

# Uloga crijevne mikrobiote u patogenezi neurodegenerativnih bolesti ljudi

---

Vranić, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:571867>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Helena Vranić**

**Uloga crijevne mikrobiote u patogenezi  
neurodegenerativnih bolesti ljudi**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2022.**

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Jasmine Vraneš i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2021./2022.

## POPIS KRATICA

ANS	autonomni živčani sustav, eng. <i>autonomic nervous system</i>
APP	amiloidni prekursorski protein
CNS	središnji živčani sustav, eng. <i>central nervous system</i>
ENS	crijevni živčani sustav, eng. <i>enteric nervous system</i>
HDAC	histonska deacetilaza, eng. <i>histone deacetylase</i>
LPS	lipopolisaharid, eng. <i>lipopolysaccharide</i>
MMSE	skrraćeno ispitivanje mentalnog statusa, eng. <i>Mini Mental State Exam</i>
PAMP	molekularni obrasci patogenih mikroorganizama, eng. <i>pathogen associated molecular patterns</i>
PCR	lančana reakcija polimerazom, eng. <i>polymerase chain reaction</i>
SCFA	kratkolančane masne kiseline, eng. <i>short chain fatty acids</i>
TLR	receptori slični Tollu, eng. <i>Toll like receptors</i>

# SADRŽAJ

SAŽETAK .....	6
SUMMARY .....	7
1 UVOD .....	1
2 CRIJEVNA MIKROBIOTA .....	2
2.1 Sastav .....	2
2.2 Funkcije .....	2
3 DIJAGNOSTIKA .....	4
3.1 Metagenomika .....	4
3.2 Metatranskriptomika, metaproteomika i metabolomika .....	4
4 NEURODEGENERATIVNE BOLESTI .....	6
4.1 Alzheimerova bolest .....	6
4.1.1 Patofiziologija .....	6
4.1.2 Klinička slika i liječenje .....	7
4.2 Parkinsonova bolest .....	8
4.2.1 Etiologija i patološke značajke Parkinsonove bolesti .....	8
4.2.2 Klinička slika, dijagnostika i liječenje Parkinsonove bolesti .....	9
4.3 Amiotrofična lateralna skleroza (ALS) .....	9
4.3.1 Patogeneza .....	9
4.3.2 Klinička slika, dijagnostika i liječenje .....	10
5 PATOFIZIOLOGIJA .....	11
5.1 Osovina crijevna mikrobiota-mozak .....	11
5.2 Mehanizmi kojima crijevna mikrobiota utječe na CNS .....	12
5.3 Kratkolančane masne kiseline .....	14
5.4 Alzheimerova bolest i mikrobiota .....	16
5.4.1 Poremećaj propusnosti u krvno-moždanoj barijeri .....	16
5.4.2 Uloga proupalnih neurotoksina .....	17
5.4.3 Sistemska upala i Alzheimerova bolest .....	18
5.5 Parkinsonova bolest (PB) i mikrobiota .....	19
5.5.1 Uloga određenih porodica bakterija u patofiziologiji .....	19
5.5.2 Moguća poveznost mikrobiote i alfa-sinukleina .....	20
5.6 Amiotrofična lateralna skleroza i crijevna mikrobiota .....	21
5.6.1 Povezanost nikotinamida, bakterije <i>Akkermansia muciniphila</i> i ALS .....	21
5.6.2 Promjene u sastavu crijevnog mikrobioma .....	22
6 MOGUĆE TERAPIJSKE OPCIJE .....	23

<b>6.1</b>	<b>Prehrana</b> .....	<b>23</b>
<b>6.2</b>	<b>Probiotici i prebiotici</b> .....	<b>23</b>
<b>6.3</b>	<b>Farmakoterapijske opcije</b> .....	<b>25</b>
<b>6.4</b>	<b>Transplatacija fekalne mikrobiote (FMT)</b> .....	<b>25</b>
<b>7</b>	<b>ZAKLJUČAK</b> .....	<b>26</b>
<b>8</b>	<b>ZAHVALE</b> .....	<b>27</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>28</b>
<b>10</b>	<b>ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>34</b>

# SAŽETAK

## Uloga crijevne mikrobiote u patogenezi neurodegenerativnih bolesti ljudi

Helena Vranić

Crijevna mikrobiota je kompleksna zajednica mikroorganizama smještena u specifičnom ekosustavu, čije izmjene imaju značajan utjecaj ne samo na različite poremećaje unutar tog ekosustava, već i na bolesti središnjeg živčanog sustava kao što su Alzheimerova i Parkinsonova bolest, amiotrofična lateralna skleroza, te druge neurodegenerativne bolesti. Dok je uloga crijevne mikrobiote u patogenezi gastrointestinalnih poremećaja kao što su ulcerozni kolitis i sindrom iritabilnog crijeva već dobro razjašnjena, njezina uloga u patogenezi neurodegenerativnih bolesti se tek posljednjih godina intenzivnije istražuje. Osovina mikrobiota crijeva–mozak je dvosmjerni komunikacijski sustav koji nije u potpunosti istražen, a obuhvaća različite neurološke, imunološke, endokrinološke i metaboličke signalne puteve. Istraživanja provedena na aksenički uzgojenim životinjama navode da crijevna mikrobiota ima značajnu ulogu u patogenezi neurodegenerativnih bolesti. Povećana propusnost crijeva i krvno-moždane barijere inducirana disbiozom može utjecati na patogenezu različitih neurodegenerativnih bolesti, posebice onih povezanih sa starenjem. Kratkolančane masne kiseline imaju značajnu ulogu u regulaciji mozga i ponašanja preko G-protein-vezanih receptora. Citokini koje stvaraju stanice imunološkog sustava u crijevima utječu na mozak preko hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine i otpuštanja kortizola. Terapijske opcije liječenja neurodegenerativnih bolesti koje bi utjecale na mikrobiom crijeva se istražuju i postoje dokazi da neke intervencije imaju povoljan učinak. Korištenje probiotika je dovelo do poboljšanja simptoma u bolesnika sa neurodegenerativnim bolestima, no postoje i kontradiktorni dokazi, te još nisu razvijene preporuke za kliničku primjenu.

**Ključne riječi:** crijevna mikrobiota; neurodegenerativne bolesti; upala; kratkolančane masne kiseline

# SUMMARY

## **The role of gut microbiota in the pathogenesis of neurodegenerative diseases in humans**

Helena Vranić

The gut microbiota is a complex community of microorganisms located in a specific ecosystem, whose changes have a significant impact not only to various disturbances within that ecosystem, but also on diseases of central nervous system such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases. While the role of intestinal microbiota in the pathogenesis of gastrointestinal disorders such as ulcerative colitis and irritable bowel syndrome is already well understood, its role in the pathogenesis of neurodegenerative diseases has only been intensively investigated in recent years. The gut microbiota-brain axis is a two-way communication system that has not been fully explored, and includes various neurological, immunological, endocrinological and metabolic signaling pathways. Research on axenic animals indicates that the gut microbiota plays a significant role in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. Dysbiosis-induced increased permeability of the gut and blood-brain barrier can affect the pathogenesis of various neurodegenerative diseases, especially those related to aging. Short-chain fatty acids play a significant role in the regulation of the brain and the behavior through G-protein-coupled receptors. Cytokines produced by cells of the immune system in the intestine affect the brain via the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the release of cortisol. Therapeutic options for the treatment of neurodegenerative diseases that would affect the gut microbiome are being investigated and there is evidence that some interventions have a beneficial effect. The use of probiotics has led to improvement of symptoms in patients with neurodegenerative diseases, but there is also contradictory evidence, and recommendations for clinical use have not yet been developed.

**Keywords:** gut microbiota; neurodegenerative disease; inflammation; short chain fatty acids



# 1 UVOD

Povezanost čovjeka i mikrobioma nije nova ideja, ali tek nedavno je njoj posvećen veći broj istraživanja. Čovjek je evoluirao sa mikrobiomom i došlo je do stvaranja međusobno korisnih mehanizama.(1) Koevolucijom, mikrobiota u odnosu na čovjeka, ostvaruje dugoročnu simbiozu, a ne parazitira kratkoročno. Sve veći broj novih saznanja govore u prilog tome da mikrobiota nije samo komenzalni „promatrač“ koji nema utjecaja na domaćina. Naprotiv, značajan dio mikrobiote se može definirati kao simbiont ili patobiont, ovisno o tome potiču li zdravlje ili bolest u domaćinu. Uzajamnost domaćina (čovjeka) i mikrobiote se najbolje vidi u crijevima, gdje možemo mikrobiom promatrati kao organ domaćina.(2) U ovome radu, prikazuju se mogući mehanizmi kojima crijevna mikrobiota ima učinak na neurodegenerativne bolesti, te potencijalne terapijske mogućnosti koje ciljaju na crijevni mikrobiom.

## 2 CRIJEVNA MIKROBIOTA

Ljudi, kao i ostali sisavci, žive u povezanosti sa velikim brojem komenzalnih mikroorganizama koji žive na izloženim i unutarnjim površinama ljudskog tijela. Cjelokupnost mikroorganizama u određenom staništu zove se mikrobiota ili mikroflora. Kolektivni genom svih mikroorganizama u mikrobioti se zove mikrobiom. Upravo broj komenzalne mikrobiote i mikrobioma uvelike premašuju broj ljudskih stanica i genoma, i to za otprilike 10-100:1.(2)

### 2.1 Sastav

Crijevna mikrobiota ima oko 100 trilijuna mikroorganizama. 95% svih mikroorganizama ljudskog mikrobioma nalaze se u crijevima. Najviše prevladavaju bakterije iz skupina *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Proteobacteria* i *Actinobacteria*, a slijede ih još i bakterije iz rodova *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Peptococcus*, *Prevotella* itd.(3)

Na sastav crijevne mikrobiote utječe niz faktora. Crijeva fetusa u utrobi majke su sterilna, no u jednom istraživanju pronađene su bakterije u mekoniju neonatusa. To otvara mogućnost da postoji transfer s majke na dijete u prenatalnom razdoblju. Do prve godine života se stabilizira crijevni mikrobiom koji ima značajke mikrobioma odraslog čovjeka. U samom probavnom sustavu, kompleksnost i brojnost mikroorganizama se povećava od želudca, prema tankom i debelom crijevu.(2)

### 2.2 Funkcije

Jedna od glavnih funkcija crijevne mikrobiote je obrana od patogena mehanizmom nutritivnog natjecanja i proizvodnjom antimikrobnih tvari.

Nadalje, bitna uloga crijevnog mikrobioma je utjecaj na lokalne urođene i adaptivne imunosne odgovore, ponajprije održavanjem epitelne barijere i indukcijom lučenja IgA.(2) Komenzalni organizmi u crijevima potrebni su za regulaciju urođenih imunosnih odgovora u crijevima, ali i sistemske urođene imunosti. Razna istraživanja pokazala su da komenzalne bakterije pomažu u obnovi crijevne epitelne barijere nakon oštećenja. Također, bakterije potiču izražaj mucina i antimikrobnih proteina koji sprječavaju naseljavanje gram-pozitivnih bakterija.

Još jedan od učinaka komenzalnih bakterija na imunološki sustav je i djelovanje na neutrofile. Glavni mehanizam adaptivne imunosti za zaštitu od mikroorganizama koji prođu epitelnu zapreku je proizvodnja IgA u sluznici crijeva. I upravo taj mehanizam ovisi o prisutnosti mikroorganizama u crijevima.(1)

Uz već navedene funkcije, treba spomenuti i da mikrobiota sudjeluje u procesu probave. Nadalje, bakterije su glavni izvor vitamina K, a i bitan izvor vitamina B kompleksa.(4)

Još jedna od uloga mikrobiote je i dalje predmet istraživanja, a to je uloga u sazrijevanju i funkcioniranju imunskog sustava domaćina.(2) Istraživanja pokazuju rizik za razvoj alergijskih bolesti, uključujući astmu, povezan sa varijacijama u mikroflori tijekom ranog djetinjstva, primjerice način poroda, dojenje, korištenje antibiotika.(1) U aksenički uzgojenim miševa vidljive su strukturne promjene u imunološkom sustavu, a i smanjen broj stanica imunološkog sustava. Komenzalni mikrobiom pruža različite signale, koji moduliraju imunološki status domaćina.(2)

## 3 DIJAGNOSTIKA

### 3.1 Metagenomika

Metagenomika proučava mikrobne genome koji su skupljeni na određenom mjestu npr. crijevima, kako bi proučila filogenetske, fizikalne i funkcionalne značajke mikrobiote. Trenutne metagenomske tehnike su bazirane na tzv. *shotgun* pristupu koji sekvencionirajući sve mikrobne genome, omogućuje kompletnu sliku mikrobiote crijeva.(5)

Ciljano sekvenciranje specifičnih gena za određenu vrstu omogućuje istraživanje filogenetskog sastava mikrobiote. Sekvenciranje 16S rRNA gena je vjerodostojna i isplativa strategija istraživanja raznolikosti cjelokupne mikrobiote.(5) Ova tehnika koristi PCR (eng. *polymerase chain reaction*) kako bi amplificirala genetske sekvence prisutne u mikrobioti.(6) Gen 16S rRNA jedan je od najsačuvanijih gena u bakterijskim genomima. Jako je koristan za filogenetsku karakterizaciju jer sadrži više varijabilnih regija, koje su drugačije u različitim bakterijama.(7) *Marker gene* pristup, baziran na PCR tehnikama ima više prednosti: učinkovit je vremenski i financijski, te je jako osjetljiv na analizirani gen. Ali, zbog usmjerenosti na samo jedan gen, propuštaju se važne informacije poput primjerice kompleksnosti cijele populacije u dobivenom uzorku.(5)

### 3.2 Metatranskriptomika, metaproteomika i metabolomika

Metagenomika ne može opisati kako kompleksna zajednica mikroorganizama funkcionira. Metatranskriptomika bazirana na sekvenciranju sljedeće generacije (eng. *next-generation sequencing* –NGS) može analizirati gensku ekspresiju i procijeniti funkciju mikroorganizama. Ova metoda detektira gene koji su aktivni i opisuje gensku ekspresiju u mikrobim zajednicama.(6) Metaproteomika istražuje sastav proteina u određenom uzorku direktno iz okoliša. Identifikacija proteina je ključan korak za opis funkcija mikrobioma i uz metabolomiku je ključna za proučavanje glavnih efektoru pomoću kojih mikroorganizmi djeluju.(5) Metabolomika omogućuje sistematsku kvantitativnu i kvalitativnu analizu metabolita u biološkom sustavu u trenutku uzorkovanja. Metaboliti sudjeluju u raznim procesima i mogu

biti izvrsni pokazatelji različitih zbivanja. Ipak, postoje mnogi izazovi jer je teško naći metaboličke biomarkere zbog njihovog velikog broja, širokog raspona koncentracija itd.(6)

## 4 NEURODEGENERATIVNE BOLESTI

### 4.1 Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest progresivna je degenerativna bolest središnjeg živčanog sustava te najčešća neurodegenerativna bolest i najčešći uzrok demencije u osoba starijih od 65 godina života. Prevalencija u pojedinaца starijih od 65 godina iznosi 7 %, a u skupini pojedinaца s više od 85 godina čak 32 %. Zbog ubrzana starenja populacije vjeruje se da će do 2050. godine u svijetu biti više od 115,4 milijuna bolesnika s Alzheimerovom bolesti, a najveći porast u broju bolesnika očekuje se u zemljama sa niskim ili srednjim bruto državnim proizvodom po glavi stanovnika.

#### 4.1.1 Patofiziologija

Biološki mehanizmi nisu do kraja objašnjeni, čini se da je bolest povezana sa kompleksnom genskom podlogom, koja dodatno u interakciji sa okolišnim faktorima dovodi do razvitka bolesti. Najčešće se pojavljuje sporadično, no u 5 % bolesnika ova bolest nastaje porodično.

Patološki nalaz u bolesnika s Alzheimerovom demencijom karakteriziran je izraženom kortikalnom atrofijom osobito hipokampalnog područja. Histopatološki nalaz u bolesnika s Alzheimerovom bolešću karakteriziran je dvama osnovnim morfološkim obilježjima: ekstracelularnim amiloidnim plakovima te unutarstaničnim nakupinama neurofibrilarnih vlakana hiperfosforiliranog tau-proteina, tzv. neurofibrilarnim snopićima.

Amiloidni plakovi sadržavaju beta-amiloidni peptid.  $\beta$ -amiloid je peptid koji sadržava više od 40-42 aminokiseline, a nastaje proteolitičkom razgradnjom transmembranskog amiloidnoga prekursorškog proteina (APP). U normalnim okolnostima se APP razgrađuje pomoću  $\alpha$ -sekretaze te stvara  $\beta$ -amiloid koji sadrži 40 aminokiselina koje se normalno odstranjuju iz mozga. U Alzheimerovoj bolesti APP se abnormalno razgrađuje s pomoću enzima  $\beta$ -sekretaze, te  $\gamma$ -sekretaze koja djeluje u transmembranskom području stvara abnormalni  $\beta$ -amiloid koji sadržava 42 aminokiseline. Tada se taj abnormalni amiloid taloži u izvanstaničnim plakovima. U posljednjim dijelovima razgradnje APP-a sudjeluju i presenilin 1 i

presenilin 2.  $\beta$ -amiloid u agregiranom stanju može biti toksičan za neurone i uzrokovat njihovu smrt.

Inkluzije fosforiliranog tau-proteina sadržavaju  $\tau$ -protein, koji je odgovoran za aksonalni transport. Pretpostavlja se da poremećaji u  $\beta$ -amiloidu uzrokuju povećani ulazak Ca u stanice, a to dovodi do poremećaja u fosforilaciji  $\tau$ -proteina, te on postaje hiperfosforiliran. Inkluzije tau-proteina neki smatraju ključnim događajem u nastanku Alzheimerove bolesti. Do sada su utvrđene mutacije triju gena koji dovode do nasljednih oblika bolesti: mutacija gena za APP, presenilin 1 i presenilin 2. U autosomno-dominantnim oblicima bolesti simptomi se pojavljuju ranije, obično prije 60. godine života.(8)

#### **4.1.2 Klinička slika i liječenje**

Bolest se dijeli prema *Clinical Dementia Rating Scale* (CDR) na blagu, umjerenu i tešku. Najraniji simptom jest oštećenje recentne memorije, koje se pojavljuje u 90 % bolesnika, uz očuvanu radnu i dugoročnu memoriju. Bolest je progresivnog tijeka. Razvija se dezorijentacija u vremenu, a kasnije i u prostoru. Mogu se pojaviti poremećaji govora, osobito nominalna afazija, i akalkulija, što bolesniku onemogućuje radnu aktivnost. Bihevioralno psihijatrijski simptomi demencije uključuju depresiju, apatiju, anhedoniju, ali pojavljuju se i agitacija, insomnija, dezinhibicija, repetitivne radnje, pa sve do agresivnog ponašanja. Mogu se pojaviti i psihotični simptomi poput vizualnih i auditivnih halucinacija, te deluzija. U neurološkom statusu nalaze se rigidnost i bradikineza, a moguće su pojave mioklonija i spastičnost. U kasnijoj fazi bolesti pacijenti postaju inkontinentni i potpuno vezani za postelju.

Premda je klasično mišljenje da se definitivna dijagnoza postavlja tek nakon smrti, primjena modernih dijagnostičkih postupaka omogućuje diferencijaciju bolesnika s Alzheimerovom bolesti od zdravih ljudi s osjetljivošću i specifičnošću od 90 %. Dijagnoza se postavlja kliničkom obradom koja sadrži uzimanje anamneze, neurološkim pregledom, te neurokognitivnim testiranjima, putem raznih testova poput *Mini Mental State Exam* (MMSE), *Clock Drawing Test* (CDT) i drugih. Koriste se strukturne neuroslikovne metode poput CT/MR mozga, te funkcijske neuroslikovne metode, poput SPECT-a. U dijagnostici se mogu koristiti i

molekularne neuroslikovne metode, poput  $\beta$ -amiloidnog-PET-a i tau-PET-a, te analizom cerebrospinalnog likvora (CSL).(8)

U liječenju primjenjuju se inhibitori kolinesteraze s ciljem povećanja kolinergičke aktivnosti u mozgu. Primjenjuju se donepezil, rivastigmin i galantamin. Koriste se i antagonist NMDA-receptora (N-metil-D-aspartata) koji štiti tkivo od toksičnosti ekscitacijskih aminokiselina koja uzrokuju smrt neurona. Takvo djelovanje ima memantin.(8)

## **4.2 Parkinsonova bolest**

Ona je progresivna neurodegenerativna bolest uzrokovana degeneracijom dopaminergičkih neurona crne tvari (supstancije nigre). Nazvana je po engleskom liječniku Jamesu Parkinsonu koji je 1817. godine opisao tu bolest. Jedna je od najčešćih neurodegenerativnih bolesti. Prevalencija bolesti raste sa životnom dobi i iznosi oko 1 % u populaciji starijih od 65 godina. Simptomi parkinsonizma se ne pojavljuju samo u idiopatskom obliku. Postoje različite bolesti i druge neurodegenerativne bolesti koje mogu izazvati simptome Parkinsonove bolesti. To je velika skupina sekundarnog parkinsonizma i atipičnog parkinsonizma, ali i parkinsonizma vezanog uz demenciju.

### **4.2.1 Etiologija i patološke značajke Parkinsonove bolesti**

Etiologija idiopatske Parkinsonove bolesti do danas nije poznata. Prema tzv. multifaktorijalnoj hipotezi smatra se da je ona rezultat interakcije genetskih i okolišnih čimbenika. Na temelju epidemioloških studija o riziku za pojavu bolesti izdvojeno je niz čimbenika, poput života u ruralnoj sredini, izloženost pesticidima i virusnim infekcijama. Pretpostavlja se da dolazi do poremećaja funkcije mitohondrija s stvaranjem slobodnih radikala i razvoja oksidativnog stresa s posljedičnom neurodegeneracijom. U malog broja bolesnika bolest se pojavljuje u porodičnom obliku i do danas je poznato više od 10 genskih lokusa koji su odgovorni za porodičnu pojavu bolesti.

Patološka značajka bolesti jest pojava Lewyevih tjelešaca, eozinofilnih citoplazmatskih inkluzija. Lewyeva tjelešca se sastoje od alfa-sinukleina te se osim u Parkinsonovoj bolesti pojavljuju i u drugim neurodegenerativnim bolestima.(8)



#### **4.2.2 Klinička slika, dijagnostika i liječenje Parkinsonove bolesti**

Četiri glavna simptoma Parkinsonove bolesti jesu: tremor u mirovanju koji se naziva akinetički tremor, bradikineza (usporenost u pokretima) , povišenje mišićnog tonusa prema tipu rigora i posturalna nestabilnost. Prva tri simptoma rani su znakovi bolesti, dok je posturalna nestabilnost kasni simptom koji se može pojaviti i nakon 10 godina trajanja bolesti. Početak simptoma obično je asimetričan na jednom ud, najčešće na ruci.

Danas je poznato da osim poremećaja motoričkih funkcija, u velikog broja bolesnika pojavljuju se i drugi simptomi poput depresije, kognitivnog pogoršanja do razvoja demencije, halucinacije i poremećaji autonomnih funkcija.

Dijagnoza je tipično klinička. Uzimaju se u obzir kriteriji koji uključuju prisutnost bradikineze i/ili rigora, akinetički tremor, odsutnost atipičnih znakova i dva od sljedeća tri znaka: dobar odgovor na levodopu, levodopom inducirani nevoljni pokreti, asimetrični početak simptoma. Liječenje je simptomatsko. U početku bolesti primjenjuju se selektivni MAO-B-inhibitori (monoamino-oksidaze B) uz fizikalnu terapiju. Levodopa je zlatni standard liječenja. Uz levodopu, agonisti dopamina su najučinkovitiji antiparkinsonici. Uz njih se još koriste i apomorfin, inhibitori enzima katekol-O-metiltransferaze (COMT), amantadin, atipični neuroleptici te antikolinergici. Od drugih oblika liječenja primjenjuje se DBS (eng. deep brain stimulation) koja je postala vodeća kirurška metoda u liječenju uznapredovale Parkinsonove bolesti.(8)

#### **4.3 Amiotrofična lateralna skleroza (ALS)**

ALS, poznat i kao Lou Gehrigova bolest, najčešća je stečena bolest motoričkih neurona.

Incidencija je oko 1-2 oboljela na 100.000 osoba. Većina oboljelih umire unutar prve 3-5 godina nakon postavljene dijagnoze.

##### **4.3.1 Patogeneza**

Uzrok ALS-a nije poznat. Bolest se najčešće pojavljuje sporadično, ali u 5-10 % oboljelih ALS se pojavljuje porodično. Postoji autosomno-dominantni, autosomno-recesivni i uz X-kromosom vezan nasljedni oblik bolesti. Prvi genski determinirani oblik ALS-a je autosomno-dominantno nasljedan oblik uzrokovan mutacijom gena koji kodira bakar/cink

superoksid-dismutazu (SOD1). To je dovelo do pretpostavke da slobodni radikali uzrokuju propadanje neurona. Ipak, poremećaj uklanjanja slobodnih radikala nije jedini pogubni poremećaj za motorički neuron jer postoje i drugi mehanizmi koji mogu kompenzirati tu manjkavu funkciju.(8)

Ono što je pogubno za motorički neuron jest i nakupljanje mutiranog proteina koji stanica ne može ukloniti što dovodi do njezine smrti. ALS je po tom mehanizmu jako sličan drugim neurodegenerativnim bolestima.(8)

#### **4.3.2 Klinička slika, dijagnostika i liječenje**

Bolest počinje sa znakovima oštećenja donjeg motoričkog neurona: atrofijom i slabošću pojedinih mišićnih skupina, najčešće malih mišića šake, ramena i glutealne muskulature. Nakon znakova zahvaćanja donjih motoričkih neurona, budu zahvaćeni i gornji motoričkih neuroni što se očituje kao spastičnost i pojava patoloških refleksa. U oboljelih je prisutna i bulbarna simptomatologija sa otežanim gutanjem i govorom. Progresijom bolesti, bolesnik nije pokretan, ne može se služiti rukama, ne može govoriti i žvakati te razvija respiratornu insuficijenciju. Nužna mu je pomoć najbližih osoba kao i stručnog osoblja.(8)

Dijagnoza se postavlja s pomoću kliničkih obilježja koja su definirana u dijagnostičkim kriterijima prema Svjetskoj neurološkoj federaciji. Također, važna dijagnostička metoda je i EMNG (eng. *electromyoneurography*) koji pokazuje generalizirano oštećenje donjih motoričkih neurona, a MR mozga i kralježničke moždine isključuju drugu etiologiju.(8)

Liječenje se provodi sa riluzolom koji posjeduje antiglutamatna svojstva i blokira glutaminičnu transmisiju u CNS. Usporava bolest i produljuje život za nekoliko mjeseci do godinu dana. Koristi se i simptomatska terapija, poput npr. baklofena za spastičnost. Postoji potreba sa multidisciplinarnim pristupom, u specijaliziranim ustanovama. Primjena neinvazivne ventilacije vjerojatno je jedna od najvažnijih odrednica preživljenja.(8)

## 5 PATOFIZIOLOGIJA

### 5.1 Osovina crijevna mikrobiota-mozak

Crijevna mikrobiota je blisko povezana sa središnjim živčanim sustavom putem osovine crijeva-mozak koja omogućuje dvosmjernu komunikaciju.(5) Osovina crijevna mikrobiota-mozak uključuje središnji živčani sustav (eng. *central nervous system-CNS*), autonomni živčani sustav (eng. *autonomic nervous system-ANS*), crijevni živčani sustav (eng. *enteric nervous system-ENS*), osovinu hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda i imunološki sustav. Kompleksne poveznice uključuju direktne i indirektne puteve između kognitivnih i emotivnih centara mozga i perifernih crijevnih funkcija.(5) Povezanost crijeva i mozga je prvotno smatrana jednosmjernom. Modulacija crijevnih funkcija, najviše pokretljivosti i sekrecije, regulirana je simpatičkim i parasimpatičkim živčanim sustavom.(9)

Probavni sustav ima vlastiti unutarnji živčani sustav koji se naziva crijevni živčani sustav (eng. *enteric nervous system-ENS*). On se nalazi u stijenci crijeva, od jednjaka sve do anusa. Oko 100 milijuna neurona tvori ovaj sustav, gotovo točno onoliko koliko ima u kralježničkoj moždini. Sadrži dva spleta: vanjski koji se zove mijenterički ili Auerbachov splet, te unutarnji koje se zove podsluznički ili Meissnerov splet.(10)

Sa crijevnim živčanim sustavom povezana su simpatička i parasimpatička vlakna. Iako crijevni sustav može funkcionirati neovisno, parasimpatičko i simpatičko podraživanje može snažno pojačati ili obuzdati gastrointestinalne funkcije.(10)

Crijevo inerviraju i brojna aferentna osjetna vlakna. Osjetni signali odlaze u mnoga područja kralježničke moždine, pa čak i u moždano deblo. Primjerice u vagusnim živcima je 80 % živčanih vlakana aferentno, a ne eferentno. Ta aferentna vlakna prenose osjetne signale iz probave u produženu moždinu.(10)

Aferentna vlakna nisu direktno povezana sa crijevnom mikrobiotom, tako da je interakcija limitirana na stanice koje su lokalizirane u epitelu i za one metabolite koji prolaze kroz epitel. Enteroendokrine stanice su sastavnica epitelnih stanica crijeva, one moduliraju pokretljivost,

sekreciju i prijenos tvari u crijevima. One komuniciraju sa vagalnim aferentnim vlaknima putem serotonina, grelina, kolecistokinina, peptida YY.(9)

## 5.2 Mehanizmi kojima crijevna mikrobiota utječe na CNS

Postoje četiri mehanizma kojima crijevna mikrobiota može utjecati na CNS. To su neuronski, endokrini, metabolički i imunološki putevi.(2)

Neuronski put se ostvaruje preko ENS-a, djelom autonomnog živčanog sustava i vagalnim aferentnim vlaknima koji prenose senzorne informacije iz crijeva prema CNS-u. Promjena crijevne mikrobiote probioticima je pokazala da postoji utjecaj na crijevne motorne funkcije. Receptori koji su izraženi na vagalnim eferentnim vlaknima reagiraju na velik broj regulatornih peptida u crijevima i dalje prenose signale prema CNS-u. Doista, vagalna aktivacija je nužna za širok spektar učinaka koje mikrobiom ili probiotici imaju na funkciju mozga.(2) Kronični tretman sa bakterijom *Lactobacillus rhamnosus* u glodavaca je inducirao promjene ekspresije GABA receptora u mozgu, smanjio simptome anksioznosti i depresije inducirane stresom putem signalizacije vagalnim vlaknima. Također, u životinjskom modelu kolitisa, izostao je anksiolitički efekt *Bifidobacterium* u vagotomiranih miševa.(7,11,12)

Neka istraživanja ukazuju na direktnu poveznicu između crijevnog mikrobioma i enteričkih neurona. Receptori slični Tollu-3,4 (eng. *Toll-like receptors*-TLR3,4) koji prepoznaju virusnu DNA i TLR-2,4 koji prepoznaju peptidoglikane i lipopolisaharide su izraženi na ENS-u u miševa i ljudi.(13,14) Jedno istraživanje je pokazalo da *Lactobacillus reuteri* poboljšava ekscitabilnost neurona u crijevima u štakora, inhibirajući kalijске kanale ovisne o kalciju.(15) Još je nejasno, u razdobljima homeostaze, dolaze li i/ili kako antigeni mikroorganizama iz lumena crijeva dolaze do sloja muscularis mucosae i submukoznog sloja.(2)

Uz neuronske i imunološke puteve, crijeva komuniciraju mozgom putem hormonalne signalizacije koja uključuje otpuštanje crijevnih peptida iz enteroendokrinih stanica.(7) Enteroendokrine stanice koje se nalaze u crijevnom epitelu, pogotovo enterokromafine stanice, mogu lučiti neurotransmitore i ostale signalne peptide na podražaj u crijevu i tako služiti kao prijenosnici signala na putu između crijeva i CNS-a.(2) Istraživanja provedena na

aksenički uzgojenim životinjama pokazuju da mikrobiota regulira i sudjeluje u otpuštanju crijevnih peptida, ali jako malo se zna mehanizam komunikacije u osovini crijeva-mozak putem hormona. Brojni crijevni peptidi sudjeluju u modulaciji ponašanja pri hranjenju, cirkadijanog ritma, u anksioznosti itd. Receptori leptina su nađeni u limbičkim strukturama i kronična terapija leptinom dovela je do promjene u poremećajima ponašanja povezanih sa stresom. U dijabetičkih miševa pokazan je antidepresivni učinak leptina. Za neuropeptid Y (eng. *neuropeptide Y-NPY*) se također misli da sudjeluje u interakciji mikrobioma i mozga jer je osjetljiv na utjecaje mikrobiote i djeluje kroz neuronski i endokrini put. Nalazimo ga na više mjesta u osovini mozak-crijeva te nosi brojne funkcije, poput regulacije raspoloženja i pokretljivosti crijeva.(7,16)

Imunološki putevi su najvjerojatnije nezavisni mehanizmi u signalizaciji između mikrobioma, crijeva i mozga.

Komenzalni mikrobiom, koji oblikuje imunološki sustav domaćina, ima učinaka na autoreaktivnost perifernih stanica imunološkog sustava prema CNS-u.(2) Tijekom homeostaze, održava se ravnoteža između sluznice, imunološkog sustava i mikrobiote, ali promjene sastava mikrobiote dovode do poremećaja ravnoteže. Dolazi do aktivacije *toll-like* receptora i posljedično promjene u profilu citokina. Davanje pro-inflamatornih citokina u glodavaca inducira simptome slične depresivnim, poremećaj cirkadijanog ritma i apetita. Točni imunomodulacijski mehanizmi kojima mikrobiota sudjeluje u imunološkim reakcijama nisu potpuno razjašnjeni. Kolonizacijom aksenički uzgojenih miševa sa komenzalnim bakterijama dolazi do aktivacije regulatornih T limfocita (Treg) i produkcije IL-10. što sugerira da promjena mikrobiote utječe na ponašanje i to modulacijom upalnog odgovora domaćina. Moguće je da se taj učinak postiže putem Treg limfocita i sintezom protuupalnih citokina.(7)

Metaboliti mikrobioma mogu modulirati težinu bolesti putem dva mehanizma: jedan je putem imunološkog sustava, a drugi je direktan učinak metabolita mikrobioma na stanice CNS-a. Vezano uz indirektnu učinke, regulatorni T-limfociti (Treg) mogu dovesti do neuroprotekcije poticanjem remijelinizacije i diferencijacije oligodendrocita. IL-10, glavni citokin Treg limfocita

može potaknuti neuroregeneraciju. Direktni učinci metabolita na CNS su još slabo razjašnjeni, ali ne manje važni. Jedni od važnih metabolita crijevnih komenzala su i kratkolančane masne kiseline (eng. *short-chain fatty acids*-SCFA) koje imaju mnoge učinke na osovину crijeva-mozak.(9)

### 5.3 Kratkolančane masne kiseline

Mikrobiota u crijevima je odgovorna za proizvodnju nekoliko metabolita koji nastaju fermentacijom topljivih vlakana kao što su galakto-oligosaharidi i frukto-oligosaharidi. Neki od tih metabolita su kratkolančane masne kiseline acetat, propionat i butirat.(17) Kroz njihovu apsorpciju i metabolizam domaćin uspijeva dobiti energiju iz namirnica, pogotovo rezistentnog škroba i vlakana koje se ne razgrađuju u gornjem dijelu probavnog sustava. Glavna lokalizacija stvaranja i apsorpcije SCFA je u proksimalnom dijelu debelog crijeva.(7) Proizvode ih fermentacijom rodovi *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Roseburia* i *Prevotella*. Vrsta SCFA koja se stvara, ovisi o vrsti vlakna i relativnoj populaciji mikrobiota u crijevima.(17)

One imaju, za domaćina korisne, regulatorne učinke na metabolizam stanica crijeva.(9) Djeluju na metabolizam i transport u epitelnim stanicama crijeva, na rast i diferencijaciju epitelnih stanica, daju izvor energije mišićima, bubrezima, mozgu i srcu. Oko 60-70 % stanica epitela distalnog kolona energiju crpi iz produkata bakterijske fermentacije.(7)

One su također i signalne molekule. Propionat, acetat i manje butirat su ligandi za barem dva receptora vezanih s G-proteinima, Gpr41 i Gpr43 koji su izraženi na stanicama distalnog dijela tankog crijeva, kolona i na adipocitima.(7) SCFA mogu pasivno ili aktivno biti transportirani u sistemsku cirkulaciju i tamo stvarati šire fiziološke učinke u metabolizmu lipida, glukoze i kolesterola.(17)

Interakcija SCFA sa Gpr43 ima učinka na upalni odgovor. Miševi koji su tretirani oralnim acetatom, pokazuju izrazito smanjenje upale. Taj učinak je posredovan vezanjem acetata na Gpr43, jer acetat, u miševa koji su bili Gpr43 deficijentni, nije postigao takav učinak. Izražaj

Gpr43 na neutrofilima i eozinofilima sugerira da bi to mogao biti jedan od molekularnih puteva putem kojih komenzalne bakterije reguliraju imunološke odgovore.(7)

One lako ulaze u cirkulaciju iz crijeva i transportirane su putem monokarboksilatnih transportera na krvno-moždanoj barijeri.(17) SCFA prolaze krvno-moždanu barijeru i ulaze u CNS, u glija stanice i manje u neurone. Smatra se da imaju ulogu izvora energije, pogotovo u ranom razvoju mozga, također u staničnoj signalizaciji i sintezi i otpuštanju neurotransmitora. Pokazalo se da one povećavaju sintezu dopamina putem indukcije tirozin-hidroksilaze. Također, pokazalo se da propionat mijenja dopaminske, serotoninске i glutamatne sustave na način sličan onome koji se promatra u poremećajima spektra autizma.(7) Više istraživanja je pokazalo da intraventrikularna infuzija propionata u štakora dovodi do promjena u socijalnom ponašanju i promjenama na mozgu sličnih onima koje primjećujemo u autizmu.(18,19) Neke kliničke studije pokazuju da pacijenti sa poremećajima spektra autizma imaju visoke razine bakterijskih vrsta *Clostridium* i *Bacteroides* u crijevima.(20) Ovi nalazi ukazuju da propionat, iako ima svoje povoljne učinke na serumski kolesterol, lipogenezu i inzulinsku osjetljivost, njegove pretjerane koncentracije možda imaju negativne efekte na zdravlje.(7)

Butirat ima direktan učinak na vagalna vlakna, stimulacija koja se u kliničkim istraživanjima pokazala korisnom za kogniciju u pacijenata sa Alzheimerovom bolesti. Butirat inhibira HDAC (eng. *histone deacetylase*) što rezultira hiperacetilacijom i opuštanjem kromatina. Posljedično dolazi do boljeg pristupa enzimima za popravak DNA i transkripciju raznih regulatornih gena. Kroz ovaj mehanizam, butirat djeluje na regulatornu regiju Forkhead box (*Foxo*) genskog lokusa. FOXO potiče više procesa za preživljenje stanice: inducira ekspresiju gena odgovornih za borbu za slobodnim radikalima, faktora autofagije i gena odgovornih za stresni odgovor. U stanjima bolesti, kao u pacijenata sa Parkinsonovom bolesti, FOXO regulira gene odgovorne za apoptozu i dovodi do smrti stanice. Ta činjenica indicira da je uska regulacija FOXO kritična za balansiranje između smrti i preživljenja stanice. Indukcija gena za autofagiju putem FOXO ključna je za neuroprotekciju, posebno u neurodegenerativnim bolestima.(17) Postoji više istraživanja koja indiciraju direktnu

neuroprotektivnu ulogu butirata preko HDAC inhibicije i učinka na FOXO ekspresiju u in vitro i in vivo modelima neurodegenerativnih bolesti.(21,22) Istraživanje provedeno na modelu Parkinsonove bolesti u *Drosophila melanogaster* pokazala je da FOXO ima protektivni učinak putem djelovanja na mitohondrije.(23)

Jedno istraživanje je pokazalo da butirat i propionat značajno smanjuju ekspresiju amiloid A4 protein prekursora, što indicira neuroprotektivnu ulogu protiv Alzheimerove bolesti.(24) Butirat je putem inhibicijskog učinka na HDAC, doveo do poboljšanja pamćenja u modelu Alzheimerove bolesti u miševa i doveo do povećane ekspresije gena povezanih sa asocijativnim učenjem.(17, 25)

#### **5.4 Alzheimerova bolest i mikrobiota**

Alzheimerovu bolest obilježavaju depoziti  $\beta$ -amiloida i nakupljanje hiperfosforiliranog tau proteina. Mehanizmi koji dovode do ovih promjena nisu još potpuno shvaćeni, ali postoje pretpostavke da ulogu ima i crijevna mikrobiota.

Poveznicu amiloidoze mozga sa proinflamatornim crijevnim mikrobiomom dokazalo je jedno istraživanje koje je metagenomskom analizom istražilo pacijente sa kognitivnim oštećenjem povezanim sa amiloidozom. Otkrivene su veće razine proinflamatornih citokina, smanjen broj bakterija *Eubacterium* (poznatih po protuupalnim svojstvima) i povećanje broja bakterijskih rodova *Escherichia/Shigella* u odnosu na zdrave kontrole.(26) U APP transgeničkih miševa koji su aksenički uzgojeni, nađena je značajna redukcija nakupljanja amiloida u odnosu na kontrole koje su imale normalnu crijevnu mikrobiotu.(5)

##### **5.4.1 Poremećaj propusnosti u krvno-moždanoj barijeri**

Strukturalni i funkcionalni poremećaj krvno-moždane barijere u Alzheimerovoj bolesti mogao bi biti rani i bitan korak u patogenezi te bolesti.(17) Jedno istraživanje je pokazalo da miševi koji nemaju mikroorganizama, kojima je uništena mikrobiota, imaju povećanu propusnost krvno-moždane barijere. Razlog tome bi mogao biti poremećaj proteina tijesnih spojeva, posebno proteina okcludina i kladina-5. Kratkolančane masne kiseline mogu ući u cirkulaciju i smanjiti permeabilnost krvno-moždane barijere. To čine na način da povećavaju



ekspresiju endotelnih proteina tijesnih spojeva, posebice okcludin i kladudin-5.(27) Ovi nalazi ukazuju da crijevna mikrobiota utječe na propusnost krvno-moždane barijere.(17) Metagenomskom analizom mikrobioma, uočena je manja brojnost bakterija koje proizvode butirat, sa većom brojnošću bakterija koje su poznate po proupalnim svojstvima u starijih pacijenata sa AB u odnosu na one bez bolesti.(5, 28)

Dodatno, oštećena barijera u crijevima, oštećeni crijevni epitel, može dovesti do translokacije patogenih mikroorganizama iz crijeva dalje u cirkulaciju. Tada, mikroorganizmi mogu doći i do mozga zbog povećane propusnosti krvno-moždane barijere.(29) Uspoređujući kontrole, uzorci mozga pacijenata sa Alzheimerovom bolesti, pokazuju veći broj bakterijskih populacija.(30) Provedeno je nekoliko istraživanja u kojima se htjela istražiti jedna od hipoteza da bi uzrok Alzheimerove bolesti mogao biti mikrobiološkog podrijetla. Jedan od dokaza koji bi išli u prilog te hipoteze je da A $\beta$  ima karakteristike jednog anti-mikrobnog proteina koji djeluje na barem 12 različitih mikroorganizama.(31) Također, jedno istraživanje je pokazalo da miševi čiji je mozak inficiran sa bakterijom *Salmonella typhimurium* u mozgu, sadrže A $\beta$  u moždanom parenhimu, blizu bakterijskih depozit.(29,32)

#### **5.4.2 Uloga proupalnih neurotoksina**

Crijevna mikrobiota proizvodi izuzetno složen niz proinflammatoryh neurotoksina koji prelaze krvno-moždanu barijeru. Oni su patogeni i imaju štetan utjecaj na funkcije neurona u CNS-u. Posebno se ističe uloga lipopolisaharida (eng. *lipopolysaccharide-LPS*), kojeg proizvode gram-negativne bakterije. Bakterijski LPS se može vezati na TLR2, TLR4 i CD14 na mikroglijalnim stanicama. Tada dolazi do stvaranja kaskade citokina i kemokina putem signalnih puteva NF- $\kappa$ B (eng. *nuclear factor kappa beta*) i MyD88 (eng. *myeloid differentiation factor 88*).(29)

Nadalje, u neokorteksu i hipokampusu pacijenata sa Alzheimerovom bolesti, detektiran je LPS.(33) Također, istraživanja na životinjskim modelima pokazala su da vezanje LPS na TLR4 dovodi do inhibicije proliferacije i neuralne diferencijacije, dok je TLR2 poboljšao

neurogenezu u hipokamusu.(34) Čini se da LPS efikasno aktivira signalni put NF- $\kappa$ B, te u konačnici doprinosi nastanku Alzheimerove bolesti.(29)

U jednom istraživanju, unos LPS-a je pojačao neurodegeneraciju i pridonio oksidativnom stresu mehanizmom smanjenja glutationa, superoksid dismutaze i povećanjem lipidne peroksidacije u mozgu miševa.(3)

Treba spomenuti da LPS može aktivirati stvaranje kompleksa inflammasoma. Inače, inflammasom je citosolna makromolekula koja je signalna platforma za aktivaciju cistein-proteaze-kaspaze-1, koja dovodi do proteolitičkih procesa i izlučivanja proinflamatornih citokina: interleukina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) i interleukina-18(IL-18). Upala posredovana inflammasomom jedan je od ključnih faktora upalnog odgovora u Alzheimerovoj bolesti. Dakle, bakterijski bi endotoksini mogli biti unutarnji faktori koji sudjeluju u upalnoj degeneraciji.(29)

#### **5.4.3 Sistemska upala i Alzheimerova bolest**

Upala sistemskog tipa može utjecati na imunološke procese u mozgu, te poticati pogoršanje Alzheimerove bolesti. Ta hipoteza je podržana kliničkim istraživanjima koje pokazuju da uslijed akutne ili kronične sistemske infekcije dolazi do kognitivnog pogoršanja i uznapredovanja neurodegeneracije.(35, 36) Povećane razine proupalnih bakterija *Escherichia/Shigella* i smanjenje razine protuupalnih bakterija *Eubacterium rectale* povezane su sa povećanim razinama IL-1 $\beta$ , CXCL2 i NLRP3 u krvnoj plazmi pacijenata sa kognitivnim poremećajima i amiloidozom mozga.(29)

Molekularni obrasci patogenih mikroorganizama (eng. *pathogen-associated molecular patterns*-PAMP) kao što je LPS se vežu na receptore izraženim na makrofazima i dendritičkim stanicama u crijevima čime dolazi do stvaranja proupalnih medijatora, poput proupalnih citokina. Crijevna epitelna barijera koja je propusnija tada propušta te upalne medijatore u sistemsku cirkulaciju i uzrokuju sistemsku upalu.(29)

Osim PAMP i metaboliti povezani sa mikroorganizmima dodatno pridonose sistemskoj upali. Tako naprimjer, promjene u crijevnom mikrobiomu miševa sa Alzheimerovom bolesti, mogu uzrokovati povišenje koncentracije fenilalanina i izoleucina , te tako provocirati infiltraciju

raznih stanica imunološkog sustava limfocita T, limfocita B, NK-stanica(eng. *natural killer cells*), dendritičkih stanica i monocita. Broj CD4+ stanica T snažno korelira sa aktivacijom mikroglije u mozgu tijekom progresije Alzheimerove bolesti.(29, 37)

## 5.5 Parkinsonova bolest (PB) i mikrobiota

### 5.5.1 Uloga određenih porodica bakterija u patofiziologiji

Metaanaliza koja je bazirana na 14 slučaj-kontrola istraživanja opisuje da u pacijenata sa PB u odnosu na zdrave kontrole, nalazimo manju brojnost bakterija pripadnika skupina *Prevotellaceae*, *Faecalibacterium* i *Lachnospiraceae*, a povećana je brojnost vrsta iz obitelji *Bifidobacteriaceae*, *Ruminococcaceae*, *Verrucomicrobiaceae* i *Christensenellaceae*.(38) Mikrobiom pacijenata sa PB karakteriziran je sa smanjenom brojnosti bakterija koje proizvode butirat i povećanom brojnosti proupalnih *Proteobacteria*.(6)

Inače, *Bifidobacteriaceae* sudjeluju u više fizioloških funkcija u organizmu: sprječava pretjerani rast štetnih bakterija u crijevu i sudjeluje u imunološkoj regulaciji. U studijama su one bile povišene, moguće kao kompenzacijski mehanizam.(38) Dugoročno davanje probiotika miševima sa PB imalo je neuroprotektivni učinak na dopaminske neurone u supstantiji nigri i dovelo je do poboljšanja simptoma bolesti.(39)

*Prevotellaceae* stvaraju SCFA razgradnjom ugljikohidrata iz dijetnih vlakana, a one imaju brojne učinke na epitelne stanice crijeva i sudjeluju na održavanje zdrave barijere crijevne sluznice. SCFA imaju i brojne druge učinke opisane u ranijim naslovima. Smanjena brojnost povezana je sa smanjenim razinama hormona grelina koji sudjeluje u regulaciji dopaminskih neurona u supstantiji nigri compacti.(38) Također još jedan povoljan učinak ovih bakterija je taj da sudjeluju u sintezi mucina u crijevnoj sluznici i na taj način osnažuju crijevnu barijeru. Dakle, smanjena brojnost tih bakterija dovodi do smanjene sinteze mucina i time povećane propusnosti crijevne barijere. To rezultira sa izloženošću tijela bakterijskim antigenima i endotoksinima, što može aktivirati ekspresiju alfa-sinukleina u kolonu i u mozgu.(6)

Bakterije iz skupine *Faecalibacterium* proizvode SCFA i protuupalne metabolite koji održavaju zdravu sluznicu crijeva. Redukcija u njihovu broju vjerojatno čini crijeva sklonijim infekciji sa crijevnim patogenima i povećava rizik formacije alfa-sinukleina u crijevima, u ENS.(29, 40)

*Akkermansia* iz porodice *Verrucomicrobiaceae* su bakterije koje razgrađuju mucin. One pretvaraju mucin u kratkolančane masne kiseline. Uključene su u proupalne mehanizme, jer razgradnjom mucina dolazi do poremećaja integracije crijevne barijere i time imunološki sustav biva izložen patogenima iz crijeva, a to može dovesti do agregacije alfa-sinukleina u ENS-u.(29) Dakle povišenje ovih bakterija može imati negativan učinak na Parkinsonovu bolest.

Više od 20 istraživanja slučaj-kontrola je provedeno sa svrhom istraživanja sastava crijevne mikrobiote u pacijenata sa Parkinsonovom bolesti. Primijećeno je da između pacijenata i kontrola postoji razlika u brojnosti više od 100 različitih taksa. Više istraživanja je sugeriralo da pojedinci sa Parkinsonovom bolesti imaju izmijenjenu mikrobiotu uspoređujući sa zdravim pojedincima, no ipak neki podaci nisu konzistentni, te vrste bakterija koje su povezane sa bolesti još nisu utvrđene. Kroz većinu istraživanja, rod *Akkermansia* i obitelj *Verrucomicrobiaceae* su bili obilniji u pacijentima sa Parkinsonovom bolesti, dok je broj bakterija iz obitelji *Lachnospiraceae* bio smanjen. Podaci su često kontradiktorni, a to je moguće zbog varijacija u dizajnim istraživanja i metodama koje se koriste u istraživanju, ali isto tako i zbog prirodne varijabilnosti crijevne mikrobiote u različitim populacijama, te zbog različitih životnih stilova i prehrane ljudi.(41)

### **5.5.2 Moguća poveznost mikrobiote i alfa-sinukleina**

Moguće je da bakterijski proteini stvaraju predložak za pogrešno savijanje proteina.(42) Provedeno je istraživanje u kojem su se animalni modeli hranili sa specifičnim sojem bakterije *Escherichia coli* koja proizvodi jedan od tih proteina, nazvanim *curl*, te je primijećeno da se u mozgu tih životinja nakuplja više alfa-sinukleina. Još jedno istraživanje koje su proveli Mazmanian i suradnici također potvrđuje tu teoriju.(43,44) Poveznica crijeva i mozga je najvjerojatnije nervus vagus. Zanimljivo, pronađeno je da pacijenti koji su 1970- ih liječili

želučani ulkus operacijom odstranjenja živca, kako bi smanjili proizvodnju želučane kiseline, bili manje skloni razvoju Parkinsonove bolesti.(42,45)

U jednom istraživanju koje se provodilo na miševima, injekcijom pogrešno savijenog alfa-sinukleina u crijeva, došlo je do njegove pojave u mozgu. Ali, kada bi istraživači prije toga uklonili nervus vagus, ne bi došlo od pojave alfa-sinukleina.(46) Autorica tog istraživanja misli da dolazi do domino efekta. Pogrešno savijeni proteini u crijevima, putem živca prenose signal do mozga, gdje onda proteini u mozgu postanu pogrešno savijeni. Planiraju se nova istraživanja u kojima se želi provjeriti, može li *curli* protein u crijevima dovesti do pojave Parkinsonove bolesti u miševa kojima je uklonjen nervus vagus.(42)

## 5.6 Amiotrofična lateralna skleroza i crijevna mikrobiota

### 5.6.1 Povezanost nikotinamida, bakterije *Akkermansia muciniphila* i ALS

Jedno istraživanje pokazalo je da bakterije u crijevu mogu izlučivati određene metabolite koji imaju regulatornu funkciju u progresiji ALS-a i na mišjim modelima i pacijentima. Tretirali su Sod-1 transgenične (Sod1-Tg) miševe sa antibioticima širokog spektra, te je došlo do egzacerbacije simptoma ALS-a. Tada su usporedili mikrobiom tih miševa sa kontrolama i otkrili su disbiozu i promjene u konfiguraciji sistemskih metabolita. Koristeći metagenomsku analizu kroz progresiju bolesti identificirali su 11 sojeva povezanih sa težinom bolesti. Zatim, nakon anaerobnog kultiviranja specifičnog soja, taj soj bi se davao Sod1-Tg miševima prethodno tretiranim antibioticima. Suplementacija tih sojeva je pokazala da *Akkermansia muciniphila* smanjuje, dok *Rzminococcus torques* i *Parabacteroides distasonis* pogoršavaju simptome ALS-a u miševa.(47)

Metabolomska analiza je provedena kako bi se dokazali metaboliti povezani sa *A. muciniphila* tretiranim miševima i nađeno je da bakterija značajno povećava koncentracije nikotinamida u živčanom sustavu. Direktnom primjenom nikotinamida došlo je do poboljšanja simptoma u Sod1-Tg miševa. Ova saznanja ukazuju na moguću primjenu nikotinamida u

liječenju ALS-a. Primjenom bakterije *A. muciniphila* ili metabolita nikotinamida dovelo je do povećane ekspresije neuroprotektivnih gena povezanih sa mitohondrijskom strukturom i funkcijom. Također, ta je primjena djelovala na homeostazu nikotinamid adenin dinukleotida (NAD<sup>+</sup>), te na izbacivanje superoksid radikala u kralježničkoj moždini, na funkciju za koju se zna da je poremećena u ALS-u.(47)

Proveli su i opažajnu studiju koja je pokazala da se sastav i funkcija mikrobioma pacijenata sa ALS-om značajno razlikuje od zdravih članova obitelji. Također nađene su značajno smanjene koncentracije nikotinamida u cerebrovaskularnom likvoru pacijenata.(47)

### **5.6.2 Promjene u sastavu crijevnog mikrobioma**

Neka klinička istraživanja pokazuju da gastrointestinalni simptomi prethode neurološkim simptomima, a intestinalna mikrobiota pokazuje manju raznolikost nego u zdravih kontrola. Jedna studija navodi smanjen omjer *Firimicutes/Bacteroidetes*, i smanjenje brojnosti bakterija iz skupina *Anaerostipes*, *Oscillibacter* i *Lachnospiraceae* u pacijenata sa ALS-om. Moguće je da proinflamatorni mikrobiom potiče oštećenje epitelne barijere i aktivira upalni odgovor u crijevima. Neki istraživači navode da oštećena barijera omogućuje toksinima iz crijeva ulaz u sistemski krvotok, porast LPS u krvotoku, te aktivaciju upalnog odgovora.(6)

## 6 MOGUĆE TERAPIJSKE OPCIJE

### 6.1 Prehrana

Prehrana je jedna od glavnih odrednica sastava mikrobiote. Specifična hrana ima utjecaja na sastav i brojnost različitih tipova bakterija u crijevu. Različite epidemiološke studije sugeriraju da postoji jaka povezanost pojave Alzheimerove bolesti i demencija sa faktorima povezanim sa životnim stilom.(3,29)

Mediterranska prehrana smatra se korisnom za pacijente sa Alzheimerovom bolesti zbog unosa voća, povrća, mahunarki, zbog bogatstva polifenolima, nezasićenim masnim kiselinama i nerazgradivim ugljikohidratima. Protuupalna svojstva ove prehrane povezuju se sa povećanjem brojnosti u *Bacteroides* i *Clostridium* koljenu, a smanjenje *Proteobacteria* i *Bacillaceae*.(3,29) Doista, konzumacija hrane u sklopu plana Mediteranske prehrane usporila je progresiju AB.(48) Istraživanja sugeriraju da prehrana bazirana na biljkama, tzv. *plant-based* prehrana kao ona u Mediteranskoj prehrani može modulirati sastav crijevnog mikrobioma i povećati razine fekalnih SCFA.(29, 49)

Crijevni mikrobiom proizvodi vitamine koji su nužni za zdravlje mozga poput B6, B9, B12. Deficijencije folata i B12 su povezane sa oslabljenim pamćenjem.(3) Jedno istraživanje navodi da je kronična izloženost miševa zapadnoj prehrani pridonijela pretilosti i poremećaju pamćenja. Ta vrsta prehrane povećava brojnost bakterija iz skupina *Flavobacterium*, *Runella* i *Flectobacillus* koji mogu aktivirati upalne odgovore preko NF-κB signalnog puta.(3, 50)

### 6.2 Probiotici i prebiotici

Probiotici su živi mikroorganizmi koji su prisutni u ljudskim crijevima koji kad se primjene u dovoljnoj količini donosi korisne učinke na zdravlje domaćina. Nadalje, učinci po kojima probiotici djeluju povoljno na mikrobiotu su: imunomodulacija, zaštita od fiziološkog stresa, antagonizam patogenima i poboljšanje barijere crijeva. Probiotici se natječu sa patogenim bakterijama za nutrijente i vezna mjesta.(4, 29)

Nađeno je da, miševi tretirani sa probioticima pokazuju bolju prostornu memoriju i manje plakova u hipokampusu.(51) Također, dugoročnom uporabom jednog kompleksnog probiotičkog pripravka, miševi su pokazali značajno poboljšanje sastava mikrobiote, smanjenu aktivaciju imunološkog sustava i oštećenja neurona i sinapsi.(52) Taj učinak se najvjerojatnije ostvaruje preko inhibicije NF-κB signalnog puta. Pacijenti sa Alzheimerovom bolesti koji su dobivali probiotike su pokazali poboljšanje u kognitivnim funkcijama i povoljne promjene u biomarkerima plazme poput malondialdehida i triglicerida.(29)

Jedno istraživanje pokazalo je da pacijenti koji su konzumirali mlijeko bogato *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* imaju značajno poboljšanje u njihovom *MMSE* rezultatu, za razliku od onih koji su pili obično mlijeko. Oni su glavne komponente raznih probiotičkih mješavina i najvjerojatnije djeluju preko stvaranja IL-10.(6,53) No, klinički rezultati nisu dovoljni da bi se donijela odluka o preporuci probiotika pacijentima sa Alzheimerovom bolesti.(29) Probiotici mogu poboljšati simptome Parkinsonove bolesti sličnim mehanizmima koji su gore opisani. Davanje probiotika dovelo je do smanjene ekspresije TNF-α, IL-8 i IL-1 u pacijenata sa Parkinsonovom bolesti.(6)

Iako se probiotici široko koriste u općoj populaciji, mnogi probiotički sojevi imaju kontradiktorne rezultate u kliničkim istraživanjima. Osim njihovih povoljnih učinaka, trebali bi proučavati i nuspojave poput transfera gena sa probiotika na normalnu floru, štetnih metaboličkih učinaka i imunološku stimulaciju.(29)

Prebiotici su spojevi koje koriste mikroorganizmi domaćina i tako imaju povoljne zdravstvene učinke. Primjeri prebiotika su: otporni škrob (eng. *resistant starch-RS*), inzulin, fruktooligosaharidi i galaktooligosaharidi.

Za RS je poznato da ima povoljan učinak na metaboličko zdravlje. Dokazano je da povećava brojnost nekih bakterijskih rodova i vrsta poput *Ruminococcus bromii*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Faecalibacterium prausnitzii* i dr.(54) Fruktooligosaharidi potiču rast povoljne mikrobiote poput *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Također, u animalnim modelima



Alzheimerove bolesti, fruktooligosaharidi su održali stabilnost i raznolikost mikrobioma, smanjili ekspresiju tau i A $\beta$  1-42 u mozgu, ublažili otok moždanog tkiva i neuronsku apoptozu.(29) Neka istraživanja indiciraju da prebiotička vlakna koja stvaraju butirat mogu imati korisne učinke u pacijenata sa Parkinsonovom bolesti.(6) U ljudi, prebiotici imaju dosta skromne učinke. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se ocijenili učinci prebiotika i njihova moguća klinička upotreba. Također, postoje i brojna tehnička pitanja kao npr. kako osigurati da prebiotik dođe na mjesto u crijevima gdje će moći imati terapijski učinak.(29)

### **6.3 Farmakoterapijske opcije**

Jedno od novijih otkrića je natrijev oligomanat koji je ekstrahiran iz algi. Pokazao je snažne i konzistentne učinke na poboljšanje kognitivnih funkcija u fazi 3 kliničkih istraživanja. Značajno smanjuje aktivaciju mikroglije i razine više proupalnih citokina, utjecajem na sastav mikrobiote i smanjujući periferne razine fenilalanina i izoleucina koje stvara crijevna mikrobiota. Taj mehanizam je otvorio mogućnost liječenja preko promjena prehrane ili putem lijekova kako bi se smanjile periferne razine fenilalanina i izoleucina.(29,37)

### **6.4 Transplatacija fekalne mikrobiote (FMT)**

FMT podrazumijeva prijenosa stolice donora u gastrointestinalni trakt pacijenta sa ciljem poboljšanja raznolikosti i funkcije mikrobiote. Za sad, FMT je preporučena samo za ponavljajuće infekcije bakterijom *Clostridium difficile*, iako postoje istraživanja za razne bolesti od upalnih bolesti crijeva, metaboličkih i malignih bolesti.(29)

Vezano uz neurodegenerativne bolesti, redoviti transferi fekalne mikrobiote u miševa doveli su do smanjenja amiloidnih plakova i aktivacije glija stanica.(55) Naravno, treba biti oprezan sa interpretacijama pretkliničkih istraživanja zbog ograničenosti životinjskih modela neurodegenerativnih bolesti. Svakako, FMT dobiva sve više pozornosti u pretkliničkim i kliničkim studijama i sigurno će se ubrzano razvijati u sljedećem razdoblju.(29)

## **7 ZAKLJUČAK**

Čini se da crijevna mikrobiota ima puno utjecaja na patogenezu neurodegenerativnih bolesti. Ipak, neurodegeneracija je kompleksan proces i treba promatrati više različitih čimbenika, a ne samo jedan aspekt mehanizma nastanka bolesti. Potrebna su daljnja istraživanja koja će omogućiti da modulacija crijevne mikrobiote ima svoje mjesto u prevenciji i kontroli navedenih bolesti.

## 8 ZAHVALE

Zahvaljujem mentorici prof.dr.sc. Jasmini Vraneš na susretljivosti, ljubaznosti i pomoći prilikom pisanja diplomskog rada.

Najviše zahvaljujem svojoj obitelji, posebno roditeljima Ružici i Daliboru, te sestri Magdaleni koji su mi bili bezuvjetna podrška tijekom cijelog mog studiranja, te dragim prijateljima koji su mi bili oslonac.

Zahvaljujem kolegama koji su sa mnom dijelili studiranje i učinili ga ljepšim.

## 9 LITERATURA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Stanična i molekularna imunologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2018.
2. Wang Y, Kasper LH. The role of microbiom in central nervous system disorders. *Brain Behav Immun.* 2014; 38:1-12.
3. Shabbir U, Arshad MS, Sameen A, Oh DH. Crosstalk between gut and brain in Alzheimer's disease: The role of gut microbiota modulation strategies. *Nutrients.* 2021; 13:690.
4. Ghaisas S, Maher J, Kanthasamy A. Gut microbiome in health and disease: linking the microbiome-gut-brain axis and environmental factors in the pathogenesis of systemic and neurodegenerative diseases. 2016; 158:52-62.
5. Tilocca B, Pieroni L, Soggiu A, Britti D, Bonizzi L, Roncada P, Greci V. Gut -brain axis and neurodegeneration: state-of.the-art of meta-omics sciences for microbiota characterization. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020; 21:4045.
6. Zhu Xueling, Li Bo, Lou P, Dai T, Chen Y, Zhuge A, Yuan Y, Li L, The relationship between the gut microbiome and neurodegenerative diseases. *Neurosci. Bull.* 2021; 37(10):1510-1522.
7. Lyte Mark, Cryan John F. Microbial endocrinology: the microbiota-gut-brain axis in health and disease. *Advances in experimental medicine and biology.* New York: Springer. 2014;817.
8. Brinar Vesna i suradnici. *Neurologija za medicinare.* Zagreb: Medicinska naklada; 2019.
9. Hirschberg S, Gisevius B, Duscha A, Haghikia A. Implications of diet an the gut microbiome in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci.* 2019; 20:3109.
10. Guyton Arthur C, Hall John E. *Medicinska fiziologija.* Zagreb: Medicinska naklada; 2017.

11. Bravo JA, et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(38):16050-16055.
12. Berick P, et al. The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication. *Neurogastroenterol Motil*. 2011; 23(12):1132-1139.
13. Barajon I, et al. Toll-like receptors 3,4 and 7 are expressed in the enteric nervous system and dorsal root ganglia. *The journal of histochemistry and cytochemistry*. 2009; 57:1013-1023.
14. Brun P, et al. Toll-like receptor 2 regulates intestinal inflammation by controlling integrity of the enteric nervous system. *Gastroenterology*. 2013.
15. Kunze WA, et al. *Lactobacillus reuteri* enhances excitability of colonic AH neurons by inhibiting calcium-dependent potassium channel opening. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13:2261-2270.
16. Lu XY et al. Leptin: a potential novel antidepressant. *Proc Natl Acad USA*. 2006; 103(5):1593-1598.
17. Westfall S, Lomis N, Kahouli I, Dia S Y, Singh S P, Prakash S. Microbiome, probiotics and neurodegenerative diseases:deciphering the gut brain axis. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74:3769-3787.
18. Schultz SR, Macfabe DF, Martin S, Jackson J, Taylor R, Boon F, Ossenkopp KP, Cain DP. Intracerebroventricular injections of the enteric bacterial metabolic product propionic acid impair cognition and sensorimotor ability in the Long-Evans rat: further development of a rodent model of autism. *Behav Brain Res*. 2009;200:33-41.
19. MacFabe DF, Cain DP, Rodriguez-Capote K, Franklin AE, Hofmann JE, Boon F, TaylorAR, Kavaliers M, Ossenkopp. Neurobiological effects of intraventricular propionic acid in rats:possible role of short chain fatty acids on the pathogenesis and characteristics of autism spectrum disorders. *Behav Brain Res*. 2007; 176:149-169.

20. Song Y, Liu C, Finegold SM. Real-time PCR quantification of clostridia in feces of autistic children . *Appl Environ Microbiol.* 2004;70:6459-6465.
21. Edwards C, Canfield J, Copes N, et al. D-beta-hydroxy-butyrates extends lifespan in *C.elegans*. *Aging(Albany NY).* 2014;6:621-644.
22. Cohen E, Bieschke J, Perciavalle RM, et al. Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science.* 2006; 313:1604-1610.
23. Koh H, Kim H, Kim MJ, et al. Silent information regulator 2 (Sir2) and Forkhead box O(FOXO) complement mitochondrial dysfunction and dopaminergic neuron loss in *Drosophila* PTEN-induced kinase 1 null mutant. *J Biol Chem.* 2012;287:12750-12758.
24. Nankova BB, Agarwal R, MacFabe DF, La Gamma EF. Enteric bacterial metabolites propionic and butyric acid modulate gene expression, including CREB-dependent catecholaminergic neurotransmission, in PC12 cells-possible relevance to autism spectrum disorders. *PLoS One.* 2014;9:e103740.
25. Govindarajan N, Agis-Balboa RC, Walter J, et al. Sodium butyrate improves memory function in an Alzheimer's disease mouse model when administered at an advanced stage of disease progression. *J Alzheimer's Dis* 2011; 26:187-197
26. Cattaneo A, Cattane N, Galluzi S, Provasi S, Lopizzo N, Festari C, Ferrari C, Guerra UP, Paghera B, Muscio C. Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation marker in cognitively impaired elderly. *Neurobiol. Aging.* 2017; 49:60-68.
27. Braniste V, Al-Ashmak M, Kowal C, et al. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med.* 2014; 6:263ra158.
28. Haran JP, Bhattarai SK, Foley SE, Ward DV, Bucci V, McCormick B A. Alzheimer's disease microbiome is associated with dysregulation of the anti-inflammatory P-glycoprotein pathway. *MBio.* 2019; 10:e00632-19.
29. Liu S, Gao J, Zhu M, Liu K, Zhang HL. Gut microbiota and dysbiosis in Alzheimer's disease: Implications for pathogenesis and treatment. *Molecular Neurobiology.* 2020; 57:5026-5043.

30. Emery DC, Shoemark DK, Batstone TE, Waterfall CM, Coghill JA, Carajewska TL, Davies M, West NX, et al. 16S rRNA next generation sequencing analysis shows bacteria in Alzheimer's post-mortem brain. *Front Aging Neurosci.* 2017; 9:195.
31. Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hoyman B, Burton MA, Goldstein LE, et al. The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One.* 5:e9505.
32. Kumar DK, Choi SH, Washicosky KJ et al. Amyloid-beta peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease. *Sci Transl Med.* 2016;8:340ra372.
33. Zhao Y, Jaber V, Lukiw WJ. Secretory products of the human GI tract microbiome and their potential impact on Alzheimer's disease:detection of lipopolysaccharide(LPS) in AD hippocampus. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017; 7:318.
34. Rolls A, Shechter R, London A, Ziv Y, Ronen A, Levy R, Schwartz M. Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat Cell Biol.* 2007; 9:1081-1088.
35. Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Culliford D, Perry VH. Proinflammatory cytokines, sickness behaviour, and Alzheimer's disease. *Neurology.* 2011; 77:212-218.
36. Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Culliford D, Woolford J, Dean C, Kerr S, Culliford D, Perry VH. Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology.* 2009; 73:768-774.
37. Wang X, Sun G, Feng T, Zhang J, Huang X, et al. Sodium oligomannate therapeutically remodels gut microbiota and suppresses gut bacterial amino acids-shaped neuroinflammation to inhibit Alzheimer's disease progression. *Cell Res.* 2019; 29: 787-803.
38. Shen T, Yue Y, He T, Huang C, Qu B, Lv W, Lai HY. The association between the gut microbiota and Parkinsons disease, a meta-analysis. *Front Aging Neurosci.* 2021; 13:636545.

39. Hsieh TH, Kuo CW, Hsieh KH, Shieh MJ, Peng CW, Chen YC, et al. Probiotics alleviate the progressive deterioration of motor functions in a mouse model of Parkinsons disease. *Brain Sci.* 2020; 10:206.
40. Unger MM, Spiegel J, Dillman KU, Grundmann D, Philippeit H, Burmann J, et al. Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinsons disease and age-matcher controls. *Parkinsonism Relat. Discord.* 2016; 32: 66-72.
41. Romano S, Savva GM, Bedarf JR, Charles IG, Hildebrand F, Narbad A. Meta-analysis of the Parkinsons disease gut microbiome suggests alterations linked to intestinal inflammation. *npj Parkinson s Disease.* 2021; 7:27.
42. Willyard C. How gut microbes could drive brain disorders. *Nature.* 2021;590: 22-25
43. Chen SG, et al. Exposure to the Functional Bacterial Amyloid Protein Curli Enhances Alpha-Synuclein Aggregation in Aged Fischer 344 Rats and *Caenorhabditis elegans*. *Sci Rep.* 2016 Oct 6;6:34477. doi: 10.1038/srep34477. PMID: 27708338; PMCID: PMC5052651.
44. Sampson TR, Challis C, Jain N, Moiseyenko A, Ladinsky MS, Shastri GG, Thron T, Needham BD, Horvath I, Debelius JW, Janssen S, Knight R, Wittung-Stafshede P, Gradinaru V, Chapman M, Mazmanian SK. A gut bacterial amyloid promotes  $\alpha$ -synuclein aggregation and motor impairment in mice. *Elife.* 2020 Feb 11;9:e53111. doi: 10.7554/eLife.53111. PMID: 32043464; PMCID: PMC7012599.
45. Svensson E, Horváth-Puhó E, Thomsen RW, Djurhuus JC, Pedersen L, Borghammer P, Sørensen HT. Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2015 Oct;78(4):522-9. doi: 10.1002/ana.24448. Epub 2015 Jul 17. PMID: 26031848.
46. Kim S, Kwon SH, Kam TI, et al. Transneuronal Propagation of Pathologic  $\alpha$ -Synuclein from the Gut to the Brain Models Parkinson's Disease. *Neuron.* 2019 Aug 21;103(4):627-641.e7. doi: 10.1016/j.neuron.2019.05.035. Epub 2019 Jun 26. PMID: 31255487; PMCID: PMC6706297.
47. Blacher Eran. Can microbes combat neurodegeneration? *Science.* 2021; 373(6551).



48. Berti V, Walters M, Sterling J, Quinn CG, Logue M, Andrews R, Matthews DC, Osorio RS, et al. Mediterranean diet and 3-year Alzheimer brain biomarker changes in middle-aged adults. *Neurology*. 2018;90:e1789-e1798.
49. De Filippis F, Pellegrini N, Vannini L, et al. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut*. 2016; 65:1812-1821.
50. Gabriel MO, Nikou M, Akinola OB, Pollak DD, Sideromenos S. Western diet-induced fear memory impairment is attenuated by 6-shogaol in C57BL/6N mice. *Behav Brain Res*. 2020; 380: 112419.
51. Abraham D, Feher J, Scuderi GL, Szabo D, Dobolyi A, Cservenak M, Juhasz J, Ligeti B, et al. Exercise and probiotics attenuate the development of Alzheimer's disease in transgenic mice: role of microbiome. *Exp Gerontol*. 2019; 115:122-131.
52. Yang X, Yu D, Xue L, Li H, Du J. Probiotics modulate the microbiota-gut-brain axis and improve memory deficit in aged SAMP8 mice. *Acta Pharm Sin B*. 2020;10:475-487.
53. Akbari E, Asemi Z, Daneshvar KR, Bahmani F, Kouchaki E, Tamtaji OR, et al. Effect of probiotic supplementation on cognitive function and metabolic status in Alzheimer's disease. A randomized, double-blind and controlled trial. *Front Aging Neurosci*. 2016; 8:256.
54. Bendiks ZA, Knudsen KEB, Keenan MJ, Marco ML. Conserved and viable responses of gut microbiome to resistant starch type 2. *Nutr Res*. 2020; 77:12-28.
55. Kim MS, Kim Y, Choi H, Kim W, Park S, Lee D, Kim DK, Kim HJ, et al. Transfer of a healthy microbiota reduces amyloid and tau pathology in an Alzheimer's disease animal model. *Gut*. 2021; 69:283-294.

## 10 ŽIVOTOPIS

Rođena sam 27. ožujka 1998. godine u Zagrebu. Osnovnu školu Antuna Mihanovića i III. gimnaziju sam završila u Zagrebu. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja redovito sam sudjelovala u natjecanjima i izvannastavnim aktivnostima.

Nakon položene mature i prijamnog ispita, 2016. godine upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija bila sam članica studentske udruge StEPP. Godine 2018. osvojila sam Rektorovu nagradu zajedno sa članovima Udruge. Također sam dobitnica Dekanove nagrade za akademsku godinu 2020./2021. Aktivno se služim engleskim jezikom u govoru i u pismu.