

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL

MEDICINĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. BOGDAN OVIDIU POPESCU

Student-doctorand: DĂNĂU ADELA

ANUL 2022

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL

MEDICINĂ

*INFLUENȚA MICROBIOTEI INTESTINALE ASUPRA  
RĂSPUNSULUI TERAPEUTIC ÎN BOALA PARKINSON  
AVANSATĂ*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. BOGDAN OVIDIU POPESCU

Student-doctorand: DĂNĂU ADELA

ANUL 2022

## Cuprins

<b>I. Partea generală</b> .....	pagina 1
1. Boala Parkinson sporadică .....	pagina 1
1.1. Etiopatogenie .....	pagina 1
1.2. Epidemiologie și date istorice .....	pagina 8
1.3. Manifestări clinice .....	pagina 13
1.4. Diagnostic .....	pagina 17
1.5. Tratament .....	pagina 20
2. Axa microbiotă intestinală – creier .....	pagina 23
2.1. Microbiomul intestinal și interacțiunea cu sistemul nervos central .....	pagina 23
2.2. Principiile și originile axei microbiotă intestinală – creier .....	pagina 26
2.3. Nervul vag și calea retrogradă de transmitere a alfa-sinucleinei de la intestinul subțire la creier .....	pagina 26
2.4. Rolul celulelor periferice ale sistemului imun în boala Parkinson sporadică .....	pagina 27
2.5. Stresul oxidativ, antioxidanții și efectul asupra axei microbiotă intestinală - creier .....	pagina 31
2.6. Dereglarea imună enterică și alterarea permeabilității barierei intestinale .....	pagina 32
2.7. Alterarea microbiotei intestinale ca factor declanșator al bolii Parkinson .....	pagina 33
2.8. Axa microbiotă intestinală - creier și tulburările gastrointestinale asociate bolii Parkinson ..	pagina 34
3. Sindromul de suprapopulare bacteriană intestinală .....	pagina 39
3.1. Definiția și semnificația în patologia neurodegenerativă .....	pagina 39
3.2. Bacteriile producătoare de hidrogen și efectele asupra microbiomului din boala Parkinson ..	pagina 42
3.3. Bacteriile producătoare de metan și efectele asupra microbiomului din boala Parkinson ..	pagina 43

3.4. Diagnosticul sindromului de suprapopulare bacteriană intestinală .....	pagina 44
3.5. Tratamentul sindromul de suprapopulare bacteriană intestinală .....	pagina 44
<b>II. Contribuții personale .....</b>	<b>pagina 47</b>
4. Studiul 1 - Sindromul de suprapopulare bacteriană intestinală la persoanele cu boala Parkinson sporadică – analiza întregului lot caz-martor. Analiza subploturilor evaluate cu aparatul Gastrolizer® și sistemul GastrCH4H2ECK® .....	pagina 47
4.1. Ipoteza de lucru și obiectivele .....	pagina 47
4.2. Material și metodă .....	pagina 49
4.3. Rezultate .....	pagina 60
4.4. Discuții și concluzii.....	pagina 119
5. Studiul 2 - Corelația markerilor hematologici periferici de inflamație cu severitatea parkinsonismului și alte caracteristici ale bolii Parkinson sporadice .....	pagina 124
5.1. Ipoteza de lucru și obiective .....	pagina 124
5.2. Material și metodă.....	pagina 124
5.3. Rezultate.....	pagina 125
5.4. Discuții și concluzii.....	pagina 138
6. Concluzii și contribuții personale .....	pagina 139
Bibliografie .....	pagina 143
Anexe.....	pagina 159

Boala Parkinson (BP), una dintre cele mai frecvente boli neurodegenerative, afectează aproximativ 1% din populația de peste 60 ani, cu incidență maximă la persoanele cu vârsta cuprinsă între 70 și 79 ani și la persoanele de sex masculin [1]. Are prevalență în creștere în paralel cu îmbătrânirea populației [18]. Determină dizabilitate progresivă cu impact major funcțional, social și economic. În prezent nu există niciun tratament curativ sau care să încetinească evoluția BP.

Predominant sporadică, BP are etiopatogenie plurifactorială, incomplet înțeleasă. Multiple mecanisme complexe și interconectate fac subiectul cercetărilor actuale, pentru o mai bună integrare, în vederea dezvoltării de terapii modificatoare de boală. Impăturirea defectuoasă a alfa-sinucleinei (AS), disfuncția mitocondrială, mecanismele inflamatorii și stresul oxidativ sunt doar câteva dintre acestea [1]. Suplimentar implicării căilor dopaminergice, cele glutamatergice, serotoninergice și adrenergice sunt alternative explorate pentru identificarea de biomarkeri și soluții terapeutice. În prezent, afectarea selectivă a neuronilor dopaminergici din substanța neagră (pars compacta) cu degenerarea tractului nigrostriatal, este considerată caracteristica absolut necesară pentru diagnostic, fiind totodată modificarea care determină dizabilitatea motorie progresivă. Denumirea de substanță neagră provine de la culoarea închisă a neuronilor, aspect datorat acumulării unui pigment numit neuromelanină, vizibil redus în analiza postmortem a creierului persoanelor cu BP[2]. Tiparul de pierdere neuronală din BP este distinct/diferit de cel din procesului de îmbătrânire, care se produce relativ uniform, nu cu selectivitate pentru zone din substanța neagră. Moartea neuronală este retrogradă, din periferie spre centru. Soții Braak și colaboratorii, după studierea postmortem a creierelor pacienților cu BP au propus ipoteza că varianta sporadică a bolii este rezultatul asocierii dintre factorii genetici și de mediu, și că producerea BP ar avea un mecanism ce amintește de un agent patogen care intră în corp prin intermediul cavității nazale, fiind înghițit și declanșând modificarea conformațională a AS și producerea corpilor Lewy la nivelul sistemului nervos enteric; propagarea de la acest nivel la nivel cerebral s-ar face via nervul vag, printr-o manieră de tip prionic [3,4]. Majoritatea studiilor recente au adus dovezi care susțin această ipoteză [5].

Manifestarea clinică cardinală pentru BP este sindromul parkinsonian (definit, conform criteriilor MDS 2015, drept bradikinezie acompaniată de tremor de repaus și/sau de rigiditate) [24]. Sindromul parkinsonian este expresia degenerării selective a neuronilor dopaminergici de la nivelul substanței negre din mezencefal, cu reducerea în consecință a cantității de dopamină eliberate la nivel striatal [13,14]. Diagnosticul de certitudine este unul histopatologic, modificarea

sine qua non fiind prezența unor agregate intraneuronale de AS modificată conformațional, numite corpi Lewy [15]. Ameliorarea semnificativă a sindromului parkinsonian la administrarea de levodopa este obligatorie pentru diagnosticul clinic de BP. Între manifestările non-motorii ale BP un loc central este ocupat de tulburarea de motilitate intestinală, constipația fiind primul simptom al bolii la până la două treimi din persoanele cu BP.

BP a devenit o entitate definită și recunoscută medical în 1817, în urma unei celebre publicații medicale, realizată de medicul londonez James Parkinson. Publicația a avut la baza propriile concluzii, după cercetarea a 6 cazuri cu manifestări similare [41, 42].

În ultimele decenii profilul epidemiologic al patologiilor neurologice s-a modificat în țările cu venit mare (Europa de vest și America de Nord), în sensul scăderii numărului de cazuri de accident vascular cerebral ischemic, în timp ce raportările de BP, boală Alzheimer și scleroză laterală amiotrofică, sunt în creștere [18].

Informațiile folosite au provenit din datele stocate în Global Burden of Disease, Injuries, and Risk Factors (GBD), arătându-se că numărul de cazuri de BP s-au dublat în ultimii 26 de ani, de la 2,5 milioane la peste 6 milioane. Acest lucru, dacă este real, reprezintă o mare problemă de sănătate publică, cu impact social și economic, major. Important de menționat este că la această dublare a raportărilor a contribuit cu siguranță și creșterea speranței de viață, modificarea factorilor de mediu (urbanizare, poluare, industrializare, migrarea populației) a factorilor de mediu, a fluxului de informații în ceea ce privește acuratețea diagnosticul, dar și standardizarea acestuia apărută în cursul anilor [18, 34, 35, 36, 37].

Etiopatogenia BP este multifactorială și nu pe deplin înțeleasă. Majoritatea studiilor recente arată că atât în formele monogenice cât și în formele sporadice ale BP, modificarea conformațională a AS cu formarea ulterioară de agregate (cum sunt corpii Lewy în cazul BP și bolii cu corpi Lewy) și propagarea trans-sinaptică de tip prionic a patologiei este un eveniment etiopatogenic central - astfel, anumite modificări ale AS pot servi atât drept biomarkeri cât și drept potențiale ținte terapeutice [7, 16, 17].

Microbiomul intestinal reprezintă un ecosistem complex format din bacterii, virusuri, fungi și arhee (și până recent, respectiv încă valabil pentru anumite regiuni geografice, și paraziți), care recent, datorită tehnicilor moleculare de analiză a putut fi cartografiat pentru a identifica miile de specii prezente local și interacțiunile acestora în condiții fiziologice și patologice. Legătura sistemului enteric cu cel nervos central a ridicat interes crescut pentru modificarea evoluției bolilor

în stadiile preclinice, dar și pentru opțiunile terapeutice, care tind să aibe un rol mai mult decât simptomatic [88]. Microbiomul intestinal are rol în producerea și facilitarea absorbției anumitor nutrienți și a preparatelor farmacologice, cu posibilitatea de modulare/adaptare/modificare în raport de factorii de mediu [31, 32].

Axa microbiotă intestinală-creier este un sistem complex de mecanisme interconectate prin care se realizează comunicarea bidirecțională între tractul gastrointestinal și creier, cu participarea sistemului imun, neuroendocrin, al axei hipotalamo-pituitar-adrenale (HPA), a nervului vag, a sistemului autonom prin conexiunile simpatice și parasimpatice, a sistemului enteric nervos și a microbiomului intestinal [86]. Studiile din ultimii ani au avut preponderent ca puncte de cercetare substanțele cu proprietăți neuroactive produse de microbiota intestinală și modul în care acestea influențează sau chiar determină anumite patologii ale sistemul nervos central (SNC) [87]. Date recente susțin inflamația și modificarea permeabilității mucoasei intestinale ca posibil precursor al BP. Deși există o diversitate de până la 1000 de specii diferite, predominante sunt cele 4 mari familii - Bacteroides, Firmicutes, Actinobacteria și Proteobacteria [92]. În condiții de fiziologie normală, acestea participă la digestie, absorbție, angiogenează, dezvoltarea și menținerea unui sistem imun inat optim, oferind protecție împotriva agenților patogeni. Lactobacillus, Enterococcus, Bifidobacteria și Streptococul sunt bacterii implicate în producerea principalilor neurotransmițători, cum sunt acidul gama-aminobutiric (GABA) și acetilcolina. Interesant de menționat este comunicarea semnalelor circuitului serotoninergic, în condițiile în care serotonina este produsă în proporție de 90% la nivelul microbiomului intestinal, iar triptofanul metabolizat la nivel intestinal participă la activarea microgliilor și la transcripția proteinelor de la nivelul astrocitelor, modulând astfel răspunsul inflamator la nivel cerebral. Acțiunea triptofanului asupra microgliilor a fost recent corelată și cu eliberarea unei neurotoxine, acidul quinolonic, care este implicat și în patogenia bolii Huntington și a depresiei [93].

Microbiomul intestinal diferă semnificativ la persoanele cu BP comparativ cu persoanele sănătoase. Modificările locale intestinale sunt corelate cu răspunsul imun sistemic, frecvent cu producerea unei cantități în exces de markeri proinflamatorii.

Inflamația sistemică și cea periferică sunt implicate în patogeniza și progresia BP [88, 89]. Această corelație a fost inițial observată în cazul dezvoltării unui sindrom parkinsonian în contexte post virale (virusul influenza, herpetic, varicelo-zostian, etc). Deși sunt procese fiziologice menite să ofere protecție împotriva agenților patogeni, acestea pot iniția sau promova mecanisme de

răspuns exagerat, cu efect lezional. Inflamația cronică este considerată a fi contribuitor la progresia bolii, dar și la menținerea statusului de neuroinflamație.

Profilul genetic individual, factorii de mediu, dieta, sunt toți factori care determină ca fiecare microbiom să aibă particularitățile sale structurale și funcționale. Există diferențe considerabile între flora indivizilor sănătoși versus cea a celor cu BP, așa cum au demonstrat-o studiile de laborator [94, 95, 96].

Tulburările gastrointestinale asociate BP se consideră a fi consecința în principal a afectării sistemului nervos enteric și a celui autonom; acestea se pot manifesta la orice nivel al tractului gastrointestinal, fiind prezente la aproximativ 60-80% dintre persoanele cu BP (statistică demonstrată prin studii de cohortă și necroptice). Comunicarea dintre microbiota intestinală și creier are la baza teoria lui Braak. Conform acesteia, în etiopatogenia BP este implicat un agent patogen care pătrunde prin mucoasa nazală, ajunge la nivel intestinal, unde determină modificări conformaționale ale AS și apoi se transmite ascendent pe calea nervului vag la nivel cerebral [3,100]. Tulburările gastrointestinale asociate BP pot să preceadă etapa motorie, sau se pot manifesta pe parcursul evoluției acesteia, contribuind la afectarea calității vieții. Manifestările gastrointestinale au o plajă largă de manifestare, de la tulburările salivare ce pot afecta dentiția prin modificarea pH-ului bucal, la falsa hipersalivație care reprezintă acumularea de salivă prin tulburare de deglutiție, tulburării esofagiene, faringiene, gastropareză (greață, inapetență, balonare), infecția cu *Helicobacter pylori* (HP), dismotilitate intestinală, sindromul de suprapopulare bacteriană la nivel intestinal, tulburări micționale și disfuncție anorectală. Toate acestea contribuie cu dizabilitate semnificativă suplimentar la tabloul motor, ceea ce afectează calitatea vieții, dar mai ales o pot pune în pericol; pneumonia de aspirație este o complicație severă, potențial amenințătoare de viață prin insuficiență respiratorie acută sau prin complicații.

Sindromul de suprapopulare bacteriană a intestinului subțire (SIBO) este o disbioză intestinală care apare la persoane cu factori predispozanți (e.g., hipomotilitate intestinală cronică / încetinirea tranzitului intestinal, modificări anatomice ale tractului intestinal, hipoclorhidie). Deși nu este o boală, se poate asocia cu simptomatologie intestinală (discomfort abdominal, balonare), tipic ameliorată după tratament antibiotic [154, 155]. În BP, SIBO este legat de simptome non-motorii și complicații motorii datorate modificărilor mucoasei gastrointestinale, prin dezvoltarea inflamației de grad scăzut cu degenerare celulară, incluzând stres oxidativ.



Asocierea dintre SIBO și BP a fost recent demonstrată de Xiaqing Li și colaboratorii, care au realizat o revizuire a literaturii publicate până în februarie 2021 pe această temă. Metaanaliza a documentat conexiunea dintre cele două condiții, sindromul de suprapopulare bacteriană la nivelul intestinului subțire regăsindu-se la peste jumate din persoanele cu BP analizate. Au fost analizate datele de la unsprezece studii clinice, care au cuprins un total de 973 persoane cu BP. Au existat diferențe în funcție de testul diagnostic realizat și de distribuția geografică, subgrupul din țările vestice având o proporție mai ridicată de SIBO comparativ cu cei din țările estice, diferență cel mai probabil explicată de particularitățile imunologice, de metabolism, dar mai ales de obiceiurile alimentare. Diagnosticul de SIBO a fost mai frecvent în studiile ce au utilizat lactuloza pentru testul respirator, (fiind de 51%), comparativ cu cei care au utilizat glucoza (35%) [172]. Cauzele identificate de apariție a SIBO au fost modificările structurale și ale motilității intestinale, utilizarea de produse farmacologice (în special antibiotice) care alterează integritatea mucoasei intestinale. Modificarea permeabilității datorită reacției inflamatorii declanșate, determină supraexpresia AS, care la rândul său este promotorul alterării barierei hematoencefalice, al neuroinflamației, și al apoptozei neuronilor din substanța neagră. Împăturirea ei defectuoasă modifică suplimentar integritatea barierei mucoasei intestinale, fiind un cerc vicios care se autoîntreține. Alterarea motilității gastrice, cu apariția de gastropareză ceea ce determină întârzierea eliminării conținutului de alimente și bacterii, este un factor predispozant pentru SIBO. Utilizarea recurentă sau de lungă durată a inhibitorilor pompei de protoni sau de histamină, bolile metabolice (spre exemplu diabetul zaharat prin afectarea sistemului nervos enteric produce gastroapreză și dismotilitatea intestinului subțire) și cele inflamatorii intestinale, precum și anormalitățile structurale dobândite prin intervenții chirurgicale sau complicații ale acestora, reprezintă factori predispozanți de apariție a SIBO. Manifestările clinice sunt diverse, nespecifice, fiind des raportate modificări ale apetitului, senzație de sațietate precoce, balonare, dureri abdominale, diaree sau constipație. Persistența SIBO determină complicații datorită unei digestii deficitare de lungă durată, malabsorbție prin scăderea capacității de asimilare a vililor intestinali sau datorită inflamației mucoasei intestinale. Toate acestea produc deficiențe minerale (în special de fier) sau hipovitaminoze (vitamina B12, A, D, E); cea mai frecventă este deficiența de vitamina B12 (cobalamină), care se absoarbe la nivelul ileonului după legarea de proteina specifică. Prezența de SIBO determină metabolizarea competitivă a cobalaminei de către bacteriile anaerobe, dar și absorbție deficitară a proteinei specifice, scăzând astfel cantitatea totală de vitamina B12.

La polul opus se afla hipervitaminozele, prin exces de foliați datorită unei sinteze excesive a acestora de către bacteriile de la nivelul intestinului subțire. Aceste complicații duc la stări de fatigabilitate, scăderi în greutate, retinopatii, neuropatii, steatoze. Deși rare, modificarea parametrilor de coagulare și afectarea funcției imune a celulelor T pot să apară.

Proiectul doctoral cuprinde 2 studii, prin care mi-am propus evaluarea pacienților cu BP pentru a clarifica asocierea dintre factori legați de microbiota intestinală și anumite particularități clinice și biologice, gradul de dizabilitate, de severitate a bolii, dar și corelația markerilor hematologici periferici de inflamație cu severitatea parkinsonismului și alte caracteristici ale bolii Parkinson sporadice. De asemenea, datele furnizate de acest proiect doctoral vor avea și posibilă importanță terapeutică cu viză simptomatică, microbiota intestinală putând fi manipulată pentru ameliorarea simptomelor motorii, respectiv a răspunsului la tratament simptomatic. Studiile arată că primele simptome ale BP apar chiar și cu 12-14 ani înainte ca persoanele afectate să îndeplinească criteriile clinice de diagnostic utilizate în practica uzuală (care permit diagnosticarea bolii numai în prezența manifestărilor motorii). Aceste manifestări precoce sunt non-motorii, prin disfuncții olfactive și ale tractului gastrointestinal. În faza prodromală sunt frecvent relatate hiposmia, constipația, apatia, depresia. În evoluție manifestările non-motorii se agravează, iar cele motorii apar, tipic unilateral. Un interes aparte îl constituie acumularea de date cu viza diagnostică, pentru depistarea BP în faza prodromală; diagnosticarea în această etapă ar reduce pierderea neuronală, cu status clinic net ameliorat, dar și la posibilitatea unei intervenții eficiente a tratamentelor modificatoare de boală.

Realizarea prezentei cercetări a avut ipoteza că, în urma unui studiu recent, până la 67% din persoanele cu BP au SIBO. Prezența SIBO, atât cu bacterii producătoare de metan cât și cu bacterii producătoare de hidrogen, se asociază cu severitatea sindromului parkinsonian dar nu și cu severitatea complicațiilor. Există dovezi care arată că microbiota persoanelor cu BP produce mai puțin hidrogen, ceea ce are ipotetic impact negativ asupra progresiei neurodegenerării având în vedere efectul posibil neuroprotector al hidrogenului legat de neutralizarea radicalilor hidroxil și scăderea stresului inflamator și scăderea expresiei factorilor proinflamatorii. Aceasta face plauzibilă ipoteza ca persoanele cu BP avansată care au SIBO producător de hidrogen să aibă modificări inflamatorii intestinale și implicit modificări ale integrității barierei intestinale mai mici comparativ cu persoanele cu BP avansată care nu au SIBO producător de hidrogen. Persoanele cu BP au în peste 80% din cazuri încetinirea tranzitului intestinal și constipație cronică (i.e., factor

predispozant pentru SIBO), care precede în majoritatea situațiilor debutul manifestărilor motorii. Prezența SIBO, atât cu bacterii producătoare de metan cât și cu bacterii producătoare de hidrogen, se asociază cu severitatea sindromului parkinsonian. În BP, SIBO este legat de simptome non-motorii și complicații motorii datorate modificărilor mucoasei gastrointestinale, prin dezvoltarea inflamației.

Hidrogenul ( $H_2$ ) și metanul ( $CH_4$ ) nu sunt produse de celulele umane ci exclusiv de bacterii, ele traversează ușor membranele, fiind absorbite rapid în intestin de unde ajung în sânge și în aerul expirat. Astfel, testele respiratorii care măsoară cantitatea de hidrogen și metan din aerul expirat după administrarea de carbohidrați (utilizați de bacterii) sunt și ele folosite pentru a diagnostica SIBO. Detectarea SIBO și inițierea terapiei cu antibiotice (rifaximină), pare să amelioreze fluctuațiile motorii.  $H_2$  este unul dintre principalele gaze endogene, produs de bacteriile intestinale ca urmare a fermentației alimentare (*Blautia* sp *Clostridium* spp) [163]. Speciile bacteriene producătoare de hidrogen sulfurat ( $H_2S$ ) sunt numeroase la nivelul microbiomului colonic al persoanelor cu BP.  $H_2S$  are capacitatea de a pătrunde intracelular, unde, în cantități excesive, poate elibera proteina citocromului C de la nivel mitocondrial, și mărește nivelul de fier citosolic și de specii reactive la oxigen. Aceste mecanisme promovează formarea de AS împăturită defectuos, cu acumularea de fibrile intracelular. Suplimentar,  $H_2S$  poate afecta nivelul de eritrocite și limfocite (cu rol în inflamația periferică), cât și metabolismul uratului, un potent agent antioxidant endogen. În 2019, un studiu publicat de Hertel și colaboratorii, a analizat microbiomul intestinal al indivizilor sănătoși în comparație cu cel al persoanelor cu BP, descoperind nivel mai mare de  $H_2S$  la cei din urmă, determinat de bacteriile *Bilophila wadsworthia* și *Akkermansia muciniphila* [143, 164]. Nivel crescut de  $H_2S$  a fost raportat și de Greco și colaboratorii în 2021 în lichidul cefalorahidian al persoanelor cu BP. Speciile bacteriene producătoare de metan reprezintă aproximativ 15% din populația microbială. În ultimele decenii, mai multe specii producătoare de metan au fost detectate în numeroase tipuri de țesuturi (la nivel intestinal, colonic, fecal sau la nivelul abceselor cerebrale). Sunt specii minor cantitative la nivelul microbiomului intestinal, ele interacționând simbiotic cu celelalte bacterii. Au efecte modulatoare locale și la distanță asupra sistemului imunitar și rol de protecție împotriva microorganismelor patogene din sistemul digestiv. Deși nu este pe deplin înțeleasă funcția lor în mecanismele patologice, bacteriile producătoare de metan în acest moment sunt considerate a juca un rol într-o gamă largă de afecțiuni, de la cele cu substrat inflamator (sindromul de colon iritabil), până la cele metabolice sau neoplazice [166, 167].

În cadrul studiului 1, am evaluat sindromul de suprapopulare bacteriană intestinală la persoanele cu boală Parkinson sporadică. În BP, SIBO este legat de simptome non-motorii și complicații motorii datorate modificărilor mucoasei gastrointestinale, prin dezvoltarea inflamației. Microbiomul intestinal, care conține peste 100 de trilioane de microorganisme distribuite într-un tipar particular și individual, are rol esențial în desfășurarea mecanismelor fiziologice și în dezvoltarea celor patologice. Comunicarea dintre microbiota intestinală și creier are la baza ipoteza lui Braak, unde, în etiopatogenia BP este implicat un agent patogen care pătrunde prin mucoasa nazală, ajunge la nivel intestinal, unde determină modificări conformaționale ale AS și apoi se transmite ascendent pe calea nervului vag la nivel cerebral. Această teorie a fost susținută de descoperirile anatomopatologice care au identificat prezența corpiilor Lewy la nivelul sistemului nervos enteric și a AS modificate la nivelul plexurilor Auerbach și Meissner. Depozite ale AS fosforilate au fost identificate la nivelul ganglionilor, a fibrelor nervoase din stratul submucos, la nivelul fibrelor enterice gastrice, duodenale și colonice la persoane ce prezentau semne clinice prodromale sau motorii tipice pentru BP. Pentru realizarea studiului am utilizat resursele umane și logistice accesibile în cadrul Spitalului Clinic Colentina București.

Testul considerat standardul de aur pentru diagnosticarea SIBO este prezența a  $\geq 10^3$  UFC în lichidul prelevat de la nivelul intestinului subțire. Pentru diagnosticarea SIBO am folosit testele respiratorii de detecție a nivelului H<sub>2</sub> și CH<sub>4</sub>, metodă bazată pe administrare orală de glucoză (75 g), cu măsurarea ulterioară pe parcursul a 2 ore a hidrogenului în aerul exhalat (canalizat asupra senzorului de citire folosind o pipă dedicată). Testele au fost realizate cu aparatul Gastrolizer<sup>®</sup> și GastrCH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>ECK<sup>®</sup>. Creșterea metanului peste 10 ppm și a hidrogenului cu peste 20 ppm în aerul expirat la 1.5 ore după 75 grame de glucoză administrată oral a fost considerată limită diagnostică pentru H-SIBO și CH<sub>4</sub>-SIBO. Cut off-ul de 20 ppm are specificitate de 90% și sensibilitate de 81% comparativ cu numărătoarea bacteriană din lichidul intestinal (i.e., sensibilitatea redusă derivă din faptul că anumite bacterii care pot suprapopula intestinul subțire produc exclusiv metan).

În cadrul cercetării prezentate am evaluat corelațiile existente între prezența SIBO cu bacterii producătoare de hidrogen (H-SIBO) și metan (CH<sub>4</sub>-SIBO) la pacienții cu BP avansată, participanți la studiul AIM-BP – date demografice, caracteristicile bolii, ale terapiei urmate, asocierea cu markerii de inflamatie periferică și tulburările gastrointestinale înregistrate. În cadrul acestui studiu au fost incluse 31 de persoane cu BP și 31 de persoane în lotul martor. Au fost incluse persoanele

care aveau diagnostic de BP avansată – definită ca stadiu Hoehn și Yahr  $\geq 2$  și/sau prezența complicațiilor motorii ale tratamentului de substituție dopaminergică (i.e., fluctuații motorii și diskinezii), sau apariția manifestărilor motorii ale BP și/sau diagnostic la vârsta de peste 50 de ani, și niciun criteriu de excludere. Acestea din urmă au fost reprezentate de vârsta  $<50$  ani în momentul apariției simptomelor sau a încadrării diagnostice, antibiotic administrat în ultimele 3 luni, probiotice/prebiotice și/sau clismă și/sau paralizante intestinale etc., administrate susținut în ultima lună, simptomatologie intestinală susținută, alta decât cea legată de tranazitul intestinal încetinit; infecții intestinale sau sistemice în ultimele 6 luni; boli infecțioase, inclusiv COVID-19; contact susținut în ultima lună (i.e., colocatar, interacțiune zilnică etc) cu persoană cu infecție activă / enterocolită cu *C. difficile* (anamnestic); boli cronice / concomitente sistemice, gastrointestinale sau neurologice mediate imun (documentate); diagnostic de cancer concomitent (documentat); tratament imunosupresor sau imunomodulator (documentat); orice dizabilitate care să interfere semnificativ cu evaluarea clinică și/sau cu capacitatea de decizie pentru oferirea acordului / consimțământului de participare la studiu (i.e., tulburare de limbaj, tulburare neurocognitivă majoră etc – documentat sau conform aprecierii investigatorului evaluator); altă boală neurodegenerativă cunoscută sau suspicionată în momentul luării în evidență. În lotul martor au fost incluse persoanele cu vârsta  $\geq 50$  ani, fără diagnostic sau suspiciune de BP, și care nu întruneau niciunul din criteriile de excludere mai sus enumerate.

Au fost analizate caracteristicile demografice și caracteristicile clinice, prezența de SIBO, prezența tulburărilor gastrointestinale și tipul acestora în ambele loturi. Pentru 23 de persoane cu BP am utilizat aparatul Gastrolyzer<sup>®</sup> (detecția nivelului de hidrogen în aerul exhalat), iar pentru 11 am folosit GastrCH4H2ECK<sup>®</sup> (detecția nivelului de hidrogen și metan în aerul exhalat); 3 dintre pacienți au efectuat testele cu ambele aparate.

În lotul persoanelor cu BP grupul de vârstă 61-70 ani a fost preponderent, urmat de grupul de vârstă 71-80 de ani; persoanele peste 80 de ani au fost în proporția cea mai mică în lotul analizat. Repartiția pe sexe în lotul analizat a avut distribuție de 52% a sexului masculin și 48% a sexului feminin. Am observat că o perioadă mai lungă de la debutul bolii se corelează înalt semnificativ statistic cu un stadiu Hoehn și Yahr mai mare ( $\rho=0.542$ ,  $p=.001$ ) și cu apariția complicațiilor ( $p=0.698$ ,  $p<.0001$ ), și o corelație înalt semnificativă statistic între prezența complicațiilor și stadiul bolii ( $\rho=0.544$ ,  $p=.001$ ). În ceea ce privește ipoteza stresului oxidativ, o corelație semnificativă statistic s-a observat între valoarea mai mare a acidului uric și sexul masculin

( $\rho=0.440$ ,  $p=.01$ ), invers proporțional cu durata bolii ( $\rho=0.560$ ,  $p=.001$ ), în sensul că pacienții cu valori mai mari ale acidului uric sunt pacienții cu o durată a bolii mai scurtă; o corelație semnificativă statistic între valoarea acidului uric și stadiul Hoehn&Yahr ( $\rho=0.508$ ,  $p=.003$ ), în sensul că pacienții cu valori mai mari ale acidului uric sunt încadrați într-un stadiu H&Y mai mic o corelație semnificativă statistic între valoarea acidului uric și prezența tremorului ( $\rho=0.397$ ,  $p=.02$ ), în sensul că pacienții cu valori mai mari ale acidului uric nu prezintă tremor sau nu prezintă rigiditate ca fenotip dominant.

SIBO s-a regăsit la 52% dintre persoanele cu BP, ca analiză globală, a întregului lot. Am observat o corelație semnificativă statistic între prezența SIBO și senzația de sațietate precoce ( $\rho=0.391$ ,  $p=.02$ ), senzația de balonare ( $\rho=0.361$ ,  $p=.04$ ) și constipația ( $\rho=0.436$ ,  $p=.01$ ). În ceea ce privește distribuția în funcție de tulburările gastrointestinale prezente în lotul persoanelor cu BP, se observă prezența în proporție egală a constipației și a durerii abdominale, urmate de balonare. Apetitul scăzut a fost cel mai puțin raportat, iar prezența unui tranzit accelerat diareic nu a fost raportată de către niciun pacient. La analiza statistică a valorilor  $SIBO \geq 20$  ppm, observăm o corelație semnificativă statistic ( $r=0.497$ ,  $p<.0001$ ) între pacienții din lotul martor și prezența  $SIBO \geq 20$  ppm. În ceea ce privește valoarea medie a H<sub>2</sub> măsurată la 1h30 în cele două loturi, observăm o diferență semnificativă statistic a acestora, în sensul că în lotul de studiu au fost măsurate valori semnificativ statistic mai mari ( $p<.0001$ ) decât în lotul martor. Observăm că valoarea medie a NLR în cele două loturi este diferită semnificativ statistic, în sensul că în lotul de studiu au fost măsurate valori semnificativ statistic mai mari ( $p<.0001$ ) decât în lotul martor, date similare fiind obținute și pentru PLR ( $p=.0002$ ); valoarea medie a MLR în cele două loturi este diferită ne semnificativ statistic, în sensul că în lotul de studiu au fost măsurate valori ne semnificativ statistic mai mari ( $p=.09$ ) decât în lotul martor. Se observă repartiția în funcție de numărul de pacienți cu valori NLR, PLR, MLR crescute, comparativ între cele două loturi, aceste rapoarte având valori mai mari la persoanele cu BP. Există diferențe semnificative statistic între cele 2 loturi în ceea ce privește vârsta medie, în lotul de control fiind pacienți semnificativ mai tineri, prezintă semnificativ mai puțini tulburări neurocognitive, valorile medii ale NLR, PLR și MLR sunt semnificativ mai mici în lotul de control. Tulburările gastro-intestinale sunt prezente doar la un număr semnificativ mai mic de subiecți în lotul de control față de lotul de studiu. De asemenea SIBO este prezent la semnificativ mai mulți pacienți decât în lotul de control.

Studiul 2 a avut ca temă corelația markerilor hematologici periferici de inflamație cu severitatea parkinsonismului și alte caracteristici ale bolii Parkinson sporadice. Am efectuat un studiu observațional descriptiv transversal pe date disponibile electronic, colectate în cadrul internărilor în Secțiile Neurologie ale Spitalului Clinic Colentina în perioada 2018-2021, pentru a investiga corelația dintre indicii hematologici NLR, MLR și PLR, considerați markeri de inflamație periferică, și caracteristicile BP idiopatică/sporadică. Ipoteză care a stat la baza acestui studiu a fost că, deși plurifactorială, mecanismul inflamator pare să fie implicat în patogeneza și în progresia bolii [33, 50]. Studii recente au demonstrat corelații între NLR și stadializarea motorie în BP sporadică/idiopatică [120,180, 181,182]. NLR, MLR și PLR sunt indicatori stabiliți pe baza hemogramei, o analiza ce se realizează în mod uzual, fiind ieftină și ușor accesibilă, fiind astfel facil de obținut în practica clinică de rutină. Sunt considerați markeri de inflamație periferică în multiple afecțiuni, de la patologia vasculară, osteoarticulară și metabolică, cu rol în afecțiunile neurodegenerative, rol reconsiderat relativ recent. Suplimentar, alături de valoarea de potențial biomarker, care ar putea contribui la creșterea sensibilității și specificității criteriilor actuale de diagnostic pentru boli neurodegenerative, asocierea acestor markeri cu anumite patologii oferă oportunitatea cercetării unor potențiale noi intervenții terapeutice în vederea ameliorării simptomatice sau evolutive [120].

În cadrul acestui studiu am evaluat corelațiile markerilor hematologici de inflamație cu durata și caracteristicile BP (markeri de inflamație periferică implicați în aprecierea gradului de activitate a bolii, evoluție, prognostic). Bazat pe criteriile de includere și de excludere detaliate mai sus, am inclus în analiză 107 pacienți (din care 64.5% persoane de sex masculin), cu vârsta medie de 70 ani. Am identificat și anume între NLR și vârstă ( $r_s = 0.377$ ,  $p < 0.001$ ), între NLR și boala cerebrovasculară ( $r_s = 0.322$ ,  $p < 0.001$ ), între MLR și PLR și stadiul Hoehn și Yahr ( $r_s = 0.259$ ,  $p = 0.018$ , respectiv  $r_s = 0.257$ ,  $p = 0.019$ ) și între PLR și complicațiile motorii ( $r_s = 0.303$ ,  $p = 0.003$ ).

În concluzie, datele obținute la persoanele cu BP au relevat prezența unui status de inflamație cronică și o tulburare a microbiomului intestinal, tradus prin identificarea SIBO și a tulburărilor gastrointestinale. Acestea se corelează cu un grad mai avansat de boală, cu prezența complicațiilor motorii și a manifestărilor non-motorii, inclusiv cu prezența tulburării neurocognitive. Datele furnizate de acest proiect doctoral au importanță pentru abordarea simptomatică, modularea

microbiomului intestinal fiind în prezent o țintă terapeutică, cu potential de creștere a calității vieții prin ameliorarea simptomelor motorii, respectiv a răspunsului la tratamentul simptomatic.



## Bibliografie selectivă

1. A. Samii , J. G. Nutt and B. R. Ransom , Parkinson's disease, *Lancet*, 2004, 363 , 1783 — 1793
2. Fabbri M, Reimão S, Carvalho M, Nunes RG, Abreu D, Guedes LC, Bouça R, Lobo PP, Godinho C, Coelho M, Gonçalves NC, Rosa MM, Antonini A, Ferreira JJ. Substantia Nigra Neuromelanin as an Imaging Biomarker of Disease Progression in Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis.* 2017;7(3):491-501
3. Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R.A., Jansen Steur, E.N., and Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24, 197-211.
4. Halliday, G.M., Del Tredici, K., and Braak, H. (2006). Critical appraisal of brain pathology staging related to presymptomatic and symptomatic cases of sporadic Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 99-103.
5. Santos, S.F., de Oliveira, H.L., Yamada, E.S., Neves, B.C., and Pereira, A., Jr. (2019). The Gut and Parkinson's Disease-A Bidirectional Pathway. *Front Neurol* 10, 574.
7. De Virgilio, A., Greco, A., Fabbrini, G., Inghilleri, M., Rizzo, M.I., Gallo, A., Conte, M., Rosato, C., Ciniglio Appiani, M., and de Vincentiis, M. (2016). Parkinson's disease: Autoimmunity and neuroinflammation. *Autoimmun Rev* 15, 1005-1011.
13. Edison, P., Ahmed, I., Fan, Z., Hinz, R., Gelosa, G., Ray Chaudhuri, K., Walker, Z., Turkheimer, F.E., and Brooks, D.J. (2013). Microglia, amyloid, and glucose metabolism in Parkinson's disease with and without dementia. *Neuropsychopharmacology* 38, 938-949.
14. Gerhard, A., Pavese, N., Hotton, G., Turkheimer, F., Es, M., Hammers, A., Eggert, K., Oertel, W., Banati, R.B., and Brooks, D.J. (2006). In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 21, 404-412.
15. Lee and Trojanowski, 2006. - Parkinson's Disease Molecular and Therapeutic Insights From Model Systems 2008, Pages 225-236
16. Deng, H., Wang, P., and Jankovic, J. (2018). The genetics of Parkinson disease. *Ageing Res Rev* 42, 72-85.
17. Kalia, L.V., and Lang, A.E. (2015). Parkinson's disease. *Lancet* 386, 896-912.

18. Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Clark, J.B., Jenner, P., and Marsden, C.D. (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54, 823-827.
24. Postuma, R.B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C.W., Oertel, W., Obeso, J., Marek, K., Litvan, I., Lang, A.E., et al. (2015). MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord* 30, 1591-1601.
31. Li, W., Wu, X., Hu, X., Wang, T., Liang, S., Duan, Y., Jin, F., and Qin, B. (2017). Structural changes of gut microbiota in Parkinson's disease and its correlation with clinical features. *Sci China Life Sci* 60, 1223-1233.
32. Dobbs, S.M., Dobbs, R.J., Weller, C., and Charlett, A. (2000). Link between *Helicobacter pylori* infection and idiopathic parkinsonism. *Med Hypotheses* 55, 93-98.
33. W.A. Rocca, The burden of Parkinson's disease: a worldwide perspective, VOLUME 17, ISSUE 11, P928-929, NOVEMBER 01, 2018, Published: October 01, 2018
34. Rocca WA. Time, sex, gender, history, and dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2017; 31: 76–79. 35. Rocca WA. The future burden of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2018; 33: 8–9.
36. GBD 2015 Neurological Disorders Collaborator Group. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Neurol* 2017; 16: 877–97.
37. *Front. Public Health*, 07 December 2021. Global Trends in the Incidence, Prevalence, and Years Lived With Disability of Parkinson's Disease in 204 Countries/Territories From 1990 to 2019
41. Charcot J-M 1872. De la paralysie agitante. In *Oeuvres Complètes (t 1) Leçons sur les maladies du système nerveux*, pp. 155–188 A Delahaye, Paris: In English: Charcot J-M. 1877. On Parkinson's disease. In *Lectures on diseases of the nervous system delivered at the Salpêtrière* (transl. Sigerson G), pp. 129–156. New Sydenham Society, London
42. Gowers WR 1888. *A manual of diseases of the nervous system*. J and A Churchill, London
50. Bjorklund A, Dunnett SB. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 2007;30:194–202.
86. Andrina Rutsch, Johan B. Kantsjo, Francesca Ronchi. The Gut-Brain Axis: How Microbiota and Host Inflammasome Influence Brain Physiology and Pathology. *Front. Immunol.*, 10 December 2020

87. Li, W., Wu, X., Hu, X., Wang, T., Liang, S., Duan, Y., Jin, F., and Qin, B. (2017). Structural changes of gut microbiota in Parkinson's disease and its correlation with clinical features. *Sci China Life Sci* 60, 1223-1233.
88. Schwiertz, A., Spiegel, J., Dillmann, U., Grundmann, D., Burmann, J., Fassbender, K., Schafer, K.H., and Unger, M.M. (2018). Fecal markers of intestinal inflammation and intestinal permeability are elevated in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 50, 104-107.
89. Kim S, Kim H, Yim YS, Ha S, Atarashi K, Tan TG, et al. Maternal gut bacteria promote neurodevelopmental abnormalities in mouse offspring. *Nature*(2017)
92. Rothhammer V, Borucki DM, Tjon EC, Takenaka MC, Chao C, Ardura-fabregat A, et al. Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature* (2018) 557:724–8.
93. Feng W, Wang Y, Liu ZQ, Zhang X, Han R, Miao YZ, et al. Microglia activation contributes to quinolinic acid-induced neuronal excitotoxicity through TNF- $\alpha$ . *Apoptosis* (2017) 22:696–709.
94. Erny D, Hrab de Angelis A, Jaitin D, Wieghofer P, David E, Keren-Shaul H, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci* (2017) 18:965–77
95. Hasegawa S, Goto S, Tsuji H, Okuno T, Asahara T, Nomoto K, et al. Intestinal dysbiosis and lowered serum lipopolysaccharide-binding protein in Parkinson's disease. *PloS One* (2015) 10:1–15.
96. Keshavarzian A, Green SJ, Engen PA, Voigt RM, Naqib A, Forsyth CB, et al. Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. *Mov Disord* (2015)
100. Braak H, de Vos RAI, Bohl J, et al. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett*. 2006.
120. Ciaramella A, Salani F, Bizzoni F, Pontieriet FE, Stefanial A, Pierantozzi M, et al. Blood dendritic cell frequency declines in idiopathic parkinson's disease and is associated with motor symptom severity. *PLoS ONE*. (2013) 8:e65352. doi: 10.1371/journal.pone.0065352
- 143.O. Goetze, A.B. Nikodem, J. Wiezcorek, M. Banasch, H. Przuntek, T. Mueller, W.E. Schmidt, D.Woitalla. Predictors of gastric emptying in Parkinson's disease *Neurogastroenterol. Motil.*, 18 (5) (2006)
154. Khoshini, R., Dai, S.C., Lezcano, S., and Pimentel, M. (2008). A systematic review of diagnostic tests for small intestinal bacterial overgrowth. *Dig Dis Sci* 53, 1443-1454.

155. Rezaie, A., Buresi, M., Lembo, A., Lin, H., McCallum, R., Rao, S., Schmulson, M., Valdovinos, M., Zakko, S., and Pimentel, M. (2017). Hydrogen and Methane-Based Breath Testing in Gastrointestinal Disorders: The North American Consensus. *Am J Gastroenterol* 112, 775-784.
163. Shen, X.; Carlström, M.; Borniquel, S.; Jädert, C.; Kevill, C.G.; Lundberg, J. Microbial regulation of host hydrogen sulfide bioavailability and metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 2013
166. Dridi B, Henry M, El Khéchine A, Raoult D, Drancourt M. High prevalence of *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* detected in the human gut using an improved DNA detection protocol. *PLoS One*. 2009 Sep 17;4(9):e7063
167. Borrel G, McCann A, Deane J, Neto MC, Lynch DB, Brugère JF, O'Toole PW. Genomics and metagenomics of trimethylamine-utilizing Archaea in the human gut microbiome. *ISME J*. 2017 Sep;11(9):2059-2074.
180. Zhu Liu, Qingli Fan, Shizheng Wu, Yaqi Wan & Yancheng Lei. Lipids in Health and Disease volume 20, Article number: 35 (2021) . Compared with the monocyte to high-density lipoprotein ratio (MHR) and the neutrophil to lymphocyte ratio (NLR), the neutrophil to high-density lipoprotein ratio (NHR) is more valuable for assessing the inflammatory process in Parkinson's disease.
182. Lisewska, P. Lisewski, P. Szarwas, N. Piekuś-Słomka, D. Roś (Bydgoszcz, Poland) 2018 International Congress, Neutrophil to lymphocyte ratio, lymphocyte to monocyte ratio and Parkinson's Disease: Preliminary report B
183. Akil E, Bulut A, Kaplan İ, et al. The increase of carcinoembryonic antigen (CEA), high-sensitivity C-reactive protein, and neutrophil/lymphocyte ratio in Parkinson's disease. *Neurol Sci* 2015;36:423-8.

Lista lucrărilor publicate

**1. Small intestinal bacterial overgrowth as potential therapeutic target in Parkinson's disease.**

Adela Dănau , Laura Dumitrescu , Antonia Lefter , Delia Tulbă and Bogdan Ovidiu Popescu  
International Journal of Molecular Sciences. **Int. J. Mol. Sci.** 2021, 22, x.  
<https://www.mdpi.com/1422-0067/22/21/11663>

**2. Serum Uric Acid Levels in Parkinson's Disease: A Cross-Sectional Electronic Medical Record Database Study from a Tertiary Referral Center in Romania.**

Adela Dănau , Laura Dumitrescu , Antonia Lefter and Bogdan Ovidiu Popescu  
Medicina 2022, 58, 245. <https://www.mdpi.com/1648-9144/58/2/245>