Porast bakterija iz koljena <i>Firmicutes</i>
<b>Koljeno <i>Bacteroidetes</i></b>	Smanjena zastupljenost bakterija iz koljena <i>Bacteroidetes</i>
<b>Koljeno <i>Actinobacteria</i></b>	Povišene razine bakterija iz koljena <i>Actinobacteria</i>
<b>Koljeno <i>Verrucomicrobia</i></b>	Smanjen udio bakterija iz koljena <i>Verrucomicrobia</i>
<b>Vrsta <i>Faecalibacterium prausnitzii</i></b>	Smanjena zastupljenost bakterijske vrste <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>

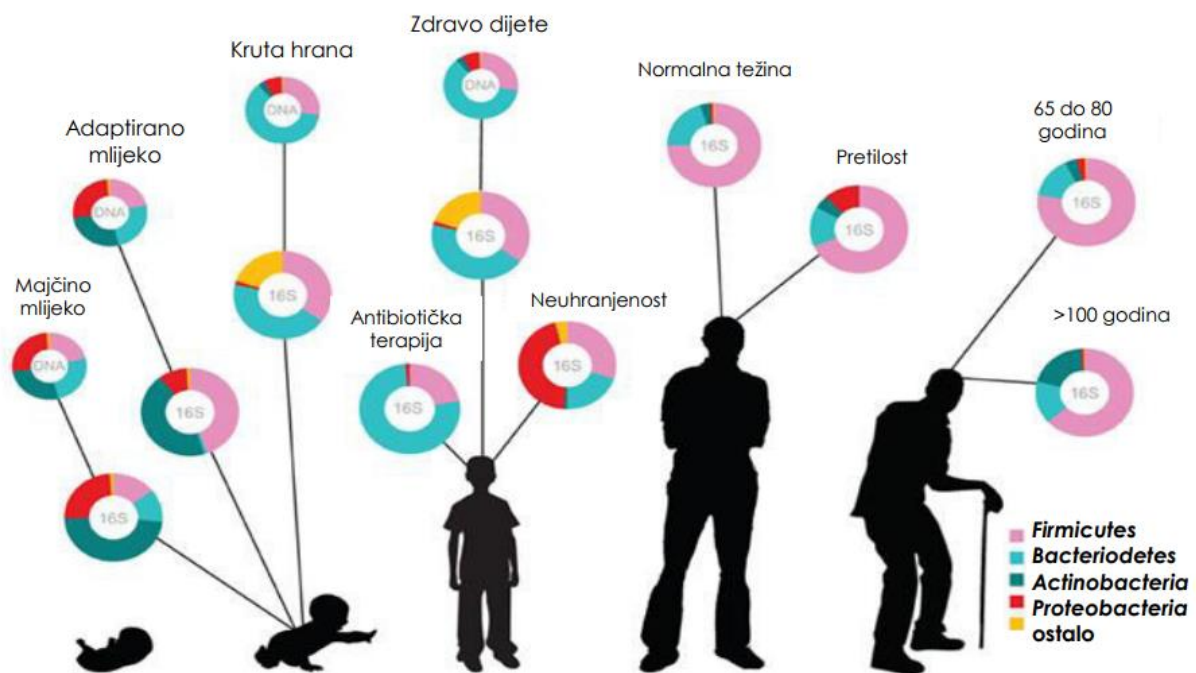
Usporedbe dominantnih koljena bakterija u crijevnoj mikrobioti pretilih i mršavih pojedinaca dale su suprotstavljene rezultate. Iako neka istraživanja rađena na modelima miša i čovjeka pokazuju značajno povećan omjer koljena *Firmicutes* u odnosu na *Bacteroidetes* u mikrobioti pretilih pojedinaca, drugi ne pokazuju promjene u ovom omjeru niti ikakvu dominantnu zastupljenost specifičnog roda. Primjerice, sekvencioniranje 16S rDNA provedeno na genetički pretilim (ob/ob) i mršavim miševima otkrilo je glavne razlike u strukturi mikrobne zajednice za razini koljena (Ley i sur., 2005). Genetički pretili miševi (ob/ob) imali su minimalno 50% redukcije u zastupljenosti koljena *Bacteroidetes* i značajan porast koljena *Firmicutes*. Drugo istraživanje pokazalo je veći postotak *Firmicutes* (71%) i manji postotak *Bacteroidetes* (26%) kod pretilih miševa (ob/ob) nego kod genetičkih heterozigota (ob/+) i miševa divljeg tipa (+/+) unatoč sličnoj konzumaciji hrane i potrošnji energije (Ley i sur., 2006). Alteracije na razini zastupljenosti koljena kod mikrobioma pretilih i mršavih pojedinaca također su pokazane istraživanjima na ljudima. Redukcija broja *Bacteroidetes* (Armougom i sur., 2009; Furet i sur., 2010) i povećanje broja *Actinobacteria* (Turbaugh i sur., 2009) i *Prevotella* (Furet i sur., 2010) primijećene su kod pretilih ispitanika. S druge strane, kada je skupina anoreksičnih pojedinaca uspoređena s mršavim i pretilim pojedincima, zastupljenost *Firmicutes* nije pokazala značajnu korelaciju s pretilošću (Armougom i sur., 2009). Ove filogenetičke razlike mogu proizaći iz brojnih varijabli, uključujući prehranu, rukovanje uzorcima, tehnike sekvencioniranja i alata za analizu podataka.

Zanimljivo je, međutim, da promjene u crijevnoj mikrobioti na razini skupina temeljene na indeksu tjelesne mase (ITM) ne koreliraju uvijek s promjenama na nižoj, definiranoj taksonomskoj razini poput roda (lat. *genus*). Primjerice, redukcija koljena *Bacteroidetes* ne znači da ne može doći do povećanja broja jedinki roda *Bacterioides* unutar te skupine. Sojevi roda *Bacterioides* koji degradiraju biljne polisaharide nađeni su u većem broju kod pretilih odraslih pojedinaca (Schwiertz i sur., 2010), no njihov broj se nije značajno razlikovao kod pretilih i zdrave indijske djece (Balamurugan i sur., 2010). Drugi razgrađivači biljnog polisaharida, u ovom slučaju celuloze, *Ruminococcus* spp, koji spada u koljeno *Firmicutes*, te rod *Bifidobacterium* bili su manje zastupljeni kod pretilih pojedinaca (Schwiertz i sur., 2010). Veći zabilježen broj bakterija roda *Lactobacillus* primijećen je u nekih pretilih pojedinaca (Million i sur., 2011) dok kod indijske pretilih i zdrave djece nije pokazana razlika između skupina (Balamurugan i sur., 2010). Zastupljenost roda *Prevotella*, koji se odlikuje sposobnošću proizvodnje plina vodika (H<sub>2</sub>), nije korelirala s pretilošću kod djece, ali je ipak veći broj jedinki zabilježen u pretilih odraslih osoba (Zhang i sur., 2009). Konačno,

broj bakterija vrste *Faecalibacterium prausnitzii* izmjeren u fecesu bio je veći kod pretilice djece (Balamurugan i sur., 2010).

### 2.2.3. Čimbenici koji utječu na sastav crijevne mikrobiote

Iako se smatra da se sastav crijevne mikrobiote uspostavlja do treće godine života (Yatsunenکو i sur., 2012) te konvergira ka mikrobioti odrasle osobe koja je relativno stabilna i postojana, dosadašnje studije su pokazale velike interindividualne i intraindividualne razlike u sastavu crijevne mikrobiote zdrave odrasle osobe. Naime, crijevnju mikrobiotu se može promatrati kao delikatnu ravnotežu mikroorganizama na koju utječe nekoliko čimbenika - kao što je dob, način prehrane, razina tjelesne aktivnosti, uporaba antibiotika, ali i sam način poroda. Dob je izrazito važan čimbenik koji utječe na sastav crijevne mikrobiote (slika 2) čemu u prilog ide činjenica da fiziološke promjene uzrokovane starenjem ljudskog organizma utječu na sastav crijevne mikrobiote u različitim životnim periodima pojedinca (Lozupone i sur., 2012).



Slika 2. Početni sastav i čimbenici koji utječu na oblikovanje crijevne mikrobiote kroz različite životne stadije čovjeka. Slika daje globalni pregled relativne zastupljenosti sastava glavnih bakterijskih koljena crijevne mikrobiote određenog metagenomskim pristupom (DNA) ili sekvencioniranjem 16S RNA gena (Ottman i sur., 2012)

Vertikalni prijenos mikrobioma iz trudne majke na potomstvo utemeljuje početni sastav crijevne mikrobiote novorođenčeta, s početkom kolonizacije pri porodu ili neposredno prije poroda. Naime, sve veći broj istraživanja upućuje na to da se sastav crijevne mikrobiote počinje uspostavljati i prije samog rođenja, odnosno *in utero* te su brojna istraživanja detektirala bakterije u placenti, pa tako mikrobiom placente većinom čine komenzalne bakterije iz koljena *Firmicutes*, *Tenericutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* i *Fusobacteria* (Hollister i sur. 2014; Jimenez i sur., 2008). Navedene spoznaje su dodatno i definitivno pobile dogmu kako je crijevo čovjeka sterilno prije rođenja te je zaključeno kako mekonij (prva stolica novorođenčeta) nije sterilan već se u njemu nalazi relativno jednostavna i oskudna zajednica mikroorganizama kojom dominiraju rodovi poput *Escherichia-Shigella*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* i *Streptococcus* (Jimenez i sur., 2008). Nadalje, na početni sastav crijevne mikrobiote novorođenčeta najveći utjecaj ima način poroda. Za razliku od crijevne mikrobiote novorođenčadi rođenom vaginalnim putem koja je poglavito kolonizirana bakterijama roda *Lactobacillus*, *Prevotella* i *Sneathia* spp., novorođenčad rođena carskim rezom ima mikrobiotu koja više nalikuje majčinoj kožnoj mikrobioti, a koja se sastoji se od bakterijskih rodova *Staphylococcus*, *Corynebacterium* i *Propionibacterium* (Dominguez i sur., 2011). Ove razlike mogu dovesti do dugotrajnih zdravstvenih posljedica, što je zasad zabilježeno kao 46%-tni porast u riziku od pretilosti u dobi od 7 godina kod djece rođene carskim rezom (Mueller, 2015).

Drugi bitan čimbenik koji utječe na crijevnu mikrobiotu novorođenčeta je – prehrana u postnatalnom periodu. Uvođenje dojenačkih formula ili krute hrane nedugo nakon rođenja remeti kolonizaciju i proliferaciju neonatalne crijevne mikrobiote, za razliku od crijevne mikrobiote novorođenčeta dojenog majčnim mlijekom. Točnije, mikrobiotom majčinog mlijeka dominiraju bakterijski rodovi *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas* i *Bradyrhizobiaceae* dok je prehrana dojenačkim formulama povezana s povećanom prevalencijom bakterijskog soja *C. difficile*, *Bacteroides fragilis* i *E. coli* (Penders i sur., 2005) te smanjenom prevalencijom bakterijskog roda *Bifidobacteria* (Bezirtzoglou i sur., 2011) u mikrobiomu novorođenčeta. Također, brojna istraživanja su pokazala kako je uporaba antibiotika majke intrapartum (u vrijeme poroda) povezana sa smanjenom bakterijskom raznolikošću u mekoniju novorođenčeta i smanjenom udjelu *Lactobacilli* i *Bifidobacteria* u crijevu novorođenčeta (Jauregui i sur., 2004).

Osim učinka prehrane na sastav crijevne mikrobiote (detaljnije u poglavlju 2.3.) drugi neprehrambeni čimbenici koji bi potencijalno mogli imati učinak na njezin sastav u odrasloj

dobi su često bili zanemarivani. Novija istraživanja su pak potvrdila kako tjelesna aktivnost može značajno utjecati na crijevnu mikrobiotu. Naime, istraživanja ukazuju na to da tjelovježba može inicirati promjenu crijevnih mikrobiota u zdravom stanju ili u nepovoljnim okolnostima, koje uključuju zapadnjački način prehrane (Kim i sur., 2011). Kao poveznica s pretilosti, demonstrirano je da tjelovježba kombinirana s prehranom bogatom šećerima i mastima ortogonalno mijenja crijevnu mikrobiotu (Kang i sur., 2014). Evans i sur. također su pokazali promjene u mikrobiomu uslijed isključivo vježbanja, ali i u kombinaciji s prehranom bogatom šećerima i mastima (Evans i sur., 2014). Vježbanje je kod miševa reduciralo razine *Erysipelotrichaceae* i *Turicibacteraceae*, rodove bakterija koje su povezane s pretilošću, regulacijom žučnih kiselina i upalnim procesima u crijevima (Evans i sur., 2014). Promjene crijevnih mikrobiota uslijed vježbanja također su povezane s poboljšanjem metaboličkih parametara, što uključuje redukciju cirkulirajućeg leptina (Queipo-Ortuno i sur., 2013). Detaljni mehanizmi kojima tjelovježba inducira promjenu crijevnih mikrobiota su još uvijek nejasni, no smatra se da mogu uključivati interakcije metabolizma mikroba i domaćina, uključujući ukriženo korištenje metabolita (Cook i sur., 2016). Daljnja istraživanja potrebna su kako bi odredila utječe li tjelovježba zaista na crijevnu mikrobiotu čovjeka uslijed pretilosti i jesu li promjene u metabolizmu i tjelesnoj masi povezane s promjenama u crijevnoj mikrobioti. Kako kod djece, tako i kod odraslih, kao jedan od čimbenika koji drastično utječu na sastav crijevnih mikrobiota pokazala se uporaba antibiotika. Uporaba antibiotika, naime, smanjuje taksonomsku raznolikost i uzrokuje trajne promjene sastava mikrobiota kod velikog broja pojedinaca. Dokazano je da učinak kratkotrajne upotrebe (7 dana) antibiotika širokog spektra može trajati i do 2 godine, pri čemu je većinom smanjena raznolikost koljena *Bacteroidetes*. Nakon prestanka terapije antibioticima i ponovnog uspostavljanja mikrobne zajednice primijećena je smanjena otpornost nanovo koloniziranih mikroorganizama što omogućuje stranim bakterijama da prerastu komensalne i tako uzrokuju trajne promjene u strukturi mikrobiota i potencijalno pridonose razvoju različitih bolesti. Stoga, osim smanjenja bioraznolikosti crijevnih mikrobiota, druga velika briga oko uporabe antibiotika je pojava otpornosti patogenih bakterija na antibiotike (Clemente i sur., 2012; Jandhyala i sur., 2015).

Konačno, kod starijih osoba smanjena je aktivnost mikrobnih reduktaza te je smanjena sposobnost biosinteze vitamina B12, odgovara na stres i imunološkog odgovora. Kako starimo tako se i broj korisnih bakterija u crijevima smanjuje. Udio rodova *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium prausnitzii* i nekoliko pripadnika koljena *Firmicutes* opada, dok se udjeli *E.coli*, pripadnici koljena *Proteobacteria* i roda *Staphylococcus* povećavaju (Hollister i sur., 2014).

#### 2.2.4. Uloga crijevne mikrobiote i utjecaj na razvoj pretilosti

Crijevna mikrobiota ima značajan utjecaj na ekspresiju domaćinskih gena odgovornih za apsorpciju i metabolizam nutrijenata (Hooper i sur., 2001). Primjerice, sterilni miševi podvrgnuti zapadnjačkoj prehrani bili su otporni na indukciju pretilosti putem prehrane i pokazali su povišene razine dijetom induciranog adipoznog faktora (eng. Fasting-Induced Adipose Factor, FIAF), cirkulirajućeg inhibitora lipoprotein lipaze. Paralelno, sterilni miševi kolonizirani mikrobima iz miša divljeg tipa pokazali su supresiju FIAF i veće odlaganje triglicerida u adipoznom tkivu (Yoon i sur., 2000). Dodatna istraživanja potrebna su kako bi se utvrdilo koji mikrobi imaju najveći utjecaj na ekspresiju FIAF i jesu li to mikrobi koji su uobičajeno prisutni ili odsutni u većem broju pretilih pojedinaca. AMP-aktivirana protein kinaza (AMPK) predstavlja dodatni mehanizam kojim mikrobi reguliraju domaćinski metabolizam. Sterilni miševi imaju povišene razine aktivirane AMPK, povećanu oksidaciju mitohondrijskih masnih kiselina, smanjeno skladištenje glikogena i ostaju mršavi neovisno o visokokaloričnoj prehrani (Backhed i sur., 2007).

Nadalje, crijevni mikrobi mogu biti i djelomično odgovorni za reduciran integritet crijevne barijere i sustavnu endotoksemiju uslijed pretilosti. Primjerice, prehrana bogata mastima kod miševa dovela je do indukcije fosforilacije lakog lanca miozina i lokalizacije okludina u citoplazmi intestinalnih epitelnih stanica. Ova promjena u funkciji barijere povezana je s povišenjem razine endotoksina u krvi tijekom hranjenja, ukazujući na to da je narušavanje barijere u crijevima barem djelomično odgovorno za endotoksemiju induciranu prehranom (de La Serre i sur., 2010).

Endotoksemija se također javlja kod pretilih ljudi i može doprinijeti metaboličkim poremećajima. Primjerice, pokazano je da pretili pojedinci otporni na inzulin imaju povišene razine cirkulirajućih lipopolisaharida (LPS) u odnosu na inzulin-osjetljive ispitanike (Cani i sur., 2007). U štakora, endotoksemija inducirana prehranom doprinijela je otpornosti na leptin u vagalnim živcima, što ukazuje na mogući mehanizam metaboličkih poremećaja induciranih endotoksinom (de La Serre i sur., 2010). Unatoč ovim zanimljivim podacima, potrebno je više istraživanja, poglavito na ljudima, koja će odrediti mehanizme endotoksemije i utječe li njena pojava značajno na povišenje adipoznosti.

Ukoliko je mukozna i epitelna barijera crijeva narušena, komenzalni mikrobi mogu djelovati lokalno na temeljni gastrointestinalni imunološki sustav (Cani i sur., 2008). Antigen-prezentirajuće stanice (npr. dendritičke stanice i makrofagi) raspoređene duž crijeva ekspimiraju receptore koji prepoznaju patogene (PPR), uključujući Toll-like receptore (eng.

Toll Like Receptors, TLR) i receptore koji posjeduju nukleotid-vezujuće oligomerizacijske domene tzc. NOD-like receptori (eng. Nod Like Receptors, NLR), koji kontinuirano odgovaraju na antigenske poticaje, uključujući i mikrobe (Carotti i sur., 2015). Uslijed pretilosti, aktivacija intestinalnog imunološkog sustava i upalnih procesa induciranih komenzalnim mikrobima mogu dovesti do povećane adipoznosti i promijenjenog metabolizma. Na primjer, kod miševa divljeg tipa, ekspresija ilealnog TNF- $\alpha$  (eng. Tumor Necrosis Factor, TNF) porasla je značajno u 6. i 16. tjednu prehrane bogate šećerima i mastima i bila je izrazito povezana s porastom tjelesne mase i metaboličkim nepravilnostima, uključujući i povišenu razinu glukoze u krvi (Ding i sur., 2010). Međutim, u sterilnih miševa izloženih istom obliku prehrane, došlo je do slabljenja upalnih procesa u crijevima, porasta masnog tkiva i metaboličkih nepravilnosti. Dobiveni podatci zajedno daju dokaz o važnosti izmjena u crijevnoj mikrobioti uslijed dijabetesa. Upravo narušavanje gastrointestinalne barijere, aktivacija gastrointestinalnog imunološkog sustava i translokacija bakterija rezultiraju izmijenjenim metabolizmom domaćinskog organizma. Međutim, daljnja istraživanja potrebna su za rasvjetljavanje mehanističke podloge ovih pojava s ciljem razumijevanja njihove veze s pretilošću.

Nadalje, metabolička aktivnost crijevne mikrobiote može regulirati ravnotežu energije putem mehanizama koji utječu na potrošnju energije iz hrane ili moduliraju gene odgovorne za skladištenje / potrošnju energije i upalne procese. Naime, kratkolančane masne kiseline (eng. Short-Chain Fatty Acids, SCFA) nastaju fermentacijom kompleksnih polisaharida, koji uključuju vlakna unesena prehranom (poput inulina i pektina) i endogene supstrate (poput mucina) (Nyman, 2002). Priroda fermentacijskog procesa i profil SCFA unutar crijeva ovisi o sastavu crijevne mikrobiote, interakcijama mikroba i domaćina (npr. sastav oligosaharida koji čine mucin) i tipu, odnosno količini potrošnje ugljikohidrata podložnih fermentaciji. Nakon apsorpcije, butirat predstavlja izvor energije za epitelne stanice kolona, dok su propionat i acetat uglavnom supstrati za glukoneogenezu i lipogenezu u crijevima i jetri (De Vadder i sur., 2014; Singh i sur., 2015). Prije samog doticaja s metabolizmom, SCFA mogu intereagirati s receptorima slobodnih masnih kiselina (eng. Free Fatty Acid Receptors, FFAR) smještenima u crijevnom epitelu i brojnim drugim tkivima.

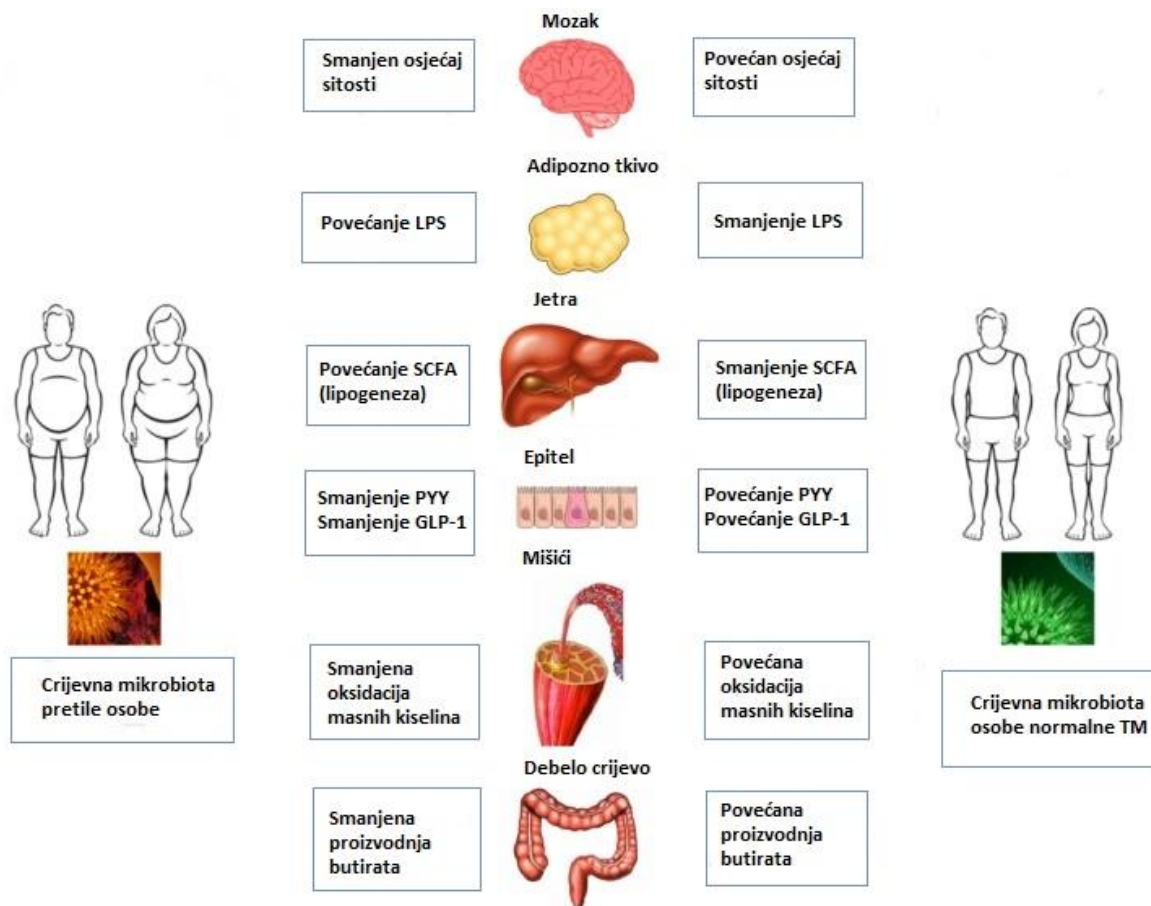
SCFA su dovedene u vezu s pretilosti nakon što su prva istraživanja pokazala da je mikrobna zajednica pretilih miševa s genetičkom predispozicijom obogaćena genima za iskorištavanje energije iz kompleksnih polisaharida biljnog porijekla (Turnbaugh i sur., 2006). Sterilni FFAR3 (-/-) miševi kolonizirani s *Bacterioides theatioamicon* i *Methanobrevibacter smithii* bili su mršaviji u usporedbi s konvencionalno uzgojenim miševima divljeg tipa, što

upućuje na ulogu FFAR3 i crijevnih mikroba u regulaciji domaćinovog iskorištavanja energije (Samuel i sur., 2008). Praćenje molekularne podloge navedenih učinaka dovodi do koraka FFAR3-induciranog otpuštanja peptida YY, hormona dobivenog iz enteroendokrinih stanica koji usporava intestinalni prijenos i doprinosi povećanom iskorištenju kalorija iz hrane (Samuel i sur., 2008). Paralelno, prijenos mikroba iz pretilih miševa u mršave, sterilne miševe rezultirao je povećanom akumulacijom jetrenog triacilglicerola (Singh i sur., 2015), mogući uzrok čega je povišena fermentacija supstrata do SCFA i iskorištenje energije. Kod ljudi, u više od jedne skupine ispitanika pokazano je da je razina SCFA povišena u fecesu pretilih pojedinaca (Schwiertz i sur., 2010).

Unatoč sposobnostima utroška energije, koje mogu imati negativan utjecaj na adipogenezu, SCFA očigledno imaju kompleksnu i pleiotropnu ulogu u razvoju pretilosti. SCFA mogu također inducirati osjećaj sitosti, senzibilizirati stanice na inzulin i reducirati upalne procese u, između ostalih, gušterači, mišićima i adipoznom tkivu. Primjer toga je SCFA-inducirana sekrecija leptina putem FFAR3, koji regulira apetit i metabolizam energije (Zaibi i sur., 2010). Istovremeno, stimulacija FFAR3 receptora u crijevima posreduje u otpuštanju „peptida nalik glukagonu“ (eng. Glucagon-Like Peptide, GLP-1) kako bi pospješila sekreciju inzulina (Tolhurst i sur., 2012), dok signalizacija u neutrofilima suprimira upalu (Maslowski i sur., 2009). Metagenomska studija na ljudima identificirala je bakterije koje proizvode butirat kao negativno povezane s pretilosti i kasnijoj otpornosti na inzulin. Primjerice, Qin i sur. te Karlsson i sur. utvrdili su niži udio butirat-producirajućih bakterija reda *Clostridiales* (uključujući bakterija roda *Roseburia* i vrstu *Faecalibacterium prausnitzii*) u pretilih pojedinaca (Qin i sur., 2012; Karlsson i sur., 2013).

Ovi naizgled konfliktni podaci predstavljaju paradoks u svrstavanju SCFA u „dobre“ ili „loše“ ovisno o patogenezi pretilosti. SCFA ne samo da povećavaju iskorištenje energije i doprinose povećanoj lipogenezi u jetri, već i istovremeno reduciraju upalu, senzibiliziraju tkiva na inzulin i doprinose sitosti. Razlike u ovim saznanjima mogu biti vezane uz pokušaj kategorizacije SCFA u samo jednu skupinu, dok, u stvarnosti, svaki metabolit ima različite metaboličke učinke. Primjerice, acetat je potencijalni agens koji doprinosi pretilosti jer je primarni supstrat lipogeneze, dok su propionat ili butirat manje vjerojatni agensi koji primarno služe kao supstrati u drugim metaboličkim procesima (Chakraborti, 2015). Štoviše, povišenje koncentracije SCFA u fecesu samo po sebi nije dovoljan pokazatelj metabolizma ovih molekula. Buduća istraživanja, stoga, zahtijevaju detaljnije razumijevanje prijenosa, metabolizma i signalizacije SCFA kod pretilosti i ostalih kroničnih bolesti.





Slika 3. Shematski prikaz utjecaja crijevne mikrobiote na pretilost (Parekh i sur., 2014)

### 2.3. UTJECAJ PREHRANE NA CRIJEVNU MIKROBIOTU

Danas se sve više pažnje posvećuje proučavanju odnosa obrasca prehrane i crijevne mikrobiote te učinku prehranbenih intervencija na sastav crijevne mikrobiote. Naime, smatra se kako prehrana ima ključnu ulogu u modulaciji sastava i metaboličkih puteva bitnih za normalno funkcioniranje crijevne mikrobiote te stoga predstavlja važnu terapijsku strategiju u borbi s pretilošću. Pošto je u ovom radu prvenstveno ispitivana uloga prehranbenih vlakana na izmjenu sastava crijevne mikrobiote, upravo najveća pažnja je posvećena važnosti njihove konzumacije u ljudskoj prehrani.

### 2.3.1. Prehrambena vlakna

Dugo se zanemarivao utjecaj prehrambenih vlakana na zdravlje čovjeka. Međutim, potkraj 19. stoljeća njihova uloga u ljudskoj prehrani počela se detaljnije ispitivati, te je 60-ak godina kasnije, poznati irski kirurg Denis Burkitt razvio teoriju kako je nedostatak prehrambenih vlakana (eng. fiber/fibre) u zapadnjačkom načinu prehrane uzrok porasta brojnih kroničnih bolesti, uključujući povišeni rizik za obolijevanje od različitih bolesti crijeva, dijabetesa, dentalnog karijesa, ali i do razvitka pretilosti (Burkitt, 1969). Mogućnost jednostavnog grupiranje ovih bolesti pod jedan zajednički uzročnik bilo je uistinu revolucionarno otkriće, te su sve zasluge vezane uz spoznaju o povoljnom učinku prehrambenih vlakana na zdravlje ljudi pripisane Burkittu koji je postao poznat i pod nazivom 'Fibre Man'.

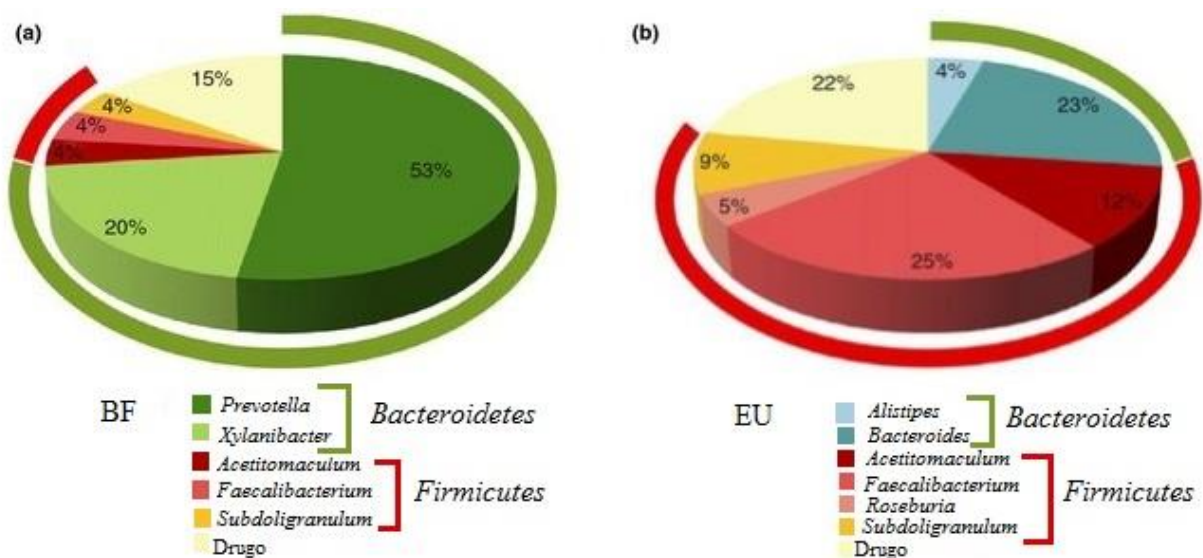
Po definiciji, prehrambena vlakna su uglavnom neprobavljivi poli i oligosaharidi prirodnog ili sintetičkog podrijetla, a građeni su od monosaharida (glukoze, fruktoze, galaktoze i manoze) stupnja polimerizacije od 2 do 20 monosaharidnih jedinica. Postoje dvije vrste prehrambenih vlakana – topiva i netopiva. U prehrambena vlakna ubrajamo i prebiotike - neprobavljive sastojke hrane koji korisno djeluju na domaćina pomoću selektivne stimulacije rasta i/ili aktivnosti jedne ili ograničenog broja bakterijskih vrsta u debelom crijevu te na taj način doprinose poboljšanju zdravlja čovjeka (Gibson i Roberfroid, 1995).

Nadalje, količina i vrsta prehrambenih vlakana variraju od namirnice do namirnice. Cjelovite žitarice se smatraju glavnim izvorom prehrambenih vlakana i čine 50% njihovog ukupnog unosa u zapadnim zemljama (Lambo i sur., 2005). Ostali važni izvori prehrambenih vlakana jesu voće i povrće te razno orašasto voće. Naime, povrćem se unese oko 30-40% prehrambenih vlakana, voćem oko 16% dok je tek oko 3% prehrambenih vlakana porijeklom iz drugih manje značajnih izvora. Za dojenčad i djecu do 2 godine referentni dnevni unos vlakana (eng. Dietary Reference Value, DRV) nije definiran, dok se za odrasle osobe DRV prehrambenih vlakana kreće između 25-30 g, odnosno 10-13 g na svakih unesenih 1000 kcal (Vranešić i Alebić, 2006). Prema institutu za medicinu (eng. Institute of Medicine, IOM) DRV prehrambenih vlakana za žene iznosi 25 g/dan, dok je DRV prehrambenih vlakana za muškarce 38 g/dan (Institute of Medicine, 2001).

Spona između učinka prehrane na crijevnu mikrobiotu i predispozicije za nastanak pretilosti uočena je u vrlo ranoj životnoj dobi, čak i prije početka konzumacije krute hrane. Primjerice, novorođenčad koja je hranjena majčinim mlijekom ima značajno smanjen rizik od razvoja pretilosti kasnije u životu, u usporedbi sa novorođenčadi koja je hranjena

supstituentima majčinog mlijeka poput dojenačkih formula (O'Sullivan i sur, 2015). Iako su egzaktni mehanizmi kojima se ostvaruje ovakav učinak još uvijek nepoznati, smatra se da majčino mlijeko koje sadrži prebiotičke oligosaharide (eng. Human Milk Oligosaccharides, HMO) odnosno šećerne polimere, djeluje povoljno na poticanje rasta specifičnih mikrobnih zajednica, uključujući *Bifidobacterium* spp. (Coppa i sur, 2004). *Bifidobacteria* u crijevu dojenčeta je vrlo bitna jer inhibira rast patogenih mikroorganizama, modulira funkciju mukozne barijere, i potiče imunološki i upalni odgovor u tijelu domaćina te se dojenje stoga može smatrati prvom preporučljivom prehranbenom intervencijom u uspostavi normalne ravnoteže crijevne mikrobiote čovjeka s obzirom da stvara okoliš pogodan za uspostavu normalne crijevne mikrobiote te normalnu tjelesnu masu tijekom života (Parigi i sur, 2015).

Nadalje, učinak prehrane na crijevnu mikrobiotu vidljiv je i na globalnoj razini. Primjerice, prehrana bogata namirnicama biljnog podrijetla koje su bogate vlaknima uočena kod djece iz Burkiné Faso povezana je s povećanom raznolikošću (eng. richness) crijevnog mikrobioma, te povećanim udjelom bakterijskog roda *Prevotella* iz koljena *Bacteroidetes* i smanjenim udjelom bakterijskog koljena *Firmicutes*, u sporedbi s europskom djecom koja su jela hranu manje bogatu vlaknima (De Filippo i sur., 2010). Također, neovisno o dobi, zapadnjačka prehrana temeljena na velikim količinama procesiranih jednostavnih šećera povezana je s disbiozom i epidemijom pretilosti te je povezana sa smanjenom raznolikošću crijevnog mikrobioma (eng. bacterial gene-richness) (Le Chatelier, 2013).



Slika 4. Usporedba zastupljenosti pojedinih bakterijskih vrsta i rodova iz koljena *Bacteroidetes* i *Firmicutes* prisutnih u uzorcima stolice (a) afričke (Burkiné Faso, BF) i (b) europske (EU) djece (prilagođeno prema De Filippo i sur., 2010)

Kratkoročni, ali i dugoročni učinci prehrane odražavaju se na raznolikost i funkcionalnost crijevne mikrobiote (David i sur, 2014; Wu i sur. 2011). Štoviše, nedavno provedeno istraživanje koje podržava ovaj koncept pokazalo je da manjak dostupnosti korisnih neprobavljivih ugljikohidrata crijevnom mikrobiomu, često primijećen u zapadnjačkom načinu prehrane, može dovesti do potencijalno nepovratnog gubitka mikrobijalne raznolikosti kroz generacije (Sonnenburg i sur., 2016).

## 2.4. PREHRAMBENE INTERVENCIJE U REGULACIJI PRETILOSTI

*“Nagle promjene uvijek su opasne.  
Svaka pretjeranost protivna je prirodi.  
Postupnost je sigurna.”*

Hipokrat

Modulacija crijevne mikrobiote predstavlja važan čimbenik u tretiranju pretilosti. Predviđa se da će unapređenje metagenomske analize razotkriti nove detalje vezane uz sastav i funkcionalnost crijevne mikrobiote, a ciljano uništavanje i kolonizacija određenih bakterija postati šire korištena terapija u borbi s pretilosti. Na temelju različitih sastava crijevne mikrobiote, postoji potencijal za razvoj specifičnih biomarkera koji bi identificirali individualni rizik od razvoja pretilosti preko stratifikacije do personaliziranih tretmana. Naime, sastav crijevne mikrobiote može biti moduliran nekolicinom usmjerenih ili neusmjerenih intervencija. Crijevni mikroorganizmi sposobni su "izvući" energiju iz neprobavljene hrane, interferirajući time s ekspresijom gena i mijenjajući tjelesnu masu i adipoznost domaćina (Jumpertz i sur., 2011). Teoretski, ekstrakcija energije unesene hrane može biti regulirana manipulacijom crijevnog mikrobioma nastale uslijed loše prehrane i to korištenjem prebiotika, probiotika ili pak njihove kombinacije tzv. sinbiotika te osim što imaju potencijal izmjene sastava crijevne mikrobiote, imaju potencijal i kontroliranja tjelesne mase domaćina. Probioticima se smatra jedna ih više kultura živih stanica mikroorganizama koje, primijenjene u ljudi ili životinja djeluju korisno na domaćina poboljšavajući svojstva autohtone crijevne mikrobiote domaćina (Havenaar i Huis in't Veld, 1992.) Prebiotici su pak neprobavljivi sastojci hrane koji povoljno utječu na domaćina, selektivno stimulirajući rast i/ili aktivnost jedne ili ograničenog broja bakterija u debelom crijevu (Gibson i Roberfroid, 1995) dok se sinbioticima smatraju prehrambeni proizvodi ili dodaci prehrani koji sadrže kombinaciju probiotika i prebiotika čime se postiže sinergistički učinak u organizmu (Gibson i Roberfroid, 2015).

#### 2.4.1. Probiotici

Probiotici ili živi bakterijski terapeutici (eng. Live Bacterial Therapeutics, LBP) potencijalno pospješuju fiziologiju domaćina uslijed pretilosti. Iako je diskutabilno mogu li permanentno kolonizirati probavni trakt, pokazano je da je tretman živim bakterijskim terapeutima bio učinkovit modulator dinamike crijevne mikrobiote. Mnogi sojevi *Lactobacila* ili *Bifidobacteria* pokazali su se učinkovitima u pospješivanju gubitka tjelesne mase (Walker i sur, 2011; Moreno-Indias i sur., 2014). *Lactobacillus plantarum* dokazano reducira veličinu adipocita i sveukupnu adipoznost kod miševa (Park i sur., 2015), dok *Lactobacillus hamnosus* GG povećava gubitak težine kod žena u kombinaciji s umjerenom restriktivskom dijetom (Sanchez i sur., 2014). Istraživanje provedeno 2015. godine pokazalo je da *Bifidobacterium pseudocatenulatum* reducira upalne procese povezane s pretilosti u miševima s induciranom pretilosti putem prehrane (Moya-Perez, 2015). Konzumacija tradicionalno fermentirane hrane, koja prirodno sadrži veliku količinu „dobrih“ mikroba, također dokazano pospješuje gubitak tjelesne mase i poboljšava metaboličke parametre narušene uslijed bolesti (Kim i sur., 2011).

#### 2.4.2. Prebiotici

Kao što je već spomenuto, prebiotici spadaju u skupinu prehrambenih vlakana te ih definiramo kao neprobavljive komponente koje, nakon što ih metaboliziraju crijevni mikrobi, moduliraju sastav i metaboličku aktivnost mikroorganizama u svrhu ostvarivanja fizioloških „povlastica“ domaćina. Dakle, da bi se neki dodatak prehrani smatrao prebiotikom on mora zadovoljiti osnovni kriterij - biti neprobavljiv, tj. otporan na kiselost želuca i djelovanje probavnih enzima u probavnom traktu. Naime, za razliku od egzogeno unesenih kultura živih mikroorganizama (probiotika), glavna uloga prebiotika jest proliferacija ili drugim riječima selektivno poticanje rasta poželjnih bakterijskih populacija već prisutnih u probavnom traktu, odnosno služe kao supstrat ili hrana već prisutnim bakterijama u probavilu za koje se smatra da pozitivno utječu na zdravlje domaćina. Fermentacijom prebiotičkih supstrata u debelom crijevu nastaju kratkolančane masne kiseline (SCFA) koje među brojnim svojim ulogama sudjeluju i u zaštiti od patogenih bakterija snižavanjem intestinalne pH vrijednosti.

Primjerice, u odraslog čovjeka, prehranom uneseni polisaharidi i otporni škrob povećavaju razinu *Ruminococcus bromii* i *Eubacterium rectale*, dvaju bakterijskih vrsta koji mogu metabolizirati netopive ugljikohidrate do SCFA (DiBaise i sur., 2008). Pozitivna uloga prebiotika u tretiranju pretilosti nije sasvim odgonetnuta, no dodatak inulina (topivog vlakna

podložnog fermentaciji) prehrani pretilih pojedinaca snižava razinu LPS u krvi, i to najvjerojatnije promjenama u količini butirata i butirata-producirajućih bakterija (Lecerf i sur., 2012).

Osim spomenutog inulina – prebiotika dokazane djelotvornosti koji se koristi kao funkcionalni sastojak hrane i spada u skupinu neprobavljivih oligosaharida, velika pažnja je posvećena i utjecaju komercijalnog dekstrina *NUTRIOSE*® na izmjenu sastava crijevne mikrobiote te njegovoj ulozi u tretiranju pretilosti. U ovom radu se koristio pšenični dekstrin u obliku komercijalnog proizvoda *NUTRIOSE*® FB06.

#### 2.4.2.1. *NUTRIOSE*® FB06

*NUTRIOSE*® je komercijalno dostupan dekstrin, glukozni polisaharid koji se proizvodi iz kukuruza, pšenice (*NUTRIOSE*® FB06) ili nekog drugog oblika jestivog škroba. Zagrijavanjem škroba na visokim temperaturama dobiva se mješavina glukoznih polimera s uskim rasponom molekularne mase (u prosjeku od 2600 do 5000 g/mol) i stupnjem polimerizacije  $N=18$ . Tijekom zagrijavanja odvija se hidroliza i repolimerizacija. Uz prisutne glikozidne veze karakteristične za škrob ( $\alpha$ -1,4 i  $\alpha$ -1,6), rekombinacija rezultira vezama koje nisu prisutne u škrobu, uključujući linearne i razgranate veze ( $\beta$ -1,6,  $\alpha$ -1,2;  $\beta$ -1,2,  $\alpha$ -1,3;  $\beta$ -1,3;  $\beta$ -1,4). Takve glikozidne veze nisu podložne razgradnji endogenim glikolitičkim enzimima te se proizvod može klasificirati u topivo prehrambeno vlakno s ukupnim udjelom vlakana od 85%.

Istraživanja koja su uključivala komercijalni proizvod *NUTRIOSE*® pokazala su da se preko 15% unesenog sadržaja razgradi, a 75% fermentira u probavnom traktu. Predložena doza koja ne inducira probavne smetnje iznosi 45 g dnevno, neovisno o duljini izlaganja. Također, pokazano je da unos *NUTRIOSE*® povećava broj *Bacteroides* u fecesu. *Bacteroides* predstavlja rod bakterija unutar koljena *Bacteroidetes*, koji uz koljeno *Firmicutes* predstavlja najzastupljeniji odjeljak bakterija crijevne mikrobiote i čiji se udio mijenja u stanju pretilosti. Bakterije roda *Bacteroides* iskorištavaju energiju iz prehrambenih polisaharida i metaboliziraju iz njih oslobođene šećere. Povišenje bakterijskih i enzimatskih aktivnosti uslijed konzumacije *NUTRIOSE*® rezultira razlaganjem neprobavljivih vlakana u debelom crijevu, inducirajući pritom povoljne učinke fermentacije, ali i iskorištavanje energije u debelom crijevu.

Nadalje, nekoliko kliničkih studija pokazalo je da dekstrin postiže povoljne rezultate poput poboljšanja apsorpcije mikronutrijenata, odgođenog pražnjenja želuca, regulacije razine glukoze u krvi i učinaka smanjenja razine lipida. Guerin-Deremaux i sur. su u istraživanju imali za cilj utvrditi učinkovitost *NUTRIOSE*<sup>®</sup> kao dodatka prehrani tijekom 12 tjedana konzumacije. Pretpostavljeno je da će konzumacija *NUTRIOSE*<sup>®</sup> tijekom 12 tjedana smanjiti tjelesnu masu zbog redukcije osjećaja gladi i unosa energije. Praćeni su parametri tjelesne tjelesna masa, sastav tijela, unos energije i osjet gladi u 120 pretilih muškaraca, kineza u dobi od 20 do 35 godina koji su prema indeksu tjelesne mase (ITM) definirani kao pretili. Pokus je proveden kao dvostruko slijepi, gdje je 60 ispitanika dobivalo pripravak *NUTRIOSE*<sup>®</sup> dok je preostalih 60 (kontrolna skupina) primala jednaku količinu maltodekstrina (GLUCIDEX). Aplikacija aktivne tvari, Ispitanici su *NUTRIOSE*<sup>®</sup>, odnosno GLUCIDEX uzimali u količini od 17 g, otopljeni u 250 mL voćnog soka dva puta dnevno u periodu od 12 tjedana. Svi ispitanici su živjeli i radili u kontroliranim uvjetima 7 dana tjedno za vrijeme trajanja istraživanja. Kriterij za neuključivanje u istraživanje bio je nedavno uzimanje prehrambenih vlakana kao dodatka prehrani, korištenje inzulina, antibiotika ili stanje koje može imati patološki odgovor na suplemente (Chronova bolest, alergija) i slično. Postotak tjelesne masti određivan je metodom bioelektrične impendancije, a ostala ispitivanja uključivala su mjerenje veličine tjela te razgovor s ispitanicima i praćenje njihovog osobnog osjećaja gladi.

Rezultati navedenog istraživanja pokazali su redukciju u vrijednostima svih mjerenih parametara (tjelesna masa, ITM, ukupan udio masnog tkiva, utrošak energije) kod ispitanika koji su uzimali *NUTRIOSE*<sup>®</sup> kao dodatak prehrani. Također, osjećaj gladi bio je osjetno smanjen već nekoliko dana po početku konzumacije suplementa u skupini koja je dobivala *NUTRIOSE*<sup>®</sup>.

Istraživanje je u konačnici pokazalo da dodatak *NUTRIOSE*<sup>®</sup> prehrani dva puta dnevno u vremenskom periodu od 12 tjedana ima pozitivne učinke na smanjenje tjelesne mase, indeksa tjelesne mase, ukupnog udjela masnog tkiva, dnevnog unosa energije i osjećaja gladi u pretilih muškaraca (Guerin-Deremaux i sur. 2011).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. ISPITANIK

U ispitivanju je sudjelovala jedna pretila osoba, definirana prema ITM-u, starosti 34 godine, muškog spola, umjerene tjelesne aktivnosti.

Unaprijed postavljeni kriteriji za selekciju ispitanika su bili sljedeći:

1. Indeks tjelesne mase (ITM) veći od 30
2. Osoba nije uzimala antibiotike u posljednja 3 mjeseca
3. Osoba je tjelesno aktivna (minimalna očekivana tjelesna aktivnost je u prosijeku tri puta tjedno po barem pola sata aktivnog vježbanja)
4. Osoba s izraženom voljom i željom za suradnjom i za napretkom
5. Osoba prakticira tipični zapadnjački način prehrane

Ispitanik je prema unaprijed određenim kriterijima izabran među ispitanicima koji su u svrhu probira popunili online anketni upitnik (Opći upitnik) omogućen za popunjavanje putem usluge *Google Disk*. Sudjelovanje ispitanika u ovom istraživanju bilo je dragovoljno, a samo istraživanje trajalo je u vremenskom periodu od kolovoza do prosinca 2016. god.

### 3.2. METODE RADA

#### 3.2.1. Opći upitnik

Opći upitnik je pripremljen kao kombinacija upitnika projekata Human Microbiome Project (NIH) i MyMicrobes (EMBL) u sklopu projekta "Praćenje biodinamike mješovitih kultura pomoću novorazvijene metode uzimanja otiska prsta". Opći upitnik proveden je kao selekcijski kriterij s ciljem pronalaska jednog ispitanika adekvatnog za uključivanje u trenutno istraživanje kojemu je svrha bila ispitati utjecaj individualizacije prehrane dodatkom prebiotika *NUTRIOSE®* FB06 na izmjenu sastava crijevne mikrobiote, odnosno na gubitak tjelesne mase i ukupnog masnog tkiva pretile osobe. Prikupljanje podataka putem općeg



upitnika je provedeno putem računala uz pomoć usluge *Google disk* tijekom kolovoza 2016. godine te je upitnik podijeljen na društvenim mrežama i stranici Studentskog centra u Zagrebu.

Putem upitnika prikupljani su podaci o čimbenicima za koje se trenutno smatra da su povezani sa sastavom mikrobiote – poput starosti, spola, tjelesne aktivnosti, raznih kroničnih bolesti, korištenja medikamenata i sl. Na osnovu odgovora, a uzimajući u obzir vrijednost ITM-a ispitanika, ocijenjeno je zadovoljava li ispitanik zahtjevima za sudjelovanje u istraživanju. Upitnik je sastavljen od 53 pitanja koja se mogu podijeliti na dio u kojem se prikupljaju opći podaci (12 pitanja), dio kojim se prikupljaju podaci o prehranbenim navikama i apetitu (26 pitanja), dio kojim se prikupljaju podaci o životnim navikama: pušenje (1 pitanje), navike spavanja (3 pitanja), razina tjelesne aktivnosti (2 pitanja), podaci vezani uz način poroda (1 pitanje), podaci o redovitosti stolice (1 pitanje) te podaci o osobnim stavovima o prehrani i vlastitom zdravlju (7 pitanja).

Upitnik je ispunilo ukupno 14 osoba uključujući oba spola. Uzimajući u obzir indeks tjelesne mase (ITM) kao glavnog pokazatelja stupnja uhranjenosti, od ukupnog broja ispitanika njih troje je imalo adekvatnu tjelesnu masu (ITM od 18,5-24,9 kg/m<sup>2</sup>), sedmero ispitanika je imalo prekomjernu tjelesnu masu (ITM od 25-29,9 kg/m<sup>2</sup>) dok je ostatak, ukupno 4 ispitanika bilo pretilo. Naime, četvero ispitanika je zadovoljilo kriterij pretilosti i to pretilosti prvog stupnja (ITM od 30-34,9 kg/m<sup>2</sup>) koji je ujedno bio i glavni selekcijski kriterij pri odabiru ispitanika za trenutno istraživanje. Također, svih četvero pretelih pojedinaca zadovoljili su i sljedeći selekcijski kriterij, odnosno nisu uzimali antibiotike u posljednja 3 mjeseca. Od četvero preostalih ispitanika njih troje je fizički aktivno, dok se jedan ispitanik izrazio kao fizički neaktivan te je izostavljen iz istraživanja. Također, svaki od trojice preostalih ispitanika je imao izraženu volju i želju za suradnjom i za napretkom. Međutim samo jedan od ispitanika je zadovoljio posljednji selekcijski kriterij prakticiranja tipičnog zapadnjačkog načina prehrane (prema odgovorima iz upitnika ispitanik redovito konzumira "fast food" hranu, rijetko doručkuje i konzumira samo 2 obroka dnevno) te je prema tome njegov način prehrane bio presudni kriterij za uključivanje u trenutno istraživanje.

### 3.2.2. Dijetetičke metode

Mjerenje unosa hranjivih tvari najčešće je korišten posredan pokazatelj nutritivnog statusa (Lee, 2010). Dijetetičke metode mjere vrstu i količinu konzumirane hrane, odnosno unos hranjivih i drugih komponenti hrane gdje se informacija o konzumiranju konvertira u količinu

komponente hrane. Najčešće korištena metoda za navedeni postupak jest uporaba tablica sa kemijskim sastavom hrane. Međutim, na točnost prikupljenih podataka osim samog odabira adekvatne dijetetičke metode, utječu i brojni drugi čimbenici. Prije svega to je složenost ponašanja ljudi, zatim dnevne varijacije u unosu hrane, ali i kvaliteta i obim podataka u tablicama s kemijskim sastavom hrane te njihova usklađenost sa sastavom konzumirane hrane (Štalić, 2014).

Naime, postoje brojne dijetetičke metode za ispitivanje potrošnje hrane, no ne i jedna jedinstvena metoda koja bi se smatrala zlatnim standardom i koja bi bila prikladna za sve znanstvene, stručne i kliničke primjene (Štalić, 2014). Najčešće korištene suvremene dijetetičke metode za mjerenje unosa hrane su: 24-satno prisjećanje unosa hrane i pića, metoda bilježenja konzumacije hrane (dnevnik prehrane) te upitnik o učestalosti potrošnje hrane i pića (FFQ). Izbor metode ovisi o svrsi ispitivanja, željenoj preciznosti, materijalnim i kadrovskim mogućnostima, raspoloživom vremenu i očekivanoj suradnji ispitanika.

Odabrane dijetetičke metode u svrhu ovog rada su sljedeće: 24-satno prisjećanje unosa hrane i pića, upitnik o učestalosti konzumacije hrane i pića (semikvantitativni FFQ) te metoda bilježenja konzumacije hrane (dnevnik prehrane) proveden prije (3-dnevni dnevnik prehrane) i tokom prehrambene intervencije (za svih 30 dana trajanja intervencije).

### 3.2.2.1. Upitnik o učestalosti konzumacije hrane i pića (FFQ)

Nakon odabira ispitanika koji je zadovoljio sve selekcijske kriterije, ispitanik je zamoljen da ispuni detaljni upitnik o učestalosti konzumacije hrane i pića (eng. Food Frequency Questionnaire, FFQ), s posebnim naglaskom na hranu bogatu prehrambenim vlaknima koji je sastavljen za potrebe ovog rada. Upitnik je izrađen u elektronskom obliku radi lakšeg popunjavanja ispitaniku, ali i obrade podataka. Referentni period konzumacije koji se procjenjivao upitnikom je mjesec dana. Upitnik se provodio na početku istraživanja, prije bilo kakvih prehrambenih intervencija, a sa ciljem prikupljanja što više informacija o ispitanikovom uobičajenim prehrambenim navikama posebice onih koji se tiču konzumacije prehrambenih vlakana, bitnih u ovom istraživanju. Istovremeno, podaci dobiveni ovim upitnikom bi mogli doprinijeti olakšanju procesa planiranja prehrane i sastavljanja jelovnika (prilog 2) sa svrhom individualizacije prehrane.

### 3.2.2.2. Dnevnik prehrane

Neposredno prije provođenja prehrambene intervencije ispitanik je zamoljen i da vodi 3-dnevni dnevnik prehrane (tablica 2) koji je uključivao 2 radana dana i 1 dan vikenda, kako bi se dobio uvid u prehrambene navike te kako bi se mogli prirediti dnevne jelovnici za period intervencije koja će pratiti navike ispitanika. Prije vođenja dnevnika prehrane ispitanik je dobio detaljnu uputu za praćenje, vaganje i bilježenje unesene hrane i pića. Također, dobio je uputu da tijekom tog perioda pokuša ne mijenjati svoje uobičajene prehrambene navike, kako bi se dobili što realniji podaci.

Također, nakon što je započeta intervencija ispitanik je tijekom svih 30 dana, koliko je trajala prehrambena intervencija, vodio dnevnik prehrane (u Excel dokumentu) uz vaganje, na unaprijed priređenim obrascima, a u svrhu da se dobije uvid o stvarnom praćenju pripremljenih preporučenih jelovnika te stvarnu količinu unesenog prehrambenog vlakna *NUTRIOSE*® FB06. Glavni obroci u danu (ručak i večera) popraćeni su i slikovnim sadržajem (slika 5) te je za svaku izmjenu ili nepridržavanje naputaka iz preporučenog plana prehrane ispitanik u dnevniku prehrane napisao kratko obrazloženje zbog čega je do toga došlo (npr. 4. i 6. dan preskočio je uzimanje prebiotičkog suplementa *NUTRIOSE*® FB06 iz razloga što je osjećao probavne smetnje, koje su poslije 6. dana prestale nakon čega je nesmetano nastavio s konzumacijom preporučene dnevne doze suplementa do kraja intervencije). Također, ispitanik je bilježio točno vrijeme konzumiranja svojih dnevnih obroka. Na ovaj način osim mogućnosti praćenja količine konzumiranih dnevnih obroka, bilo je moguće pratiti i konzistentnost i redovitost konzumacije obroka u određenim vremenskim razmacima za svaki od 30 dana, imajući u vidu preporuke da razmak između dnevnih obroka ne bi trebao biti dulji od 4 sata (Šatalić, 2014).

### 3.2.2.3. 24-satno prisjećanje unosa hrane i pića

24-satno prisjećanje napravljeno je za 1 od dana za koji je ispitanik vodio 3-dnevni dnevnik prehrane, kao kontrola vođenja dnevnika prehrane. Ispitanik nije unaprijed znao kada će se metoda provesti. Ispitanik je količinu namirnica izražavao u gramima ukoliko mu je bila poznata masa konzumirane namirnice, veličinom pakiranja za kupovne namirnice, odnosno uz pomoć kuhinjskog pribora poznatih masa (npr. žilica, čajna žličica, čaša, šalica). Za složena jela elaborirao je cjelokupnu recepturu. 24-satno prisjećanje odrađeno je po principu „*three step*“.

Četvrtak, 2.2.2017							
	Namirnica	Količina	Mj. jedin.	Vrijeme	Piće	Količina	Mj. jedin.
Zajutrak	Jogurt	400	g	08:30 h	Kava bez		
	Voćni musli	1	žlica		mlijeka i	2	šalice
	Lanene sjemenke	1	žlica		šećera		
Doručak	Kiwi	2	kom	12:00 h	Voda	1	L
	Jabuka	1	kom				
	Suplement	14	g				
Ručak	Puretina	300	g	14:00 h	Voda	1	L
	Kiselj kupus	250	g				
	Maslac	10	g				
Užina	Posni sir	5	žlica	16:00 h	Voda	0.5	L
Večera	Pizza	300	g	19:30 h	Zeleni čaj	2	šalice
					s medom		
Kasni ob.	/	/	/	22:30	Pivo	1	L



Slika 5. Primjer jelovnika za jedan dan iz dnevnika prehrane kojeg je ispitanik vodio tijekom svih 30 dana trajanja prehranbene intervencije

### 3.2.3. Antropometrijske metode

Antropometrijska mjerenja zauzimaju središnje mjesto u ocjenjivanju stupnja uhranjenosti pojedinca zbog jednostavnosti, praktičnosti i malih zahtjeva za opremom. Ova mjerenja pružaju informacije o veličini i masi tijela, veličini i proporciji dijelova tijela, koštanom obliku i razvoju mekih tkiva.

Tijekom provođenja ovog istraživanja antropometrijska mjerenja su provedena u tri navrata: prvo mjerenje obavljeno je na početku istraživanja, prilikom samog uključivanja u istraživanje i prije prehranbene intervencije (31.01.2017.), drugo mjerenje napravljeno je na polovici istraživanja (nakon 14 dana od početka intervencije), te je posljednje mjerenje odrađeno po završetku istraživanja.

Ispitaniku je mjerena tjelesna masa i tjelesna visina u laganoj odjeći i bez obuće, na kombiniranoj medicinskoj vagi sa stadiometrom (Seca, Type 710-220, Vogel & Halke GmbH & CO., Germany). Tjelesna masa mjerena je s preciznošću od 0,1 kg, dok je tjelesna visina mjerena s preciznošću od 0,1 cm. Iz dobivenih vrijednosti računski se dobio indeks tjelesne mase (ITM) kako bi se odredilo stanje uhranjenosti ispitanika, prema formuli:

$$\text{ITM} = \frac{\text{tjelesna masa (kg)}}{\text{tjelesna visina (m}^2\text{)}}$$

Udio masnog tkiva (% ukupnog masnog tkiva i stupanj visceralne masnoće), kao i određivanje udjela mišićnog tkiva te vrijednosti bazalnog metabolizma (kcal) rađeno je metodom bioelektrične impedancije (BIA) uz korištenje mjernog uređaja OMRON BF500 (Omrom Healthcare, Vernon Hills, Illionis, USA) (Slika 5).

BIA je najčešće korištena metoda za procjenu sastava tijela, odnosno ukupnog udjela vode u tijelu (eng. Total Body Water, TBW), ukupnog masnog tkiva (eng. Fat Mass, FM) i ukupnog udjela bezmasnog tkiva (eng. Fat Free Mass, FFM). Bioelektrična impedancija provodi se tako da se struja malog napona propušta kroz tijelo te se putem pruženog otpora (razlika u potencijalima) dobivaju rezultati o sastavu tijela.



Slika 6. Uređaj za mjerenje sastava tijela, OMRON BF500.

#### 3.2.4. Modifikacija prehrane suvremenim dijetetičkim metodama

S obzirom da je cilj ovoga rada bio smanjenje ispitanikove tjelesne mase isključivo izmjenom prehrambenih navika, na temelju detaljnih podataka dobivenih putem 3-dnevnog dnevnika prehrane, 24-satnog prisjećanja te upitnika o učestalosti konzumacije hrane i pića (FFQ) bilo je moguće modificirati ispitanikovu prehranu. Cilj je bio osmisliti adekvatan plan

prehrane koji bi imao pozitivan učinak na rast povoljnih crijevnih bakterija, a koje bi u konačnici mogle doprinijeti gubitku tjelesne mase i ukupnog masnog tkiva.

Svi prikupljeni dijetetički podaci obrađivana su uz pomoć nacionalnih prehrambenih tablica (Kaić-Rak i Antonić, 1990) koje su zbog manjkavosti namirnica, nadopunjene podacima iz danskih prehrambenih tablica (DTU, 2009), odnosno američkih (USDA, 2011) kako bi se prikupljeni podaci pretvorili u nutrijente. U konačnici, unos svih praćenih nutrijenata prikazan je kao aritmetička sredina vrijednosti izračunatih za pojedini nutrijent za sva 3 dnevnika prehrane, odnosno kao ukupan prosjek vrijednosti pojedinih nutrijenata za 30 dana vođenja dnevnika prehrane.

Nadalje, cilj osmišljenog plana prehrane nije bila restrikcija broja kalorija, već pomniji odabir namirnica jednakog energetskog, ali nutritivno bogatijeg sastava, s posebnim naglaskom na praćenje količine unosa prehrambenih vlakana. Naime, ključno je razlikovati energetski bogatu od nutritivno bogate hrane. U mnogim slučajevima, 'zdrava hrana' je češće definirana odsustvom 'problematičnih' sastojaka poput masti, šećera i natrija, negoli prisustvom korisnih odnosno hranjivih tvari u pojedinoj namirnici.

#### 3.2.4.1. Planiranje prehrane

Pojam planiranja prehrane podrazumijeva sastavljanje obroka za jedan ili više dana držeći se osnovnih principa planiranja prehrane: kontroliran energetski unos, adekvatnost, uravnoteženost, nutritivnu gustoću, umjerenost i raznolikost (Štalić, 2008), prema dobi i spolu.

Na temelju cjelodnevne energetske potrošnje (eng. Total Daily Energy Expenditure, TDEE), procijenjena je energetska potreba za očuvanje trenutne tjelesne mase i trenutne razine tjelesne aktivnosti ispitanika. Naime, TDEE se procjenjuje putem jednadžbi ovisno o stupnju uhranjenosti, spolu, dobi, tjelesnoj masi i visini i razini tjelesne aktivnosti (Štalić, 2014.). Najzastupljenija jest Harris-Benedictova jednadžba za koju su zaslužni James Arthur Harris i Francis Gano Benedict, još 1919. godine. Stoga, izračunom iz Harris-Benedictove jednadžbe dobiven je podatak kako je ukupno 3068 kcal/dan potrebno da ispitanik zadrži trenutnu tjelesnu masu, dok je vrijednost potrebna za održavanje bazalnog metabolizma dobivena mjerenjem metodom bioelektrične impedancije iznosila 2088 kcal.

U konačnici, ispitanik je dobio 5 isprintanih letaka sa sugeriranim planom prehrane kojeg se trebao pridržavati 30 dana (Prilog 3). Plan je izrađen s posebnom pažnjom na unos

prehrambenih vlakana te je prosječni dnevni unos koji osiguravaju predloženi jelovnici iznosio 26 g, uz energetske unos od 2921 kcal – 2970 kcal, s prosječnim udjelom proteina od 17%, ugljikohidrata 47% te masti 36%. Plan prehrane je osmišljen za 5 dana u tjednu, sa ciljem rotiranja predloženog 5-dnevnog plana prehrane 6 puta u 30 dana. Također, ispitanik je dobio suplemente *NUTRIOSE*® FB06 s detaljnom uputom o količini i načinu konzumacije. Konzumacija prebiotičkog suplementa je predviđena tijekom 30 dana, dva puta dnevno po 7 g, odnosno ukupno 14 g/dan komercijalnog prebiotika s ukupnim udjelom vlakana od 85%. Dakle, uz preporučeni dnevni unos od 26 g prehrambenih vlakana putem prehrane, izvor dodatnih 12 g/dan prehrambenih vlakana je bio suplementacijom prebiotikom *NUTRIOSE*® FB06. Uzimajući u obzir dnevne preporuke za unos vlakana za muškarce starije od 30 godina u iznosu od 38 g, preporučene od strane instituta za medicinu, DRV prehrambenih vlakana kroz individualiziranu prehranu izraženu jelovnicima te kroz suplementaciju prebiotikom *NUTRIOSE*® FB06 je zadovoljena.

Nadalje, ispitaniku je omogućen svakodnevni kontakt sa stručnim osobljem za sve eventualno nastale nedoumice i nejasnoće oko provođenja intervencije, prehrane, vođenja dnevnika i dr. Ispitaniku je savjetovano da kroz 30 dana provođenja novog režima prehrane blago modulira svoje prehrambene navike. Preporučeno je da svoj dan započne konzumacijom cjelovitih žitarica koje sadrže vlakna kako bi već rano ujutro potaknuo probavne procese u organizmu. Naime, poseban naglasak je stavljen na zajutak kao prvi i najvažniji dnevni obrok te je naglašeno kako razmak između dnevnih obroka ne bi trebao biti dulji od 4 sati. Također, preporučeno je i da proizvode od bijelog brašna kao i rafinirane žitarice (kruh, rižu, tjesteninu) zamijeni cjelovitima. Općenito, sugerirano je da se posebna pažnja pri kupnji namirnica obrati na deklaracije, odnosno preporučljivo je odabirati proizvode koji sadrže riječ "cjelovit", bilo da se radi o žitaricama, kruhu ili nekom od ostalih pekarskih proizvoda. Nadalje, preporučeno je grickalice zamjeniti narezanim svježim povrćem, a salatama ili juhama dodati sjemenke. Umjesto konzumacije zaslađenih voćnih napitaka, ispitaniku je savjetovana konzumacija cijelih voćki s obzirom da se velika količina prehrambenih vlakana nalazi u kori voća, a od pića preporučena je konzumacija vode (2-2,5 L) i zelenog te kombucha čaja uz dodatak meda i limuna.

Naime, u ovom istraživanju cilje nije bio do gubitka kilograma doći restrikcijom dnevnog unosa energije (kcal/dan), dopuštena je umjerena konzumacija energetski bogatih, a nutritivno siromašnih namirnica (npr. sladoled, puding, pekarski proizvodi), ali se u isto vrijeme nastojalo upoznati ispitanika i sa nekim nesvakidašnjim namirnicama koje doprinose normalnom funkcioniranju crijevne mikrobiote i imaju probiotički i/ili prebiotički učinak

(npr. tempeh, kombucha čaj, humus) kao i uključiti u prehranu fermentirane proizvode za koje je poznato da također imaju pozitivan učinak na crijevnu mikrobiotu (kiseli kupus, jogurt/kefir/kiselo mlijeko, suhe kobasice). Nadalje, pri odabiru makronutrijenata preporučen je odabir proteina biljnog porijekla (npr. grah, leća), jednostruko i višestruko zasićenih masnih kiselina (npr. maslinovo ulje), polisaharida odnosno složenih ugljikohidrata (npr. odabir kruha sa cjelovitim žitaricama nad običnim kruhom od bijelog brašna), a kao nepoželjni istaknuti su proteini životinjskog porijekla, zasićene i trans masne kiseline te dodani šećeri. Naglašena je i važnost kozumiranja raznolike prehrane, više manjih dnevnih obroka, umjereni unos alkohola (ne više od dva pića dnevno) kao i umjereni unos soli (manje od jedne žličice odnosno 6 g dnevno).

### 3.2.5. Prikupljanje i analiza uzoraka stolice

Da bi se odredio utjecaj intervencije, odnosno suplementacije prehrambenim vlaknom *NUTRIOSE®* FB06 uz minimalnu izmjenu prehrane ispitanika na sastav i zastupljenost mikroorganizama crijevne mikrobiote izuzimani su uzorci fecesa iz kojih je izolirana mikrobna DNA te je sekvencioniran marker gen koji kodira za 16S rRNA kako bi se odredila taksonomska zastupljenost svakog mikroorganizma.

Svaki uzorak fecesa je pohranjen u hladnjaku na  $-80^{\circ}\text{C}$  do postupka izolacije DNA koja je obavljena korištenjem Maxwell 16 Tissue Purification Kit-a. Izoliranoj DNA je određena koncentracija te je poslana na sekvencioniranje. Za sekvencioniranje 16rRNA gena korištena je Illumina MiSeq platforma s tehnologijom sparenih krajeva (eng. pair-end) koja omogućava očitavanje sekvenacija DNA dužine do 600 parova baza. U ovom radu su korištene regije V3 i V4 16S rRNA gena za određivanje taksonomske raznolikosti fekalne mikrobiote. Dobiveni rezultati sekvencioniranja obrađeni su QIIME platformom i prikazani su u ovom radu.

#### 3.2.5.1. Prikupljanje uzoraka stolice

Ispitaniku su dane 3 plastične, sterilne posudice u kojima je trebao prikupiti feces. Od ispitanika su prikupljena 3 uzorka stolice, prvi uzorak prije same intervencije, drugi uzorak 2 tjedna od početka intervencije i treći uzorak po završetku intervencije, nakon čega je uslijedila automatizirana izolacija mikrobnog DNA i sekvencioniranje 16s RNA marker gena. Uzorak



je nakon izuzimanja pohranjen na -20 °C te je zaleđen dopremljen na PBF gdje je pohranjen na -80 °do postupka izolacije DNA.

### 3.2.5.2. Automatizirana izolacija DNA i sekvencioniranje 16s RNA marker gena

Izolacija DNA iz početnih uzoraka fecesa provedena je na Maxwell uređaju prema uputama proizvođača. Za izolaciju DNA iz uzoraka fecesa korišten je Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kit. U jažicu za dodavanje uzoraka kazete Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kita-a dodano je 0,5 g fecesa. Postupak izolacije DNA se odvijao prema uputama proizvođača za kit. Na kraju procesa izolirana i pročišćena DNA suspendirana je u eluacijskom puferu. U jednom radnom ciklusu moguće je istovremeno obraditi 16 uzoraka.

Sekvencioniranje DNA izvršeno je kao vanjska usluga u Molecular Research Lab, Teksas, SAD. Korištena je metoda sekvencioniranja sparenih krajeva (pair-end sequencing) na Illumina MiSeq uređaju. Korištene su početnice 341F-806R za umnažanje V3 i V4 regija gena koji kodira za 16S rRNA korištenjem polimerazne lančane reakcije (PCR) u 30 ciklusa. Nakon umnažanja fragmenta gena PCR produkti su provjereni na 2%-om agaroznom gelu te su pročišćeni korištenjem kalibriranih Ampure XP kuglica. Pročišćeni PCR produkti su korišteni za izradu DNA knjižnica upotrebom Illumina TruSeq DNA library protokola te zatim sekvencionirani Illumina MiSeq platformom. Dobiveni sirovi podaci su spojeni u cjelovite sljedove, pročišćeni i filtrirani na osnovu kvalitete sekvence i obrađeni u programskom paketu QIIME u sprezi s taksonomskom bazom SILVA.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Crijevna mikrobiota ima važnu ulogu u razvitku pretilosti. Sastav crijevne mikrobiote, osim što se oko 90% razlikuje interindividualno, podložan je i vrlo rapidnim promjenama unutar samog pojedinca (intradividualno), u različitim točkama vremena i pod utjecajem različitih intrinzičnih ili ekstrinzičnih čimbenika. U ovom radu praćen je odgovor prehrane kao ključnog ekstrinzičnog čimbenika na izmjenu sastava crijevne mikrobiote pretilih osoba i to na temelju tri uzorka fecesa tijekom 30 dana trajanja prehranbene intervencije.

U istraživanju je sudjelovao jedan pretili ispitanik koji je zadovoljio selekcijske kriterije. Proveden je opći upitnik, neposredno prije početka istraživanja, u svrhu probira, ali i kako bi se prikupili podaci ispitanika o prehranbenim i životnim navikama, odnosno tipu prehrane i učestalosti konzumacije određenih skupina namirnica, životnim navikama i sl. Po utvrđivanju prikladnosti ispitanika za uključivanje u istraživanje, ispitanik je detaljno upućen u cijeli protokol istraživanja te je izrazio zainteresiranost za sudjelovanje i potpisao sve potrebne pristanke. Na samom početku ispitanik je ispunio detaljni FFQ te je vodio 3-dnevni dnevnik prehrane kako bi se dobio bolji uvid u njegovu prehranu te kako bi mu se mogli prirediti ogledni primjeri jelovnika uz adekvatne korekcije njegovih. Prilikom početka intervencijskog dijela istraživanja ispitaniku je uzet uzorak fecesa te su mu izmjerene tjelesna masa i visina te udio masnog i mišićnog tkiva. Ispitaniku je osiguran dodatak prehrani s detaljnom uputom za konzumaciju; uz to su mu dani primjeri jelovnika (Prilog 2) te su mu još jednom dane detaljne upute za vođenje dnevnika prehrane. Ispitaniku su uzorkovana još dva uzorka fecesa i to 2 tjedna nakon početka intervencije, te po završetku 30-odneve prehranbene intervencije. Istovremeno, u dane uzorkovanja fecesa određivana su i sva antropometrijska mjerenja. Sljedeći korak bila je izolacija bakterijskog DNA te sekvencioniranje uzoraka Illumina MiSeq metodom u MR DNA (USA).

Cilj ovog ispitivanja, stoga, bilo je adekvatnim promjenama prehranbenih navika i bez uvođenja kalorijske restrikcije testirati hipotezu da suplementacija prebiotikom *NUTRIOSE*® FB06 dovodi do gubitka tjelesne mase i ukupnog masnog tkiva tako da utječe na sastav i zastupljenost crijevne mikrobiote. Sastav crijevne mikrobiote ispitanik je na taksonomskoj razini koljena i roda.

#### 4.1. Rezultati upitnika o učestalosti konzumacije hrane i pića (FFQ)

Podaci dobiveni putem FFQ-a sugeriraju kako ispitanik glavninu svog ukupnog dnevnog unosa prehrambenih vlakana ostvaruje kroz unos povrća, dok je odmah iza povrća sljedeći glavni izvor prehrambenih vlakana u prehrani ispitanika voće. Ispitanik puno češće konzumira bijeli kruh i rižu kao i običnu tjesteninu koji posjeduju puno niže udjele prehrambenih vlakana od integralnih varijanti istih (npr. 100 g bijelog kruha sadrži 3,9 g vlakana, dok 100 g integralnog kruha sadrži 7,8 g, odnosno duplo veću količinu).

Općenito, kroz podatke dobivene FFQ-em može se zaključiti kako ispitanik preferira i češće konzumira namirnice animalnog nego namirnicama biljnog podrijetla. Također, ispitanik konzumira kavu 4-5 puta dnevno, pivo i/ili vino 2-3 puta dnevno te žestoka i gazirana pića 3-4 puta tjedno. Rezultatima prikupljenim iz FFQ-a dobiveni su podaci koji su nužni za planiranje prehrane i sastavljanje jelovnika

#### 4.2. Rezultati 3-dnevnog dnevnika prehrane

Ispitanik u svojoj uobičajenoj prehrani konzumira samo 2 obroka dnevno, što je jasno vidljivo iz tablice 2. Te redovito preskače doručak odnosno zajutak, umjesto kojeg konzumira samo 2 šalice espresso kave bez dodanog mlijeka ili šećera. Prvi dnevni obrok mu je poslijepodne, obično oko 13 sati, a drugi oko 20 sati, oba od kojih su visokoenergetska što je tipičan primjer zapadnjačkog načina prehrane. Naime, ispitanik je i sam naglasio kako redovito konzumira gotovu hranu, izvan vlastitog doma prvenstveno radi manjka vremena i manjka organiziranosti (podaci dobiveni iz općeg upitnika), što se jasno vidi i iz njegovog 3-dnevnog dnevnika prehrane. Ispitanikova prehrana je vrlo siromašna voćem i povrćem, i općenito namirnicama koje doprinose normalnom funkcioniranju crijevne mikrobiote uključujući i prehrambena vlakna.

Nadalje, ispitanik se vrlo jasno izražavao prilikom opisa namirnica za vrijeme vođenja dnevnika prehrane te je na temelju opisa bilo moguće dobiti informacije o načinu pripreme hrane (npr. pire/pečeni krumpir), količini konzumirane hrane (npr. tanjur i/ili g) i sl. Znakom \*\* je označena „punjena palačinka“, odnosno nedovoljno jasno opisana namirnica iz drugoga dana. Naime, tako generalnim opisom nije moguće ustvrditi niti točan način pripreme namirnice (npr. punjena palačinka može biti i pohana i pečena) niti sadržaj punjenja (npr. slatko/slano). U konačnici, ovakav naizgled nebitan podatak stvara velike poteškoće stručnoj osobi prilikom obrade podataka u tablicama sa kemijskim sastavom hrane. No, kako se ovdje

radilo o individualnom pristupu, neposrednim kontaktom s ispitanikom došlo se do potrebnih informacija o detaljima konzumirane namirnice.

Tablica 2. 3-dnevni dnevnik prehrane

	Vrsta hrane	Vrijeme	Količina
1. dan  Utorak (17.01.2017.)	Kava (espresso), bez dodanog mlijeka i šećera	7:00 h	2 šalice (kratka kava)
	Pohana piletina Pire krumpir Bijeli kruh Voda*	13:00 h	3 komada (300 g) ½ tanjura (150 g) 2 kriške (60 g) 1 L
	Pizza sa šunkom i sirom Krafna od marmelade Pivo	20:00 h	1 velika pizza (500 g) 1 krafna (60 g) 1 L
2. dan  Srijeda (18.01.2017.)	Kava (espresso), bez dodanog mlijeka i šećera	7:00 h	2 šalice (kratka kava)
	Špageti Bolognese Bijeli kruh	13:30 h	2 tanjura (400 g) 2 kriške (60 g)
	Kebab (sendvič) Punjena palačinka**	20:00 h	1 veliki sendvič (300 g) 1 palačinka (200 g)
3. dan  Subota (21.01.2017.)	Kava (espresso), bez dodanog mlijeka i šećera	7:00 h	2 šalice (kratka kava)
	Ćevapi u lepinji s kajmakom Pomfrit Pivo	13:00	1 velika porcija (200 g) 1 velika porcija (150 g) 1 L
	Zagrebački odrezak Pečeni krumpir Crno vino	20:30 h	2 komada (200 g) 1 velika porcija (150 g) 0,7 L

\*Ispitanik je svakodnevno konzumirao 2-3 L vode

\*\* Nedovoljno detaljno opisana namirnica

Tablica 3. Pregled ukupnog dnevnog unosa energije, unosa makronutrijenata i ukupnog unosa prehrambenih vlakana prema dnevniku prehrane kojeg je ispitanik vodio za 3 dana u tjednu (2 radna dana, i jedan dan vikenda)

	Energija (kcal)	Proteini (%)	Ugljikohidrati (%)	Masti (%)	Prehrambena vlakna (g)
1. dan	3034,7	19,3	42,3	38,4	23,5
2. dan	2991,3	18,4	48,7	32,9	21,4
3. dan	2931,3	21,3	43,7	35,0	22,1
PROSJEK	2985,6	19,6	44,9	35,4	22,3

Obradom podataka iz 3-dnevnog dnevnika prehrane dobiven je prosjek dnevnog energetskog unosa od 2985,6 kcal, sa najvećim dnevnim unosom ugljikohidrata od 44,9 %, zatim masti 35,4 % i proteina 19,6 %. Prosjek dnevnog unosa prehrambenih vlakana iznosio je 22,3 g, što je manje od DRV.

#### 4.3. Rezultati 24-satnog prisjećanja unosa hrane i pića

Za vrijeme trajanja trećeg dana 3-dnevnog dnevnika prehrane, sa ispitanikom je zbog nemogućnosti intervjua uživo, 24-satno prisjećanje o unosu hrane i pića konzumiranih prethodnoga dana provedeno telefonskim putem i to prema metodi „*three step*“ u trajanju od približno 20 min. Naime, dijetetička metoda 24-satnog prisjećanja je vrlo koristan alat koji služi kao kontrola vođenja dnevnika prehrane, s obzirom da prilikom vođenja dnevnika prehrane može doći do podcjenjivanje unosa energije i to u iznosu od oko 15% (Poslusna i sur., 2009). Upravo uporaba „*three step*“ metode može doprinijeti smanjenju podcjenjivanja unosa hrane na način da se tzv. višestrukim prijelazom nastoje ublažiti nastale pogreške.

Stoga, za vrijeme provedbe telefonskog intervjua od ispitanika je u prvom koraku zatraženo da brzo navede listu konzumirane hrane za ispitivani dan. U drugom koraku od ispitanika je zatraženo da konzumiranu hranu detaljnije opiše (npr. dodavanje šećera i mlijeka u kavu, rafinirana ili integralna riža, bijeli ili integralni kruh, dosoljavanje hrane itd.). Naposljetku, u trećem koraku koji služi za provjeru kako bi se uključila eventualno preskočena epizoda hranjenja (npr. manji međuobroci u obliku voćke ili jogurta) od ispitanika je zatraženo da definira veličinu konzumirane porcije opisivanjem pomoću poznatog

kuhinjskog posuđa (npr. žlica, žličica, čaša, šalica, tanjur) odnosno da navede broj komada, kriški, pakiranja i sl.

Rezultati 24-satnog prisjećanja su potvrdili visoku pouzdanost informacija dobivenih putem 3-dnevnog dnevnika prehrane. Također, 24-satnim prisjećanjem je bilo moguće utvrditi detaljne informacije o prethodno nedovoljno detaljnoj namirnici iz drugog dana 3-dnevnog dnevnika prehrane označenu sa \*\* (tablica 2). Naime, kroz navedeni „three step“ proces ispitanik je elaborirao da je konzumirana namirnica pripravljena metodom pečenja, te punjena svježim slanim sirom, što je vrlo bitan podatak pri obradi podataka u prehranbenim tablicama.

#### 4.4. Rezultati 30-dnevnog dnevnika prehrane

Ispitanik je vodio dnevnik prehrane tijekom svih 30 dana trajanja prehranbene intervencije. Iz podataka dobivenih iz 30-dnevnog dnevnika prehrane uočeno je da je ispitanik od svih 30 dana, samo 2 dana preskočio konzumaciju preporučenog prebiotičkog suplementa *NUTRIOSE*® FB06 te je ispitanik kao uzrok tomu naveo probavne tegobe. U prosjeku kroz svih 30 dana dnevni energetske unos je iznosio 2582,8 kcal te je omjer makronutrijenata iznosio: proteini 18,3 %, ugljikohidrati 46,5 % i masti 34,2 % (tablica 4). Unos prehranbenih vlakana kroz prehranu je znatno povećan tijekom trajanja intervencije, u odnosu na ispitanikovu uobičajenu prehranu (na temelju podataka iz 3-dnevnog dnevnika prehrane) te je zabilježeno redovito (28/30 dana, dakle 93%) konzumiranje preporučenog prebiotičkog suplementa *NUTRIOSE*® FB06.

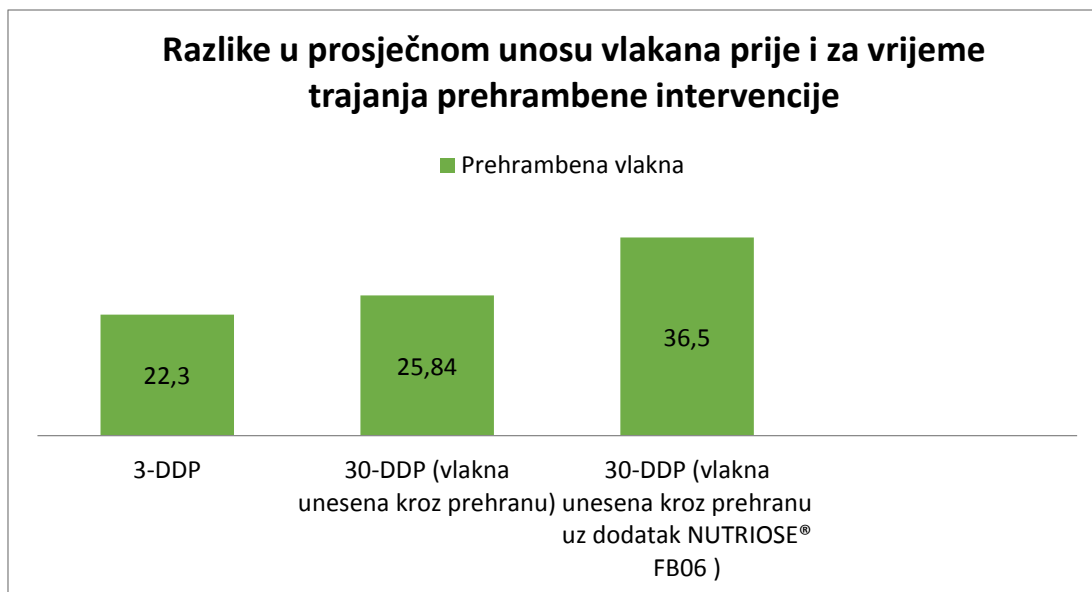
Tablica 4. Prosjek ukupnog dnevnog unosa energije, makronutrijenata i prehranbenih vlakana za 3 vremenska intervala u trajanju od 10 dana.

	Energija (kcal)	Proteini (%)	Ugljikohidrati (%)	Masti (%)	Prehranbena vlakna (g)	
					Unos kroz prehranu	Suplementacija <i>NUTRIOSE</i> ®
1.-10. dan	2623,5	21,1	40,8	36,7	25,0	9,6 g
11.-20. dan	2900,8	18,5	50,3	31,1	25,8	12 g
21.-30. dan	2224,2	15,2	48,5	34,7	26,1	12 g
PROSJEK	2582,8	18,3	46,5	34,2	25,6	11,2 g

Također, ispitanik je pokazao dosljednost u redovitom konzumiranju više dnevnih obroka (5-6 obroka dnevno), što je u svojoj uobičajenoj prehrani prije intervencije redovito zanemarivo. Umjesto preskakanja jutarnjeg obroka, ispitanik je tijekom prehrambene intervencije redovito konzumirao 2 manja obroka prije podne. Zajuttrak (oko 7 sati) je uglavnom uključivao konzumaciju oko ½ šalice žitarica sa suhim voćem i orašastim plodovima (Musli) i 400 g jogurta uz dodatak lanenih ili chia sjemenki, dok je za doručak redovito konzumirao po dvije voćke (banana, jabuka, naranča ili kivi). Ručao je uglavnom između 13 i 15 sati svakoga dana te je redovito konzumirao juhe ili salate kao dodatak glavnom jelu. Za glavno jelo je uglavnom odabirao namirnice mesnog podrijetla (npr. mješano meso, pljeskavice, ćevapi, buncek, bečki odrezak), zatim ribu (brudet, orada, crni rižoto od sipa), tjesteninu. Večerao je uglavnom između 19 i 21 sat, i to uglavnom gotova jela (kebab, pizza, punjene palačinke), popraćena alkoholnim napitkom (vino ili pivo). Za kasni obrok (oko 22 sata) odabirao je uglavnom zeleni ili kombucha čaj.

Nadalje, uspoređujući 3-dnevni dnevnik prehrane prije intervencije i 30-dnevni dnevnik prehrane za vrijeme trajanja prehrambene intervencije uočeno je da je ispitanik i dalje nastavio konzumirati slične namirnice, poglavito gotova jela (pizza, kebab, ćevapi), ali je uveo i nove namirnice (jogurt, žitarice, razne juhe i salate, više voća i povrća i sl.). Općenito, od namirnica biljnog podrijetla je najviše konzumirao zelenu salatu, kiseli kupus, grah, banane, jabuke, naranče, kivi.

Naime, na temelju podataka prikupljenih iz 3-dnevnog dnevnika prehrane vođenog prije prehrambene intervencije i 30-dnevnog dnevnika prehrane za vrijeme trajanja prehrambene intervencije, razlika u prosječnom dnevnom unosu prehrambenih vlakana je očigledna (slika 7). Naime, najniže procijenjene vrijednosti prosječnog unosa prehrambenih vlakana se odnose na ispitanikovu prehranu prije uvođenja prehrambene intervencije, odnosno prije individualizacije prehrane. Kada uspoređujemo prosječan dnevni unos prehrambenih vlakana prije i za vrijeme trajanja prehrambene intervencije dodatkom *NUTRIOSE*® FB06, unos prehrambenih vlakana je značajno veći za vrijeme trajanja intervencije, što i nije za čuditi se s obzirom da je samo suplementacijom već u prehranu uneseno 12 g prehrambenih vlakana. Međutim, procijenjeni prosječni unos prehrambenih vlakana isključivo kroz prehranu (bez dodatka *NUTRIOSE*® FB06) za vrijeme trajanja intervencije i dalje je veći nego prije intervencije što sugerira kako su smjernice predložene jelovnicima prehrane mogle doprinijeti ispitanikovom pomnijem odabiru namirnica



Slika 7. Usporedba prosječnog dnevnog unosa prehrambenih vlakana prije i za vrijeme trajanja prehrambene intervencije dobivenog putem 3-DDP (3-dnevnog dnevnika prehrane) i 30-DDP (30-dnevnog dnevnika prehrane)

#### 4.5. Rezultati antropometrijskih mjerenja i sastava tijela na temelju bioelektrične impedancije

Tablica 5. Rezultati antropometrijskih mjerenja.

DATUM MJERENJA	31.01.2017	22.02.2017.	08.03.2017.
TJELESNA VISINA	178 cm	178 cm	178 cm
TJELESNA MASA	104,4 kg	100,4 kg	99,4 kg
ITM	32,95 kg/m <sup>2</sup>	31,7 kg/m <sup>2</sup>	31,4 kg/m <sup>2</sup>
UDIO MIŠIĆNOG TKIVA	32,8 %	33%	34,9%
UDIO MASNOSTI	31,1%	30,6%	27,3%
UDIO VISCERALNOG MASNOSTI	15	14	13
BAZALNI METABOLIZAM	2088 kcal	2024 kcal	2014 kcal

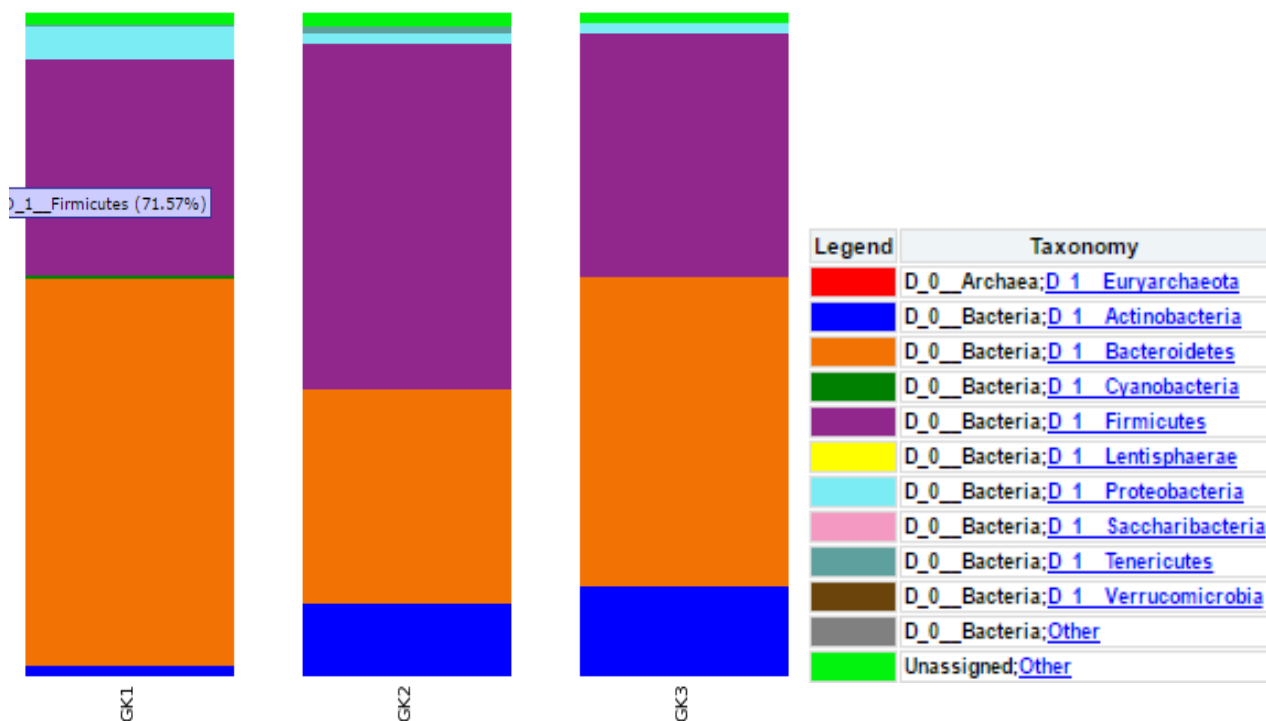
U usporedbi sa sličnim istraživanjem koje su 2011. godine proveli Guerin-Dermaux i sur. kada su ispitali učinak prebiotičkog suplementa *NUTRIOSE*® na smanjenje tjelesne mase i ukupnog masnog tkiva, trenutno provedeno ispitivanje pokazalo je slične rezultate. Naime, antropometrijski parametri u ovom ispitivanju su pokazali smanjenje tjelesne mase za 4,8%



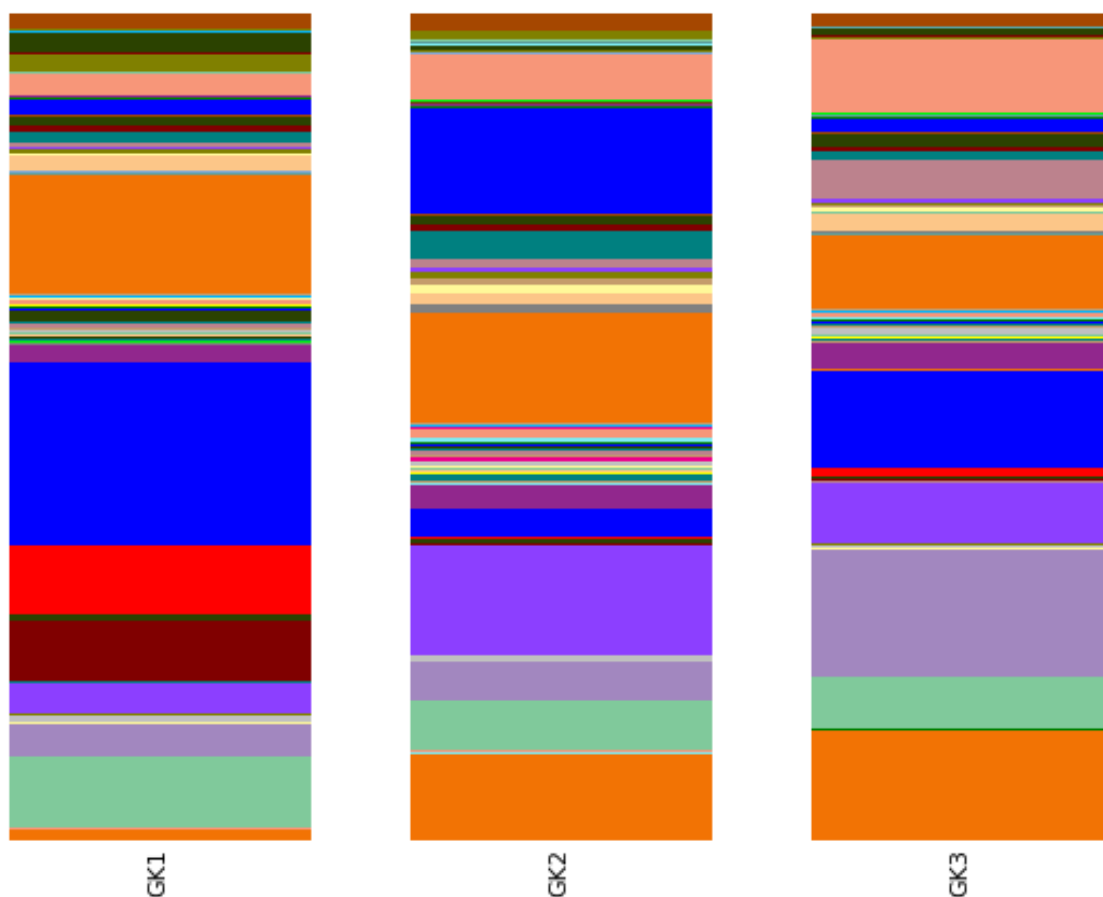
kao i značajno smanjenje ukupnog masnog tkiva (12,2%) te smanjenje stupnja visceralne masti (sa 15 na 13) ispitanika.

#### 4.6. Rezultati sekvencioniranja crijevnog mikrobioma

Na nivou koljena (slika 8) zamjetan je rast udjela koljena *Actinobacteria* tijekom razdoblja na kojem je subjekt pratio prehrambene preporuke i bio suplementiran prebiotičkim vlaknom *NUTRIOSE®* FB06. U početna dva tjedna prehrambene intervencije koljeno *Actinobacteria* je poraslo s početne zastupljenosti od 1,4% na 10,8% da bi nakon mjesec dana postiglo zastupljenost od 13,5%. Koljeno *Bacteroidetes* je s početnih 58,5% zastupljenosti palo nakon 2 tjedna na 32,03% i u četvrtom tjednu poraslo na 46,5%. Zastupljenost koljena *Firmicutes* je u drugom tjednu porasla na 52,2% s početnih 32,5% da bi se nakon mjesec dana vratila na 36,7%. Zastupljenost potencijalno upalnog koljena *Proteobacteria* (Verdam i sur., 2013) je pala s početnih 4,9% na početku na 1,5% nakon dva tjedna prehrambene intervencije i ostala je na toj razini do kraja. Na nivou koljena manje od 2% sekvencija nema dodijeljenu taksonomiju.



Slika 8. Sastav crijevne mikrobiote ispitanika na nivou koljena. Uzorak GK1 odgovara sastavu prije intervencije, uzorak GK2 nakon dva tjedna intervencije, a uzorak GK3 nakon 30 dana intervencije.



Slika 9. Sastav crijevne mikrobiote ispitanika na nivou roda. Uzorak GK1 odgovara sastavu prije intervencije, uzorak GK2 nakon dva tjedna intervencije, a uzorak GK3 nakon 30 dana intervencije.

Nadalje, promatrajući sastav crijevne mikrobiote na nivou rodu (slika 9) u početnom uzorku od pet najzastupljenijih rodova - *Prevotella 9*, *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Prevotella 2* i *Alloprevotella* - koji čine preko 60% ukupno prisutnih bakterijskih rodova samo *Prevotella 9*, *Faecalibacterium*, *Bacteroides* zadržavaju zastupljenost veću od 5% tijekom prehrambene intervencije. U finalnom uzorku pojedinačno najzastupljeniji bakterijski rod je nekultivirana bakterija iz *Bacteroidales* S24-7 grupe za koju nije moguće odrediti djelovanje na domaćina. Sljedeći najzastupljeniji bakterijski rod je *Bifidobacterium* koji je povećao zastupljenost deseterostruko tijekom terapije na 13,3% i za kojeg se smatra da spada u tzv. korisne bakterije koje pozitivno utječu na zdravlje domaćina. Zastupljenost roda *Prevotella 9* je smanjena s 22,2% na 12%, ali još uvijek spada među najzastupljenije rodove. *Prevotella* je bakterijski rod čija je zastupljenost povezana s tipom prehrane i zastupljenija je u ljudi koji

imaju povećan unos ugljikohidrata. Zastupljenost roda *Faecalibacterium* je prehrambenom intervencijom smanjena s 14,4% na 9% nakon mjesec dana, međutim još je veća nego u normalnoj zdravoj populaciji gdje je njegova zastupljenost oko 5%. *Faecalibacterium* se smatra pozitivno utječe na zdravlje domaćina utjecajem na imunološki sustav i njegova mala zastupljenost, odnosno nedostatak, povezan je sa Chronovom bolesti,+, pretilošću, astmom i depresivnim poremećajima. Rodovi sa zastupljenošću većom od 5% nakon intervencije su još *Dialister*, *Parabacteroides* i *Bacteroides*. Njihova se zastupljenost intervencijom nije značajnije promijenila. Uloga rodova *Dialister* i *Parabacteroides* u ljudskom probavnom sustavu još nije poznata dok se za rod *Bacteroides* smatra da je jedan od glavnih proizvođača energije fermentacijom širokog raspona šećernih derivata iz biljnih izvora, te je također povezan s razvojem pretilosti u ljudi.

#### 4.5.1. Beta raznolikost crijevne mikrobiote

Jedna od mjera kojom možemo opisati sličnost mikrobiote između različitih uzoraka ili vremenskih točaka je beta raznolikost. Ona nam daje mjeru u kojoj se pojedini uzorci međusobno razlikuju, a prikazuje se točkama u trodimenzionalom koordinatnom sustavu. Svaka točka predstavlja jedan uzorak, a udaljenost točaka je obrnuto proporcionalna raznolikosti uzoraka.



Slika 10. Beta raznolikost uzoraka fekalne mikrobiote ispitanika prikazana težinskom UniFrac metrikom

Na primjeru prikazane beta raznolikosti vidljivo je da je u prva dva tjedana suplementacije prebiotikom (GK2) došlo do značajne razlike u sastavu i zastupljenosti mikroorganizama. Nastavkom intervencije prebiotikom (GK3) mikrobiota se i dalje mijenja, međutim u manjem obimu nego početkom intervencije.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Antropometrijski parametri su pokazali smanjenje tjelesne mase za 4,8%
2. U toku intervencije došlo je do značajnog smanjenja udjela ukupnog masnog tkiva ispitanika u iznosu od 12,2% i smanjivanja stupnja visceralne masnoće s 15 na 13
3. Analiza beta raznolikosti fekalne mikrobiote pokazuje značajne promjene u sastavu i zastupljenosti mikroorganizama vidljive tokom cijelog trajanja intervencije
4. U sastavu crijevne mikrobiote zamjetan je značajan porast korisnog bakterijskog roda *Bifidobacterium* koji se deseterostruko povisio tijekom prehrambene intervencije
5. Dodatna istraživanja su nužna za određivanje prebiotičkog efekta pšeničnog dekstrina *NUTRIOSE®* FB06 i djelotvorne koncentracije

## 6. LITERATURA

- Albuquerque, D., Stice, E., Rodriguez-Lopez, R., Manco, L., Nobrega, C. (2015) Current review of genetics of human obesity: from molecular mechanisms to an evolutionary perspective. *Mol. Genet. Genomics*. **290**, 1191–1221.
- Armougom, F., Henry, M., Vialettes, B., Raccach, D., Raoult, D. (2009) Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and methanogens in anorexic patients. *PLoS One*. **4**, e7125.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H.B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E.G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W.M., Brunak, S., Doré, J., MetaHIT Consortium, Antolín, M., Artiguenave, F., Blottiere, H.M., Almeida, M., Brechot, C., Cara, C., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariáz, G., Dervyn, R., Foerstner, K.U., Friss, C., van de Guchte, M., Guedon, E., Haimet, F., Huber, W., van Hylckama-Vlieg, J., Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Knol, J., Lakhdari, O., Layec, S., Le Roux, K., Maguin, E., Mérieux, A., Melo Minardi, R., M'rini, C., Muller, J., Oozeer, R., Parkhill, J., Renault, P., Rescigno, M., Sanchez, N., Sunagawa, S., Torrejon, A., Turner, K., Vandemeulebrouck, G., Varela, E., Winogradsky, Y., Zeller, G., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Bork, P. (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. **473**, 174–180.
- Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I. (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 18-23.
- Backhed, F. (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* **307**, 1915–1920.
- Backhed, F., Manchester, J.K., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I. (2007) Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 979–984.
- Balamurugan, R., George, G., Kabeerdoss, J., Hepsiba, J., Chandragunasekaran, A.M.S., Ramakrishna, B.S. (2010) Quantitative differences in intestinal *Faecalibacterium prausnitzii* in obese Indian children. *Br. J. Nutr.* **103**, 335-338.
- Bäumlér, A.J., Sperandio, V. (2016) Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*. **535**, 85 –93.

- Bengmark, S. (1998) Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* **42**, 2–7.
- Bezirtzoglou, E., Tsiotsias, A., Welling, G. (2011) Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe* **17**, 478-482.
- Bluher, M. (2009). Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp. Clin. Endocr. Diab.* **117**, 241-250.
- Burkitt, D. P. (1969). Related disease - Related cause? *Lancet* **294**, 1229-1231.
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmee E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrieres J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* **56**, 1761–1772.
- Cani P.D., Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck A.M., Delzenne N.M., Burcelin R. (2008) Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* **57**, 1470– 1481.
- Carotti, S., Guarino, M.P., Vespasiani-Gentilucci, U., Morini, S. (2015) Starring role of toll-like receptor-4 activation in the gut-liver axis. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* **6**, 99–109.
- Chakraborti, CK. (2015) New-found link between microbiota and obesity. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* **6**, 110–119.
- Chen, J., He, X., Huang, J. (2014) Diet Effects in Gut Microbiome and Obesity. *J. Food Sci.* **79**, 1-10.
- Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., Knight, R. (2012) The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. *Cell* **148**, 1258–1270.
- Cook, M.D., Allen, J.M., Pence, B.D., Wallig, M.A., Gaskins, H.R., White, B.A., Woods, J.A. (2016) Exercise and gut immune function: evidence of alterations in colon immune cell homeostasis and microbiome characteristics with exercise training. *Immunol. Cell. Biol.* **94**, 158–163.

- Coppa, G., Bruni, S., Morelli, L., Soldi, S., Gabrielli, O. (2004) The First Prebiotics in Humans. *J. Clin. Gastroenterol.* **38**, 80-83.
- David, L.A., Maurice, C.F., Carmody, R.N., Gootenberg, D.B., Button, J.E., Wolfe, B.E., Ling, A.V., Devlin, A.S., Varma, Y., Fischbach, M.A., Biddinger, S.B., Dutton, R.J., Turnbaugh, P.J. (2014) Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* **505**, 559–563.
- D’Argenio, V., Salvatore, F. (2015) The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clin. Chim. Acta.* **451**, 97–102.
- De Filippo C., Cavalieri D., Di Paola M., Ramazzotti M., Poullet J.B., Massart S., Collini S., Pieraccini G., Lionetti P. (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.
- de La Serre, C.B., Ellis, C.L., Lee J., Hartman, A.L., Rutledge, J.C., Raybould, H.E. (2010) Propensity to highfat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **299**, 440–448.
- De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Goncalves, D., Viner, a J., Zitoun, C., Duchampt, A., Backhed F., Mithieux G. (2014) Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell* **156**, 84–96.
- den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., Bakker, B.M. (2013) The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* **54**, 2325–2340.
- DiBaise J.K., Zhang H., Crowell M.D., Krajmalnik Brown R., Decker G.A., Rittmann B.E., (2008) Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin. Proc.* **83**, 460–469.
- Di Cesare, M., Bentham, J., Stevens, G.A., Zhou, B., Danaei, G., Lu, Y., Bixby, H., Cowan, M.J., Riley, L.M., Hajifathalian, K., Fortunato, L., Taddei, C., Bennett, J.E., Ikeda, N., Khang, Y.H., Kyobutungi, C., Laxmaiah, A., Li, Y., Lin, H.H., Miranda, J.J., Mostafa, A., Turley, M.L., Paciorek, C.J., Gunter, M., Ezzati, M. (2016) Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet* **387**, 1377– 1396.
- Ding, S., Chi, M.M., Scull, B.P., Rigby, R., Schwerbrock, N.M., Magness, S., Jobin, C., Lund, P.K. (2010) High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. *PLoS One* **5**, e12191.



- Dominguez-Bello, M.G., Blaser, M.J., Ley, R.E., Knight, R. (2011) Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. *Gastroenterology* **140**, 1713–1719.
- Eckburg, P., Bik, E., Bernstein, C., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., et al. (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**, 1635–1638
- European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: full text. Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts) (2007) *Eur. J. of Cardiovasc. Prev. Rehabil.* **14**, 1-113.
- Evans, C.C., LePard, K.J., Kwak, J.W., Stancukas, M.C., Laskowski, S., Dougherty, J., Moulton, L., Glawe, A., Wang, Y., Leone, V., Antonopoulos, D.A., Smith, D., Chang, E.B., Ciancio, M.J. (2014) Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity. *PLoS One* **9**, e92193.
- Foster, K.R. and Lukaski, H.C. (1996). Whole-body impedance-what does it measure? *Am. J. Clin. Nutr.* **64**, 388-396.
- Geer, E.B., Shen, W. (2009) Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. *Gender Med.* **6**, 60-75.
- Gensollen, T., Iyer, S.S., Kasper, D.L., Blumberg, R.S. (2016) How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science* **352**, 539–544.
- Gérard, P. (2016) Gut microbiota and obesity. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 147–162.
- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* **6**, 1401-1412.
- Guerin-Deremaux, L., Li, S., Pochat, M., Wils, D., Mubasher, M., Reifer, C., Miller, L. (2011) Effects of NUTRIOSE® dietary fiber supplementation on body weight, body composition, energy intake, and hunger in overweight men. *Int. J. Food. Sci. Nutr.* **62**, 628-635.
- Guyton, A. (1981) Textbook of medical physiology. Saunders, Philadelphia, str. 861.

- Havenaar, R. i J. H. J. Huis in't Veld (1992) Probiotics: A General View. U: "The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease", vol. 1. (B. J. Wood, ed.), Elsevier AppHed Science, London, str. 151-170.
- Hawrelak J., Myers S. (2004) The causes of intestinal dysbiosis: a review. *Altern. Med. Rev.* **9**, 180–197.
- Hollister, E.B., Gao, C., Versalovic, J. (2014) Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology* **146**, 1449–1458.
- Hooper L.V., Wong M.H., Thelin A., Hansson L., Falk P.G., Gordon, J.I. (2001) Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* **291**, 881–884.
- Institute of Medicine (2001). Dietary Reference Intakes: Proposed Definition of Dietary Fiber. Washington, DC: The National Academies Press.
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Reddy, D. N. (2015) Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* **21**, 8836–8847.
- Janssen, I., Katzmarzyk, P.T., Ross, R. (2004) Waist circumference and not body mass index explains obesity-related health risk. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 379-384.
- Jaureguy, F., Carton, M., Panel, P., Foucaud, P., Butel, M., Doucet-Populaire, F. (2004) Effects of Intrapartum Penicillin Prophylaxis on Intestinal Bacterial Colonization in Infants. *J. Clin. Microbiol.* **42**(11), 5184-5188.
- Jelčić J, Baretić M, Koršić M (2010) *Smjernice o dijagnostici i liječenju debljine* [online]. <<http://www.hlz.hr/smjernice/Smjernice%20za%20lije%C4%8Denje%20debljine.pdf>>. Pristupljeno 10. kolovoza 2017.
- Jimenez, E., Marin, M.L., Martin, R. (2008) Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res. Microbiol.* **159**, 187–193.
- Jumpertz, R., Duc Son, L., Turnbaugh, P.J. (2011) Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **94**, 58-65.

- Kang, S., Jeraldo, P., Kurti, A., Miller, M., Cook, M., Whitlock, K., Goldenfeld, N., Woods, J., White, B., Chia, N., Fryer, J. (2014) Diet and exercise orthogonally alter the gut microbiome and reveal independent associations with anxiety and cognition. *Mol. Neurodegener.* **9**, 36.
- Karlsson, F., Tremaroli, V., Nookaew, I., Bergström, G., Behre, C., Fagerberg, B., Nielsen, J., Bäckhed, F. (2013) Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* **498**, 99-103.
- Kim, E., An, S., Lee, M., Kim, T., Lee, H., Hwang, W., Choe, S., Kim, T., Han, S., Kim, H., Kim, D., Lee, K. (2011) Fermented kimchi reduces body weight and improves metabolic parameters in overweight and obese patients. *Nutr. Res.* **31**, 436-443.
- Knights, D., Ward, T.L., McKinlay, C., Miller, H., Gonzalez, A., McDonald, D., Knight, R. (2014) Rethink "Enterotypes". *Cell. Host. Microb.* **16**, 433-437.
- Kremers, S., Reubsæet, A., Martens, M., Gerards, S., Jonkers, R., Candel, M., de Weerd, I., de Vries, N. (2010) Systematic prevention of overweight and obesity in adults: a qualitative and quantitative literature analysis. *Obes. Rev.* **11**, 371-379.
- Lambo, A.M., Öste, R., Nyman, M.E. (2005) Dietary fiber in fermented oat and barley  $\beta$ -glucan rich concentrates. *Food Chem.* **89**, 283-293.
- Lecerf, J., Dépeint, F., Clerc, E., Dugenet, Y., Niamba, C., Rhazi, L., Cayzeele, A., Abdelnour, G., Jaruga, A., Younes, H., Jacobs, H., Lambrey, G., Abdelnour, A., Pouillart, P. (2012) Xylo-oligosaccharide (XOS) in combination with inulin modulates both the intestinal environment and immune status in healthy subjects, while XOS alone only shows prebiotic properties. *Br. J. Nutr.* **108**, 1847-1858.
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J.M., Kennedy, S., Leonard, P., Li, J., Burgdorf, K., Grarup, N., Jørgensen, T., Brandslund, I., Nielsen, H.B., Juncker, A.S., Bertalan, M., Levenez, F., Pons, N., Rasmussen, S., Sunagawa, S., Tap, J., Tims, S., Zoetendal, E.G., Brunak, S., Clement, K., Dore, J., Kleerebezem, M., Kristiansen, K., Renault, P., Sicheritz Ponten, T., de Vos, W.M., Zucke, J.D., Raes, J., Hansen, T., Bork, P., Wang, J., Ehrlich, S.D., Pedersen, O. (2013) Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **500**, 541–546.
- Lederberg, J., McCray, A.T. (2001) 'Ome Sweet 'Omics — a genealogical treasury of words. *Scientist* **15**, 8.
- Lee, R.D., Nieman, D.C. (2010) *Nutritional Assessment*, 5. izd., McGraw-Hill.

- Ley, R., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C., Knight, R., Gordon, J. (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 11070-11075.
- Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., Gordon, J.I. (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**, 1022-1023.
- Lozupone, C., Stombaugh, J., Gordon, J., Jansson, J. and Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **489**, 220-230.
- Maslowski, K., Vieira, A., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Di Yu, Schilter, H., Rolph, M., Mackay, F., Artis, D., Xavier, R., Teixeira, M., Mackay, C. (2009) Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* **461**, 1282-1286.
- Metelko, Ž., Harambašić, H. (1999) Internistička propedeutika i osnove fizikalne dijagnostike. Zagreb: Medicinska naklada.
- Million, M., Maraninchi, M., Henry, M., Armougom, F., Richet, H., Carrieri, P., Valero, R., Raccach, D., Vialettes, B., Raoult, D. (2011) Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *Int. J. Obes.* **36**, 817-825.
- Moreno-Indias, I., Cardona, F., Tinahones, F., Queipo-Ortuno, M. (2014) Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Front. Microbiol.*, 5.
- Moya-Pérez, A., Neef, A., Sanz, Y. (2015) *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 Reduces Obesity-Associated Inflammation by Restoring the Lymphocyte-Macrophage Balance and Gut Microbiota Structure in High-Fat Diet-Fed Mice. *PLoS ONE*, **10**, p.e0126976.
- Mueller, N., Whyatt, R., Hoepner, L., Oberfield, S., Dominguez-Bello, M., Widen, E., Hassoun, A., Perera, F., Rundle, A. (2014) Prenatal exposure to antibiotics, cesarean section and risk of childhood obesity. *Int. J. Obes.* **39**, 665-670.
- Musić Milanović, S. (2010) Demografske, bihevioralne i socio-ekonomske odrednice debljine odraslih u Hrvatskoj. PhD thesis, Sveučilište u Zagrebu.
- Natividad, J.M.M., Verdu, E.F. (2013) Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: Pathological and therapeutic implications. *Pharmacol. Res.* **69**, 42 –51.

- Neish, A.S. (2009) Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* **136**, 65-80.
- Nyman M. (2002) Fermentation and bulking capacity of indigestible carbohydrates: the case of inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.* **87**, 163-168.
- Smilowitz, J., O’Sullivan, A., Farver, M. (2015) The Influence of Early Infant-Feeding Practices on the Intestinal Microbiome and Body Composition in Infants. *Nutr. Metab. Insights* **1**.
- Ogden, C.L., Yanovski, S.Z., Carroll, M.D., Flegal, K.M., (2007) The epidemiology of obesity. *Gastroenterology* **132**, 2087–2102.
- Ottman, N., Smidt, H., deVos, W.M., Belzer, C. (2012) The function of our microbiota: who is out there and what they do? *Front. Cell. Infect.* **2**, 104.
- Parekh, P. J., Arusi, E., Vinik, A. I., Johnson, D. A. (2014) The role and influence of gut microbiota in pathogenesis and management of obesity and metabolic syndrome. *Front. Endocrinol.* **5**, 47.
- Parigi, S., Eldh, M., Larssen, P., Gabrielsson, S., Villablanca, E. (2015) Breast Milk and Solid Food Shaping Intestinal Immunity. *Front. Immunol.* **6**.
- Penders, J., Vink, C., Driessen, C., London, N., Thijs, C., Stobberingh, E. (2005) Quantification of *Bifidobacterium spp.*, *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* **243**, 141-147.
- Poslusna, K., Ruprich, J., de Vries, J.H., Jakubikova, M., van't Veer, P. (2009) Misreporting of energy and micronutrient intake estimated by food records and 24 hour recalls, control and adjustment methods in practice. *Br. J. Nutr.* **101**, 73-85.
- Qin J., Li Y., Cai Z., Li S. Zhu J., Zhang F., Liang S., Zhang W., Guan Y., Shen D., Peng Y., Zhang D., Jie Z., Wu W., Qin Y., Xue W., Li J., Han L., Lu D., Wu P., Dai Y., Sun X., Li Z., Tang A., Zhong S., Li X., Chen W., Xu R., Wang M., Feng Q., Gong M., Yu J., Zhang Y., Zhang M., Hansen T., Sanchez G., Raes J., Falony G., Okuda S., Almeida M., Le Chatelier E., Renault P., Pons N., Batto J.M., Zhang Z., Chen H., Yang R., Zheng W., Yang H., Wang J., Ehrlich S.D., Nielsen R., Pedersen O., Kristiansen K. (2012) A metagenome-wide association study of gut microbiota in Type 2 diabetes. *Nature* **490**, 55–60.
- Queipo-Ortuño, M., Seoane, L., Murri, M., Pardo, M., Gomez-Zumaquero, J., Cardona, F., Casanueva, F., Tinahones, F. (2013) Gut Microbiota Composition in Male Rat Models under

Different Nutritional Status and Physical Activity and Its Association with Serum Leptin and Ghrelin Levels. *PLoS ONE* **8**, e65465.

- Samuel, B., Shaito, A., Motoike, T., Rey, F., Backhed, F., Manchester, J., Hammer, R., Williams, S., Crowley, J., Yanagisawa, M., Gordon, J. (2008) Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 16767-16772.
- Sanchez, M., Darimont, C., Drapeau, V., Emady-Azar, S., Philippe, L., Ammon-Zuffrey, C., Doré, J., Tremblay, A. (2013) Effect of *Lactobacillus Rhamnosus* CGMCC1.3724 Supplementation on Weight loss and Maintenance in Obese Men and Women. *Can. J. Diabetes*, **37**, 269.
- Sartor, R. (2008) Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* **134**, 577-594.
- Schwartz, A., Taras, D., Schafer, K., Beijer, S., Bos, N.A., Donus, C., Hardt P.D. (2010) Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity* **18**, 190–195.
- Singh, V., Chassaing, B., Zhang, L., San Yeoh, B., Xiao, X., Kumar, M., Baker, M., Cai, J., Walker, R., Borkowski, K., Harvatine, K., Singh, N., Shearer, G., Ntambi, J., Joe, B., Patterson, A., Gewirtz, A., Vijay-Kumar, M. (2015) Microbiota-Dependent Hepatic Lipogenesis Mediated by Stearoyl CoA Desaturase 1 (SCD1) Promotes Metabolic Syndrome in TLR5-Deficient Mice. *Cell Metab.* **22**, 983-996.
- Sonnenburg, E.D., Smits, S.A., Tikhonov, M., Higginbottom, S.K., Wingreen, N.S., Sonnenburg, J.L. (2016) Diet induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature* **529**, 212– 208.
- Swinburn, B.A., Sacks, G., Hall, K.D., McPherson, K., Finegood, D.T., Moodie, M.L., Gortmaker, S.L. (2011) The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet* **378**, 804– 814.
- Štalić, Z. (2014) Znanost o prehrani 1: Prehrambeni standardi i smjernice [interna skripta]. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Šušković, J. (2016) Crijevna mikroflora, prehrana i zdravlje: Mikrobna ekologija gastrointestinalnog trakta [interna skripta]. Zagreb: Prehrambeno - biotehnološki fakultet.

- Tolhurst, G., Heffron H., Lam, Y.S., Parker, H.E., Habib, A.M., Diakogiannaki, E., Cameron, J., Grosse, J., Reimann, F., Gribble, F.M. (2012) Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes* **61**, 364–371.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., Gordon, J.I. (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**, 1027–1031.
- Turnbaugh, P., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B., Duncan, A., Ley, R., Sogin, M., Jones, W., Roe, B., Affourtit, J., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A., Knight, R., Gordon, J. (2008) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* **457**, 480-484.
- Turnbaugh, P. J., Backhed, F., Fulton, L., Gordon, J. I. (2008) Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* **3**, 213–223.
- Turnbaugh, P.J., Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Knight, R., Gordon, J.I. (2009) The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci. Transl. Med.* **1**, 6-14.
- Verdam, F.J., Fuentes, S., de Jonge, C., Zoetendal, E.G., Erbil, R., Greve, J.W. i sur. (2013) Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. *Obesity* **21**, 607–615.
- Virgin H.W., Todd J.A. (2011) Metagenomics and personalized medicine. *Cell.* **147**, 44–56.
- Vranešić D., Alebić I. (2006) Hrana pod povećalom: kako razumjeti i primijeniti znanost o prehrani. Profil International, Zagreb, str.40.
- Vrhovec, B., Jakšić, B., Reiner, Ž., Vucelić, B. (2008). Interna medicina. Zagreb: Naklada Ljevak.
- Walker, A.W., Duncan, S.H., Louis, P., Flint, H.J. (2014) Phylogeny, culturing and metagenomics of the human gut microbiota. *Trends Microbiol.* **22**, 267–74.
- Walker, A., Ince, J., Duncan, S., Webster, L., Holtrop, G., Ze, X., Brown, D., Stares, M., Scott, P., Bergerat, A., Louis, P., McIntosh, F., Johnstone, A., Lobley, G., Parkhill, J., Flint, H. (2010) Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J.* **5**, 220-230.

- Wang, G., Speakman, J. (2016) Analysis of Positive Selection at Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Body Mass Index Does Not Support the “Thrifty Gene” Hypothesis. *Cell Metabolism* **24**, 531-541.
  
- WHO (2017) BMI classification. WHO - World Health Organization, <[http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro\\_3.html](http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html)>. Pristupljeno 15. kolovoza 2017.
  
- Wolf, A.M., Woodworth, K.A. (2009). Obesity prevention: recommended strategies and challenges. *Am. J. Med.* **122**, 19-23.
  
- Wu, G., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y., Keilbaugh, S., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W., Knight, R., Sinha, R., Gilroy, E., Gupta, K., Baldassano, R., Nessel, L., Li, H., Bushman, F., Lewis, J. (2011). Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science* **334**, 105-108.
  
- Yatsunenko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A. C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., Knight, R., Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**, 222–227.
  
- Yoon, J.C., Chickering, T.W., Rosen, E.D., Dussault, B., Qin, Y., Soukas, A., Friedman, J.M., Holmes, W.E., Spiegelman, B.M. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma target gene encoding a novel angiopoietin-related protein associated with adipose differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5343–5349.
  
- Zaibi, M.S., Stocker, C.J., O’Dowd, J., Davies, A., Bellahcene, M., Cawthorne, M.A., Brown, A.J., Smith, D.M., Arch, J.R. (2010) Roles of GPR41 and GPR43 in leptin secretory responses of murine adipocytes to short chain fatty acids. *FEBS Lett.* **584**, 2381– 2386.
  
- Zhang, H., DiBaise, J.K., Zuccolo, A., Kudrna, D., Braidotti, M., Yu, Y., Parameswaran, P., Crowell, M.D., Wing, R., Rittmann, B.E., Krajmalnik-Brown, R. (2009) Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 2365-2370.



## Prilog 1. Opći upitnik

### ANKETA

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

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

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

\* Required

1. Vaš ID broj u istraživanju je: \*

---

2. **Spol** \*

*Mark only one oval.*

Muški

Ženski

3. **Starost** \*

*Mark only one oval.*

18 - 29

30 -39

40 -49

50 - 59

60 - 69

4. **Bračni status** \*

*Mark only one oval.*

oženjen/udana

živim u vanbračnoj zajednici

rastavljen/a

slobodan(na)

ne želim odgovoriti

5. **Obrazovanje** \*

*Mark only one oval.*

osnovna škola

srednja škola

fakultet

ne želim odgovoriti

6. **Visina u cm:** \*

---

7. **Težina u kg:** \*

---

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

Mark only one oval.

- DA  
 NE

9. Ako ste uzimali antibiotik molimo napišite koji.

\_\_\_\_\_

10. Tip prehrane \*

Mark only one oval.

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

11. Jeste li fizički aktivni? \*

Mark only one oval.

- DA  
 NE

12. Koliko vremena trošite na fizičke aktivnosti?

Mark only one oval.

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

13. Kojim fizičkim aktivnostima se bavite?

Check all that apply.

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

14. Pušite li? \*

Mark only one oval.

- Da  
 Ne  
 Bivši pušač

15. **Konzumirate li alkohol? \***

*Mark only one oval.*

- Ne
- svaki dan
- jednom tjedno
- jednom mjesečno

16. **Način poroda \***

*Mark only one oval.*

- vaginalno
- carski rez
- ne znam

17. **Prosječna učestalost stolice? \***

*Mark only one oval.*

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

18. **Smatrate li da ste? \***

*Mark only one oval.*

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

19. **Debljate li se brzo? \***

*Mark only one oval.*

- Ne
- Da
- Samo ako dulje vrijeme previše jedem

20. **Želite li biti u boljoj formi? \***

*Mark only one oval.*

- Da
- Ne

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

*Check all that apply.*

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

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

*Check all that apply.*

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

23. **Koliko prosječno spavate dnevno? \***

*Mark only one oval.*

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

24. **Koliko prosječno jedete obroka dnevno? \***

*Mark only one oval.*

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5 i više

25. **Koliko često doručkujete? \***

*Mark only one oval.*

- svaki dan
- ponekad
- rijetko
- nikad

26. **Na poslu/školi: \***

*Mark only one oval.*

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

27. **Koliko često konzumirate kavu? \***

*Mark only one oval.*

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

28. **Koliko često konzumirate čaj? \***

*Mark only one oval.*

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

29. **Koliko često konzumirate mlijeko? \***

*Mark only one oval.*

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

30. **Koliko često konzumirate pivo? \***

*Mark only one oval.*

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

31. **Koliko često konzumirate vino? \***

*Mark only one oval.*

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

32. **Koliko često konzumirate jaka alkoholna pića? \***

*Mark only one oval.*

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

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

*Mark only one oval.*

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

34. **Koliko često konzumirate gazirana pića? \***

*Mark only one oval.*

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

35. **Koliko često konzumirate voće? \***

*Mark only one oval.*

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

36. **Koliko često konzumirate povrće? \***

*Mark only one oval.*

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

37. **Koliko često konzumirate meso? \***

*Mark only one oval.*

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

38. **Koliko često konzumirate ribu? \***

*Mark only one oval.*

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

39. **Koliko često konzumirate kruh? \***

*Mark only one oval.*

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

40. **Koristite li umjetne zaslađivače? \***

*Mark only one oval.*

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

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

Mark only one oval.

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

42. Koliko ste često naduti? \*

Mark only one oval.

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

43. Konzumirate li neke od sljedećih lijekova? \*

Check all that apply.

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

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

Check all that apply.

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



45. **Alergič(an/na) sam na: \***

*Check all that apply.*

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

46. **Uzimate li probiotike? \***

*Mark only one oval.*

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

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

*Check all that apply.*

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

48. **Što ste jučer jeli za doručak? \***

---

---

---

---

---

49. **Što ste jučer jeli za ručak? \***

---

---

---

---

---

50. Što ste jučer jeli za večeru? \*

---

---

---

---

---

51. Što ste prekjučer jeli za doručak? \*

---

---

---

---

---

52. Što ste prekjučer jeli za ručak?

---

---

---

---

---

53. Što ste prekjučer jeli prekjučer za večeru?

---



---



---



---



---

## Prilog 2. Preporučeni jelovnici

1. DAN		RECEPTI													
<b>ZAJUTRAK</b>		<b>Ručak:</b> Piletina u povrću sa pire krumpirom 													
Müsli sa orašastim plodovima i suhim voćem, 40 g Jogurt, 1 čašica (200 g) Banana, 1 komad															
<b>DORUČAK</b>		<b>Postupak:</b> 1. Na maslinovom ulju (2 žlice) popržite prethodno začinjena pileća prsa 2. Zatim na istom tom ulju dinstajte papriku, luk i češnjak 3. Dodajte pasiranu rajčicu 4. Vratite pileća prsa u tavu sa povrćem i ostavite da se dinsta skupa sa povrćem još nekoliko minuta 5. U međuvremenu skuhaite krumpir 6. Kuhani krumpir propasirajte te dodajte 15 g margarina kako bi napravili pire 7. Na tanjuru prilikom posluživanja pire krumpir polijte umakom od povrća, te poslužite uz pileća prsa													
Kajgana, 2 jaja Integralni kruh, 2 kriške Polutvrđi sir po izboru, 2-3 šnite Kava, 1 šalica															
<b>RUČAK</b>		<b>Večera:</b> Tempoh sendvič sa zelenom salatom 													
<table border="0"> <tr> <td>Piletina, 2 pileća prsa</td> <td>Pasirana rajčica, 1/2 šalice</td> </tr> <tr> <td>Crvena paprika, 1 komad</td> <td>Maslinovo ulje, 2 žlice</td> </tr> <tr> <td>Zelena paprika, 1 komad</td> <td>Sol, prstohvat</td> </tr> <tr> <td>Luk, 1 komad</td> <td>Papar, prstohvat</td> </tr> <tr> <td>Češnjak, 2 češnja</td> <td>Krumpir, 2-3 krumpira srednje veličine</td> </tr> <tr> <td>Svježi peršin, 1 žličica</td> <td>Margarin, 15 g</td> </tr> <tr> <td>Timijan, 1/2 žličice</td> <td></td> </tr> </table>			Piletina, 2 pileća prsa	Pasirana rajčica, 1/2 šalice	Crvena paprika, 1 komad	Maslinovo ulje, 2 žlice	Zelena paprika, 1 komad	Sol, prstohvat	Luk, 1 komad	Papar, prstohvat	Češnjak, 2 češnja	Krumpir, 2-3 krumpira srednje veličine	Svježi peršin, 1 žličica	Margarin, 15 g	Timijan, 1/2 žličice
Piletina, 2 pileća prsa	Pasirana rajčica, 1/2 šalice														
Crvena paprika, 1 komad	Maslinovo ulje, 2 žlice														
Zelena paprika, 1 komad	Sol, prstohvat														
Luk, 1 komad	Papar, prstohvat														
Češnjak, 2 češnja	Krumpir, 2-3 krumpira srednje veličine														
Svježi peršin, 1 žličica	Margarin, 15 g														
Timijan, 1/2 žličice															
<b>UŽINA</b>		<b>Postupak:</b> 1. Izrežite tempeh na tanke ploške, i popržite na malo maslinovog ulja, s objiju strana 2. Donju krišku kruha premažite tankim slojem maslaca, zatim na namazanu krišku posložite tempeh, 2-3 šnite sira, plošku rajčice i preklopite sendvič sa drugom kriškom kruha 3. Poslužite sa šalicom kefir ili jogurta i zelenom salatom													
Jabuka, 1 komad Tamna čokolada (70% kakaa), 2 rebra (20 g) Bademi, 1/4 šalice (20 g)															
<b>VEČERA</b>		<b>KASNI MEĐUOBROK</b> Zeleni čaj s medom i limunom, 1 šalica													
Tempeh, 150 g Integralni kruh, 2 kriške Maslinovo ulje, 2 žlice Sir (po izboru), 2-3 šnite Zelena salata, 50 g Sol, prstohvat Papar, prstohvat															
Svježa rajčica, 1 komad Kefir/jogurt, 1 čašica (200 g)															
Energija: 2970,67 kcal Proteini: (16,01%) Ugljikohidrati: (50,26%) Masti: (33,72%) Prehrambena vlakna: 25,37 g															

2. DAN	RECEPTI
<p style="text-align: center;"><b>ZAJUTRAK</b></p>	
<p>Müsli sa orašastim plodovima i suhim voćem, 40 g Jogurt, 1 čašica (200 g) Banana, 1 komad</p>	<p><b>Ručak:</b> Špageti Bolognese</p>
<p style="text-align: center;"><b>DORUČAK</b></p>	
<p>Tuna, 125 g Posni sir, 100 g Integralni kruh, 2 kriške</p>	<p><b>Postupak:</b></p>
<p style="text-align: center;"><b>RUČAK</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Skuhajte integralnu paštu (špagete), <i>al dente</i></li> <li>2. U međuvremenu, na tavi sa malo maslinovog ulja stavite mljeveno goveđe meso da se pirja dok ne poprimi zlatno-smeđu boju; posolite i popaprite po volji</li> <li>3. U drugoj tavi na maslinovom ulju pirjajte prethodno nasjeckano povrće (mrkvu, papriku, luk i češnjak), dok ne omekša</li> <li>4. U tavu sa povrćem ubacite propirjano mljeveno goveđe meso, dodajte pasiranu rajčicu, začine i sve dobro promiješajte</li> <li>5. Špagete servirajte u tanjur, prelijte umakom i poslužite sa 4-5 sitnih kiselih krastavaca kao prilogom</li> </ol>
<p>Mljeveno goveđe meso, 50 g Luk, 1 glavica Češnjak, 2 češnja Mrkva, 1/2 šalice Zelena paprika, 1 komad Maslinovo ulje, 2 žlice</p> <p>Timijan, 1/2 žličice Sol, prstohvat Papar, prstohvat Pasirana rajčica, 1/2 šalice Integralna pašta (špageti), 100 g Kiselí krastavci, 4-5 komada</p>	<p style="text-align: center;"><b>UŽINA</b></p>
<p>Guacamole umak, 1/2 šalice Tortilja čips, 1 šalica</p>	<p><b>Večera:</b> Omljet s gljivama i zelena salata</p>
<p style="text-align: center;"><b>VEČERA</b></p>	
<p>Jaja, 2 komada Gljive, 100 g Sol, prstohvat Papar, prstohvat Maslinovo ulje, 2 žlice Zeleni kupus, 1/2 glavice Sir (po izboru), 2-3 šnite Integralni kruh, 1 kriška Gotova juha od rajčice, 1 tanjur</p>	<p><b>Postupak:</b></p>
<p style="text-align: center;"><b>KASNI MEĐUOBROK</b></p>	<p><u>Za juhu</u></p>
<p>Kombucha čaj, 1 šalica</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Uspite sadržaj vrećice u lonac s vodom, i slijedite upute sa pakiranja</li> </ol>
<p>Energija: 2921,34 kcal Proteini: (19,84%) Ugljikohidrati: (40,04%) Masti: (40,12%) Prehrambena vlakna: 24,33 g</p>	<p><u>Za omljet</u></p>
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Na maslinovom ulju popržite luk (i ostalo povrće po izboru), ubacite gljive i pirjajte dok sve ne omekša</li> <li>2. Izmiješajte 2 jaja, posolite po volji pa dodajte u tavu sa povrćem, pospite sa malo sira te pecite s obe strane (kao palačinku)</li> <li>3. Omljet poslužite uz salatu od ribane glavice kupusa</li> </ol>

3. DAN	RECEPTI														
<p style="text-align: center;"><b>ZAJUTRAK</b></p>															
<p>Jogurt, 1 čašica (200 g) Banana, 1 komad</p>	<p><b>Ručak:</b> Riba sa kus-kusom i brokulom</p>														
															
<p style="text-align: center;"><b>DORUČAK</b></p>	<p><b>Postupak:</b></p>														
<p>Kajgana, 2 jaja Integralni kruh, 1 kriška Sir po izboru, 2-3 šnite Kava, 1 šalica</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Na malo maslinovog ulja ispržite sitno nasjeckani češnjak</li> <li>2. Napravite marinadu od ulja, soka od pola limuna, soli, prženog češnjaka i ružmarina</li> <li>3. Namažite ribu sa svih strana i iznutra marinadom te ostavite da odstoji u marinadi barem pola sata</li> <li>4. U vatrootalnu posudu stavite ribu, te je prelite marinadom</li> <li>5. Uz rubove složite komade luka isječenog na kriške i poneku plošku limuna</li> <li>6. Prekrijte aluminijskom folijom i pecite u pećnici oko 15 min; zatim, skinite foliju i dopecite</li> <li>7. Pečenu ribu poslužite s kus-kusom i brokulom (kus-kus prethodno skuhati, te začiniti maslinovim uljem, nasjeckanim zelenim maslinama i feta sirom)</li> </ol>														
<p style="text-align: center;"><b>RUČAK</b></p>															
<table border="0"> <tr> <td>Riba, 200 g</td> <td>Brokula, 50 g</td> </tr> <tr> <td>Limun, ½ komada</td> <td>Kus-kus, 50 g</td> </tr> <tr> <td>Češnjak, 2 češnja</td> <td>Feta sir, 50 g</td> </tr> <tr> <td>Luk, 1 glavica</td> <td>Zelene masline, 5 komada</td> </tr> <tr> <td>Maslinovo ulje, 2 žlice</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Ružmarin, 10 g</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sol, prstohvat</td> <td></td> </tr> </table>	Riba, 200 g	Brokula, 50 g	Limun, ½ komada	Kus-kus, 50 g	Češnjak, 2 češnja	Feta sir, 50 g	Luk, 1 glavica	Zelene masline, 5 komada	Maslinovo ulje, 2 žlice		Ružmarin, 10 g		Sol, prstohvat		<p><b>Večera:</b> Burrito sa grahom i rižom</p>
Riba, 200 g	Brokula, 50 g														
Limun, ½ komada	Kus-kus, 50 g														
Češnjak, 2 češnja	Feta sir, 50 g														
Luk, 1 glavica	Zelene masline, 5 komada														
Maslinovo ulje, 2 žlice															
Ružmarin, 10 g															
Sol, prstohvat															
<p style="text-align: center;"><b>UŽINA</b></p>															
<table border="0"> <tr> <td>Puding od čokolade, 1 čašica (200 g)</td> <td>Jabuka, 1 komad</td> </tr> </table>	Puding od čokolade, 1 čašica (200 g)	Jabuka, 1 komad	<p><b>Postupak:</b></p>												
Puding od čokolade, 1 čašica (200 g)	Jabuka, 1 komad														
<p style="text-align: center;"><b>VEČERA</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Stavite rižu da se kuha</li> <li>2. U međuvremenu na maslinovom ulju stavite da se pirja luk i češnjak, te postepeno dodajte pasiranu rajčicu; posolite i popaprite po volji. Zatim dodajte grah (malo vode ako je potrebno) i na kraju dodajte kukuruz te sve dobro promiješajte</li> <li>3. U drugoj tavi 2-3 min. zagrijte tortilju sa svake strane (bez ulja)</li> <li>4. Zagrijanu tortilju stavite na tanjur, na nju posložite skuhanu i ocijeđenu rižu, smjesu graha i kukuruza, pospite malo sira te zarolajte (prvo preklopite krajeve tortilje)</li> <li>5. Poslužite sa zelenom salatom začinjenom maslinovim uljem, jabučnim octom i prstohvatom soli</li> </ol>														
<p style="text-align: center;"><b>TORTILJA I PASTA</b></p>															
<table border="0"> <tr> <td>Tortilja, 2 komada</td> <td>Pasirana rajčica, 50 ml</td> </tr> <tr> <td>Crni grah, ½ šalice</td> <td>Sol, prstohvat</td> </tr> <tr> <td>Kukuruz, ½ šalice</td> <td>Papar, prstohvat</td> </tr> <tr> <td>Riža, ½ šalice</td> <td>Zelena salata, 100 g</td> </tr> <tr> <td>Luk, 1 glavica</td> <td>Jabučni ocat, 1 žlica</td> </tr> <tr> <td>Češnjak, 2 češnja</td> <td>Maslinovo ulje, 2 žlice</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Naribani sir (po volji)</td> </tr> </table>	Tortilja, 2 komada	Pasirana rajčica, 50 ml	Crni grah, ½ šalice	Sol, prstohvat	Kukuruz, ½ šalice	Papar, prstohvat	Riža, ½ šalice	Zelena salata, 100 g	Luk, 1 glavica	Jabučni ocat, 1 žlica	Češnjak, 2 češnja	Maslinovo ulje, 2 žlice		Naribani sir (po volji)	
Tortilja, 2 komada	Pasirana rajčica, 50 ml														
Crni grah, ½ šalice	Sol, prstohvat														
Kukuruz, ½ šalice	Papar, prstohvat														
Riža, ½ šalice	Zelena salata, 100 g														
Luk, 1 glavica	Jabučni ocat, 1 žlica														
Češnjak, 2 češnja	Maslinovo ulje, 2 žlice														
	Naribani sir (po volji)														
<p style="text-align: center;"><b>KASNI MEĐUOBROK</b></p>															
<p>Kombucha čaj, 1 šalica Kefir (ako osjetite glad), 200 g</p>															
<p>Energija: 2952,51 kcal Proteini: (16,6%) Ugljikohidrati: (43,19%) Masti: (40,21%) Prehrambena vlakna: 26. 91 g</p>															

4. DAN	RECEPTI
<b>ZAJUTRAK</b>	
Integralni kruh, 2 kriške Maslac od kikirikija, 1 žlica Pekmez od šljiva, 1 žlica Kava, 1 šalica	<b>Ručak:</b> Kiseli kupus s kobasicama
	 <p data-bbox="823 730 922 752">Postupak:</p> <ol data-bbox="823 779 1347 954" style="list-style-type: none"> <li>1. U loncu na maslinovom ulju popržite češnjak</li> <li>2. Dodajte kiseli kupus u lonac te pirjajte na laganoj vatri</li> <li>3. Dodajte oko 1 šalice mlake vode u lonac sa kiselim kupusom i češnjakom, te začinite po volji (sol i papar)</li> <li>4. Skuhajte kobasice u vodi</li> <li>5. Nakon što su kobasice gotove, narežite ih na sitne kolutove i umiješajte sa kiselim kupusom te poslužite</li> </ol>
<b>DORUČAK</b>	
Müsli sa orašastim plodovima i suhim voćem, 40 g Jogurt, 1 čašica (200 g) Banana, 1 komad	
<b>RUČAK</b>	
Kiseli kupus, 200 g Češnjak, 2 češnja Maslinovo ulje, 2 žlice Sol, prstohvat Papir, prstohvat Kobasice, 2 komada Integralni kruh, 1 kriška	<b>Večera:</b> Riža s grahoricama
<b>UŽINA</b>	 <p data-bbox="823 1402 922 1424">Postupak:</p> <ol data-bbox="823 1451 1347 1727" style="list-style-type: none"> <li>1. Skuhajte rižu</li> <li>2. U velikoj tavi na maslinovom ulju kratko popržite mrkvu (4-5 min dok ne omekša), dodajte nasjeckani češnjak i izribani đumbir, te nastavite dinstati dok se ne ispuste mirisi</li> <li>3. Zatim u istu tu tavu dodajte skuhanu rižu, dodajte soja sos, gotovi grašak i kukuruz i sve skupa pirjajte na laganoj vatri još nekoliko minuta</li> <li>4. Posolite i popaprite po volji</li> <li>5. Na kraju, po volji, dodajte indijske oraščice te sve dobro promiješajte i poslužite</li> </ol>
Guacamole umak, 50 g Tortilja čips, 60 g Tamna čokolada (70% kaka), 2 rebra (20 g)	
Smeđa riža, 100g Grašak, 1 šalica Kukuruz, 1/2 šalice Mrkva, 1/2 šalice Češnjak, 2 češnja Đumbir, 1/2 žličice	Sol, prstohvat Papir, prstohvat Soja sos, 10 ml Indijski oraščići, 20 g
<b>KASNI MEĐUOBROK</b>	
Zobena kaša (po volji dodati jednu žličicu pekmeza od šljiva), 40 g Zeleni čaj s medom i limunom, 1 šalica	
Energija: 2937,95 kcal Proteini: (12,15%) Ugljikohidrati: (55,02%) Masti: (32,86%) Prehrambena vlakna: 27,32 g	

## 5. DAN

### ZAJUTRAK

Zobena kaša, 40 g  
Grožđice, 10 g  
Bademi, 10 g  
Sjemenke lana, 10 g  
Pekmez od šljiva, 1 žlica

### DORUČAK

Tuna, 125 g  
Posni sir, 100 g  
Integralni kruh, 2 kriške

### RUČAK

Leća, 50 g	Crvena paprika, 1/2
Ječam, 50 g	žličice
Mrkva, 50 g	Svinjetina (T-bone), 1
Korijen peršina, 20 g	odrezak (100 g)
Luk, 1 glavica	
Češnjak, 3 češnja	
Sol, prstohvat	
Papar, prstohvat	
Lovorov list, 1 komad	

### UŽINA

Humus, 50 g	Banana čips, 30 g
Integralni krekeri, 60 g	Bademi, 30 g

### VEČERA

Palenta, 1 šalica	Sol, prstohvat
Kiselomlijeko, 180 g	

### KASNI MEĐUOBROK

Kombucha čaj, 1 šalica  
Kefir ili zobena kaša (ako osjetite glad)

Energija: 2968,24 kcal  
Proteini: (19,23%) Ugljikohidrati: (46,13%) Masti: (34,64%)  
Prehrambena vlakna: 26,27 g

## RECEPTI

**Ručak:** Varivo od leće i svinjski odrezak



Postupak:

Za varivo

1. Sve povrće sitno nasjeckajte
2. U lonac ubacite opranu leću i ječam, dodajte sve usitnjeno povrće, sol, crvenu papriku i ostale začine
3. Zalijte vodom (paziti da vode bude dovoljno, jer ječam jako povećava obujam)
4. Kuhajte cca. 35 min, provjerite gustoću, ako je potrebno dolijte malo vode ili začina po volji

Za odrezak

1. Kapnite par kapi ulja na tavu, tek toliko da se na tavi napravi tanki uljnati film. Pričekajte još kratko da se ulje ugrije, pa položite začinjeno meso u tavu i pecite ovisno o stupnju pečenosti koji želite postići (4-10 min). Zatim odrezak okrenite i ponovite isto i na drugoj strani.

**Večera:** Palenta sa kiselim mlijekom



Postupak:

1. U 3 dcl uzavrele posoljene vode, lagano sipajte 1 šalicu kukuruzne krupice i miješajte dok ne dobijete željenu gustoću
2. Poslužite palentu sa kiselim mlijekom