

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet

Kristina Žuna

**Utjecaj promjena prehrambenih i životnih navika na sastav mikrobiote usta u pretilih
žena Zagrebačke županije**

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, na Zavodu za endokrinologiju Interne klinike Rebro, KBC Zagreb, i u Laboratoriju za spektrometriju masa i funkcionalnu proteomiku, Zavoda za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom prof. dr. sc. Višnje Bačun-Družina i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2018./2019.

Popis i objašnjenje kratica:

- WHO – eng. *World Health Organisation*, Svjetska zdravstvena organizacija
- ITM – indeks tjelesne mase
- GWAS – eng. *genome wide association studies*, studije genetičkih asocijacija na čitavom genomu
- SNPs – eng. *single nucleotide polymorphisms*, jednonukleotidni polimorfizmi
- FIAF – eng. *fasting-induced adipocyte factor*, adipocitni faktor induciran postom
- TNF α – eng. *tumor necrosis factor- α* , faktor nekroze tumora α
- LB – eng. *Luria-Bertani*, kompletna hranjiva podloga za uzgoj enterobakterija
- MRS – eng. *Man, Rogosa and Sharpe broth*, kompletna hranjiva podloga za uzgoj bakterija iz roda *Lactobacillus*
- PBS – eng. *phosphate buffered saline*, fosfatni pufer
- MALDI-TOF – eng. *matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight*, matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom s analizatorom vremena leta
- TOF – eng. *time of flight*, vrijeme leta.

Sadržaj rada:

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Pretilost | 1 |
| 1.2. Uzroci pretilosti | 1 |
| 1.3. Klinička obilježja pretilosti | 3 |
| 1.4. Utjecaj promjena prehrambenih i životnih navika na liječenje pretilosti | 5 |
| 1.5. Utjecaj sastava mikrobiote na razvoj pretilosti | 6 |
| 1.5.1. Crijevna mikrobiota | 6 |
| 1.5.1.1. Istraživanja provedena na laboratorijskim životinjama | 7 |
| 1.5.1.2. Istraživanja provedena na ljudima | 8 |
| 1.5.2. Mikrobiota usne šupljine | 9 |
| 2. HIPOTEZA | 11 |
| 3. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE | 12 |
| 3.1. ISPITANICI | 12 |
| 3.2. MATERIJAL | 13 |
| 3.2.1. Upitnici o životnim i prehrambenim navikama | 13 |
| 3.2.2. Laboratorijska oprema za mikrobiološku analizu uzoraka sline | 15 |
| 3.2.2.1. Pribor | 15 |
| 3.2.2.2. Kemikalije | 15 |
| 3.2.2.3. Aparature | 16 |
| 3.2.3. Puferi | 16 |
| 3.2.4. Hranjive podloge | 17 |
| 3.2.5. Računalni programi | 18 |
| 3.3. METODE | 19 |
| 3.3.1. Uzorkovanje sline | 19 |
| 3.3.2. Mikrobiološko ispitivanje sastava sline | 19 |
| 3.3.2.1. Pripremanje decimalnih razrjeđenja | 19 |
| 3.3.2.2. Nacjepljivanje uzoraka na hranjive podloge | 19 |
| 3.3.2.3. Izolacija pojedinačnih kolonija | 19 |
| 3.3.2.4. MALDI-TOF spektrometrija masa | 20 |
| 3.3.3. Statistička analiza | 20 |
| 4. REZULTATI | 22 |
| 4.1. Rezultati mršavljenja | 22 |

| | |
|---|----|
| 4.2. Rezultati promjena prehrambenih i životnih navika | 24 |
| 4.3. Rezultati analize mikrobiološkog sastava uzoraka sline | 27 |
| 5. RASPRAVA..... | 40 |
| 6. ZAKLJUČCI..... | 46 |
| 7. ZAHVALE..... | 47 |
| 8. POPIS LITERATURE | 48 |
| 9. SAŽETAK | 54 |
| 10. SUMMARY..... | 55 |

1. UVOD

1.1. Pretilost

Pretilost je kompleksna i multifaktorijalna bolest, a Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization*, WHO) definira pretilu osobu kao onu kojoj je indeks tjelesne mase (ITM) 30 kg/m² ili viši. Godine 2014. je 13 % ukupne svjetske populacije bilo pretilo (Pineda i sur., 2018), a predviđa se da će do 2030. godine 38 % svjetske populacije biti prekomjerne težine te 20 % pretilo (Kelly i sur., 2008).

Prema rezultatima statističke obrade podataka, 2015. godine je među 20 najmnogoljudnijih država svijeta, najveći broj pretilih odraslih osoba bio u Sjedinjenim Američkim Državama i Filipinima, dok su Kina i Indija imale najveći broj pretile djece. Najmanji postotak pretilih odraslih osoba je bio u Vijetnamu, a najmanji postotak pretile djece u Bangladešu (Afshin i sur., 2017).

Pretilost je sve više zastupljena na području Sjeverne Amerike i u zapadnoj Europi. Prije 15 godina, 1 od 5 osoba u Sjedinjenim Američkim Državama je bila pretila, dok se 2017. godine taj broj povećao na 1 od 5 osoba. Slični trendovi rasta zamijećeni su i u zapadnoj Europi. Također, smatra se da će do 2050. godine 60 % muškaraca i 50 % žena biti pretilo, što označava razliku u razvoju pretilosti u muškaraca i žena. Pretilost je sve učestalija i u djece, a predviđa se da će se do 2050. godine 50 % muške djece biti pretilo. (Agha i sur., 2017).

1.2. Uzroci pretilosti

Razlozi rastućeg trenda pretilosti diljem svijeta se ogledaju u multifaktorijalnosti te bolesti. Faktori rizika za razvoj pretilosti uključuju životne, okolišne i genetske čimbenike. Životni čimbenici uključuju socioekonomske i kulturološke razlike, različite etničke pozadine, nutrijentima siromašnu hranu dostupnu na tržištu, urbanizaciju, industrijalizaciju i svakodnevne životne navike. Neke od životnih navika pojedinaca koje mogu dovesti do pretilosti su visoko kalorična i nutritivno siromašna prehrana, spavanje u prosjeku manje od 6 sati ili više od 8 sati dnevno, niska tjelesna aktivnost te sjedeći i/ili stresni način života. U tom slučaju je moguće u potpunosti ukloniti uzrok bolesti u smislu odgovora pojedinca na vanjske utjecaje što čini ljudsko ponašanje jednim od glavnih uzroka nastanka pretilosti (Hruby i Hu, 2016).

Okolišne čimbenike, koji utječu na razvoj pretilosti, čine molekule koje se nazivaju obesogeni. One mogu stupati u interakciju s kromatinom, transkripcijskim faktorima, hormonskim receptorima, molekulama imunološkog sustava i mikroorganizmima nastanjenima u debelom crijevu (Steger i Lazar, 2011). Neki od obesogena s najvećim zabilježenim utjecajem na ljudski organizam su organotini, bisfenol A, ftalati, perfluoroktanoična kiselina te tiazolidinedioni. Oni utječu na promjenu u homeostazi

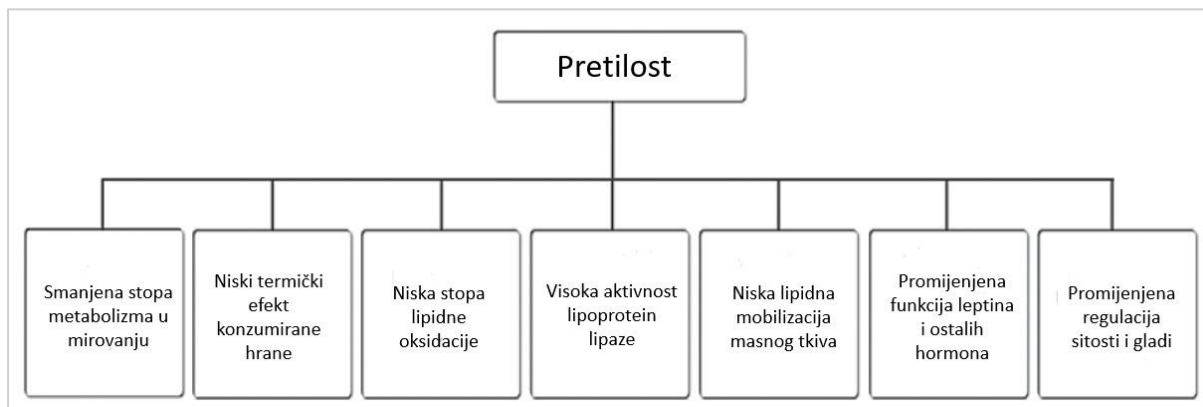
lipida i masnog tkiva, osjetljivosti na inzulin, koncentraciji triglicerida u krvi te mijenjaju hormonsku ravnotežu (Grün i Blumberg, 2009). Sve te interakcije posljedično mijenjaju ekspresiju gena u stanicama te mogu rezultirati promjenama u prehranbenim i životnim navikama te voditi razvoju pretilosti. Postoje tri hipoteze koje pretpostavljaju načine na koje se to može dogoditi, a to su povećanje osjeta gladi putem smanjenja koncentracije leptina i/ili povećanja koncentracije grelina, preusmjerenje metabolizma u smjeru sinteze masnog tkiva putem smanjenja koncentracije adiponektina i razvoja rezistencije na inzulin putem povećanja koncentracije TNF α (eng. *tumor necrosis factor- α* , faktor nekroze tumora α) te povećanja metaboličke efikasnosti, odnosno povećanog kalorijskog unosa iz istih vrsta hrane.

Pretilost nije samo posljedica životnih i okolišnih čimbenika, već i genetske predispozicije svakog pojedinca. Između 30 % i 70 % pretilosti u ljudi je nasljedno (Huđek i sur., 2018). Neki tipovi pretilosti, koji su ovisni o genetskim predispozicijama, su monogenska, sindromska, oligogenska i poligenska pretilost. Mehanizam nastanka poligenske pretilosti je kompleksan i uključuje delikatne interakcije između samih gena te utjecaja okolišnih čimbenika na ekspresiju pojedinih gena. Ostali tipovi pretilosti koji su ovisni o genetskim predispozicijama se pojavljuju veoma rijetko, a monogenska isključivo ovisi o genskom utjecaju (Huvenne i sur., 2016).

Godine 2005. je stvorena Genska mapa ljudske pretilosti (eng. *Human Obesity Gene Map*) koja opisuje preko 250 grupa različitih gena povezanih s razvojem pretilosti. Uključeni su geni povezani s regulacijom lipidnog metabolizma i stvaranja masnog tkiva, kao i oni koji utječu na apetit i održavanje energetske ravnoteže organizma (Bašić i sur., 2012). Napredak u identifikaciji gena povezanih s pretilošću su donijele studije genetičkih asocijacija na čitavom genomu (eng. *genome wide association studies*, GWAS) studije, zaključno s kojima se zna za devet lokusa povezanih s monogenskom pretilošću i 58 lokusa povezanih s poligenskom pretilošću (Choquet i Meyre, 2011). Jednostruki nukleotidni polimorfizmi (eng. *single nucleotide polymorphisms*, SNPs) gena FTO su među prvim identificiranim genima povezanima s adipogenezom i razvojem rizika od pretilosti (Fawcett i Barroso, 2010). GWAS studije su identificirale i β -adrenergički receptor, leptin i leptinski receptor, interleukin 6 i druge gene povezane s metabolizmima masti, energije i održavanjem hormonske ravnoteže (Chung i Leibel, 2008).

1.3. Klinička obilježja pretilosti

Fiziološke promjene koje se javljaju u pretilih osoba su smanjena stopa lipidne oksidacije i lipidne mobilizacije masnog tkiva, povišena aktivnost lipoprotein lipaza, smanjena stopa metabolizma u stanju mirovanja, poremećena hormonalna regulacija te poremećena regulacija osjećaja gladi i sitosti (Bašić i sur., 2012), što je prikazano na slici 1.



Slika 1. Shematski prikaz fizioloških promjena koje se javljaju u pretilih osoba (Prilagođeno prema Bašić i sur., 2012).

U vremenima nedostatka hrane, razgradnja masnog tkiva služi za sprječavanje gladovanja. Kod pretilosti, višak masnog tkiva i pojačana aktivnost lipaza dovode do povećanog oslobađanja slobodnih masnih kiselina, a lipidi i njihovi metaboliti uzrokuju oksidacijski stres što djeluje štetno na endoplazmatski retikulum i mitohondrije u stanicama adipoznog i svih ostalih tkiva u tijelu (Hutley i Prins, 2005).

Leptin, hormon kojeg sintetiziraju stanice masnog tkiva, odgovoran je za stimulaciju lipolize i inhibiciju lipogeneze te prijenos signala o stanju metaboličke energije do hipotalamusa. U pretilih osoba, koncentracije leptina u krvi su višestruko povećane što dovodi do rezistencije na leptin i poremećene regulacije stvaranja metaboličke energije (Farooqi i sur., 2007). Ovisnost o hrani je također povezana s rezistencijom na leptin, što može dovesti do pretilosti (Wang i sur., 2009). Kod pretilosti se javlja i rezistencija na inzulin, hormon kojeg sintetizira gušterača, a koji je odgovoran za održavanje homeostaze glukoze.

Kao i leptin, inzulin može proći kroz moždanu barijeru te prenijeti signale do hipotalamusa, a njegove koncentracije su povišene u pretilih osoba. Leptin i inzulin sudjeluju u inhibiciji sinteze dopamina, koji je povezan s pružanjem osjećaja zadovoljstva nakon konzumacije hrane, a u uvjetima rezistencije na te hormone, može doći do unosa povećanih količina hrane. Grelin, peptidni hormon kojeg sintetiziraju stanice želuca, odgovoran je za osjećaj gladi i njegova koncentracija je u pretilih osoba niža nego u zdravih pojedinaca. Međutim, njegova uloga u pretilosti se ogleda u stimulaciji sinteze dopamina, što

je povezano s pružanjem osjećaja zadovoljstva nakon konzumacije hrane te prijenosa signala do hipotalamusa, što može dovesti do većeg unosa hrane (Jarolimova i sur., 2013).

Dokazana je povezanost između povišenog indeksa tjelesne mase i učestalije pojave dijabetesa melitusa tipa 2, dislipidemije, povišenog krvnog tlaka i srčanih bolesti, a posebno je povećan rizik od srčanog udara (Wang i sur., 2009). Tehnologijom magnetske rezonancije u citoplazmama hepatocita, kardiomiocita, stanica štitnjače i stanica skeletnih mišića su nađene kapljice masti, što je povezano s razvojem bolesti jetre, srca i krvožilnog sustava te rezistencije na inzulin (Gadde i sur., 2018).

Komorbiditeti povezani s pretilošću su uzrokovani i utjecajem povećane tjelesne mase na opće stanje organizma. Zbog povećanog pritiska na zglobove se javljaju degenerativne upalne bolesti zglobova, a zbog upalnih adipokina se mijenja sastav sinovijalne tekućine i javljaju se oštećenja mišića. Povećani pritisak na zglobove uzrokuje oštećenja hrskavice što vodi do razvoja osteoartritisa (Bokarewa i sur., 2005).

Nakupljanje masnog tkiva u gornjem dišnom sustavu rezultira poteškoćama u disanju, apnejama u spavanju te povećanom incidencijom astme kod žena (Bergeron i sur., 2005). Kod žena se također češće pojavljuju sindrom policističnih jajnika, menoragija, amenoreja, depresija, neplodnost te urinarna inkontinencija. Također, s pretilošću se povezuju i bolesti žučnog mjehura, a ako te bolesti postanu kronične, mogu dovesti i do razvoja raka žučnog mjehura.

Osim raka žučnog mjehura, pretilost je povezana i s razvojem raka dojke, prostate, debelog crijeva, jednjaka, bubrega i endometrija. U 20-33 % slučajeva se pretilost može smatrati uzrokom raka dojke, jednjaka i bubrega (Carroll, 1998). Mehanizam koji stoji iza razvoja raka se zasniva na kroničnim upalnim procesima posredovanim adipokinima, hormonskom disbalansu te posljedičnom utišavanju imunološkog odgovora.

Pretilost može uzrokovati mnoge zdravstvene probleme poput kardiovaskularnih bolesti, bolesti bubrega i metabolizma, osteoporoze te više vrsta rakova. Međutim, otkrivanjem i razumijevanjem čimbenika koji uzrokuju pretilost, kao i promjena koje zbog nje nastaju u organizmu, moguće ju je adekvatno liječiti te spriječiti njeno nastajanje.

1.4. Utjecaj promjena prehrambenih i životnih navika na liječenje pretilosti

Pretilost je bolest većinski uzrokovana stvaranjem pozitivne energetske bilance unošenjem nutritivno siromašne, ali kalorijski bogate hrane te neučestalom tjelesnom aktivnošću. Bez obzira na uzrok, strategije liječenja pretilosti se ogledaju u mijenjaju prehrambenih i životnih navika, poboljšanju socioekonomskih okolnosti te liječničkoj potpori (Chan i Woo, 2010).

Promjena navika uključuje modificiranje dijete i povećanje tjelesne aktivnosti, a lijekovima je potrebno i tretirati bolesti koje nastaju uz pretilost, kao što su dijabetes melitus tipa 2 ili bolesti kardiovaskularnog sustava. Kako bi se postigla negativna energetska bilanca, potrebno je promijeniti dnevni unos hrane. To se može postići izbacivanjem ili limitiranjem određenih skupina makronutrijenata, smanjenjem veličine porcija i/ili brojanjem kalorija.

Iako postoji mnogo varijacija dijete, poput visokoproteinske, mediteranske, sa smanjenim ili povećanim udjelom masti ili sa smanjenim udjelom ugljikohidrata, dosadašnja istraživanja ne pokazuju značajnu razliku u učinkovitosti ovih dijeta. Štoviše, pokazano je da nema razlike u smanjenju tjelesne mase među promjenama u unosu makronutrijenata sve dok je kalorijski unos nepromijenjen, stoga je svaka dijeta dobar izbor uz preporuku liječnika i nutricionista (Wyatt, 2013). Prema tome, potrebno je smanjiti kalorijski unos i povećati učestalost tjelesne aktivnosti kako bi energetska bilanca postala negativna. Energetski deficit od oko 500 do 600 kalorija dnevno će dovesti do gubitka pola kilograma po tjednu, u maksimalnom periodu od 24 tjedna. Za pretile osobe, kojima je ITM $> 30 \text{ kg/m}^2$, preporučuju se i dijete u kojima se 800 do 1200 kalorija dnevno dodaje prethodno formuliranim obrocima, obično u praškastom obliku. Takav tretman se smije provoditi maksimalno 12 tjedana, uz mogući gubitak od 2 kilograma tjedno (Witham i Avenell, 2010).

Iako su promjene prehrambenih navika značajnije za gubljenje tjelesne mase, tijekom dužeg perioda je tjelesna aktivnost važna kako bi se masa učinkovito gubila, a izgubljeni kilogrami se ne bi ponovno vratili. Također, tjelesnom aktivnošću je moguće ciljano gubiti masno tkivo i dobiti na mišićnoj masi. Postavlja se pitanje koliko točno tjelesne aktivnosti je potrebno za efektivno mršavljenje. Donnelly i sur. zaključuju da je 60 minuta srednje jačine vježbanja kao što je brzo hodanje, većinu dana u tjednu, dovoljno za prevenciju debljanja (Donnelly i sur., 2009).

Međutim, za efikasno mršavljenje je potrebno vježbati barem 150 minuta tjedno, i uključiti trening kojim će se tjedno gubiti od 1200 do 1800 kalorija. Potrebno je uvesti razne vrste treninga jer same vježbe snage nisu dovoljne da bi se održala učinkovita stopa mršavljenja. Aerobni trening je ključan za gubljenje visceralnog masnog tkiva (Ismail i sur., 2012). Prije početka takvih treninga, pacijentima je potrebno objasniti kako će trening izgledati i koje su njegove pozitivne posljedice, a u svakom trenutku je potrebno moći medicinski intervenirati, posebno ako se radi o pretilim pacijentima s kroničnim bolestima, poput bolesti srca.

Još jedna od životnih navika koja ima utjecaj na status tjelesne mase je pušenje. Dokazano je da pušenje općenito utječe na gubljenje na tjelesnoj masi, a prestanak pušenja će u 80 – 90 % slučajeva dovesti do dobitka na tjelesnoj masi. Otprilike 10 – 20 % pušača će dobiti oko 10 kilograma netom nakon što prestanu pušiti (Bush i sur., 2017). Iako se čini da je pušenje, s obzirom na predložene dokaze, rješenje za mršavljenje, to nikako nije slučaj. Negativni utjecaj pušenja na zdravlje i povećani rizici od razvoja bolesti u pušača su višestruko značajniji od jednog pozitivnog aspekta, mršavljenja.

Mnoga istraživanja dokazuju povezanost gubitka sna i dobitka na tjelesnoj masi. Spavanje je ključno za pravilno djelovanje neuroendokrinih funkcija što posljedično utječe na regulaciju apetita i koncentracije glukoze u krvi (Beccutia i Pannain, 2013). Vrijeme spavanja kraće od 6 sati utječe na promjene u odgovoru na glad i apetit, što rezultira preferiranjem hedonističkog uživanja hrane u odnosu na konzumaciju hrane zbog potrebe (Chaput i St-Onge, 2014).

Također, manjak spavanja bi mogao utjecati i na vrstu i količinu hrane koja se konzumira, s naglaskom na nutrijentima siromašnu i kalorijski bogatu hranu te povećane porcije obroka (St-Onge i sur., 2013). Također, postoji povezanost između toga da ljudi koji spavaju kraće jedu puno više obroka u danu. Istraživana je i povezanost vremena spavanja dužeg od 8 sati dnevno s pretilošću, ali je utvrđeno da je duže spavanje povezano s depresijom, koja se javlja kod pretilih ljudi. Također, dosta pacijenata koji kažu da spavaju duže od 8 sati u danu obično dio tog vremena budni leže bez spavanja (Knutson, 2012).

Kako bi se pretilost učinkovito liječila, potrebno je uzeti u obzir sve aspekte koji je uzrokuju. Promjena prehranbenih i životnih navika, posebno za svakog pacijenta, će dovesti do zamjetnih rezultata. Svakako se je potrebno savjetovati s liječnikom i nutricionistom kako bi se mršavljenje provelo na najzdraviji mogući način, imajući na umu i ostale bolesti koje se mogu javiti kod pretilih pacijenata.

1.5. Utjecaj sastava mikrobiote na razvoj pretilosti

1.5.1. Crijevna mikrobiota

Jedan od okolišnih čimbenika koji mogu doprinijeti uzroku pretilosti su mikroorganizmi nastanjeni u debelom crijevu. Mikrobiota ljudskog debelog crijeva se sastoji od otprilike 100 bilijuna (10^{12}) različitih mikroorganizama, a ukupni broj gena nađen u toj mikrobioti je 100 puta veći nego broj gena u ljudskom genomu (Qin i sur., 2010). Brojne su uloge tih mikroorganizama, kao na primjer sinteza vitamina K, B9 i biotina, razgradnja dijetalnih vlakana, održavanje zdravlja imunskog sustava i prevencija kolonizacije debelog crijeva patogenima. Mikroorganizmi debelog crijeva mogu razgraditi molekule koje organizam ne može, a to su uglavnom kompleksni ugljikohidrati i polisaharidi, koji se razgrađuju do kratkolančanih masnih kiselina kao što su butirac, propionat i acetat (Turnbaugh i sur., 2006).

Promjena u sastavu mikrobiote debelog crijeva bi mogla utjecati na razvoj pretilosti kroz mehanizme mijenjanja izlučivanja peptida iz debelog crijeva, promijenjenog metabolizma masnih kiselina te veći energetski unos kroz hranu koja prolazi kroz debelo crijevo (Musso i sur., 2010).

1.5.1.1. Istraživanja provedena na laboratorijskim životinjama

Istraživanja koja su prvotno dokazala povezanost između pretilosti i sastava mikrobiote debelog crijeva su bila provedena na laboratorijskim miševima koji nisu imali mikroorganizme u probavnom sustavu jer su cijelo vrijeme bili uzgajani u sterilnim uvjetima. Kad se mikrobiota iz normalnih miševa prenijela u miševima bez mikrobiote, u primatelja transplantanta je zamijećeno 60% povećanje udjela masnog tkiva u organizmu bez promjene u količini i vrsti hrane koju su jeli. Također, miševi bez mikrobiote u crijevima su mogli jesti veće količine kalorijski bogate i nutritivno siromašne hrane, a udebljati se manje od normalnih miševa koji su konzumirali istu vrstu i količinu hrane.

Nadalje, kad se mikrobiota iz pretilih miševa prenijela u miševima bez mikrobiote, oni su iz iste vrste hrane sintetizirali više energije, i s vremenom imali veći udio masnog tkiva u organizmu, u odnosu na miševima u koje je prenesena mikrobiota miševa normalne težine (Bäckhed i sur., 2004). Pretili laboratorijski miševi su imali manje raznolikosti mikrobiotu debelog crijeva od zdravih miševa, s povećanim udjelom mikroorganizama roda Firmicutes u odnosu na rod Bacteroidetes (Turnbaugh i sur., 2008). U pretilih miševa je također nađena viša koncentracija butirata u debelom crijevu, koji nastaje razgradnjom kompleksnih ugljikohidrata i primarna je hrana stanicama debelog crijeva.

Transplantirana mikrobiota iz pretilih miševa u miševima bez mikrobiote također utječe na promjenu ekspresije gena domaćina koji kodiraju za proteine koji sudjeluju u sintezi masnog tkiva. Jedan od takvih proteina je adipocitni faktor induciran postom (eng. *fasting-induced adipocyte factor*, FIAF), koji ima ključnu ulogu u reguliranju sinteze masnog tkiva. Kad dođe do njegove supresije, koju posreduje određena mikrobiota i mijenja ekspresiju gena koji kodira za FIAF, dolazi do povećane sinteze masnog tkiva iz triglicerida dobivenih iz razgrađene hrane. To dokazuje da se u pretilih subjekata uistinu iz iste hrane koju jedu i subjekti normalne težine sintetizira više energije (Bäckhed i sur., 2004).

Već je jedan dan promijenjene dijeta dovoljan da bi se promijenio i sastav mikrobiote, što je dokazano u laboratorijskim miševima kojima je u jednom danu promijenjena dijeta od one s visokim udjelom masti i malim udjelom vlakana na onu s niskim udjelom masti i visokim udjelom vlakana (Wu i sur., 2011).

1.5.1.2. Istraživanja provedena na ljudima

Istraživanja na ljudima su pokazala veći omjer mikroorganizama roda Firmicutes u usporedbi s rodom Bacteroidetes u debelom crijevu pretilih ljudi (Ley i sur., 2006). Povećani kalorijski unos rezultira povećanim udjelom mikroorganizama roda Firmicutes za otprilike 20 %, a istovremeno se udio mikroorganizama roda Bacteroidetes smanjuje za 20 % u ukupnom sastavu mikrobiote. To je dokazano i u pretilih osoba koje su konzumirale dijetu s niskim udjelom ugljikohidrata i masti te izgubile 25 % tjelesne mase u periodu od godinu dana (Ley i sur., 2005). Međutim, omjeri raznih rodova mikroorganizama su se mijenjali ovisno o periodu mršavljenja, vrsti hrane koja se konzumira, uzimanju antibiotika i drugim faktorima. Potvrđeno je da osobe normalne težine imaju veći broj vrsta mikroorganizama u ukupnom sastavu mikrobiote.

Na mikrobiotu debelog crijeva je moguće pozitivno utjecati i konzumacijom prebiotika te probiotika. Prebioticima se smatraju sastojci hrane koje ljudski organizam ne može probaviti, ali koji selektivno stimuliraju rast probiotičkih mikroorganizama, posebice bakterija roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Takvi sastojci hrane su na primjer oligosaharidi, poput inulina i rezistentnog škroba.

Probioticima se smatraju živi mikroorganizmi koji domaćinu pružaju određene zdravstvene prednosti. Dokazano je da povećanim unosom probiotičkih suplemenata ili hrane koja sadrži probiotike, može doći do značajnog gubitka na težini u laboratorijskih životinja (Yoo i sur., 2013), međutim u ljudi su rezultati istraživanja još uvijek nekonzistentni. Dror i sur. su dokazali kako promjena u mikrobioti čovjeka može dovesti do mršavljenja u odraslih ljudi, ali i do debljanja u djece (Dror i sur., 2017), dok su Million i sur. dokazali kako veća primjena iste vrste mikroorganizma roda *Lactobacillus* može potaknuti mršavljenje pretilih ispitanika, a istovremeno potaknuti debljanje u pothranjenih ispitanika (Million i sur., 2012).

Dosadašnja istraživanja pokazuju važnost sastava mikrobiote ljudskog debelog crijeva u razgradnji hrane, regulaciji metabolizma masti i sintezi energije. Postavlja se pitanje kako promjena u sastavu ljudske mikrobiote debelog crijeva utječe na općeniti status ljudskog zdravlja i prevenciju debljanja. Također, mikrobiota debelog crijeva je samo jedan dio ukupne mikrobiote koja nastanjuje ljudsko tijelo i više je istraživana u odnosu na sastav mikrobiote drugih dijelova probavnog sustava. Međutim, razlike u mikroflori usne šupljine u pretilih i osoba normalne težine nisu dovoljno istražene, iako i mikroflora usne šupljine ima značajnu ulogu u razvoju pretilosti.

1.5.2. Mikrobiota usne šupljine

S obzirom na dokaze o povezanosti sastava mikrobiote debelog crijeva i razvoja pretilosti, postavlja se pitanje o utjecaju mikrobiote usta na debljanje jer istraživanja pokazuju da postoji veza između sastava mikrobiote crijeva i mikrobiote usne šupljine (Kodukula i sur., 2017). Veza između mikrobiote usne šupljine i pretilosti je kompleksna i raznolika. Može biti uzročno-posljedična, kao odgovor na povećani kalorijski unos i hranu siromašnu nutrijentima, a može biti i oportunistička, u smislu proliferacije mikrobiote kao odgovora na promjene metabolizma (Goodson i sur., 2009).

Istraživanjima je dokazana značajna razlika između sastava mikrobiote usne šupljine u pretilih i zdravih pojedinaca. Broj različitih vrsta nađenih u mikrobioti usta pretilih pojedinaca je bio značajno manji nego u zdravih pojedinaca, što je u skladu s nađenim sastavima mikrobiote debelog crijeva, kao i prevladavanje mikroorganizama koji pripadaju koljenu Firmicutes, u odnosu na koljeno Bacteroidetes (Tam i sur., 2018). Pronađena je i veza između učestalosti pojave bakterija roda *Lactobacillus* u pretilih ljudi u procesu mršavljenja te je dokazano da će pretile osobe koje smanje unos ugljikohidrata imati više bakterija *Lactobacillus* u slini, u usporedbi s onima koji su u procesu mršavljenja, a konzumiraju iste ili veće količine ugljikohidrata nego prije mršavljenja (Rosing i sur., 2017).

Pretilost je uvelike povezana s razvojem dijabetesa melitusa tipa 2, a mikrobiota usne šupljine bi mogla imati ulogu u razvoju ili sprječavanju te bolesti. Shillitoe i sur. su proveli ispitivanje sastava sline na pacijentima s dijabetesom prije i poslije podvrgavanja operaciji ugradnje želučane premosnice, koja obično rezultira značajnim gubitkom tjelesne mase. Dvanaest tjedana nakon operacije, ispitanici su u slini imali deset puta veću koncentraciju bakterija iz roda *Bifidobacteria* te smanjenje koncentracije endotoksina i TNF α , a koji su povezani s razvojem rezistencije na inzulin (Shillitoe i sur., 2012). Zbog toga što pretilost uzrokuje povećanje koncentracije endotoksina i TNF α te uzrokuje rezistenciju na inzulin i razvoj dijabetesa melitusa tipa 2, nastaju mnogi upalni procesi u tijelu. Ti upalni procesi uzrokuju i bolesti usne šupljine, kao što je periodontitis. Glavni simptomi periodontitisa su krvarenje desni, crvenilo desni i neugodan zadah iz usta (Deshpande i Amrutiya, 2017).

Osim navedenih koljena bakterija, u pretilih pojedinaca je zamijećeno prevladavanje mikroorganizama iz koljena Proteobacteria, Fusobacterium i Actinobacterium. U koljenu Firmicutes, primijećene su statistički značajne razlike između koncentracije pojedinih vrsta u pretilih i zdravih pojedinaca. To se posebno odnosi na mikroorganizme *Selenomonas noxia*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* i *Veillonella parvula*. U zdravih osoba, mikroorganizmi iz roda *Streptococcus* čine 20 % sastava oralne mikrobiote, ali sa značajno više različitih vrsta nego u pretilih ljudi jer u pretilih ljudi dominiraju samo određene vrste. Iz koljena Proteobacteria je u pretilih

ljudi prevladavala *Neisseria mucosa*, a iz koljena Bacteroidetes mikroorganizmi roda *Prevotella* (Goodson i sur., 2009).

Zanimljivo je istaknuti da je mikrobiota usne šupljine promijenjena i u ljudi koji pate od apneje u spavanju (Xu i sur., 2018) što je jedna od učestalih posljedica pretilosti. Također, istraživanja pokazuju da je u slini pretilih pušača i pušača normalne težine statistički značajno prevladavala vrsta *Streptococcus sanguinis*, u odnosu na osobe koje su nepušači (Silva-Boghossian i sur., 2018).

Iako postoje određene hipoteze, potrebno je još mnogo istraživanja mikrobiote usne šupljine u pretilih i zdravih ljudi kako bi se odredio točan mehanizam pomoću kojeg promjena u sastavu mikrobiote utječe na razvoj pretilosti. Također, na sastav mikrobiote utječu prehrambene i životne navike poput tjelesne aktivnosti, promjene u dijeti, pušenja, duljine spavanja i ostalih životnih navika, a prikupljanje što više rezultata u raznim grupama pretilih ljudi omogućit će određenije zaključke.

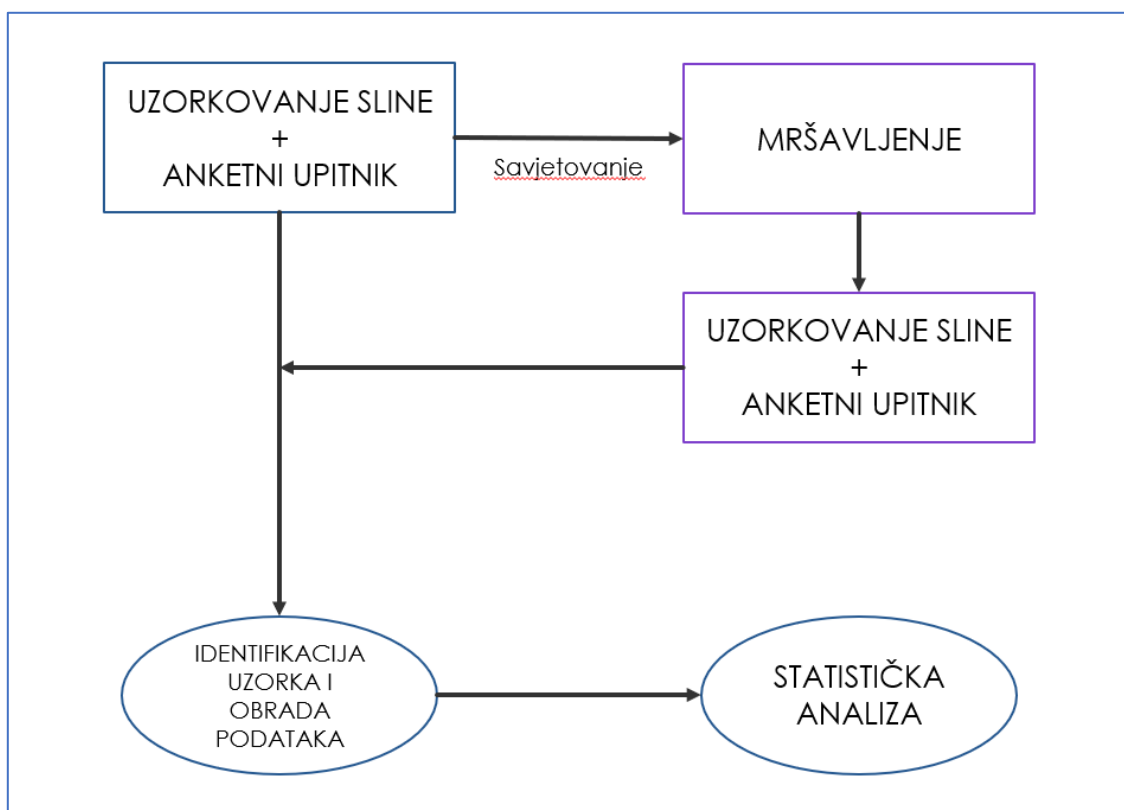
2. HIPOTEZA

Uzroci pretilosti su mnogi, od genetske podloge do raznih životnih i okolišnih čimbenika. Međutim, pretilost uvelike uzrokuju sedimentarni način života te unos kalorijski bogate i nutritivno siromašne hrane. Dokazano je da promjena prehrambenih i životnih navika rezultira gubljenjem tjelesne mase i posebno gubitkom masnog tkiva. Sa smanjenjem tjelesne mase, smanjuje se i rizik od razvoja bolesti koje se povezuju s pretilošću, kao što su dijabetes melitus tipa 2 te bolesti srca i krvožilnog sustava.

Također, jedan od okolišnih čimbenika koji utječe na razvoj pretilosti je i sastav mikrobiote crijevne mikroflore. Nadalje, dokazano je da se sastav crijevne mikrobiote mijenja s gubljenjem na tjelesnoj masi i promjenom životnih i prehrambenih navika. Navedene promjene povezane su i s promjenama sastava mikrobiote usne šupljine, a što do danas nije dovoljno istraženo.

Hipoteza ovog rada je da procesi mršavljenja i promjene prehrambenih i životnih navika utječu na sastav mikrobiote usne šupljine i uspješnost mršavljenja u skupini pretilih ispitanica Zagrebačke županije. Sastav mikrobiote usne šupljine će biti raznolikiji nakon mršavljenja na što će utjecati promjena u određenim prehrambenim i životnim navikama.

Tijek istraživanja u ovom radu prikazan je na slici 2.



Slika 2. Shematski prikaz tijeka istraživanja.

3. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE

3.1. ISPITANICI

Istraživanje je bilo otvorenog tipa u kojemu je sudjelovalo 17 sudionica koje su potpisale dobrovoljni pristanak i sudjelovale u bihevioralnom i strukturiranom petodnevnom programu liječenja debljine u Zavodu za endokrinologiju Interne klinike Rebro, KBC Zagreb. Nakon uključivanja u program liječenja debljine, uzeti su im osnovni podaci, te su im pružene podrška i potrebna znanja za promjene životnih i prehrambenih navika. Program uključuje i redovno kontroliranje izgubljene tjelesne mase nakon određenog vremenskog perioda.

Nakon potpisanog pristanka za sudjelovanje u istraživanju, pacijentice su ispunile anketni upitnik te se provelo mjerenje tjelesne visine i težine. Uzorkovanje sline (2 mL) provedeno je nakon ispiranja usne šupljine fiziološkom otopinom. Isto se ponovilo po povratku na kontrolu nakon određenog vremena mršavljenja.

Kriteriji za odabir sudionika istraživanja su bili:

- shvaćanje tijeka istraživanja i potpisani informirani pristanak,
- ITM viši od 30 kg/m^2 ,
- punoljetnost.

Zbog homogenosti skupine, za potrebe ovog istraživanja su odabrane samo osobe ženskog spola. Prosječna starost je bila $48,44 \pm 14,72$ godina, a visina $165,56 \pm 5,00$ cm. Prosječan ITM na prvom mjerenju je bio $41,99 \pm 7,31$.

Skupini pretilosti tipa I, gdje je ITM $30 - 34,9 \text{ kg/m}^2$, pripadalo je 11,76 % ispitanica. Skupini pretilosti tipa II, gdje je ITM $35 - 39,9 \text{ kg/m}^2$, pripadalo je 41,18 % ispitanica, a skupini pretilosti tipa 3, gdje je ITM $\geq 40 \text{ kg/m}^2$, pripadalo je 47,06 % ispitanica.

3.2. MATERIJAL

3.2.1. Upitnici o životnim i prehrabnim navikama

Anketni upitnik koji sudionice istraživanja ispunjavaju obuhvaća niz pitanja o relevantnim i osnovnim prehrabnim i životnim navikama kao što su razne skupine namirnica koje se konzumiraju te dnevno vrijeme sjedenja, vježbanja i spavanja. U tablici 1 su navedena postavljena pitanja u sklopu upitnika korištenog u ovom istraživanju.

Tablica 1. Pregled upitnika korištenog u istraživanju.

| Broj | Prehrabne navike |
|------|---|
| 1. | Koliko uobičajeno imate dnevnih obroka? |
| | A) jedan |
| | B) dva |
| | C) tri |
| | D) četiri |
| | E) pet ili više |
| 2. | Moja svakodnevna prehrana je: |
| | A) uravnotežena i raznolika (bogatija voćem) |
| | B) uravnotežena i raznolika (bogatija povrćem) |
| | C) uravnotežena i raznolika (jednako zastupljeno voće i povrće) |
| | D) bogata mesom i mesnim prerađevinama |
| | E) bogata slatkišima i grickalicama |
| | F) vegetarijanska |
| 3. | Doručujete li? |
| | A) ne |
| | B) da, neredovito |
| | C) da, redovito |
| 4. | Dodajete li sol svom obroku za stolom? |
| | A) nikada |
| | B) kad jelo nije dovoljno slano |
| | C) skoro uvijek prije nego što probam |
| 5. | Vaš dnevni unos tekućine je: |
| | A) manji od 1 litre |
| | B) između 1 i 2 litre |
| | C) veći od 2 litre |
| 6. | Što najviše pijete od tekućine? |
| | A) gazirane sokove |
| | B) negazirane sokove |
| | C) alkoholna pića (vino, pivo i sl.) |
| | D) žestoka alkoholna pića |
| | E) vodu |
| | F) sve od navedenog |
| 7. | Koliko kriški kruha obično pojedete dnevno? |
| | 1 - nijednu |
| | 2 - do tri |
| | 3 - četiri ili više |

| Broj | Prehrambene navike |
|------|---|
| 8. | Koliko često koristite maslinovo ulje? |
| | 1 – gotovo nikad, 5 – svaki dan |
| 9. | Konzumirate li mlijeko? |
| | A) da, ponekad |
| | B) da, svakodnevno |
| | C) ne pijem mlijeko |
| 10. | Konzumirate li mliječne preradevine (sir, vrhnje, jogurt i sl.)? |
| | A) da, ponekad |
| | B) da, svakodnevno |
| | C) ne |
| 11. | Koliko dnevno konzumirate porcija sljedećih namirnica? |
| | Voća? |
| | Povrća? |
| | Mesa? |
| | Ribe? |
| Broj | Životne navike i simptomi |
| 1. | Biste li rekli da je Vaše zdravlje bolje u odnosu na prošlu godinu? |
| | 1 - najbolje moguće, 5 - najgore moguće |
| 2. | Imate li problema kod obavljanja uobičajenih aktivnosti? |
| | 1- nemam nikakvih problema, 5 – imam velikih problema |
| 3. | Unazad 7 dana, koliko ste prosječno dnevno proveli vremena hodajući ili vježbajući? |
| | A) manje od 20 minuta |
| | B) pola sata |
| | C) 1 sat |
| | D) 2 sata |
| | E) više od 2 sata |
| 4. | Tijekom zadnjih 7 dana, koliko ste dana hodali u trajanju od najmanje 10 minuta bez prekida? |
| 5. | Unazad 7 dana, koliko ste prosječno dnevno proveli vremena sjedeći? |
| | A) manje od 1 sata |
| | B) oko 2 sata |
| | C) 3 do 4 sata |
| | D) 8 sati |
| | E) više od 8 sati |
| 6. | Unazad 7 dana, koliko ste prosječno dnevno proveli vremena spavajući? |
| | A) manje od 6 sati |
| | B) 6 do 7 sati |
| | C) 8 sati |
| | D) više od 8 sati |
| 7. | Jeste li pušač/ica? |
| | A) pušač |
| | B) povremeni pušač |
| | C) bivši pušač |
| | D) nepušač |
| 8. | Krvari li Vam iz desni, i ako da, koliko često? |
| | A) prilikom četkanja zubi često mi krvari iz desni |
| | B) prilikom četkanja zubi rijetko mi krvari iz desni |

| Broj | Životne navike i simptomi |
|------|--|
| 8. | Krvari li Vam iz desni, i ako da, koliko često? |
| | C) prilikom četkanja zubi nikada mi ne krvari iz desni |
| | D) spontano mi krvari iz desni |
| | E) nikada mi ne krvari iz desni |

3.2.2. Laboratorijska oprema za mikrobiološku analizu uzoraka sline

3.2.2.1. Pribor

- Aluminijska folija
- Automatske pipete (200, 1000 µL)
- Erlenmeyerove tikvice različitih volumena
- Kivete po Eppendorfu različitih volumena
- Laboratorijske žlice
- Ljepljiva traka
- Marker za pisanje
- Mikrobiološka ušica
- Papir za vaganje i zamatanje čepova
- Pipetni nastavci
- Plastične Petrijeve zdjelice
- Staklene čaše
- Staklene i plastične menzure različitih volumena
- Staničevina
- Štapić po Drigalskom
- Vata za pravljenje čepova

3.2.2.2. Kemikalije

- α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina (HCCA), MALDI matrica, *Bruker Daltonik*, Njemačka
- Acetonitril, LC-MS čistoće, *Fisher Chemical*, Velika Britanija
- Agar, *Kemika*, Hrvatska
- Amonijev citrat, *Kemika*, Hrvatska
- Amonijev dihidrogenfosfat (NH₄H₂PO₄), *Kemika*, Hrvatska
- Bakto-tripton, *Kemika*, Hrvatska
- Glicerol, *Kemika*, Hrvatska

- Kalijev dihidrogenfosfat (KH₂PO₄), *Kemika*, Hrvatska
- Kalijev klorid (KCl), *Kemika*, Hrvatska
- Kazein hidrozilat, *Kemika*, Hrvatska
- Kvašičev ekstrakt, *Kemika*, Hrvatska
- Manganov (II) sulfat tetrahidrat (MnSO₄ x 4 H₂O), *Kemika*, Hrvatska
- Magnezijev sulfat heptahidrat (MgSO₄ x 7 H₂O), *Kemika*, Hrvatska
- Man, Rogosa i Sharpe tekuća hranjiva podloga (MRS), *Biolife*, Velika Britanija
- Man, Rogosa i Sharpe kruta hranjiva podloga (MRS), *Biolife*, Velika Britanija
- Mravlja kiselina, p.a., *Fluka*, Sjedinjene Američke države
- Natrijev acetat, *Kemika*, Hrvatska
- Natrijev citrat, *Kemika*, Hrvatska
- Natrijev klorid (NaCl), *Kemika*, Hrvatska
- Natrijev hidrogenfosfat (Na₂HPO₄), *Kemika*, Hrvatska
- Trifluoro octena kiselina, p.a., *Sigma Aldrich*, Sjedinjene Američke Države
- Tween 80, *Kemika*, Hrvatska
- Voda, LC-MS čistoće, *Fisher Chemical*, Velika Britanija

3.2.2.3. Aparature

- Analitička vaga model 1712 MP8, Silver edition, *Sartorius*, Velika Britanija
- Aparatura za termostatiranje BTE-S, *Termo-medicinski aparati*, Hrvatska
- Laminar, *Iskra*, Slovenija
- Vaga, *Sartorius*, Velika Britanija
- Zamrzivač: Ultra low temperature freezer, *New Brunswick scientific*, SAD
- Microflex LT spektrometar masa, *Bruker Daltonik*, Njemačka

3.2.3. Pufferi

Za pripremu adekvatnih razrjeđenja uzoraka sline za nacjepljivanje na krute hranjive podloge je korišten fosfatni puffer (eng. *Phosphate Buffered Saline*, PBS). Sterilizacija puffera se provodi pri temperaturi 121°C i tlaku 1,01 x 10⁵ Pa. Sastav puffera je naveden u tablici 2.

Tablica 2. Sastav fosfatnog pufera.

| SASTOJAK | KOLIČINA |
|--|------------|
| NaCl | 8 g |
| KCl | 0,2 g |
| Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O | 1,15 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,2 g |
| Destilirana voda | do 1000 mL |

3.2.4. Hranjive podloge

U ovom radu su za aerobni uzgoj mikroorganizama iz uzoraka sline korištene kompletne hranjive podloge LB (eng. *Luria-Bertani*) i MRS (eng. *Man, Rogosa and Sharpe broth*) u krutom obliku. Korištene podloge su odabrane kako bi se uzgojio što veći broj različitih mikroorganizama, a što je bitno za mikrobiološku analizu nepoznatog sastava uzorka. Uzgoj se provodio u aerobnim uvjetima, a navedene hranjive podloge su pripremljene prema uputama proizvođača i sterilizirane u autoklavu 15 minuta pri temperaturi od 121°C i tlaku $1,01 \times 10^5$ Pa.

Kompletna hranjiva podloga MRS korištena je za uzgoj mikroorganizama iz roda *Lactobacillus*. Sastav tekuće podloge je naveden u tablici 3, a kruta hranjiva podloga se dobije tako da se prije sterilizacije u tekuću hranjivu podlogu doda agar u prahu u koncentraciji od 15 g/L.

Tablica 3. Sastav MRS kompletne hranjive podloge

| SASTOJAK | KOLIČINA |
|--|-------------|
| Glukoza | 20 g |
| Mesni ekstrakt | 10 g |
| Kvašćev ekstrakt | 10 g |
| Kazein hidrolizat | 10 g |
| Kalijev hidrogenfosfat | 5 g |
| Natrijev acetat | 2 g |
| Amonijev citrat | 2 g |
| MgSO ₄ × 7 H ₂ O | 0,1 g |
| MnSO ₄ × 4 H ₂ O | 0,05 g |
| Tween 80 | 1 mL |
| Destilirana voda | do 1 000 mL |

Kompletna hranjiva podloga LB je korištena za uzgoj bakterija. Sastav tekuće podloge je naveden u tablici 4, a kruta podloga se dobije tako da se prije sterilizacije u tekuću hranjivu podlogu doda agar u prahu u koncentraciji od 15 g/L.

Tablica 4. Sastav LB hranjive podloge u tekućem obliku.

| SASTOJAK | KOLIČINA |
|------------------|-----------------|
| Bakto-tripton | 10g |
| Kvašćev ekstrakt | 5g |
| NaCl | 5g |
| Destilirana voda | do 1000 mL |

3.2.5. Računalni programi

Za potrebe deskriptivne i analitičke statistike dobivenih podataka je korišten program Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, SAD). Za potrebe analize dobivenih spektara masa nakon spektrometrije masa izoliranih kolonija mikroorganizama je korištena programska podrška MALDI Biotyper 3.0.

3.3. METODE

3.3.1. Uzorkovanje sline

Uzorkovanje sline se provodilo na Zavodu za endokrinologiju Interne klinike Rebro, KBC Zagreb. Uzorci sline, u volumenu od 2 mL, su se pacijenticama uzimali poslije ispiranja usne šupljine s 10 mL fiziološke otopine te pohranjivali u sterilne epruvete od 15 mL i odmah spremale u hladnjak na -20°C . Nastavak istraživanja je proveden u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama gdje su epruvete s uzorcima pohranjene na temperaturi od -20°C u zamrzivaču prije same mikrobiološke analize.

3.3.2. Mikrobiološko ispitivanje sastava sline

3.3.2.1. Pripremanje decimalnih razrjeđenja

Kako bi se uzorci sline nacijepili na hranjive podloge, potrebno ih je razrijediti. Eksperimentalno je određeno da se razrjeđivanjem sline 100 puta (10^{-2}) postiže optimalna količina poraslih kolonija mikroorganizama koje se mogu prebrojati i koristiti za daljnju analizu. Originalni uzorci sline koji su bili zamrznuti na -20°C su prethodno ostavljeni na sobnoj temperaturi da se potpuno otope kako bi se mogli koristiti u pripremi uzoraka za identifikaciju mikroorganizama.

Decimalna razrjeđenja uzoraka sline pripremljena su na način da je 10^{-1} razrjeđenje dobiveno miješanjem 900 μL PBS-a i 100 μL originalnog uzorka sline te dobro promiješano na vorteks miješalici, a 10^{-2} miješanjem 100 μL suspenzije 10^{-1} razrjeđenja sline i 900 μL PBS-a. Svi postupci provodili su se u sterilnim laboratorijskim uvjetima rada.

3.3.2.2. Nacjepeljivanje uzoraka na hranjive podloge

Pripremljene otopine decimalnih razrjeđenja uzoraka sline se sterilnim postupkom nacjepeljuju na krute MRS i LB hranjive podloge. Svaki uzorak sline je paralelno nacijepljen na jednu LB i jednu MRS podlogu u volumenu od 100 μL razrjeđenja uzorka sline. Postupak nacjepeljivanja na krute hranjive podloge proveden je štapićem po Drygalskom tako da se uzorak sline kružnim pokretima razmazao po cijeloj površini ploče. Ploče su termostahirane na 37°C tijekom 48 sati.

3.3.2.3. Izolacija pojedinačnih kolonija

Nakon 48-satnog uzgoja na krutim hranjivim podlogama, uočene fenotipski različite kolonije su izolirane na odvojene hranjive podloge metodom iscrpljivanja kako bi se dobile čiste bakterijske kulture za analizu. Svaka odabrana kolonija je označena svojom specifičnom oznakom.

3.3.2.4. MALDI-TOF spektrometrija masa

Identifikacija pojedinačnih odabranih kolonija poraslih mikroorganizama iz uzoraka sline se provodila pomoću MALDI-TOF (eng. *matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight*, matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom s analizatorom vremena leta) spektrometrije masa u Laboratoriju za molekularnu i staničnu biologiju na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Mikroorganizmi su identificirani primjenom MALDI-TOF spektrometrije masa koristeći microflex LT spektrometar masa (*Bruker Daltonik*, Bremen, Njemačka) i programsku podršku MALDI Biotyper 3.0.

Pojedinačne izolirane kolonije mikroorganizama na krutim MRS i LB hranjivim podlogama se prenose sterilnim postupkom na MALDI pločicu te se na njih nanosi 1 µL mravlje kiseline. Nakon sušenja, potrebno je dodati i 1 µL otopine MALDI matrice (otopina α -cijano-4-hidroksicimetne kiseline u 50%-tnom acetonitrilu i 2,5%-tnoj trifluorooctenoj kiselini).

Sušenjem se matrica kristalizira, a uzorak koji je uhvaćen u matrici se ko-kristalizira. Laserska zraka ionizira uzorak uhvaćen u matrici te se generiraju pojedinačni ioni koji se ubrzavaju do unaprijed određenog potencijala i razdvajaju na osnovi razlike u njihovim omjerima mase i naboja. TOF (eng. *time of flight*, vrijeme leta) analizator mjeri vrijeme potrebno da ioni prođu kroz njegovu cijev te se tako generiraju karakteristični spektri masa, ovisno o uzorku. Proteini mikroorganizama koji se većinski detektiraju ovom metodom su ribosomalni.

Nakon toga se spektri masa uspoređuju s ostalim spektrima masa u bazama podataka, a programski algoritam računa povezanost između dobivenog spektra i spektara koji su pohranjeni u bazama podataka. Rezultati se izražavaju u obliku logaritamskih vrijednosti, koje mogu biti u rasponu od 0 – 3,000. Sigurno identificiranom vrstom mikroorganizma se smatra ona koja pokazuje logaritamsku vrijednost iznad 2,000, a logaritamska vrijednost između 1,700 i 1,999 pokazuje sigurnu identifikaciju na razini roda. Logaritamske vrijednosti ispod 1,700 pokazuju nepouzdanu identifikaciju mikroorganizma.

3.3.3. Statistička analiza

Za statističku obradu podataka je korišten Fisherov egzaktni test uz program Microsoft Excel 2016. Rezultati su izraženi u postocima, aritmetičkim sredinama i standardnim devijacijama aritmetičke sredine gdje je to bilo moguće.

Pomoću Fisherovog egzaktnog testa ispituje se statistički značajna različitost među dvije skupine podataka, a u ovom primjeru se koristio za validaciju sastava mikrobiote usne šupljine i odgovora na anketna pitanja među ispitanicama, prije i nakon procesa mršavljenja i promjene životnih navika.

Dvije su hipoteze Fisherovog egzaktnog testa, nulta i alternativna. Nulta hipoteza pretpostavlja da među dvjema ispitivanim skupinama nema statistički značajne razlike, a alternativna hipoteza pretpostavlja da među ispitivanim skupinama ima značajne razlike. Osim toga, odabire se razina značajnosti (p-vrijednost), a u slučaju preliminarnog istraživanja poput ovog, razina značajnosti bila je 0,1000. Svaki rezultat koji pokazuje razinu značajnosti manju od 0,1000 smatra se statistički značajnim.

4. REZULTATI

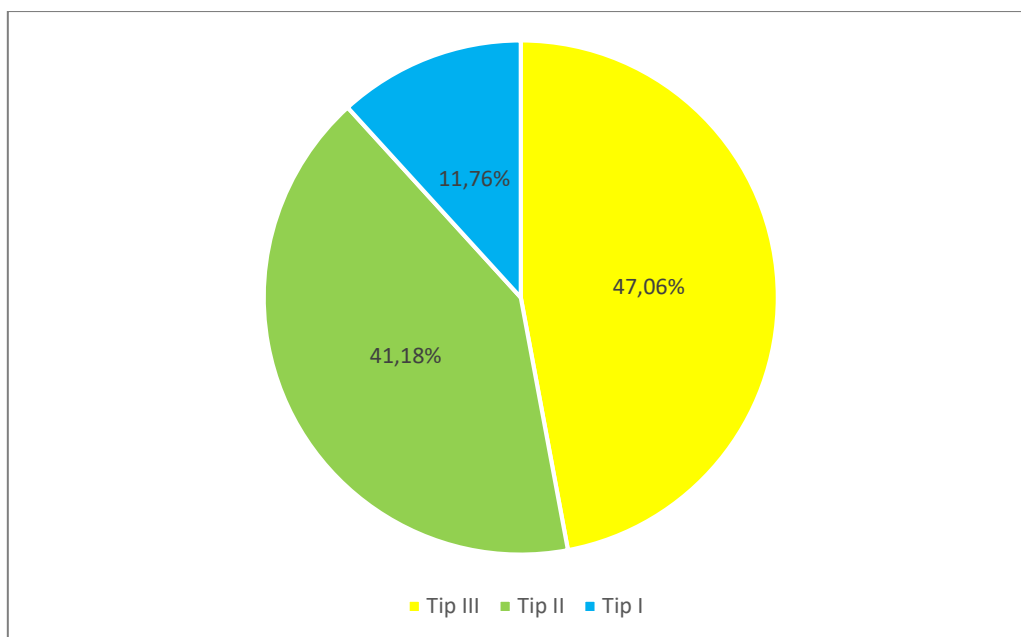
4.1. Rezultati mršavljenja

Istraživanje je provedeno na skupini od 17 pretilih ženskih osoba od kojih su sve promijenile prehrambene i životne navike prema uputama dobivenim na Zavodu za endokrinologiju Interne klinike Rebro, KBC Zagreb. Prosječna dob ispitivane skupine na početku istraživanja bila je $48,44 \pm 14,72$ godina, s rasponom od 23 do 69 godina. Prosječna visina ispitivane skupine bila je $165,56 \pm 5,00$ cm, s rasponom od 157 do 174 cm. Prosječni period mršavljenja kroz cijelu skupinu je bio $5,76 \pm 0,60$ mjeseci, s rasponom od 6 do 8 mjeseci.

Na početku istraživanja srednja vrijednost tjelesne mase skupine bila je $111,99 \pm 18,62$ kg, s rasponom od 80,30 do 148 kg. Na prvoj kontroli je srednja vrijednost tjelesne mase bila $105,58 \pm 17,68$ kg, s rasponom od 82,40 do 141 kg. ITM je izračunat iz tjelesne visine i tjelesne mase, a srednja vrijednost mu je na početku mršavljenja bila $41,99 \pm 7,31$ kg/m², što spada u pretilost tipa III (>40 kg/m²). Srednja vrijednost ITM nakon mršavljenja je bila $38,58 \pm 6,64$ kg/m² (35-39,9 kg/m²), što spada u pretilost tipa II.

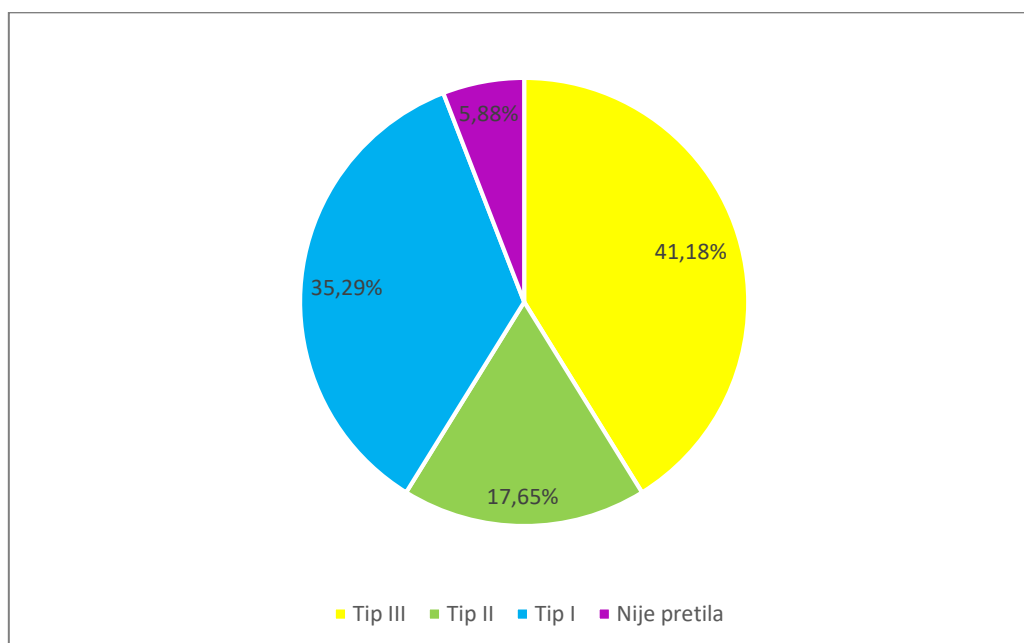
Statističkom usporedbom, koristeći t-test usporedbe očekivanja dvije skupine, gdje se vrijednost od $2p < 0,0500$ smatra statistički značajnom, dobiven je rezultat od $2p < 0,3286$.

Prije mršavljenja, 11,76 % ispitanica je pripadalo pretilosti tipa I (30-34,9 kg/cm²), 41,18 % ispitanica je pripadalo pretilosti tipa II, a 47,06 % ispitanica je pripadalo pretilosti tipa III, što je prikazano na slici 3.



Slika 3. Raspodjela ispitanica po tipovima pretilosti prije mršavljenja ($n = 17$).

Nakon mršavljenja, 41,18 % ispitanica je pripadalo pretilosti tipa III, 17,65 % ispitanica je pripadalo pretilosti tipa II, 35,29 % ispitanica je pripadalo pretilosti tipa I, a 5,88 % ispitanica je bilo prekomjerne težine, ali ne pretilo, što je prikazano na slici 4. Prosječni postotak izgubljene tjelesne mase bio je $5,56 \pm 4,62$ %, s rasponom od 0,09 do 16,00 %.



Slika 4. Raspodjela ispitanica po tipovima pretilosti nakon mršavljenja ($n = 17$).

4.2. Rezultati promjena prehrambenih i životnih navika

Pri uključivanju u program mršavljenja u sklopu Interne klinike Rebro, KBC Zagreb, sve ispitanice uključene u studiju su ispunile upitnike vezane za njihove prehrambene i životne navike. Nakon perioda mršavljenja su ponovno ispunile isti upitnik, a pitanja koja sadrži upitnik navedena su u cijelosti u tablicama 5 i 6. Nakon što su se prikupili podaci iz oba ispunjena upitnika, statistički su obrađeni, a rezultati su analizirani i međusobno uspoređeni kako bi se utvrdila razlika prije i nakon gubitka kilograma. Statistički značajnim rezultatima promjena prehrambenih i životnih navika smatraju se oni koji imaju p-vrijednost nižu od 0,1000. Rezultati usporedbe odgovora na upitnike o prehrambenim navikama su navedeni u tablici 5.

Tablica 5. Rezultati statističke obrade podataka o prehrambenim navikama (n=17).

| Prehrambene navike | Prije | Poslije | p - vrijednost |
|---|--------|---------|----------------|
| Koliko uobičajeno imate dnevnih obroka? | | | |
| A) jedan | 0,00% | 0,00% | 1,0000 |
| B) dva | 17,65% | 6,70% | 0,6029 |
| C) tri | 47,06% | 53,30% | 1,0000 |
| D) četiri | 29,41% | 26,70% | 1,0000 |
| E) pet ili više | 5,90% | 13,30% | 0,5887 |
| Moja svakodnevna prehrana je: | | | |
| A) uravnotežena i raznolika (bogatija voćem) | 17,65% | 25,00% | 0,3017 |
| B) uravnotežena i raznolika (bogatija povrćem) | 23,53% | 18,75% | 0,4915 |
| C) uravnotežena i raznolika (jednako zastupljeno voće i povrće) | 35,29% | 50,00% | 0,0449 |
| D) bogata mesom i mesnim prerađevinama | 41,18% | 18,75% | 0,0011 |
| E) bogata slatkišima i grickalicama | 5,90% | 6,30% | 1,0000 |
| F) vegetarijanska | 0,00% | 0,00% | 1,0000 |
| Doručujete li? | | | |
| A) ne | 11,76% | 12,50% | 0,6814 |
| B) da, neredovito | 35,29% | 37,50% | 0,7691 |
| C) da, redovito | 52,94% | 50,00% | 0,7773 |
| Dodajete li sol svom obroku za stolom? | | | |
| A) nikada | 58,90% | 58,90% | 1,0000 |
| B) kad jelo nije dovoljno slano | 41,18% | 41,18% | 1,0000 |
| C) skoro uvijek prije nego što probam | 0,00% | 0,00% | 1,0000 |
| Vaš dnevni unos tekućine je: | | | |
| A) manji od 1 litre | 17,65% | 6,30% | 0,0153 |
| B) između 1 i 2 litre | 76,47% | 87,50% | 0,0419 |
| C) veći od 2 litre | 5,90% | 6,30% | 1,0000 |
| Što najviše pijete od tekućine? | | | |
| A) gazirane sokove | 11,80% | 6,30% | 0,1380 |
| B) negazirane sokove | 5,90% | 6,30% | 1,0000 |
| C) alkoholna pića (vino, pivo i sl.) | 0,00% | 0,00% | 1,0000 |
| D) žestoka alkoholna pića | 0,00% | 0,00% | 1,0000 |
| E) vodu | 76,50% | 87,50% | 0,0617 |
| F) sve od navedenog | 5,90% | 0,00% | 0,0289 |

| Prehrambene navike | Prije | Poslije | p - vrijednost |
|---|--------|---------|--------------------|
| Koliko kriški kruha obično pojedete dnevno? | | | |
| 1 - nijednu | 11,76% | 25,00% | 0,0279 |
| 2 - do tri | 65% | 50,00% | 0,0449 |
| 3 - četiri ili više | 25,00% | 25,00% | 1,0000 |
| Koliko često koristite maslinovo ulje? | | | |
| 1 - najmanje, 5 - najviše (prosjeak) | 2,13 | 2,93 | <0,00001 |
| Konzumirate li mlijeko? | | | |
| A) da, ponekad | 47,10% | 37,50% | 0,2524 |
| B) da, svakodnevno | 23,50% | 31,30% | 0,3421 |
| C) ne pijem mlijeko | 29,40% | 31,30% | 0,8775 |
| Konzumirate li mliječne prerađevine (sir, vrhnje, jogurt i sl.)? | | | |
| A) da, ponekad | 52,90% | 68,80% | 0,0294 |
| B) da, svakodnevno | 41,20% | 18,80% | 0,0011 |
| C) ne | 5,90% | 12,50% | 0,1464 |
| Koliko dnevno konzumirate porcija sljedećih namirnica? | | | |
| Voće? (prosjeak) | 4,75 | 6,25 | <0,00001 |
| Povrće? (prosjeak) | 4,69 | 6,06 | <0,00001 |
| Meso? (prosjeak) | 4,59 | 4,38 | 0,0370 |
| Ribu? (prosjeak) | 0,88 | 1 | 0,2704 |

Broj dnevnih obroka koje su ispitanice konzumirale se nije značajno promijenio, ali je vidljivo neznatno smanjenje postotka ispitanica koje su konzumirale samo dva obroka dnevno (sa 17,65 % na 6,70 %, $p < 0,6029$) i povećanje postotka ispitanica koje su jele pet obroka dnevno (5,90 % na 13,30 %, $p < 0,5887$).

Raznovrsnost prehrane ispitanica se statistički značajno promijenila, što se odnosi na smanjenje unosa mesa i mesnih prerađevina ($p < 0,0011$) i povećanje raznolikosti konzumacije namirnica gdje je jednako zastupljeno voće i povrće ($p < 0,0449$).

Statistički značajna razlika u redovitosti konzumacije doručka se nije pojavila, s tim da je najveći postotak ispitanica tvrdio da redovno doručkuju, prije (52,94 %) i poslije mršavljenja (50,00 %, $p < 0,7773$). Nije bilo nikakve razlike u konzumaciji soli prije i poslije mršavljenja, a najveći postotak ispitanica je u oba slučaja (58,90 %, $p < 1,0000$) tvrdio da nikada ne dodaje sol obroku za stolom.

Pojavile su se značajne razlike u dnevnoj konzumaciji tekućine, gdje se postotak ispitanica koje unose manje od jedne litre tekućine smanjio ($p < 0,0153$), a onih koje unose između 1 i 2 litre tekućine povećao ($p < 0,0419$). Uz količinu tekućine, značajno se promijenio i postotak ispitanica koje su pile vodu među svim navedenim vrstama pića ($p < 0,0617$), a smanjio postotak ispitanica koje su konzumirale sve vrste pića ($p < 0,0289$).

Što se tiče unosa kruha, značajno se povećao postotak ispitanica koje nisu jele nijednu krišku dnevno ($p < 0,0279$) i smanjio se postotak ispitanica koje su jele do tri kriške kruha dnevno ($p < 0,0449$).

Statistički se značajno povećala učestalost korištenja maslinovog ulja u prehrani ($p < 0,00001$), a značajne promjene u dnevnoj konzumaciji mlijeka nije bilo. Međutim, došlo je do statistički značajne promjene u dnevnoj konzumaciji mliječnih prerađevina poput sira i jogurta, s porastom postotka ispitanica koje su konzumirale mliječne prerađevine ponekad ($p < 0,0294$) i smanjenjem postotka ispitanica koje su konzumirale mliječne prerađevine svakodnevno ($p < 0,0011$). Statistički značajna promjena u raznolikosti prehrane se ogleda i u porastu dnevne konzumacije voća ($p < 0,00001$), povrća ($p < 0,00001$) i smanjenjem dnevne konzumacije mesa ($p < 0,0370$).

Životne navike, u smislu promjene zdravstvenog stanja, pušenja, spavanja i tjelovježbe su ispitivane prije i nakon mršavljenja u istom upitniku. Rezultati usporedbe odgovora na upitnike o životnim navikama su navedeni u tablici 6.

Tablica 6. Rezultati statističke obrade podataka o životnim navikama i simptomima ($n=17$).

| Životne navike i simptomi | Prije | Poslije | p - vrijednost |
|--|--------------|----------------|-----------------------|
| Biste li rekli da je Vaše zdravlje bolje u odnosu na prošlu godinu? | | | |
| 1 - najbolje moguće, 5 - najgore moguće (prosjeak) | 3,18 | 2,71 | 0,0031 |
| Imate li problema kod obavljanja uobičajenih aktivnosti? | | | |
| 1- nemam nikakvih problema, 5 – imam velikih problema (prosjeak) | 1,76 | 1,41 | 0,0208 |
| Unazad 7 dana, koliko ste prosječno dnevno proveli vremena hodajući ili vježbajući? | | | |
| A) manje od 20 minuta | 29,41% | 31,30% | 0,8775 |
| B) pola sata | 0,00% | 0,00% | 1,0000 |
| C) 1 sat | 17,65% | 43,80% | 0,0001 |
| D) 2 sata | 29,41% | 12,50% | 0,0087 |
| E) više od 2 sata | 23,53% | 12,50% | 0,0676 |
| Tijekom zadnjih 7 dana, koliko ste dana hodali u trajanju od najmanje 10 minuta bez prekida? (prosjeak) | 4,4 | 5,73 | <0,0001 |
| Unazad 7 dana, koliko ste prosječno dnevno proveli vremena sjedeći? | | | |
| A) manje od 1 sata | 0,00% | 12,50% | 0,0002 |
| B) oko 2 sata | 0,00% | 0,00% | 1,0000 |
| C) 3 do 4 sata | 64,71% | 62,50% | 0,8830 |
| D) 8 sati | 11,76% | 12,50% | 0,4349 |
| E) više od 8 sati | 23,53% | 12,50% | 0,0676 |
| Unazad 7 dana, koliko ste prosječno dnevno proveli vremena spavajući? | | | |
| A) manje od 6 sati | 29,41% | 25,00% | 0,6330 |
| B) 6 do 7 sati | 47,06% | 62,50% | 0,0327 |
| C) 8 sati | 5,90% | 12,50% | 0,1464 |
| D) više od 8 sati | 17,60% | 0,00% | <0,00001 |
| Jeste li pušač/ica? | | | |
| A) pušač | 17,65% | 23,53% | 0,3856 |
| B) povremeni pušač | 5,90% | 5,90% | 1,0000 |
| C) bivši pušač | 29,41% | 23,53% | 0,5218 |
| D) nepušač | 47,06% | 41,18% | 0,4764 |

| Životne navike i simptomi | Prije | Poslije | p - vrijednost |
|--|--------------|----------------|-----------------------|
| Krvari li Vam iz desni, i ako da, koliko često? | | | |
| A) prilikom četkanja zubi često mi krvari iz desni | 17,65% | 11,76% | 0,3222 |
| B) prilikom četkanja zubi rijetko mi krvari iz desni | 52,94% | 47,06% | 0,4796 |
| C) prilikom četkanja zubi nikada mi ne krvari iz desni | 0,00% | 11,76% | 0,0003 |
| D) spontano mi krvari iz desni | 17,65% | 5,90% | 0,0153 |
| E) nikada mi ne krvari iz desni | 11,76% | 23,53% | 0,0419 |

Statistički značajnim se pokazala promjena u mišljenju ispitanica o njihovom općenitom stanju zdravlja, gdje su ispitanice nakon mršavljenja smatrale njihovo stanje zdravlja zamjetno boljim u odnosu na prošlu godinu ($p < 0,0031$). Također, nakon mršavljenja je veći postotak ispitanica imao manje problema kod obavljanja tjelesnih aktivnosti ($p < 0,0208$). Što se tiče učestalosti tjelovježbe, značajno se smanjio postotak ispitanica koje su vježbale 2 sata tjedno ($p < 0,0087$) i više od 2 sata ($p < 0,0676$), ali se povećao postotak ispitanica koje su vježbale 1 sat tjedno ($p < 0,0001$). Također se značajno povećao i broj dana u tjednu u kojem su ispitanice hodale bar 10 minuta dnevno ($p < 0,0001$). Značajno se povećao i postotak ispitanica kod kojih se smanjilo dnevno vrijeme sjedenja na manje od jednog sata ($p < 0,0002$), a smanjio se postotak ispitanica koje su sjedile više od 8 sati dnevno ($p < 0,0676$).

Što se tiče navika spavanja, značajno se smanjio postotak ispitanica koje su spavale više od 8 sati dnevno ($p < 0,00001$), a povećao postotak ispitanica koje su spavale 6 do 7 sati dnevno ($p < 0,0327$). Nisu primijećene značajne promjene u pušenju, ali su zamijećene promjene u učestalosti krvarenja desni kod ispitanica. Povećao se postotak ispitanica kojima nikada ne krvari iz desni ($p < 0,0419$) te kojima nikada ne krvari iz desni prilikom četkanja zubi ($p < 0,0003$), a smanjio postotak ispitanica kojima spontano krvari iz desni ($p < 0,0153$).

4.3. Rezultati analize mikrobiološkog sastava uzoraka sline

Nakon što su se uzorci sline skupine pretilih ispitanica, uzorkovani prije i poslije mršavljenja, razrijedili i nacijepili na LB i MRS hranjive podloge, uzgojeni su, izolirani i identificirani spektrometrijom masa. Kako bi se rezultati identifikacije mikroorganizama iz uzoraka sline lakše statistički obradili, mikroorganizmi su svrstani u pripadajuća koljena. Za statističku usporedbu učestalosti pojave pojedinih mikroorganizama korišten je Fisherov egzaktni test s razinom značajnosti $p = 0,1000$, zbog manjeg broja ispitanika koji su sudjelovali u istraživanju. To znači da će svaki rezultat usporedbe učestalosti mikroorganizama biti statistički značajan ako je za taj uzorak $p < 0,1000$.

Iz uzoraka sline skupine ispitanica uzetih prije mršavljenja, izolirane su i identificirane 77 različite vrste mikroorganizama, koje su pripadale koljenima Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria i Bacteroidetes. Nakon mršavljenja, iz uzoraka sline skupine ispitanica je izolirano i identificirano 107 različitih vrsta mikroorganizama, koje su pripadale koljenima Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes i Ascomycota.

U tablici 7 prikazana je statistička usporedba učestalosti pojave mikroorganizama iz pojedinih koljena, prije i nakon mršavljenja.

Tablica 7. Prikaz statističke učestalosti pojave mikroorganizama pojedinih koljena u uzorcima ispitanica, prije i nakon mršavljenja.

| Koljeno | Prije mršavljenja, n = 77 | % | Poslije mršavljenja, n = 107 | % | p - vrijednost |
|-----------------------|--------------------------------------|----------|---|----------|-----------------------|
| Firmicutes | 44 | 59,46 | 57 | 53,27 | 0,3922 |
| Proteobacteria | 22 | 29,73 | 34 | 31,78 | 0,8775 |
| Actinobacteria | 9 | 12,16 | 14 | 13,08 | 1 |
| Bacteroidetes | 2 | 2,70 | 1 | 0,90 | 0,6212 |
| Ascomycota | 0 | 0,00 | 1 | 0,90 | 1 |

Rodovi *Aeromonas*, *Acidovorax*, *Moraxella* i *Chryseobacterium* su se prije mršavljenja pojavili u uzorcima slina od barem dvije različite ispitanice, dok se nisu uopće pojavili u uzorcima slina ispitanica nakon mršavljenja. Rodovi *Viridibacillus*, *Burkholderia*, *Neisseria*, *Cupravidius*, *Kocuria* i *Rhizobium* su se pojavili u uzorcima slina od barem dvije ispitanice nakon mršavljenja, ali prije mršavljenja uopće nisu detektirani.

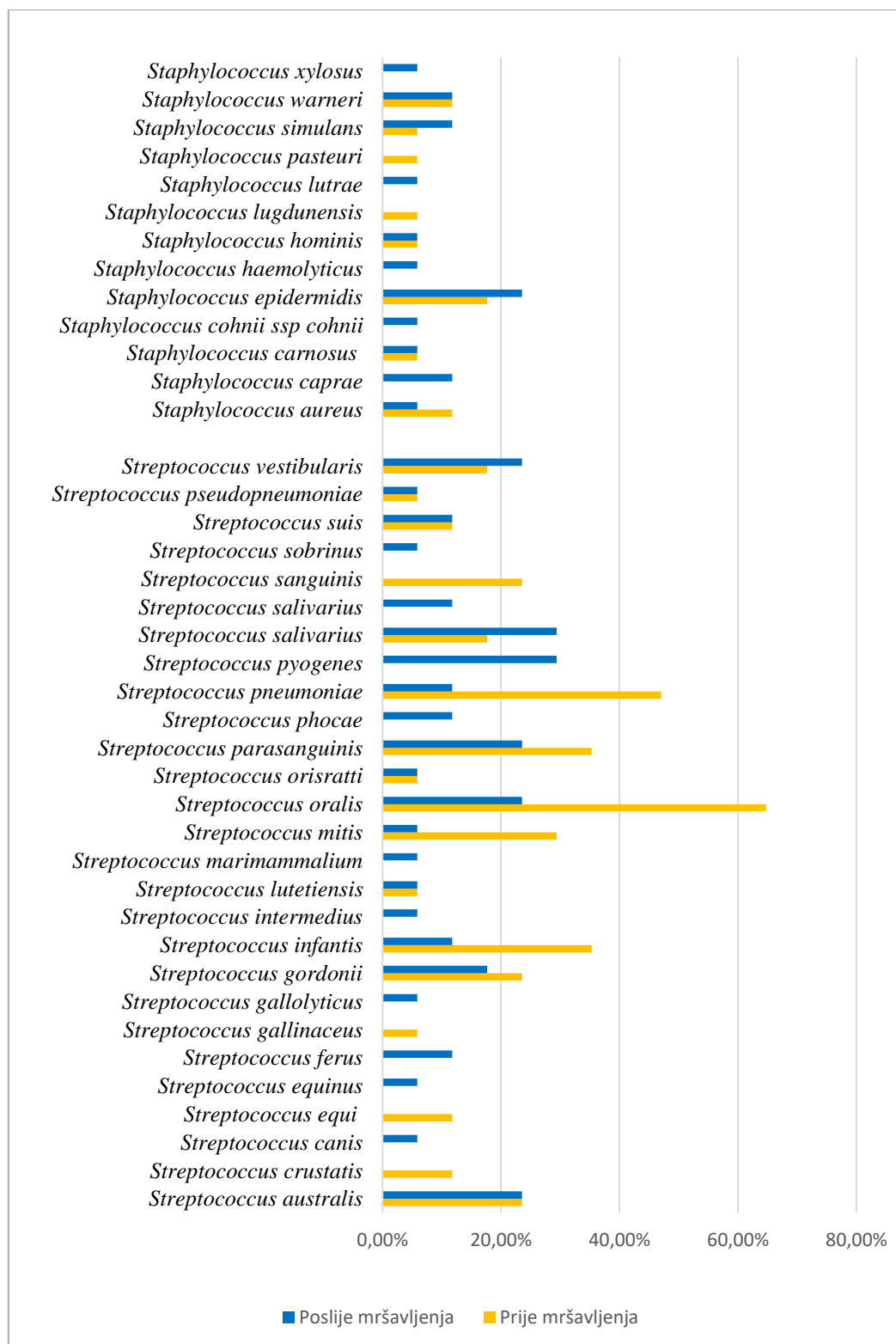
Usporedba učestalosti mikroorganizama je prikazana posebno za svako koljeno kojemu ti mikroorganizmi pripadaju. U tablici 8, prikazani su rezultati usporedbe za koljeno Firmicutes, u tablici 9 za koljeno Actinobacteria, u tablici 10 za koljeno Proteobacteria, u tablici 11 za koljeno Bacteroidetes, a u tablici 12 za koljeno Ascomycetes. Također je grafički prikazana učestalost identificiranih mikroorganizama na slikama 5 do 10.

Tablica 8. Prikaz statističke usporedbe učestalosti pojave mikroorganizama iz koljena Firmicutes prije i poslije mršavljenja po broju i postotku u pretilih ispitanica. Plavom bojom su označeni mikroorganizmi gdje su rezultati statistički značajni.

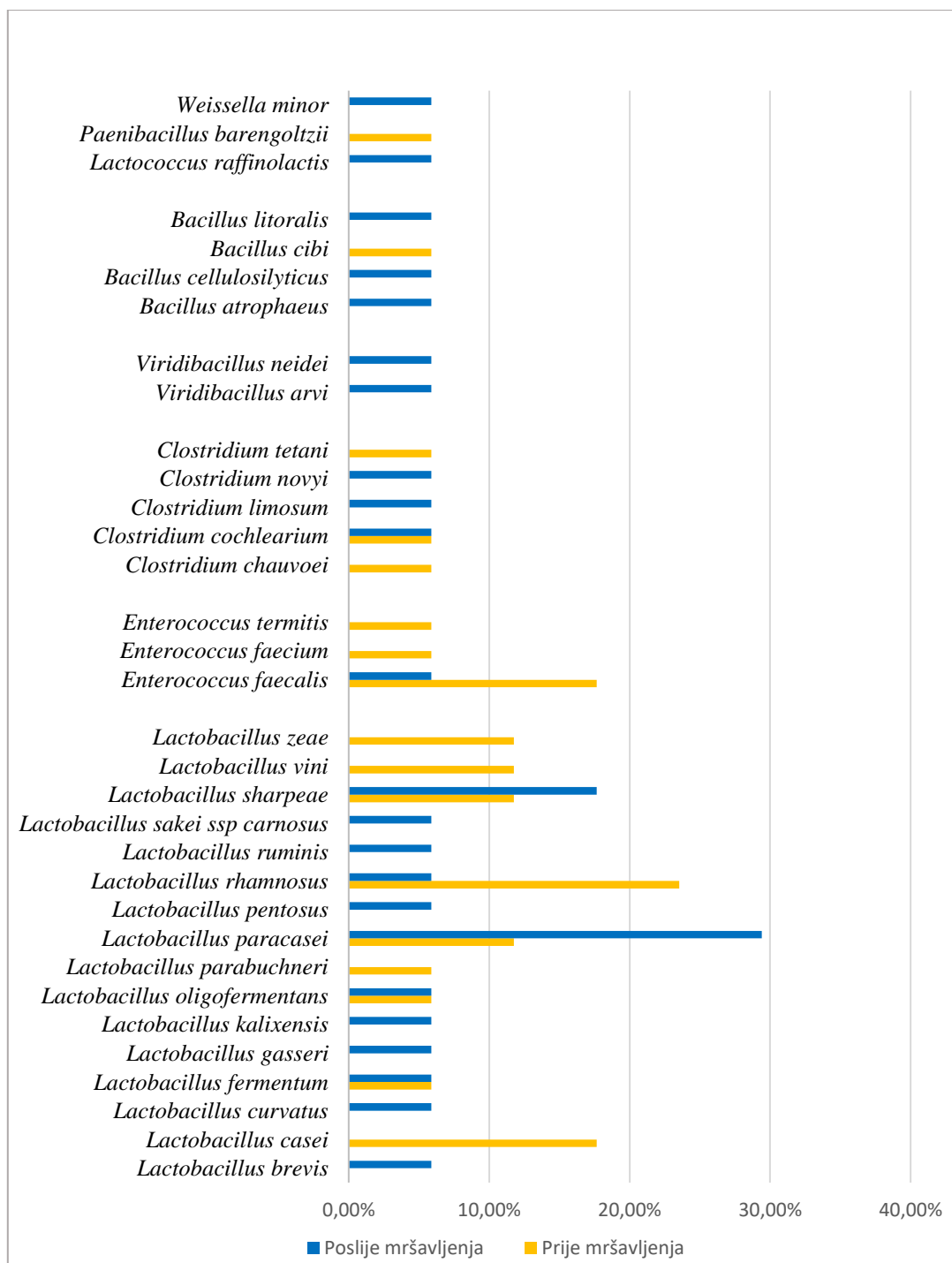
| | Mikroorganizmi | Prije mršavljenja, n = 17 | % | Poslije mršavljenja, n = 17 | % | p - vrijednost |
|------------|--|---------------------------------|--------------|-----------------------------------|--------------|----------------|
| Firmicutes | <i>Streptococcus australis</i> | 4 | 23,53 | 4 | 23,53 | 1,0000 |
| | <i>Streptococcus crustatis</i> | 2 | 11,76 | 0 | 0,00 | 0,4848 |
| | <i>Streptococcus canis</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Streptococcus equi</i> | 2 | 11,76 | 0 | 0,00 | 0,4848 |
| | <i>Streptococcus equinus</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Streptococcus ferus</i> | 0 | 0,00 | 2 | 11,76 | 0,4848 |
| | <i>Streptococcus gallinaceus</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| | <i>Streptococcus gallolyticus</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Streptococcus gordonii</i> | 4 | 23,53 | 3 | 17,65 | 1,0000 |
| | <i>Streptococcus infantis</i> | 6 | 35,29 | 2 | 11,76 | 0,2245 |
| | <i>Streptococcus intermedius</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Streptococcus lutetiensis</i> | 1 | 5,88 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Streptococcus marimammalium</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Streptococcus mitis</i> | 5 | 29,41 | 1 | 5,88 | 0,1748 |
| | <i>Streptococcus oralis</i> | 11 | 64,71 | 4 | 23,53 | 0,0366 |
| | <i>Streptococcus orisratti</i> | 1 | 5,88 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Streptococcus parasanguinis</i> | 6 | 35,29 | 4 | 23,53 | 0,7080 |
| | <i>Streptococcus phocae</i> | 0 | 0,00 | 2 | 11,76 | 0,4848 |
| | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 8 | 47,06 | 2 | 11,76 | 0,0570 |
| | <i>Streptococcus pyogenes</i> | 0 | 0,00 | 5 | 29,41 | 0,0455 |
| | <i>Streptococcus salivarius</i> | 3 | 17,65 | 5 | 29,41 | 0,6880 |
| | <i>Streptococcus salivarius</i> | 0 | 0,00 | 2 | 11,76 | 0,4848 |
| | <i>Streptococcus sanguinis</i> | 4 | 23,53 | 0 | 0,00 | 0,1026 |

| Mikroorganizmi | Prije mršavljenja, n = 17 | % | Poslije mršavljenja, n = 17 | % | p - vrijednost |
|---------------------------------------|---------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|----------------|
| <i>Streptococcus sobrinus</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Streptococcus suis</i> | 2 | 11,76 | 2 | 11,76 | 1,0000 |
| <i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> | 1 | 5,88 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Streptococcus vestibularis</i> | 3 | 17,65 | 4 | 23,53 | 1,0000 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 2 | 11,76 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Staphylococcus caprae</i> | 0 | 0,00 | 2 | 11,76 | 0,4848 |
| <i>Staphylococcus carnosus</i> | 1 | 5,88 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Staphylococcus cohnii</i> | 0 | 0,0 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 3 | 17,65 | 4 | 23,53 | 1,0000 |
| <i>Staphylococcus hominis</i> | 1 | 5,88 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Staphylococcus lugdunensis</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| <i>Staphylococcus lutrae</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Staphylococcus pasteurii</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| <i>Staphylococcus simulans</i> | 1 | 5,88 | 2 | 11,76 | 1,0000 |
| <i>Staphylococcus warneri</i> | 2 | 11,76 | 2 | 11,76 | 1,0000 |
| <i>Staphylococcus xylosum</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Lactobacillus brevis</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Lactobacillus casei</i> | 3 | 17,65 | 0 | 0,00 | 0,2273 |
| <i>Lactobacillus curvatus</i> | 0 | 0,00% | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> | 1 | 5,88 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Lactobacillus gasseri</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Lactobacillus kalixensis</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Lactobacillus oligofermentans</i> | 1 | 5,88 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Lactobacillus parabuchneri</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |

| Mikroorganizmi | Prije mršavljenja, n = 17 | % | Poslije mršavljenja, n = 17 | % | p - vrijednost |
|-----------------------------------|---------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|----------------|
| <i>Lactobacillus paracasei</i> | 2 | 11,76 | 5 | 29,41 | 0,3983 |
| <i>Lactobacillus pentosus</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | 4 | 23,53 | 1 | 5,88 | 0,3353 |
| <i>Lactobacillus ruminis</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Lactobacillus sakei</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Lactobacillus sharpeae</i> | 2 | 11,76 | 3 | 17,65 | 1,0000 |
| <i>Lactobacillus vini</i> | 2 | 11,76 | 0 | 0,00 | 0,4848 |
| <i>Lactobacillus zeae</i> | 2 | 11,76 | 0 | 0,00 | 0,4848 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 3 | 17,65 | 1 | 5,88 | 0,6012 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| <i>Enterococcus termitis</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| <i>Clostridium chauvoei</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| <i>Clostridium cochlearium</i> | 1 | 5,88 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Clostridium limosum</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Clostridium novyi</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Clostridium tetani</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| <i>Viridibacillus arvi</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Viridibacillus neidei</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Bacillus atrophaeus</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Bacillus cellulosilyticus</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Bacillus cibi</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| <i>Bacillus litoralis</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Lactococcus raffinolactis</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Paenibacillus barengoltzii</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| <i>Weissella minor</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |



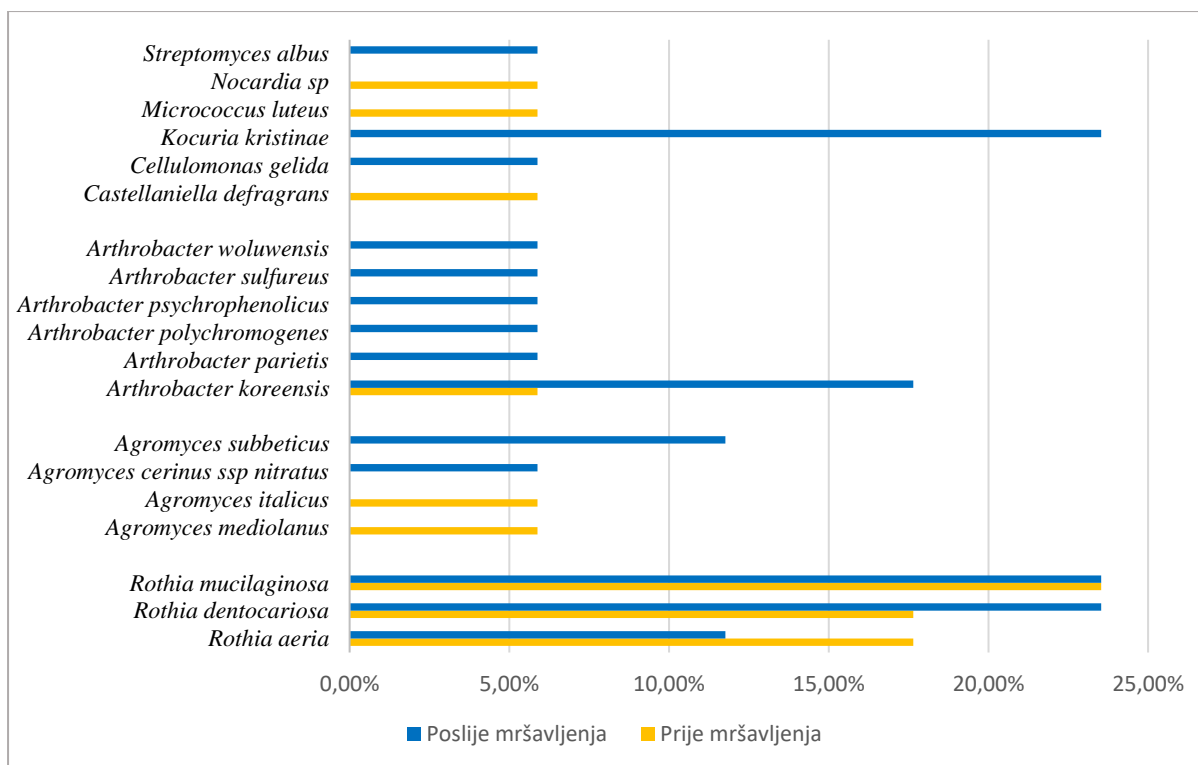
Slika 5. Usporedba učestalosti pojave određenih mikroorganizama iz koljena Firmicutes u pretilih ispitanica prije i poslije mršavljenja (n=17).



Slika 6. Usporedba učestalosti pojave određenih mikroorganizama iz koljena Firmicutes u pretilih ispitanica prije i poslije mršavljenja (n=17).

Tablica 9. Prikaz statističke usporedbe učestalosti pojave mikroorganizama iz koljena Actinobacteria prije i poslije mršavljenja po broju i postotku u pretilih ispitanica.

| | Mikroorganizmi | Prije mršavljenja, n = 17 | % | Poslije mršavljenja, n=17 | % | p - vrijednost |
|-----------------------|-------------------------------------|--|----------|--|----------|-----------------------|
| Actinobacteria | <i>Rothia aeria</i> | 3 | 17,65 | 2 | 11,76 | 1,0000 |
| | <i>Rothia dentocariosa</i> | 3 | 17,65 | 4 | 23,53 | 1,0000 |
| | <i>Rothia mucilaginoso</i> | 4 | 23,53 | 4 | 23,53 | 1,0000 |
| | <i>Agromyces mediolanus</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| | <i>Agromyces italicus</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| | <i>Agromyces cerinus</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Agromyces subbeticus</i> | 0 | 0,00 | 2 | 11,76 | 0,4848 |
| | <i>Arthrobacter koreensis</i> | 1 | 5,88 | 3 | 17,65 | 0,6012 |
| | <i>Arthrobacter parietis</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Arthrobacter polychromogenes</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Arthrobacter psychrophenicus</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Arthrobacter sulfureus</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Arthrobacter woluwensis</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Castellaniella defragrans</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| | <i>Cellulomonas gelida</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Kocuria kristinae</i> | 0 | 0,00 | 4 | 23,53 | 0,1026 |
| | <i>Micrococcus luteus</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| | <i>Nocardia sp.</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| | <i>Streptomyces albus</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |

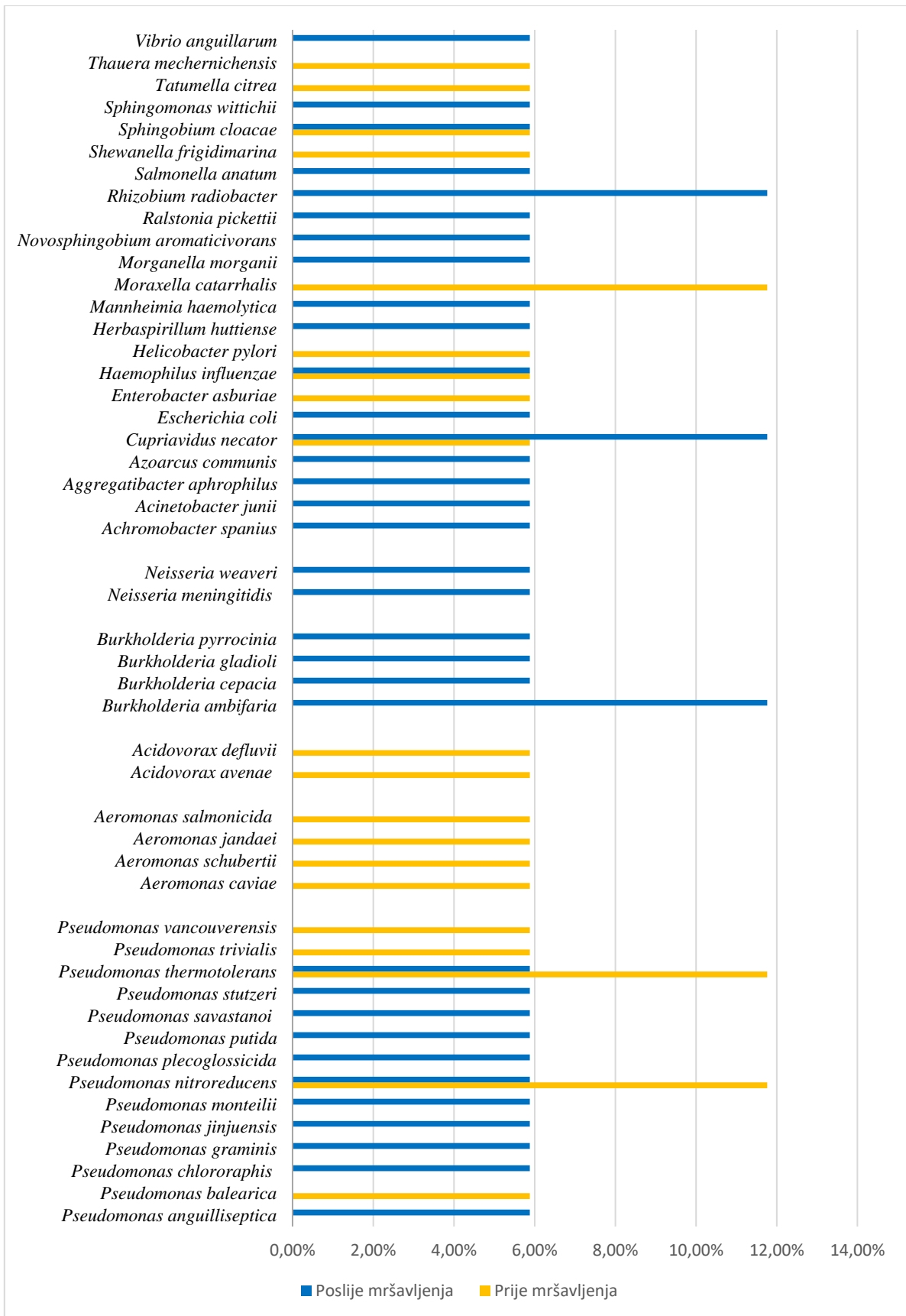


Slika 7. Usporedba učestalosti pojave određenih mikroorganizama iz koljena Actinobacteria u pretelih ispitanica prije i poslije mršavljenja (n=17).

Tablica 10. Prikaz statističke usporedbe učestalosti pojave mikroorganizama iz koljena Proteobacteria prije i poslije mršavljenja po broju i postotku u pretelih ispitanica.

| | Mikroorganizmi | Prije mršavljenja, n = 17 | % | Poslije mršavljenja, n = 17 | % | p - vrijednost |
|----------------|------------------------------------|---------------------------|-------|-----------------------------|------|----------------|
| Proteobacteria | <i>Pseudomonas anguilliseptica</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Pseudomonas balearica</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| | <i>Pseudomonas chlororaphis</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Pseudomonas graminis</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Pseudomonas jinjuensis</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Pseudomonas monteilii</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Pseudomonas nitroreducens</i> | 2 | 11,76 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Pseudomonas putida</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Pseudomonas savastanoi</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Pseudomonas stutzeri</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Pseudomonas thermotolerans</i> | 2 | 11,76 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| | <i>Pseudomonas trivialis</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |

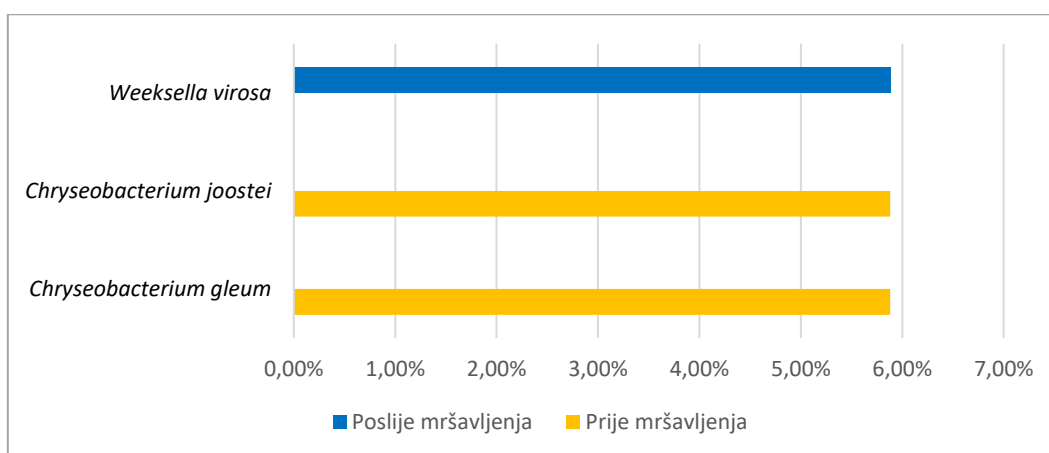
| Mikroorganizmi | Prije mršavljenja, n = 17 | % | Poslije mršavljenja, n = 17 | % | p - vrijednost |
|--|--|----------|--|----------|-----------------------|
| <i>Pseudomonas vancouverensis</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| <i>Aeromonas caviae</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| <i>Aeromonas schubertii</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| <i>Aeromonas jandaei</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| <i>Aeromonas salmonicida</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| <i>Acidovorax avenae</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| <i>Acidovorax defluvii</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| <i>Burkholderia ambifaria</i> | 0 | 0,00 | 2 | 11,76 | 0,4848 |
| <i>Burkholderia cepacia</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Burkholderia gladioli</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Burkholderia pyrrocinia</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Neisseria weaveri</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Achromobacter spanius</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Acinetobacter junii</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Aggregatibacter aphrophilus</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Azoarcus communis</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Cupriavidus necator</i> | 1 | 5,88 | 2 | 11,76 | 1,0000 |
| <i>Escherichia coli</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88% | 1,0000 |
| <i>Enterobacter asburiae</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | 1 | 5,88 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Helicobacter pylori</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| <i>Herbaspirillum huttiense</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Mannheimia haemolytica</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Moraxella catarrhalis</i> | 2 | 11,76 | 0 | 0,00 | 0,4848 |
| <i>Morganella morgani</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Novosphingobium aromaticivorans</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Ralstonia pickettii</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Rhizobium radiobacter</i> | 0 | 0,00 | 2 | 11,76 | 0,4848 |
| <i>Salmonella anatum</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Shewanella frigidimarina</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| <i>Sphingobium cloacae</i> | 1 | 5,88 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Sphingomonas wittichii</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |
| <i>Tatumella citrea</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| <i>Thauera mechernichensis</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| <i>Vibrio anguillarum</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |



Slika 8. Usporedba učestalosti pojave određenih mikroorganizama iz koljena Proteobacteria u pretilih ispitanica prije i poslije mršavljenja (n=17).

Tablica 11. Prikaz statističke usporedbe učestalosti pojave mikroorganizama iz koljena Bacteroidetes prije i poslije mršavljenja po broju i postotku u pretilih ispitanica.

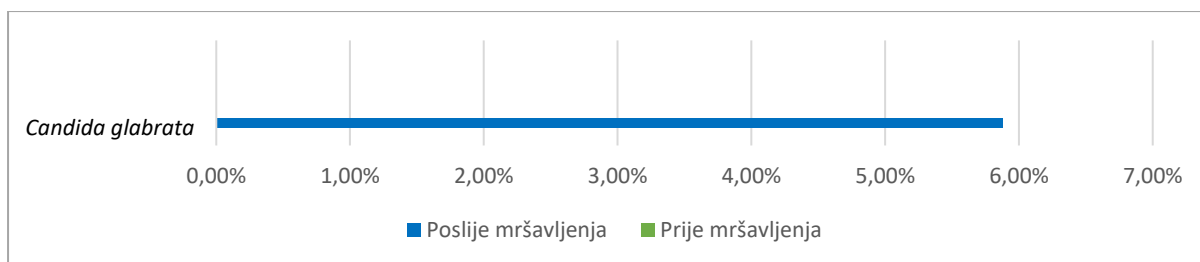
| | Mikroorganizmi | Prije mršavljenja, n = 17 | % | Poslije mršavljenja, n = 17 | % | p - vrijednost |
|---------------|---------------------------------|---------------------------|------|-----------------------------|------|----------------|
| Bacteroidetes | <i>Chryseobacterium gleum</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| | <i>Chryseobacterium joostei</i> | 1 | 5,88 | 0 | 0,00 | 1,0000 |
| | <i>Weeksella virosa</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |



Slika 9. Usporedba učestalosti pojave određenih mikroorganizama iz koljena Bacteroidetes u pretilih ispitanica prije i poslije mršavljenja (n=17).

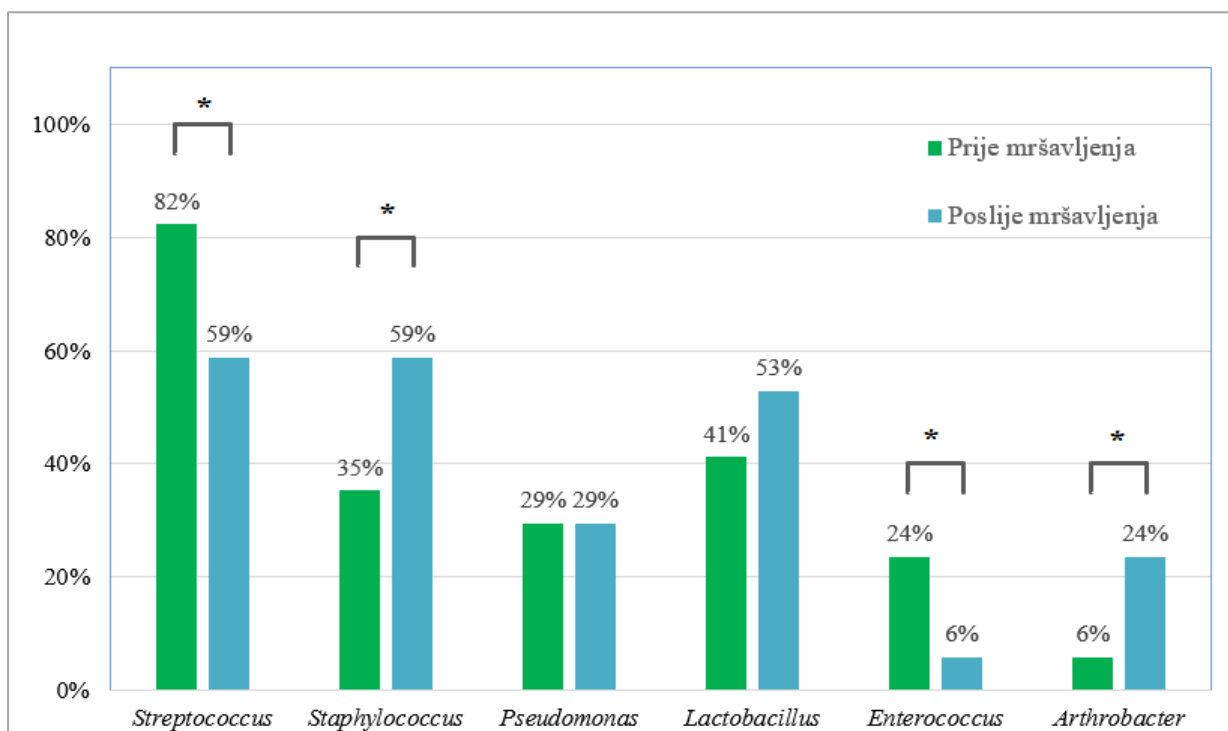
Tablica 12. Prikaz statističke usporedbe učestalosti pojave mikroorganizama iz koljena Ascomycota prije i poslije mršavljenja po broju i postotku u pretilih ispitanica.

| | Mikroorganizmi | Prije mršavljenja, n = 17 | % | Poslije mršavljenja, n = 17 | % | p - vrijednost |
|------------|-------------------------|---------------------------|------|-----------------------------|------|----------------|
| Ascomycota | <i>Candida glabrata</i> | 0 | 0,00 | 1 | 5,88 | 1,0000 |



Slika 10. Usporedba učestalosti pojave određenih mikroorganizama iz koljena Ascomycota u pretilih ispitanica prije i poslije mršavljenja (n=17).

U uzorcima prije i poslije mršavljenja, rodovi mikroorganizama koji su se najučestalije pojavljivali su rodovi *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter* i *Enterococcus*. Usporedba učestalosti pojave tih rodova je prikazana na slici 11. Prije mršavljenja, u uzorcima sline ispitanica je statistički značajno bila veća učestalost bakterija roda *Streptococcus* ($p < 0,0006$) te *Enterococcus* ($p < 0,0006$), a statistički značajno manja učestalost bakterija roda *Staphylococcus* ($p < 0,0011$) i *Arthrobacter* ($p < 0,0006$). Statistički značajne razlike u učestalosti pojave bakterija roda *Pseudomonas* ($p < 1,0000$) i *Lactobacillus* ($p < 0,1189$) nisu zamijećene, što je prikazano na slici 11.



Slika 11. Frekvencija pojavljivanja rodova najučestalijih mikroorganizama u pretilih ispitanica prije i poslije mršavljenja. Statistički značajni rezultati su označeni crtom i zvjezdicom iznad vrijednosti.

5. RASPRAVA

Istraživanje je provedeno na skupini od 17 pretilih žena uključenih u program mršavljenja u vidu mijenjanja prehrambenih i životnih navika na Zavodu za endokrinologiju Interne klinike Rebro, KBC Zagreb. Prosječna dob skupine je bila $48,44 \pm 14,72$ godina. Na početku istraživanja je prosječna tjelesna masa skupine bila $111,96 \pm 18,62$ kilograma, a nakon mršavljenja $105,58 \pm 17,68$ kilograma. Koristeći t-test usporedbe očekivanja među dvije skupine, gdje se dobivena vrijednost od $2p < 0,1000$ smatra statistički značajnom, ovaj se rezultat ne smatra značajnim ($2p < 0,3286$). Također, na početku istraživanja je prosječni ITM skupine bio $41,99 \pm 7,31$ kg/m², a nakon mršavljenja $38,58 \pm 6,64$ kg/m², što korištenjem t-testa usporedbe također nije bila statistički značajna promjena ($2p < 0,1727$). To se može objasniti prosječnim periodom mršavljenja od $5,76 \pm 0,60$ mjeseci, koji nije bio dostatan za statistički značajne promjene tih vrijednosti, ali i nepridržavanjem preporučenih promjena u prehrambenim i životnim navikama. Prosječni postotak izgubljene tjelesne mase bio je $5,56 \pm 4,62$ %, a postotak izgubljene tjelesne mase od 5,00 % se obično preporučuje svakom pretilom individualcu kao minimalan početni gubitak tjelesne mase (Fildes i sur., 2015).

U ovom istraživanju, ispitanice su trebale prije i poslije procesa mršavljenja ispuniti anketni upitnik u kojem su odgovarale na 19 pitanja koja su povezana s prehrambenim i životnim navikama poput konzumacije raznih namirnica, broja obroka i količine unesene tekućine te navika pušenja, spavanja i vježbanja. Ispitivanjem i statističkim uspoređivanjem je utvrđeno da se broj obroka koje su ispitanice konzumirale nije značajno promijenio, iako su vidljiva neznatna povećanja postotka ispitanica koje su jele 5 obroka dnevno i smanjenje postotka onih koje su jele samo dva obroka dnevno. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjima koja dokazuju da razlika u dnevnom broju obroka nije poticala mršavljenje ako je dnevni kalorijski unos ostao isti (Cameron i sur., 2010). Također, značajno se smanjio unos mesa i mesnih proizvoda ($p < 0,0011$), a dokazano je da povećani unos mesa i mesnih proizvoda doprinosi razvoju pretilosti (Wang i Beydoun, 2009). Raznolikost prehrane se povećala u ispitanica koje mršave što se ogleda u statistički značajnom povećanju udjela voća i povrća u prehrani ($p < 0,0449$), a što je u skladu s istraživanjima koja potvrđuju da efikasan proces mršavljenja zahtijeva konzumaciju raznolike prehrane (Abris i sur., 2018).

Što se tiče učestalosti konzumiranja doručka, nije se pojavila statistički značajna razlika, a najveći postotak ispitanica je prije (52,94 %) i nakon mršavljenja (50,00 %, $p < 0,7773$) odgovorio da redovno doručkuje. To je skladu s postojećim istraživanjima koja dokazuju da učestalost konzumacije doručka nije u korelaciji s promjenom vrijednosti ITM-a (Barr i sur., 2016). Do razlika u konzumaciji soli nije došlo nakon mršavljenja, a najveći postotak ispitanica je i prije i poslije mršavljenja tvrdio da nikada ne zasoljava svoje obroke (58,90 %, $p < 1,0000$). Postojeća istraživanja dokazuju da povećani unos soli rezultira povećanim okusom žeđi i apetitom, a pretila djeca radije biraju zasoljenu hranu. Međutim, nije dokazano da odrasli pretili ljudi radije biraju zasoljenu hranu jer postoje oprečni dokazi (Oh i sur.,

2017). Rezultati anketnog upitnika pokazuju da pretili ljudi prije mršavljenja ne preferiraju soliti hranu, a ta se navika zadržava i nakon mršavljenja. Nakon mršavljenja, u značajnog postotka ispitanica se povećao dnevni unos tekućine od 1 do 2 litre ($p < 0,0419$), a povećani unos tekućine je dokazano povezan s mršavljenjem (Thornton, 2016). Značajno se povećao unos vode u ispitanica nakon mršavljenja ($p < 0,0617$), a smanjio postotak onih koje su konzumirale sve navedene vrste pića, između ostalog i gazirane sokove ($p < 0,0289$). Rezultati Papandreou i suradnika (2013) pokazuju da je povećani unos zašećerenih sokova, kao što su gazirana pića, povezan s razvojem pretilosti, a što potvrđuju dobiveni rezultate u ovom radu. Unos mlijeka nije povezan s razvojem pretilosti (Papandreou i sur., 2013), a tijekom ovog istraživanja značajne promjene u dnevnoj konzumaciji mlijeka nisu zamijećene. Ipak, došlo je do značajnog smanjenja postotka ispitanica koje su svakodnevno konzumirale mliječne proizvode poput sira i jogurta ($p < 0,0011$) te povećanja postotka ispitanica koje su samo ponekad konzumirale te namirnice ($p < 0,0294$).

Unos ugljikohidrata je ispitivan kroz prosječni dnevni unos kruha, a rezultati pokazuju da se nakon mršavljenja značajno povećao postotak ispitanica koje uopće nisu jele kruh ($p < 0,0279$) te smanjio postotak ispitanica koje su jele do tri kriške kruha dnevno ($p < 0,0449$). Neka istraživanja dokazuju pozitivnu korelaciju između smanjenog unosa kruha bilo koje vrste i efikasnog mršavljenja, dok postoje i zaključci drugih istraživanja koji tvrde da promjena u unosu kruha nema značajan utjecaj na gubitak kilograma (Bautista-Castaño i Serra-Majem, 2012). Stoga se ne može zaključiti kako je smanjenje unosa kruha u skupine ispitanica u ovom istraživanju značajno doprinijelo mršavljenju. Na početku ovog istraživanja je ispitanicama preporučeno korištenje maslinovog ulja kao alternative korištenju životinjskih masti u prehrani tijekom procesa mršavljenja, a rezultati pokazuju statistički značajno uvećanje učestalosti korištenja maslinovog ulja tijekom tog procesa ($p < 0,00001$). Galvão Cândido i suradnici (2018) su u dvostruko slijepom placebo kontroliranom istraživanju dokazali da konzumacija maslinovog ulja smanjuje postotak masnog tkiva u tijelu kod ispitanica s viškom masnog tkiva. Iz toga proizlazi da je povećana učestalost konzumacije maslinovog ulja pomogla ispitanicama tijekom mršavljenja.

Na kontroli poslije mršavljenja, ispitanice su smatrale da je stanje njihovog zdravlja puno bolje nego u odnosu na prošlu godinu i u odnosu na odgovore koje su dale prije započinjanja procesa mršavljenja ($p < 0,0031$), a također su statistički značajno imale manje problema kod obavljanja tjelesnih aktivnosti ($p < 0,0208$). Mršavljenje uistinu poboljšava općenito zdravlje organizma, posebno antropometrijska obilježja te lipidni i glikemijski profil (Ashtary-Larky i sur., 2017).

Prema rezultatima istraživanja, statistički se značajno smanjio postotak ispitanica koje su vježbale 2 sata tjedno ($p < 0,0087$) i više od 2 sata ($p < 0,0676$), ali se povećao postotak ispitanica koje su vježbale 1 sat tjedno ($p < 0,0001$). Također se značajno povećao i broj dana u tjednu u kojem su ispitanice hodale bar 10 minuta dnevno ($p < 0,0001$). Međutim, iako je 1 sat umjerenog vježbanja tjedno dovoljan za

prevenciju debljanja, za efikasnije mršavljenje bi bilo potrebno vježbati barem 150 minuta tjedno (Donnelly i sur., 2009) i provoditi aerobne treninge koji su ključni za gubljenje visceralnog masnog tkiva (Ismail i sur., 2012) te se može zaključiti kako adekvatna razina tjelovježbe nije postignuta u ispitanica u ovom istraživanju, a ključna je za gubljenje na tjelesnoj masi.

St-Onge i suradnici (2013) su dokazali da nedostatak sna, odnosno prosječni period spavanja manji od 6 sati dnevno, dovodi do razvoja želje za kalorijski bogatom i nutritivno siromašnom hranom što posljedično dovodi do pretilosti. U ovom istraživanju, najveći postotak ispitanica je prije mršavljenja spavao 6 do 7 sati dnevno, ali se postotak ispitanica koje spavaju 6 do 7 sati dnevno statistički značajno uvećao ($p < 0,0327$), a može se reći kako je produženo trajanje spavanja utjecalo na gubljenje na tjelesnoj masi. Usto, statistički se značajno smanjio postotak ispitanica koje su spavale više od 8 sati dnevno ($p < 0,00001$), a prosječno spavanje duže od 9 sati je također povezano s razvojem pretilosti zbog dužeg perioda mirovanja u danu, smanjene tjelesne aktivnosti i depresije, koja je česta posljedica pretilosti (Chaput i sur., 2013). Iz toga proizlazi da je i smanjenje prosječnog vremena spavanja na 6 do 7 sati dnevno utjecalo na gubljenje kilograma. Postotak ispitanica koje su pušačice ili puše neredovito se nije promijenio prije i poslije mršavljenja što nije u skladu s ciljem mijenjanja životnih navika prema uputama koje su ispitanice dobile na početku istraživanja. Dare i suradnici (2015) objašnjavaju kako u pretilih ljudi pušenje može dovesti do nakupljanja visceralnog masnog tkiva, ali naravno i do mnogih komorbiditetnih bolesti i stanja. Nakon mršavljenja je došlo do statistički značajno smanjenog postotka ispitanica u kojih dolazi do pojave spontanog krvarenja desni ($p < 0,0153$) i povećanja postotka ispitanica kojima nikad ne krvare desni ($p < 0,0429$). To se može objasniti činjenicom da je u pretilih ljudi dokazano veća učestalost pojave upalnih procesa u tijelu, pa tako i u usnoj šupljini, što rezultira pojavom raznih bolesti, poput periodontitisa, kojoj su glavni simptomi crvenilo i krvarenje iz desni (Deshpande i Amrutiya, 2017).

Uzorci sline ispitanica koje su sudjelovale u ovom istraživanju su uzeti nakon ispiranja usta fiziološkom otopinom prije i poslije mršavljenja, razrijeđeni na drugo decimalno razrjeđenje, kako bi se broj naraslih kolonija mogao lako izbrojati, te nacijepljeni na LB i MRS hranjive podloge za uzgoj laktobacila i enterobakterija, kako bi se pokrio najveći mogući broj vrsta koje se mogu otkriti. Nakon što su kolonije narasle na hranjivim podlogama, izolirane su te identificirane spektrometrijom masa, a rezultati su uspoređivani Fisherovim egzaktnim testom s razinom značajnosti od $p = 0,1000$, a ta vrijednost je odabrana zbog malog broja ispitanica u istraživačkoj skupini i same prirode istraživanja, koje je preliminarno. Svaki rezultat usporedbe s p vrijednošću manjom od $0,1000$ se smatra statistički značajnim.

Tam i suradnici (2018) su dokazali da je sastav mikrobiote usne šupljine značajno manje raznolik nego u osoba idealne tjelesne mase, a prevladavaju mikroorganizmi koji pripadaju koljenu Firmicutes. To je u skladu s rezultatima ovog istraživanja jer je iz uzoraka sline ispitanica uzetih prije mršavljenja

izolirano i identificirano 77 različitih vrsta mikroorganizama, koje se može svrstati u 4 različita koljena. Nakon mršavljenja, iz uzoraka sline ispitanica je izolirano i identificirano 107 različitih vrsta mikroorganizama koje se mogu svrstati u 5 različitih koljena. Nije primijećena statistički značajna razlika između učestalosti pojave različitih koljena među uzorcima sline prije i poslije mršavljenja, ali je primijećen trend smanjenja udjela mikroorganizama koljena Firmicutes (s 59,46 % na 53,27 %, $p < 0,3922$) i Bacteroidetes (s 2,70 % na 0,90 %, $p < 0,6212$). Nakon mršavljenja, primijećen je porast udjela mikroorganizama koji pripadaju koljenu Proteobacteria (29,73 % na 31,78 %, $p < 0,8775$), Actinobacteria (s 12,16 % na 13,08 %, $p < 1,0000$) i Ascomycota (s 0,00 % na 0,90 %, $p < 1,0000$). Pad učestalosti pojave mikroorganizama koji pripadaju koljenu Firmicutes je u skladu s očekivanjima i dosadašnjim istraživanjima, ali pad učestalosti mikroorganizama koji pripadaju koljenu Bacteroidetes nije u skladu s dosadašnjim istraživanjima (Bäckhed i sur., 2004).

U uzorcima i prije i poslije mršavljenja, rodovi mikroorganizama koji su se najučestalije pojavljivali su rodovi *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter* i *Enterococcus*.

Nakon mršavljenja, 21,49 % vrsta mikroorganizama pripada rodu *Streptococcus*, što je u skladu s istraživanjem gdje je dokazano da 20 % vrsta mikroorganizama u usnoj šupljini zdravih osoba čine oni koji pripadaju rodu *Streptococcus* (Kolebrander, 2000). Međutim, ne može se reći sa sigurnošću da rezultati ovog istraživanja u potpunosti podupiru tu činjenicu jer su sve ispitanice osim jedne nakon mršavljenja još uvijek pripadale kategoriji pretilih ljudi. Zamijećene su statistički značajne razlike u učestalosti pojave određenih vrsta *Streptococcus* prije i poslije mršavljenja, a učestalost pojave roda *Streptococcus* među uzorcima slina ispitanica nakon mršavljenja značajno pada u odnosu na učestalost pojave u uzorcima ispitanica prije mršavljenja ($p < 0,0006$). Vrste *Streptococcus oralis* ($p < 0,0366$) i *Streptococcus pneumoniae* ($p < 0,0570$) su se statistički značajno učestalije pojavljivale u uzorcima sline pretilih ispitanica prije mršavljenja, što je u skladu s postojećim istraživanjima. Goodson i suradnici (2009) su dokazali veću učestalost bakterije *Streptococcus oralis* u usnoj šupljini pretilih osoba u odnosu na osobe zdrave težine, a učestalija pojava bakterije *Streptococcus pneumoniae* u pretilih ljudi je povezana s većim rizikom od razvoja upale pluća koja može biti posljedica pretilosti. Međutim, bakterija *Streptococcus pyogenes* se statistički značajno učestalije pojavljivala u ispitanica nakon mršavljenja, a ona je također jedan od patogena koji uzrokuju upalu pluća. Usto, u uzorcima sline ispitanica nakon mršavljenja je došlo do pojave mikroorganizama koji se uopće nisu pojavljivali prije mršavljenja, a neki od njih, poput rodova *Burkholderia*, *Viridibacillus*, *Kocuria* i *Neisseria* su patogeni. Nakon mršavljenja je u slini ispitanica također statistički značajno porastao broj vrsta roda *Arthrobacter* u odnosu na uzorke sline uzete prije mršavljenja ($p < 0,0006$), a te se vrste smatraju oportunističkim patogenima (Wackett, 2016). Jedan od mogućih razloga za njihovom pojavom može biti godišnje doba uzimanja uzoraka, što je u slučaju ovog istraživanja pretežno bio zimski period, kada je dokazano oslabljen imunitet te je veća incidencija od pojave infektivnih zaraza (Pascual i Dobson, 2005). Nakon mršavljenja je u uzorku sline ispitanica pronađen i rod *Rhizobium*, koji se prije nije pojavljivao, a

njegova pojava se može objasniti time da su ispitanice konzumirale više povrća pa moguće i leguminoza, s čijim korijenima mikroorganizmi roda *Rhizobium* rastu u simbiozi (Geurts i Bisseling, 2002). S obzirom na sve navedeno, ne može se zaključiti da se učestalost pojave bakterije *Streptococcus pyogenes* povećala u uzorcima sline ispitanica nakon mršavljenja zbog samog gubitka kilograma uslijed promjene prehranbenih i životnih navika.

Također, došlo je i do potpunog izostanka određenih rodova mikroorganizama iz uzoraka sline ispitanica nakon mršavljenja, kao što su *Aeromonas*, *Acidovorax*, *Moraxella* i *Chryseobacterium*. Rodovi *Aeromonas*, *Moraxella* i *Chryseobacterium* su patogeni spojevi, ali se ne može sa sigurnošću zaključiti kakva je veza između njihove pojave u uzorcima sline ispitanica prije mršavljenja i potpunog iščezavanja u uzorcima sline uzetim nakon mršavljenja. Mikroorganizmi roda *Acidovorax* se mogu naći na voću, i može se zaključiti da je njihova pojava u uzorku bila slučajna, odnosno vjerojatno ovisna o tome što su ispitanice jele prije uzorkovanja.

Iako nije statistički značajan, zabilježen je porast učestalosti pojave vrsta roda *Lactobacillus* kod uzoraka sline ispitanica nakon mršavljenja ($p < 0,1189$). Rosing i suradnici (2017) su pronašli da postoji veza između učestalosti pojave bakterija roda *Lactobacillus* u pretilih ljudi i mršavljenja te su dokazali da će osobe koje mršave i imaju smanjeni unos ugljikohidrata imati veću učestalost bakterija roda *Lactobacillus* u slini. To je djelomično u skladu s rezultatima ovog istraživanja, jer su ispitanice u toku mršavljenja unosile manje ugljikohidrata u odnosu na njihovu prehranu prije mršavljenja, a odnosi se specifično na unos kruha uz $p < 0,0279$. Za detaljnije evaluiranje ovih rezultata, trebalo bi proučiti ukupni unos pojedinih makronutrijenata u pretilih ispitanica koje su u fazi mršavljenja.

Nakon mršavljenja, u uzorcima sline ispitanica značajno opada učestalost pojave vrsta roda *Enterococcus*. Nema mnogo istraživanja koja se bave prevladavanjem ove vrste u slini pretilih ljudi, ali je istraživanje Hou i suradnika (2017) dokazalo da se mikroorganizmi vrste *Enterococcus* značajno više pojavljuju u crijevnoj mikrobioti pretilih djece. Iako je crijevna mikrobiota dokazano povezana s oralnom mikrobiotom, u ovom istraživanju se ne može sa sigurnošću zaključiti da je opadanje učestalosti pojave vrste *Enterococcus* u uzorcima sline ispitanica bilo povezano s gubitkom kilograma. Također, nakon mršavljenja u uzorcima sline ispitanica značajno raste učestalost pojave bakterija roda *Staphylococcus* što je u skladu s istraživanjem Wu i suradnika (2018) i može se zaključiti da je povezano s gubljenjem na tjelesnoj masi.

Nedavna istraživanja Pedrotti i suradnika (2019) na miševima, *in vivo*, *ex vivo* i *in vitro*, potvrđuju da okolišni podražaji utječu na epigenetske mehanizme, a koji djeluju na aktivnost proliferator peroksisomalnog receptora gama, osnovnog transkripcijskog regulatora za pohranu lipida i metabolizam glukoze. Epigenetski činitelji u sisavaca, kao što su starosna dob, hrana, piće, korištenje lijekova, način života, fizička aktivnost, psihička opterećenost i mikrobiota, bitno utječu na pojavu i razvitak debljine.

Na kraju treba reći kako je jedan od nedostataka ovog istraživanja bio ljudski faktor, odnosno nepridržavanje rokova za kontrole pa i to treba uzeti u obzir. Također, ovo je preliminarno istraživanje s malim uzorkom ispitanika ($n = 17$) i svakako ga treba proširiti uz značajno veći broj ispitanika i uz kontrolnu skupinu. Tada bi se dobiveni rezultati mogli preciznije interpretirati, posebno kod pojavljivanja određenih vrsta mikroorganizama samo u uzorcima sline prije ili nakon mršavljenja.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i provedene diskusije može se zaključiti:

- Hipoteza rada je u potpunosti potvrđena dobivenim rezultatima koji ukazuju da su procesi mršavljenja i promjene životnih navika utjecali na sastav oralne mikrobiote u pretilih ispitanica Zagrebačke županije.
- Nakon mršavljenja, u uzorcima sline ispitanica utvrđena je statistički značajno veća učestalost bakterija rodova *Staphylococcus* ($p < 0,0011$) i *Arthrobacter* ($p < 0,0006$), a manja rodova *Streptococcus* ($p < 0,0006$) i *Enterococcus* ($p < 0,0006$).
- U uzorcima sline ispitanica nakon mršavljenja, utvrđena je statistički značajno manja učestalost bakterija *Streptococcus oralis* ($p < 0,0366$) i *Streptococcus pneumoniae* ($p < 0,0570$), a veća učestalost bakterije *Streptococcus pyogenes* ($p < 0,0455$).
- Statistički značajne razlike u promjenama prehrambenih navika ispitanica bile su smanjeni unos mesa i mesnih preradevina ($p < 0,0011$) te kruha ($p < 0,0279$), povećani unos maslinovog ulja ($p < 0,00001$), uravnoteženija i raznolikija prehrana ($p < 0,0449$), povećani dnevni unos tekućina između 1 i 2 L ($p < 0,0419$) i povećano konzumiranje vode ($p < 0,0617$).
- Tijekom mršavljenja, statistički značajne razlike u promjenama životnih navika bile su povećani postotak ispitanica koje su spavale 6 do 7 sati dnevno ($p < 0,0327$) i onih koje su hodale ili vježbale 1 sat tjedno ($p < 0,0001$) te smanjeni postotak ispitanica koje su sjedile više od 8 sati dnevno ($p < 0,0676$).
- Nakon provedenog razdoblja mršavljenja u trajanju od $5,76 \pm 0,60$ mjeseci, učesnice studije smatraju svoje zdravlje boljim u odnosu na prethodni period ($p < 0,0031$) i lakše obavljaju uobičajene aktivnosti ($p < 0,0208$), a utvrđeno je i smanjeno spontanog krvarenja desni usta ($p < 0,0153$).

7. ZAHVALE

Od srca se zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Višnji Bačun-Družina, na pruženoj potpori, stručnim savjetima te velikoj riznici znanja koju je bila voljna podijeliti sa mnom tijekom izrade ovog rada.

Voljela bih se zahvaliti i asistentici Ani Huđek, mag. ing., na savjetima, usmjeravanju i pomoći kod statističke obrade podataka te višoj tehničkoj suradnici Lidiji Buzuk na strpljenju i doprinosu pri laboratorijskom radu. Također, na suradnji i pomoći se zahvaljujem dr. sc. Martini Matovinović, dr. med., te znanstvenoj suradnici dr. sc. Snježani Kazazić.

Za kraj, zahvaljujem se svima koji su me na bilo koji način podržavali, ohrabivali ili surađivali sa mnom tijekom pisanja ovog rada.

8. POPIS LITERATURE

- Abris, G. P., Provido, S., Hong, S., Yu, S. H., Lee, C. B., Lee, J. E. (2018) Association between dietary diversity and obesity in the Filipino Women's Diet and Health Study (FiLWHEL): A cross-sectional study. *PloS One* **13**, e0206490. doi: 10.1371/journal.pone.0206490
- Afshin, A., Forouzanfar, M. H., Reitsma, M. B., Sur, P., Estep, K., et al. (2017) Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N. Engl. J. Med.* **377**, 13–27. doi: 10.1056/NEJMoa1614362
- Agha, M., Agha, R. (2017) The rising prevalence of obesity: part A: impact on public health. *Int. J. Surg. Oncol.* **2**, e17. doi: 10.1097/IJ9.000000000000017
- Ashtary-Larky, D., Ghanavati, M., Lamuchi-Deli, N., Payami, S. A., Alavi-Rad, S., Boustaninejad, M., et al. (2017) Rapid Weight Loss vs. Slow Weight Loss: Which is More Effective on Body Composition and Metabolic Risk Factors? *Int. J. Endocrinol. Metab.* **15**, e13249. doi: 10.5812/ijem.13249
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., et al. (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 15718–15723. doi: 10.1073/pnas.0407076101
- Barr, S.I., DiFrancesco, L., Fulgoni, V.L. (2016) Association of breakfast consumption with body mass index and prevalence of overweight/obesity in a nationally-representative survey of Canadian adults. *Nutr. J.* **15**, 33. doi: 10.1186/s12937-016-0151-3
- Bašić, M., Butorac, A., Landeka Jurčević, I., Bačun-Družina, V. (2012) Obesity: Genome and environment interactions. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **63**, 395-405. doi: 10.2478/10004-1254-63-2012-2244
- Bautista-Castaño, I., Serra-Majem, L. (2012) Relationship between bread consumption, body weight, and abdominal fat distribution: evidence from epidemiological studies. *Nutr. Rev.* **70**, 218-33. doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00454.x.
- Beccutia, G., Pannain, S. (2013) Sleep and obesity. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **14**, 402–412. doi: 10.1097/MCO.0b013e3283479109
- Bergeron, C., Boulet, L.P., Hamid, Q. (2005) Obesity, allergy and immunology. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **115**, 1102-4. doi: 10.1016/j.jaci.2005.03.018

- Bokarewa, M., Nagaev, I., Dahlberg, L., Smith, U., Tarkowski, A. (2005) Resistin, an Adipokine with Potent Proinflammatory Properties. *J. Immunol.* **174**, 5789-5795. doi: 10.4049/jimmunol.174.9.5789
- Bush, T., Lovejoy, J.C., Deprey, M., Carpenter, K.M. (2017) The effect of tobacco cessation on weight gain, obesity, and diabetes risk. *Obesity* **24**, 1834–1841. doi: 10.1002/oby.21582
- Cameron, J.D., Cyr, M.-J., Doucet, E. (2010) Increased meal frequency does not promote greater weight loss in subjects who were prescribed an 8-week equi-energetic energy-restricted diet. *Br. J. Nutr.* **103**, 1098–1101. doi: 10.1017/S0007114509992984
- Carroll, K.K. (1998) Obesity as a risk factor for certain types of cancer. *Lipids* **33**, 1055-9. doi: 10.1007/s11745-998-0305-8
- Chan, R.S.M., Woo, J. (2010) Prevention of Overweight and Obesity: How Effective is the Current Public Health Approach. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **7**, 765–783. doi: 10.3390/ijerph7030765
- Chaput, J. P., McNeil, J., Després, J. P., Bouchard, C., Tremblay, A. (2013) Seven to eight hours of sleep a night is associated with a lower prevalence of the metabolic syndrome and reduced overall cardiometabolic risk in adults. *PLoS One* **8**, e72832. doi: 10.1371/journal.pone.0072832
- Chaput, J.-P., St-Onge, M.-P. (2014) Increased Food Intake by Insufficient Sleep in Humans: Are We Jumping the Gun on the Hormonal Explanation? *Front Endocrinol.* **5**, 116. doi: 10.3389/fendo.2014.00116
- Choquet, H., Meyre, D. (2011) Genetics of Obesity: What have we Learned? *Curr. Genomics* **12**, 169–179. doi: 10.2174/138920211795677895
- Chung, W.K., Leibel, R.L. (2008) Considerations regarding the genetics of obesity. *Obesity* **16**, S33-9. doi: 10.1038/oby.2008.514
- Dare, S., Mackay, D. F., Pell, J. P. (2015) Relationship between smoking and obesity: a cross-sectional study of 499,504 middle-aged adults in the UK general population. *PLoS One* **10**, e0123579. doi: 10.1371/journal.pone.0123579
- Deshpande, N. C., Amrutiya, M. R. (2017) Obesity and oral health - Is there a link? An observational study. *J. Indian. Soc. Periodontol.* **21**, 229–233. doi: 10.4103/jisp.jisp_305_16
- Donnelly, J.E., Blair, S.N., Jakicic, J.M., Manore, M.M., Rankin, J.W., Smith, B.K. (2009) American College of Sports Medicine Position Stand. Appropriate physical activity intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. *Med. Sci. Sports Exerc.* **41**, 459-71. doi: 10.1249/MSS.0b013e3181949333.

- Dror, T., Dickstein, Y., Dubourg, G., Paul, M. (2017) Microbiota manipulation for weight change. *Microb. Pathog.* **106**, 146-161. doi: 10.1016/j.micpath.2016.01.002.
- Farooqi, I. S., Bullmore, E., Keogh, J., Gillard, J., O'Rahilly, S., Fletcher, P. C. (2007) Leptin regulates striatal regions and human eating behavior. *Science* **317**, 1355. doi: 10.1126/science.1144599
- Fawcett, K.A., Barroso, I. (2010) The genetics of obesity: FTO leads the way. *Trends Genet.* **26**, 266–274. doi: 10.1016/j.tig.2010.02.006
- Fildes, A., Charlton, J., Rudisill, C., Littlejohns, P., Prevost, A. T., Gulliford, M. C. (2015) Probability of an Obese Person Attaining Normal Body Weight: Cohort Study Using Electronic Health Records. *Am. J. Public Health* **105**, e54–e59. doi: 10.2105/AJPH.2015.302773
- Gadde, K.M., Martin, C.K., Berthoud, H.R., Heymsfield, S.B. (2018) Obesity: Pathophysiology and Management. *J. Am. Coll. Cardiol.* **71**, 69-84. doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.011.
- Galvão Cândido, F., Xavier Valente, F., da Silva, L.E., Gonçalves Leão Coelho, O., Gouveia Peluzio, M.D.C., Gonçalves Alfenas, R.C. (2018) Consumption of extra virgin olive oil improves body composition and blood pressure in women with excess body fat: a randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *Eur. J. Nutr.* **57**, 2445-2455. doi: 10.1007/s00394-017-1517-9.
- Geurts, R., Bisseling, T. (2002). *Rhizobium* nod factor perception and signalling. *Plant cell* **14**, S239–S249. doi: 10.1105/tpc.002451
- Goodson, J. M., Groppo, D., Halem, S., Carpino, E. (2009) Is obesity an oral bacterial disease? *J. Dent. Res.* **88**, 519–523. doi: 10.1177/0022034509338353
- Grün, F., Blumberg, B. (2009) Minireview: The Case for Obesogens. *Mol. Endocrinol.* **23**, 1127–1134. doi: 10.1210/me.2008-0485
- Hou, Y. P., He, Q. Q., Ouyang, H. M., Peng, H. S., Wang, Q., Li, J., et al. (2017) Human Gut Microbiota Associated with Obesity in Chinese Children and Adolescents. *Biomed. Res. Int.* **2017**, 7585989. doi: 10.1155/2017/7585989
- Hruby, A., Hu, F.B. (2016) The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics* **33**, 673–689. doi: 10.1007/s40273-014-0243-x
- Hudek, A., Škara, L., Smolkovič, B., Kazazić, S., Ravlić, S., Nanić, L., Matovinović Osvatić, M., Jelčić, J., Rubelj, I., Bačun-Družina, V. (2018) Higher prevalence of FTO gene risk genotypes AA rs9939609, CC rs1421085, and GG rs17817449 and saliva containing *Staphylococcus aureus* in obese women in Croatia. *Nutr. Res.* **50**, 94-103. doi: 10.1016/j.nutres.2017.12.005

- Hutley, L., Prins, J.B. (2005) Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. *Am. J. Med. Sci.* **330**, 280-9. doi: 10.1097/00000441-200512000-00005
- Huvenne, H., Dubern, B., Clément, K., Poitou, C. (2016) Rare Genetic Forms of Obesity: Clinical Approach and Current Treatments in 2016. *Obes. Facts* **9**, 158-73. doi: 10.1159/000445061
- Ismail, I., Keating, S.E., Baker, M.K., Johnson, N.A. (2012) A systematic review and meta-analysis of the effect of aerobic vs. resistance exercise training on visceral fat. *Obes. Rev.* **13**, 68-91. doi: 10.1111/j.1467-789X.2011.00931.x.
- Jarolimova, J., Tagoni, J., Stern, T. A. (2013) Obesity: its epidemiology, comorbidities, and management. *Prim. Care Companion CNS Disord.* **15**, PCC.12f01475. doi:10.4088/PCC.12f01475
- Kelly, T., Yang, W., Chen, C.-S., Reynolds, K., He, J. (2008) Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int. J. Obes.* **32**, 1431–7. doi: 10.1038/ijo.2008.102
- Knutson, K. L. (2012) Does inadequate sleep play a role in vulnerability to obesity? *Am. J. Hum. Biol.* **24**, 361–371. doi:10.1002/ajhb.22219
- Kodukula, K., Faller, D. V., Harpp, D. N., Kanara, I., Pernokas, J., Pernokas, M., et al. (2017) Gut Microbiota and Salivary Diagnostics: The Mouth Is Salivating to Tell Us Something. *Biores. Open Access* **6**, 123–132. doi: 10.1089/biores.2017.0020
- Kolenbrander, P.E. (2000) Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 413–37. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.413
- Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., Gordon, J. I. (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 11070-5. doi: 10.1073/pnas.0504978102
- Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., Gordon, J.I. (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**, 1022-3. doi: 10.1038/4441022a
- Million, M., Angelakis, E., Paul, M., Armougom, F., Leibovici, L., Raoult, D. (2012) Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. *Microb. Pathog.* **53**, 100-8. doi: 10.1016/j.micpath.2012.05.007
- Musso, G., Gambino, R., Cassader, M. (2010) Obesity, diabetes, and gut microbiota: the hygiene hypothesis expanded? *Diabetes Care* **33**, 2277-84. doi: 10.2337/dc10-0556.
- Oh, S. W., Koo, H. S., Han, K. H., Han, S. Y., Chin, H. J. (2017) Associations of sodium intake with obesity, metabolic disorder, and albuminuria according to age. *PloS One* **12**, e0188770. doi: 10.1371/journal.pone.0188770

- Papandreou, D., Andreou, E., Heraclides, A., Rousso, I. (2013) Is beverage intake related to overweight and obesity in school children? *Hippokratia* **17**, 42–46. doi: 10.3305/nh.2014.30.4.7666
- Pascual, M., Dobson, A. (2005) Seasonal Patterns of Infectious Diseases. *PLoS Med.* **2**, e5. doi: 10.1371/journal.pmed.0020005
- Pedrotti, S., Caccia, R., Neguembor, M.V., Garcia-Manteiga, J.M., Ferri, G., et al. (2019) The Suv420h histone methyltransferases regulate PPAR- γ and energy expenditure in response to environmental stimuli. *Sci. Adv.* **5**, eaav1472. doi: 10.1126/sciadv.aav1472
- Pineda, E., Sanchez-Romero, L. M., Brown, M., Jaccard, A., Jewell, J., Galea, G., Webber, L., et al. (2018) Forecasting Future Trends in Obesity across Europe: The Value of Improving Surveillance. *Obes. facts* **11**, 360-371. doi: 10.1159/000492115
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., et al. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59-65. doi: 10.1038/nature08821
- Rosing, J. A., Walker, K. C., Jensen, B., Heitmann, B. L. (2017) Oral *Lactobacillus* Counts Predict Weight Gain Susceptibility: A 6-Year Follow-Up Study. *Obes. Facts* **10**, 473–482. doi: 10.1159/000478095
- Shillitoe, E., Weinstock, R., Kim, T., Simon, H., Planer, J., Noonan, S., Cooney, R. (2012) The oral microflora in obesity and type-2 diabetes. *J. Oral Microbiol.* **4**, 10.3402/jom.v4i0.19013. doi: 10.3402/jom.v4i0.19013
- Silva - Boghossian, C.M., Cesário, P.C., Leão, A.T.T., Colombo, A.P.V. (2018) Subgingival microbial profile of obese women with periodontal disease. *J. Periodontol.* **89**, 186-194. doi: 10.1002/JPER.17-0236
- Steger, D. J., Lazar, M. A. (2011) Adipogenic hotspots: where the action is. *EMBO J.* **30**, 1418-9. doi: 10.1038/emboj.2011.80
- St-Onge, M. P., Wolfe, S., Sy, M., Shechter, A., Hirsch, J. (2013) Sleep restriction increases the neuronal response to unhealthy food in normal-weight individuals. *Int. J. Obes.* **38**, 411–416. doi: 10.1038/ijo.2013.114
- Tam, J., Hoffmann, T., Fischer, S., Bornstein, S., Gräßler, J., Noack, B. (2018) Obesity alters composition and diversity of the oral microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus independently of glycemic control. *PloS One* **13**, e0204724. doi: 10.1371/journal.pone.0204724
- Thornton S. N. (2016) Increased Hydration Can Be Associated with Weight Loss. *Front. Nutr.* **3**, 18. doi: 10.3389/fnut.2016.00018

- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Gordon, J. I. (2008) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* **457**, 480–484. doi: 10.1038/nature07540
- 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**, 1027–31. doi:10.1038/nature4441023a
- Wackett, L. P. (2016) *Arthrobacter* and related genera: An annotated selection of World Wide Web sites relevant to the topics in environmental microbiology. *Microb. Biotechnol.* **9**, 136–138. doi: 10.1111/1751-7915.12339
- Wang, G. J., Volkow, N. D., Thanos, P. K., Fowler, J. S. (2009) Imaging of brain dopamine pathways: implications for understanding obesity. *J. Addict. Med.* **3**, 8–18. doi: 10.1097/ADM.0b013e31819a86f7
- Wang, Y., Beydoun, M. A. (2009) Meat consumption is associated with obesity and central obesity among US adults. *Int. J. Obes.* **33**, 621–628. doi: 10.1038/ijo.2009.45
- Witham, M.D., Avenell, A. (2010) Interventions to achieve long-term weight loss in obese older people: a systematic review and meta-analysis. *Age Ageing* **39**, 176–84. doi: 10.1093/ageing/afp251
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y. Y., Keilbaugh, S. A., et al. (2011) Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* **334**, 105–108. doi: 10.1126/science.1208344
- Wu, Y., Chi, X., Zhang, Q., Chen, F., Deng, X. (2018) Characterization of the salivary microbiome in people with obesity. *PeerJ*. **6**, e4458. doi: 10.7717/peerj.4458
- Wyatt, H.R. (2013) Update on Treatment Strategies for Obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, 1299–1306. doi: 10.1210/jc.2012-3115
- Xu, H., Li, X., Zheng, X., Xia, Y., Fu, Y., Li, X., et al. (2018) Pediatric Obstructive Sleep Apnea is Associated With Changes in the Oral Microbiome and Urinary Metabolomics Profile: A Pilot Study. *J. Clin. Sleep Med.* **14**, 1559–1567. doi:10.5664/jcsm.7336
- Yoo, S.R., Kim, Y.J., Park, D.Y., Jung, U.J., Jeon, S.M., Ahn, Y.T., Hu, C.S., McGregor, R., Choi, M.S. (2013) Probiotics *L. plantarum* and *L. curvatus* in combination alter hepatic lipid metabolism and suppress diet-induced obesity. *Obesity* **21**, 2571–8. doi: 10.1002/oby.20428

9. SAŽETAK

Kristina Žuna

Utjecaj promjena prehrambenih i životnih navika na sastav mikrobiote usta u pretilih žena Zagrebačke županije

Pretilost je kompleksna bolest koja može biti uzrokovana genetskim, životnim i okolišnim čimbenicima, a osoba s indeksom tjelesne mase višim od 30 kg/m² se smatra pretilom. Iako je usna šupljina prvi dio probavnog trakta, više se zna o povezanosti i utjecaju crijevne mikrobiote na razvoj pretilosti. Cilj ovog rada je bio ispitati utjecaj promjene prehrambenih i životnih navika na promjenu oralne mikrobiote i uspješnost mršavljenja u skupini od 17 pretilih ispitanica. Prije i nakon mršavljenja, ispitanice su mjerene, odgovarale su na anketni upitnik te im je uzet uzorak sline. Sastav mikrobiote usta je ispitan nacjepljivanjem uzoraka sline na hranjive podloge, a nakon uzgoja i izolacije čistih kolonija, pojedini mikroorganizmi su identificirani spektrometrijom masa. Dobiveni rezultati pokazuju da su ispitanice u vremenu od $5,6 \pm 0,60$ mjeseci u prosjeku izgubile $5,56 \pm 4,46$ % ukupne tjelesne mase, sa značajnim promjenama u sastavu mikrobiote usta uslijed značajnih promjena u prehrambenim i životnim navikama. Raznolikost sastava mikrobiote usta bila je značajno veća u ispitanica nakon mršavljenja. Nadalje, utvrđeno je značajno smanjenje učestalosti bakterija *Streptococcus oralis* i *Streptococcus pneumoniae* nakon provedenog mršavljenja. Životne navike koje su statistički značajno doprinijele mršavljenju i promjeni sastava mikrobiote usta su bile spavanje duže od 6 sati dnevno te učestalija tjelesna aktivnost, a prehrambene navike su bile uravnoteženija i raznolika prehrana, povećani unos tekućine, smanjeni unos mesa i mesnih prerađevina te povećani unos maslinovog ulja. Rezultati pokazuju važan utjecaj promjena prehrambenih i životnih navika na sastav mikrobiote usta i na razvoj pretilosti. Prikazani rezultati su preliminarno istraživanje, a za sveobuhvatnu sliku promjena pri mršavljenju bit će potrebno provesti istraživanje na brojnijoj skupini ispitanika.

Ključne riječi: pretilost, mikrobiota usta, prehrambene i životne navike, mršavljenje

10. SUMMARY

Kristina Žuna

Effect of Changes in Nutritional Habits and Lifestyle on the Composition of Oral Microbiota in Obese Women of Zagreb County

Obesity is a complex disease with genetic, lifestyle and environmental origins, and a person with a body mass index above 30 kg/m^2 is considered obese. Although the oral cavity is the first part of the digestive tract, the connection between obesity and gut microbiota is more researched. The aim of this study was to examine the effect of changes in nutritional and lifestyle habits on microbial salivary composition and weight loss performance in a group of 17 obese women. Before and after weight loss, the participants were measured, responded to the questionnaire, and a sample of their saliva was taken. Salivary microbial composition was determined by growing samples on solid culture media, isolating single colonies and identifying them by using mass spectrometry. Obtained results show that the participants lost $5,56 \pm 4,46 \%$ of total body mass in the period of $5,6 \pm 0,60$ months, with statistically significant changes in the microbial composition of the oral cavity due to significant changes in nutritional and lifestyle habits. Microbial composition of the oral cavity was significantly more varied in participants after weight loss, while *Streptococcus oralis* and *Streptococcus pneumoniae* species appeared significantly more frequent before weight loss. Lifestyle habits that significantly contributed to weight loss and changes in the salivary microbial composition were sleeping longer than 6 hours a day with more frequent physical activity, while significantly important changes in nutritional habits were a more balanced and varied diet, increased fluid intake, decreased meat and meat products intake and increased olive oil intake. These results show the importance of the impact of changes in nutritional and lifestyle habits on the microbial composition of the mouth and on the development of obesity. Presented results are preliminary, where a larger group of participants would be needed for a more comprehensive research.

Keywords: obesity, oral microbiota, nutritional habits and lifestyle, weight loss