

# Streszczenie

## Wstęp

Choroba Alzheimera (*Alzheimer's disease* – AD) jest najczęstszą przyczyną demencji i charakteryzuje się postępującym deficytem funkcji poznawczych. Kluczowymi cechami choroby są gromadzenie, oligomeryzacja i odkładanie się amyloidu  $\beta$  w formie blaszek amyloidowych oraz formowanie splątków neurofibrylarnych złożonych z hiperfosforylowanego białka tau. W konsekwencji dochodzi do zapalenia w zakresie ośrodkowego układu nerwowego, utraty synaps i śmierci neuronów. Pomimo licznych danych dowodzących znaczenia amyloidu  $\beta$  w AD wciąż nie jest jasne co inicjuje jego agregację. Aktualnie stosowane leczenie ma jedynie charakter objawowy i nie prowadzi do wyleczenia, poszukuje się zatem nowych możliwości terapeutycznych.

Kluczowym elementem dwukierunkowych interakcji pomiędzy jelitami a ośrodkowym układem nerwowym jest mikrobiota jelitowa. Istotny wpływ na efekt tych interakcji wywiera zróżnicowanie i skład mikrobioty. Bakterie jelitowe produkują znaczną ilość amyloidu, który pomimo innej sekwencji aminokwasów jest w swojej strukturze trzeciorzędowej podobny do amyloidu produkowanego w ośrodkowym układzie nerwowym. Poprzez mechanizm mimikry molekularnej bakteryjne amyloidy, na podobieństwo białek prionowych, mogą indukować nieprawidłowe fałdowanie natywnych amyloidów umożliwiając ich agregację i formowanie blaszek amyloidowych. Zachodzące z wiekiem zmiany w barierze krew-mózg, w szczególności zwiększenie jej przepuszczalności w zakresie hipokampa, związanego z procesami pamięci i uczenia, stwarza możliwość przenikania substancji z układu krwionośnego do mózgu. Z kolei zwiększenie przepuszczalności bariery jelitowej może skutkować przenikaniem samych bakterii lub ich produktów do krwi. Mikrobiota jelitowa determinuje funkcje bariery jelitowej i jej przepuszczalność. Może przyczyniać się także do

nadmiernej stymulacji układu immunologicznego i indukcji przewlekłego stanu zapalnego obserwowanego u osób w podeszłym wieku. Nadmierny rozplam drobnoustrojów w jelicie cienkim, gdzie przepuszczalność jelitowa jest fizjologicznie większa, stanowi potencjalne źródło znacznej ilości bakteryjnych produktów, w tym amyloidu i lipopolisacharydów.

Badania na modelach zwierzęcych i obserwacje kliniczne wskazują na wpływ mikrobioty na procesy uczestniczące w patogenezie AD. Dotychczas nie opublikowano wyników badań oceniających ilościowe zaburzenia mikrobioty w AD, choć dostępne są wyniki badań przeprowadzonych u pacjentów z innymi chorobami neurozwyrodnieniowymi, takimi jak choroba Parkinsona. Podobnie, dane odnośnie wykładników stanu zapalnego w jelicie oraz przepuszczalności bariery jelitowej u pacjentów z AD są ograniczone. Uzyskane informacje mogą wskazać potencjalne nowe strategie terapeutyczne w AD obejmujące oddziaływanie na trzewny układ immunologiczny i przepuszczalność jelitową, w tym poprzez modyfikację składu i liczebności mikrobioty jelitowej.

### Cel pracy

Celem badania była ocena częstości występowania zaburzeń ilościowych mikrobioty jelitowej w postaci SIBO u pacjentów z AD. Ponadto badano w tej grupie chorych stężenie kalprotektyny i zonuliny w kale jako markerów odpowiednio stanu zapalnego jelit i przepuszczalności bariery jelitowej. Szczegółowa analiza porównawcza charakterystyki pacjentów z dodatnim i z ujemnym wynikiem testu oddechowego miała na celu uchwycenie potencjalnego związku pomiędzy zaburzeniami ilościowymi mikrobioty jelitowej a badanymi stężeniami markerów w stolcu oraz danymi klinicznymi, z uwzględnieniem stopnia otępienia.

### Materiał i metody

Badanie przeprowadzono u 45 chorych ze zdiagnozowanym otępieniem łagodnego lub umiarkowanego stopnia w przebiegu AD. Grupę kontrolną stanowiło 16 osób dobranych pod względem wieku, płci i BMI, wykluczając osoby ze zdiagnozowanym otępieniem i innymi zaburzeniami psychicznymi oraz chorobami OUN. Dane kliniczne dotyczące schorzeń współistniejących, przyjmowanych leków oraz występujących dolegliwości pozyskano z dokumentacji medycznej i przy pomocy kwestionariusza. U wszystkich badanych przeprowadzono wodorowy test oddechowy w kierunku SIBO. W uzyskanej od 35 osób w grupie badanej oraz 15 osób w grupie kontrolnej próbce stolca oznaczono przy pomocy testu ELISA stężenie kalprotektyny i zonuliny.

### Wyniki

W grupie badanej mediana wieku wynosiła 74 lata, mediana BMI 26,9 kg/m<sup>2</sup>, 80% grupy stanowiły kobiety. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną pod względem tych parametrów. W grupie kontrolnej częściej występowało migotanie przedsionków (p=0,022). Zgodnie z oczekiwaniem w grupie badanej częściej stosowano inhibitory acetylocholinoesterazy (p<0,001), memantynę (p<0,001), SSRI (p=0,002), kwetiapinę (p=0,021) i inne neuroleptyki (p=0,011) oraz ASA (p=0,015). W grupie kontrolnej częściej występowała zgaga (p=0,027) oraz zaburzenia związane z oddawaniem moczu (p<0,001). Dodatni wynik w kierunku SIBO uzyskano u 48,9% w grupie badanej oraz 25% w grupie kontrolnej (p=0,097). Mediana stężenia kalprotektyny i zonuliny w stolcu w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej wynosiła odpowiednio: 43,1 vs 36,7 µg/g (p=0,884) oraz 73,5 vs 49,0 ng/ml (p=0,177). Porównując pacjentów z AD z dodatnim i z ujemnym wynikiem testu oddechowego mediana stężenia kalprotektyny i zonuliny wynosiła odpowiednio: 52,6 vs 42,2 µg/g (p=0,590) oraz 63,0 vs 83,8 ng/ml (p=0,568).

Podgrupy pacjentów z dodatnim i ujemnym wynikiem SIBO nie wykazywały różnic pod względem wieku, płci, BMI, stopnia otępienia w skali MMSE oraz stosowanych leków. Zgaga występowała częściej w grupie pacjentów, u których wynik wodorowego testu oddechowego był ujemny ( $p=0,038$ ). Nie stwierdzono zależności pomiędzy wynikiem w skali MMSE

a stężeniem kalprotektyny ( $R=0,22$ ,  $p=0,306$ ) i stężeniem zonuliny ( $R=0,05$ ,  $p=0,808$ ). Ponadto nie wykazano związku pomiędzy stężeniem kalprotektyny i zonuliny a wiekiem, BMI, płcią, przyjmowanymi lekami czy zgłaszanymi objawami. U pacjentów z chorobą niedokrwienną serca mediana stężenia kalprotektyny była istotnie wyższa niż u pacjentów, u których schorzenie to nie występowało ( $p=0,017$ ).

### Wnioski

U pacjentów z AD stwierdzono tendencję do częstszego występowania SIBO w porównaniu do dobranych pod względem wieku osób w grupie kontrolnej bez demencji, jednak różnica pomiędzy grupami nie była istotna statystycznie. Nie wykazano związku między występowaniem SIBO u pacjentów z AD a stopniem otępienia ocenianym według skali MMSE. Stężenie kalprotektyny i zonuliny w kale u pacjentów z AD nie było istotnie wyższe niż u osób z grupy kontrolnej. Może to wynikać z potencjalnego wpływu leków cholinergicznym stosowanych w AD na wartości markerów stanu zapalnego jelit i przepuszczalności bariery jelitowej. Nie wykazano związku między występowaniem SIBO u pacjentów z AD a stężeniem kalprotektyny i zonuliny w kale. U pacjentów z AD nie stwierdzono również korelacji pomiędzy stężeniem kalprotektyny i zonuliny w kale a stopniem otępienia ocenianym według skali MMSE.

# Summary

## Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most frequent cause of dementia characterized by a progressive decline in cognitive function. The key feature of the disease is aggregation, oligomerization and deposition of amyloid beta (A $\beta$ ) in the form of plaques as well as formation of neurofibrillary tangles composed of hyperphosphorylated tau protein. Those deposits trigger neuroinflammation leading to synapse loss and neuronal death. Despite large amount of data on A $\beta$  role in AD it is still not well known what triggers amyloid aggregation and plaque formation. The current treatment is only symptomatic and does not cure the disease, therefore there is a need for new therapeutic possibilities.

Intestinal microbiota is a key element in bidirectional communication between central nervous system and the gut. The outcome of these interactions is affected by intestinal microbiota composition and its diversity. The gut microbiota is a source of a significant amount of amyloids, which differ from CNS amyloids in their primary structure but share similarities in their tertiary structure. Through molecular mimicry bacterial amyloids may act as prion proteins that induce misfolding of native amyloids leading to their aggregation and deposition in amyloid plaques. Age-dependent blood-brain barrier changes, especially increased permeability in the hippocampus associated with learning and memory, allow blood-derived molecules to enter the brain. The gut barrier dysfunction may result in the leakage of bacteria or their products to the bloodstream. Intestinal microbiota determines intestinal barrier function and permeability, contributes to overstimulation of immune system and induction of chronic inflammation observed in the elderly. Overgrowth of bacteria in the small intestine, where permeability is physiologically increased, is a possible source of bacterial products, including amyloids and lipopolysaccharides.

Research based on animal models and clinical data indicate microbiota contribution to the pathogenesis of AD. Until now no data on quantitative microbiota disturbances in AD were published, although there are some research results in other neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease. Similarly, data on intestinal inflammation and permeability markers in AD are limited. Results of these studies may allow for new therapeutic strategies in AD which encompass influencing intestinal immune system and gut permeability, including qualitative and quantitative modifications of microbial composition.

### Aims

The research purpose was to evaluate the incidence of quantitative microbiota abnormalities in the form of small intestinal bacterial overgrowth (SIBO) in AD patients. Additionally markers of intestinal inflammation and permeability, calprotectin and zonulin levels, respectively, were assessed in stool samples. Extensive analysis of patient subgroups with positive and negative breath test results was conducted for evaluation of potential relationship between the tested parameters and clinical data including degree of dementia.

### Material and methods

The research was conducted in 45 patients with mild or moderate dementia in the course of AD. The control group consisted of 16 participants matched according to age, sex and BMI (subjects diagnosed with dementia, other mental disorders and CNS diseases were excluded). Data on comorbidities, pharmacotherapy as well as gastrointestinal and other symptoms were acquired from documentation and questionnaire analysis. Every participant was tested for SIBO with hydrogen breath test. Quantitative evaluation of fecal calprotectin and zonulin level was performed by ELISA tests in 35 AD patients and 15 controls.

## Results

In AD patients median age was 74 years, BMI 26.9 kg/m<sup>2</sup>, 80% of the group were female. There were no significant differences between the above characteristics compared to the control subjects. Atrial fibrillation was more frequent in the control group (p=0.022). As expected, there was more frequent use of acetylcholinesterase inhibitors (p<0.001), memantine (p<0.001), SSRI (p=0.002), quetiapine (p=0.021) and other neuroleptics (p=0.011) in AD patients. There was an increased frequency of heartburn (p=0.027) and urinary disorders (p<0.001) in the control group. The positive result of SIBO test was found in 48.9% of AD patients and 25% of the control subjects (p=0.097). The median fecal calprotectin and zonulin levels in AD group compared to the control group amounted to 43.1 vs 36.7 µg/g (p=0.884) and 73.5 vs 49.0 ng/ml (p=0.177), respectively. Comparing AD patients with positive breath test result to AD patients with negative breath test result, the median calprotectin and zonulin levels amounted to 52.6 vs 42.2 µg/g (p=0.590) and 63.0 vs 83.8 ng/ml (p=0.568), respectively. There were no differences in age, sex, BMI, MMSE score and medication use between AD subgroups positive and negative for SIBO. Heartburn occurred more frequently in AD patients with negative SIBO results (p=0.038). There was no correlation between MMSE score and the level of calprotectin (R=0.22, p=0.306) and zonulin (R=0.05, p=0.808). There was no association between calprotectin and zonulin levels and age, BMI, medication use and specified symptom frequency. The calprotectin level was significantly higher in AD patients diagnosed with ischemic heart disease (p=0.017).

## Conclusions

There was a tendency for more frequent SIBO incidence in AD than in age-matched controls without dementia, although the difference was not statistically significant. In AD patients there was no association between SIBO and MMSE score. There was no significant difference between fecal calprotectin and zonulin levels in AD patients comparing to the control group.

This may result from potential influence of cholinergic drugs used in the treatment of AD on intestinal inflammatory and permeability markers. There was no association between the presence of SIBO and fecal calprotectin and zonulin levels. Moreover, no correlation between fecal calprotectin or zonulin level and MMSE score in AD patients was found.