

# Utjecaj crijevne mikrobiote na amiotrofičnu lateralnu sklerozu

---

**Copić, Barbara**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:807815>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-05**

*Repository / Repozitorij:*

**BIotech**

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA  
Prijediplomski sveučilišni studij  
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

*Barbara Copic*

*Utjecaj crijevne mikrobiote na amiotrofičnu lateralnu sklerozu*

*Završni rad*

Rijeka, 2024. godine

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA  
Prijediplomski sveučilišni studij  
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

*Barbara Copic*

*Utjecaj crijevne mikrobiote na amiotrofičnu lateralnu sklerozu*

*Završni rad*

Rijeka, 2024. godine

Mentor rada: prof. dr. sc. Ivana Munitić

UNIVERSITY OF RIJEKA  
FACULTY OF BIOTECHNOLOGY AND DRUG DEVELOPMENT  
Undergraduate study  
„Biotechnology and drug research“

*Barbara Copic*

*The Role of Gut Microbiota in Amyotrophic Lateral sclerosis*

*Undergraduate thesis*

Rijeka, 2024. godine

Mentor rada: prof. dr. sc. Ivana Munitić

Završni rad obranjen je dana 20. rujna 2024.

pred povjerenstvom:

1. prof. dr. sc. Jasminka Giacometti, predsjednica povjerenstva
2. prof. dr. sc. Željka Maglica
3. prof. dr. sc. Ivana Munitić

Rad ima 35 stranica, 6 slika, 1 tablicu i 47 literaturnih navoda

## SAŽETAK

Amiotrofična lateralna skleroza je složena i brzo progresivna neurodegenerativna bolest. Pacijenti obično prežive 3-5 godina nakon dijagnoze, a liječenje se fokusira na ublažavanje simptoma i palijativnu skrb. Iako je poznato >40 gena čije mutacije uzrokuju ALS, većina slučajeva je sporadična (~90%), bez jasne obiteljske povijesti bolesti. Ipak, određene genetske mutacije koje povećavaju rizik za ALS mogu biti prisutne i u sporadičnim slučajevima. Nedavna istraživanja usmjerila su se na okolišne čimbenike koji doprinose razvoju ALS-a, uključujući crijevnu mikrobiotu koja korelira s progresijom bolesti u ljudskim i životinjskim studijama. Ljudski gastrointestinalni trakt nastanjuje oko  $10^{14}$  mikroorganizama koji dvosmjerno komuniciraju s domaćinom putem osovine crijevna mikrobiota-mozak. Mikrobiota i njezini metaboliti reguliraju funkcije poput modulacije imunskog sustava, održavanja energetske homeostaze i integriteta crijevne barijere. Na crijevnu mikrobiotu utječe životni stil domaćina, prehrambene navike te izloženost antibioticima, što može rezultirati disbiozom, odnosno neravnotežom mikrobnih zajednica tijekom bolesti, uključujući ALS. Mikrobiota je povezana s patofiziološkim obilježjima ALS-a. Neuroinflamacija i narušena regulacija imunskog sustava ključne su značajke ALS-a, a povezani su s posebnim mikrobiotskim profilima u studijama na miševima. Također, pacijenti s ALS-om pokazuju različite metabolomičke profile u plazmi, koji mogu biti pod utjecajem mikroba u crijevima. Nadalje, strukturne, funkcionalne i biokemijske abnormalnosti gastrointestinalnog sustava uočene su kod pacijenata s ALS-om, a povezane su s promjenama u crijevnoj mikrobioti. Uz sve veće razumijevanje uloge mikrobiote u patogenezi ALS-a, poraslo je i zanimanje za potencijalne terapijske pristupe koji ciljaju na modulaciju crijevne mikrobiote. Dosadašnja istraživanja predlažu nekoliko metoda, uključujući upotrebu probiotika, prebiotika, sinbiotika i postbiotika te transplantaciju fekalne mikrobiote čiji bi cilj bio obnoviti zdravu mikrobiotu, smanjiti neuroinflamaciju i poboljšati simptome

ALS-a. Iako su istraživanja na životinjskim modelima pokazala obećavajuće rezultate, potrebna su daljnja klinička ispitivanja kako bi se potvrdila učinkovitost ovih terapija kod pacijenata s ALS-om. Modulacija crijevne mikrobiote predstavlja inovativan pristup koji bi mogao usporiti napredovanje ALS-a i poboljšati kvalitetu života oboljelih.

**Ključne riječi:** amiotrofična lateralna skleroza, crijevna mikrobiota, osovina crijevna mikrobiota-mozak, disbioza, neuroinflamacija.

## **SUMMARY**

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a complex and rapidly progressing neurodegenerative disorder. Patients typically have a survival rate of only 3 to 5 years following diagnosis, with treatment mainly focusing on alleviating symptoms and providing palliative care. While over 40 genes with mutations that cause ALS have been identified, the majority of cases are sporadic (~90%), lacking a clear family history of the disease. Nevertheless, certain genetic mutations that increase the risk for ALS can also be present in sporadic cases. Recent studies have explored the impact of environmental factors in ALS development, including the gut microbiota, which has been linked to ALS in human and animal studies. Gut microbiota is a collection of approximately  $10^{14}$  microorganisms. The gut microbiota-brain axis is the main communication pathway between these microorganisms and the host. The composition of the gut microbiota is influenced by factors like the host's lifestyle, diet, and exposure to antibiotics, potentially leading to dysbiosis, an imbalance in microbial communities seen in several diseases, including ALS. The gut microbiota is associated with multiple pathophysiological characteristics of ALS. Neuroinflammation and immune dysregulation are recognized as critical features of ALS, and they have been linked to distinct microbiota profiles in mouse models. ALS patients also exhibit unique metabolomic profiles in their blood plasma, which may be partially shaped by gut microorganisms. Additionally, ALS patients often present structural, functional, and biochemical abnormalities in their gastrointestinal systems, correlating with alterations in gut microbiota. As understanding of the microbiota's role in ALS pathogenesis grows, there has been increasing interest in therapeutic approaches aimed at modifying the gut microbiota. Recent studies have proposed several strategies, such as using probiotics, prebiotics, synbiotics, and postbiotics, as well as fecal microbiota transplantation, with the aim of restoring a healthy microbiota, reduce neuroinflammation, and improve ALS symptoms. While animal model studies have shown promising results,



further clinical trials are needed to validate the effectiveness of these treatments in ALS patients. Modulating the gut microbiota offers a novel strategy that could potentially slow ALS progression and enhance patients' quality of life.

**Key words:** Amyotrophic lateral sclerosis, gut microbiota, gut microbiota-brain axis, dysbiosis, neuroinflammation.

# SADRŽAJ

SAŽETAK .....	5
SUMMARY .....	7
1 UVOD – AMIOTROFIČNA LATERALNA SKLEROZA .....	1
1.1 Genetski i okolišni čimbenici .....	1
1.2 Patogenetski mehanizmi .....	4
2 SVRHA RADA .....	7
3 CRIJEVNA MIKROBIOTA .....	9
3.1 Sastav .....	9
3.2 Funkcije .....	11
3.3 Disbioza i povezanost s bolestima .....	12
3.4 Osovina crijevna mikrobiota-mozak .....	13
4 CRIJEVNA MIKROBIOTA I ALS .....	17
4.1 Disfunkcija tjelesnih barijera u ALS-u .....	17
4.2 Utjecaj disbioze na GMBA i mehanizmi povezani s ALS-om .....	18
4.2.1 Živčani putovi .....	19
4.2.2 Imunosni put .....	20
4.2.3 Endokrini put .....	22
4.3 Pregled istraživanja .....	24
4.3.1 Istraživanja na mišjim modelima .....	24
4.3.2 Istraživanja na ljudskoj populaciji .....	27
5 CRIJEVNA MIKROBIOTA KAO META TERAPIJE .....	30
5.1 Transplantacija fekalne mikrobiote .....	31
5.2 Probiotici .....	31
5.3 Prebiotici .....	32
5.4 Sinbiotici .....	33
5.5 Postbiotici .....	33
6 ZAKLJUČAK .....	35
REFERENCE .....	36
ŽIVOTOPIS .....	40

# **1 UVOD – AMIOTROFIČNA LATERALNA SKLEROZA**

Amiotrofična lateralna skleroza (ALS) je neurodegenerativna bolest koju karakterizira progresivna degeneracija motoričkih neurona u mozgu i leđnoj moždini (1). Motorički neuroni podijeljeni su u dvije glavne skupine: gornji motorički neuroni u motoričkom korteksu i donji motorički neuroni u moždanom deblu i leđnoj moždini (2). Gornji motorički neuroni čine kortikospinalne i kortikobulbarne putove te uspostavljaju izravne ili neizravne veze s motoričkim neuronima u leđnoj moždini i moždanom deblu, koji potom inerviraju skeletne mišiće i pokreću njihove kontrakcije (1).

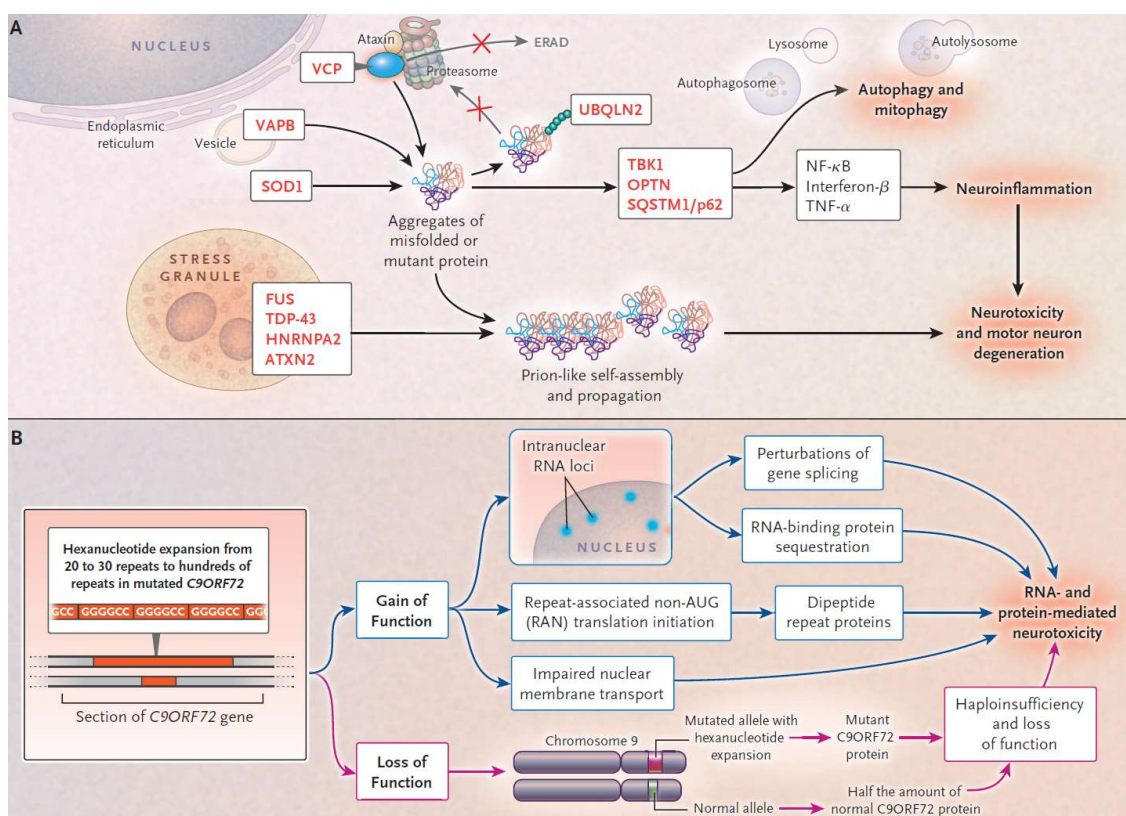
ALS je prvi opisao neurolog Jean-Martin Charcot, a naziv bolesti ukazuje na propadanje gornjih motoričkih neurona, čiji silazni aksoni u bočnom dijelu leđne moždine izgledaju kao ožiljci ("lateralna skleroza"), kao i na propadanje spinalnih motoričkih neurona, što dovodi do denervacije i slabljenja mišića ("amiotrofija") (1). S progresijom bolesti i odumiranjem motoričkih neurona moždanog debla i leđne moždine dolazi do stanjivanja ventralnih korijena i atrofije mišića jezika, ždrijela, udova i dišnog mišićja (2). Zanimljivo je da ALS, sve do kasnih stadija bolesti, ne utječe na neurone koji inerviraju očne mišiće ili mjehur. Kao i većina neurodegenerativnih bolesti, ALS je u početku lokalizirana na ograničen broj mišića, ali se kasnije širi na susjedne regije (1). Simptomi, koji u početku mogu biti suptilni grčevi ili slabost mišića u udovima ili bulbarnim mišićima, napreduju do paralize gotovo svih skeletnih mišića. U konačnici, zbog paralize dišnog mišićja i respiratorne insuficijencije dolazi do smrti koja najčešće nastupa 3-5 godina od pojave prvih simptoma. Rijetki oblici bolesti pokazuju produljeno preživljenje, no faktori koji na to utječu ostaju nejasni.

## **1.1 Genetski i okolišni čimbenici**

Kliničke manifestacije ALS-a mogu biti pod utjecajem genetskih i uglavnom nepoznatih okolišnih čimbenika (3). Otprilike 10% svih slučajeva ALS-a čine obiteljski (familijarni; fALS) slučajevi, koji uključuju jednog ili

više članova obitelji oboljelih od ove bolesti, a svi takvi slučajevi su nasljedni. Ostalih 90% čine sporadični (sALS) slučajevi, koji nemaju povijest bolesti u obitelji (4). Sekvenciranjem genoma otkriveno je da i pacijenti sa sALS-om mogu imati mutacije u ALS povezanim genima (1). Genetički faktori objašnjavaju dio sporadičnih slučajeva, ali etiologija ostalih ostaje nejasna (4).

Razvojem molekularnih genetičkih tehnika identificirano je više od 50 potencijalnih gena koji mogu modificirati tijek bolesti ili biti patogeni za ALS (5). Najčešće mutacije nalaze se u genima *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* i *C9ORF72*, dok su mutacije u drugim genima relativno rijetke.



**Slika 1: Mehanizmi djelovanja ALS mutacija.** Slika A prikazuje izmijenjenu homeostazu proteina u ALS-u. Mnogi geni povezani s ALS-om kodiraju adaptorske proteine koji su ključni u razgradnji proteina, djelujući na razini endoplazmatskog retikuluma te kroz proteolitičke i autofagijske putove. Proteini koji vežu RNA mogu se samoorganizirati u agregate nalik prionima. Slika B prikazuje mehanizme bolesti povezane s *C9ORF72*. Smatra se da toksičnost proširenih heksanukleotidnih ponavljanja u genu *C9ORF72* uključuje taloženje intranuklearne RNA, s posljedičnim poremećajem u prekrajanju RNA i vezivanjem RNA-vezujućih

*proteina; nekonvencionalnu translaciju polipeptida iz proširene DNA (RAN-translacija), što dovodi do stvaranja toksičnih ponavljajućih dipeptida; poremećaje u nukleocitoplazmatskom transportu; te smanjene razine proteina C9ORF72. Slika preuzeta od Hu et al. 2024 (5).*

Prvi gen povezan s fALS-om, *SOD1*, identificiran je 1993. godine (5). Mutacije *SOD1* dovode do njihove agregacije i posljedičnog stvaranja neurotoksičnih inkluzija u neuronima (*Slika 1*), što je patološki znak ALS-a uzrokovanog mutacijama *SOD1*. Superoksid dismutaza 1 je antioksidativni enzim koji štiti stanice od reaktivnih kisikovih vrsta (ROS; prema engl. *reactive oxygen species*) pretvaranjem slobodnog radikala superoksida u vodikov peroksid i kisik. (4). Istraživanja sugeriraju da mutacije u *SOD1* mogu uzrokovati toksičnost kroz konformacijske i funkcionalne promjene koje uključuju interakcije s nekoliko proteina i višestruke patogenetske mehanizme. Ovi mehanizmi uključuju agregaciju proteina, disfunkciju mitohondrija, oksidativni stres, apoptozu, narušeni transport aksona, ekscitotoksičnost, i stres endoplazmatskog retikuluma (5), a više riječi o pojedinim mehanizmima bit će u nastavku

TDP-43, protein kodiran *TARDBP* genom, ključan je za regulaciju izražaja gena kroz različite procese, uključujući stabilnost mRNA, translokaciju mRNA, preradu pre-mRNA i regulaciju nekodirajućih RNA (5). Studije pokazuju prisutnost TDP-43-pozitivnih inkluzijskih tijela u motoričkom korteksu ili leđnoj moždini kod otprilike 97% pacijenata s ALS-om, odnosno u svih pacijenata osim nositelja *SOD1* i *FUS* mutacija. Translokacija TDP-43 u citoplazmu uzrokuje gubitak njegove funkcije u jezgri, što remeti nukleocitoplazmatski transport (4). Akumulacija TDP-43 u citoplazmi, povezana je s narušenom funkcijom mitohondrija i oksidativnim stresom.

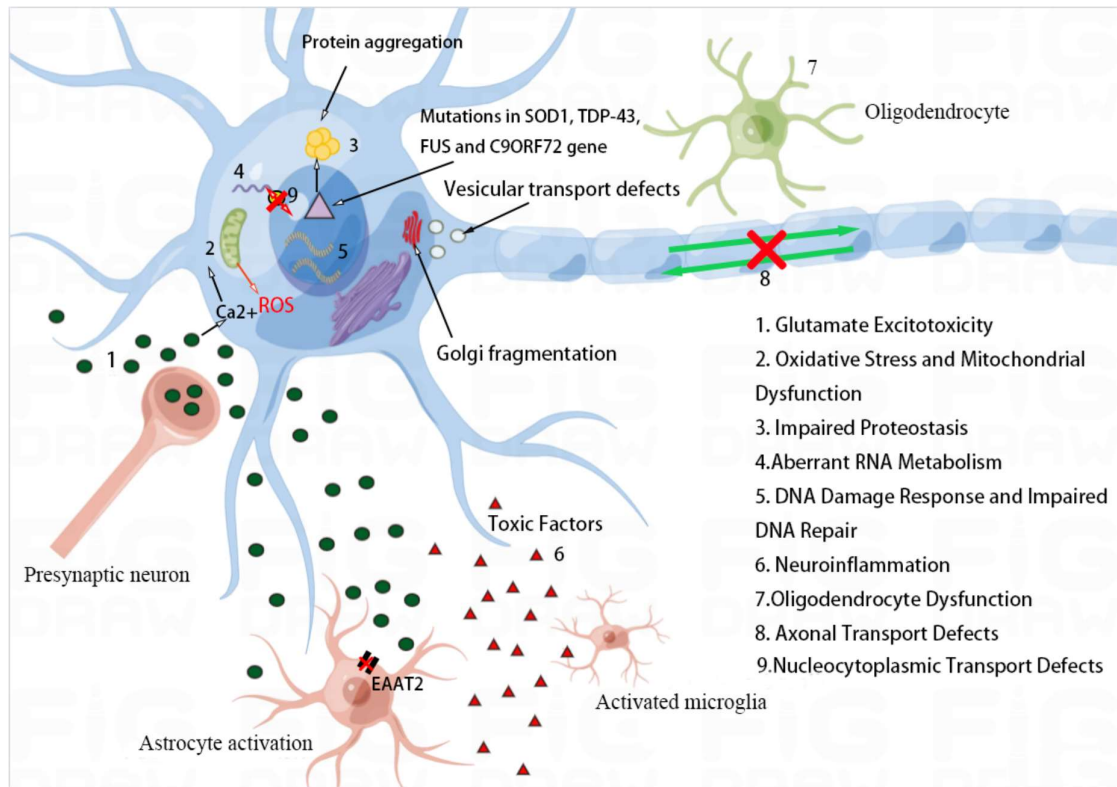
Heksanukleotidno ponavljajuće proširenje GGGGCC unutar *C9ORF72* gena je najčešća mutacija u pacijenata s fALS-om (1). Složeni mehanizmi mutacije ovog gena prikazani su na slici 1. Nadalje, *C9ORF72* ima ključnu ulogu u regulaciji autofagije, modulaciji neuroinflamacije, metabolizmu

lipida, rastu aksona i transportu te funkcijama presinaptičkih i postsinaptičkih veza.

Postoje istraživanja koja sugeriraju da okolišni čimbenici mogu utjecati na tijek bolesti, uključujući izloženost raznim kemikalijama, metalima, pesticidima, elektromagnetskim poljima i određenim životnim navikama poput pušenja i pretjeranog fizičkog napora (6). Uz to, crijevna mikrobiota također se istražuje kao potencijalno važan okolišni čimbenik, jer se pokazalo da metaboliti koji potječu iz gastrointestinalnog trakta mogu prodrijeti kroz krvno-moždanu barijeru (BBB; prema engl. *blood-brain barrier*) te utjecati na metaboličke, transkripcijske i epigenetske čimbenike u neuronima i drugim stanicama CNS-a (3). Iako ovi čimbenici sami po sebi ne uzrokuju izravno ALS, oni djeluju na unutarnje predispozicije organizma i time mogu doprinijeti razvoju bolesti. Međutim, precizna uloga takvih okolišnih čimbenika u ALS-u ili drugim patologijama središnjeg živčanog sustava (CNS; prema engl. *central nervous system*) i dalje je predmet intenzivnog istraživanja (6).

## **1.2 Patogenetski mehanizmi**

Patogeneza ALS-a nije rezultat pojedinačnog faktora, već posljedica složenih interakcija različitih molekularnih i genetskih putova (5). Predloženi mehanizmi ALS-a uključuju ekscitotoksičnost, oksidativni stres, mitohondrijsku disfunkciju, poremećaje proteostaze, RNA metabolizma, nukleocitoplazmatskog transporta, neuroinflamaciju, disfunkciju oligodendrocita i aksonskog transporta (*Slika 2*).



**Slika 2: Predloženi patogenetski mehanizmi u ALS-u.** Postoji više čimbenika odgovornih za patofiziološke mehanizme u ALS-u. Predloženo je nekoliko mehanizama koji mogu poticati neurodegenerativne učinke. (1) Hiperstimulacija glutamatnih receptora može nastati kroz nekoliko mehanizama, uključujući povećano oslobađanje glutamata u sinapsama, promjene u AMPAR receptorima i smanjeno uklanjanje glutamata od strane astrocita. (2) Oksidativni stres smatra se inicijalnim faktorom ALS-a i snažno je povezan s mitohondrijskom disfunkcijom. (3) Patološki proteini mogu se nakupljati u citoplazmi u velikim količinama. Glavni putevi za uklanjanje proteina (UPS i autofagija-lizosomski sustav) uključeni su u ovaj proces. (4) Proteini koji vežu RNA (RBP) mogu biti nepravilno locirani unutar citoplazme, što može uzrokovati promjene u transkripciji i spajanju RNA. (5) Oštećenja DNA i nedostaci u popravku DNA mogu ubrzati smrt motoričkih neurona kroz različite mehanizme. (6) Neuroinflamacija se smatra ključnim čimbenikom u nastanku i progresiji ALS-a. Aktivirana mikroglia može aktivirati neurotoksičnost astrocita izlučivanjem upalnih čimbenika. (7) Disfunkcija oligodendrocita može dovesti do smanjenja potpore neuronima, što rezultira neuronskom disfunkcijom. (8) Narušeni transport aksona vjerojatno je povezan s razvojem ALS-a. (9) Oštećen transport vezikula može uzrokovati agregaciju proteina i fragmentaciju Golgijevog aparata u ALS-u.

AMPArs: prema engl.  $\alpha$ -amino-3-hidroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors; C9ORF72: otvoreni okvir čitanja na kromosomu 9; EAAT2: transporter ekscitacijskih aminokiselina 2; FUS: fuzijski gen u sarkomu; RBPs: proteini koji vežu RNA; UPS: ubikvitin-proteasomni sustav; ROS: reaktivni kisikovi spojevi. Slika preuzeta od Hu et al. 2024. (5).

Ekscitotoksičnost posredovana glutamatom je jedan od ranih mehanizama koji se može pogoršati mutacijama, poput onih u genu *SOD1* (5). Prekomjerna akumulacija glutamata u sinaptičkoj pukotini dovodi do povećanog ulaska kalcija u neurone, aktivirajući štetne enzimske putove i stvaranje slobodnih radikala, što uzrokuje smrt motoričkih neurona. Smanjena prisutnost transportera ekscitacijskih aminokiselina EAAT2 (prema engl. *excitatory amino acid transporter 2*) na astrocitima također doprinosi pogoršanju ekscitotoksičnosti.

Oksidativni stres, kao što je ranije spomenuto, može biti rezultat disfunkcije *SOD1*, *TARDBP* i *FUS* (4). Neravnoteža između proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS; prema engl. *reactive oxygen species*) i antioksidativnih kapaciteta stanica uzrokuje oštećenja lipida, proteina i DNA. Mutacije u *SOD1*, smanjena aktivnost antioksidativnih enzima, te akumulacija TDP-43 u citoplazmi, koja je povezana s mitohondrijskom disfunkcijom, sve zajedno pogoršavaju oksidativni stres i doprinose neurodegeneraciji (5). Disfunkcija mitohondrija usko je povezana s oksidativnim stresom i ekscitotoksičnošću. Prekomjerni unos kalcija može uzrokovati mitohondrijsku disfunkciju, čime se pojačava proizvodnja ROS-a i neuronska oštećenja.

Neuroinflamacija, koja uključuje aktivaciju mikroglije i astrocita te nakupljanje imunskih stanica poput T-stanica, važan je čimbenik u progresiji ALS-a (5). Mutacije u *C9ORF72* utječu na mikroglijalnu funkciju, što povećava neuroinflamaciju i pogoršava stanje.

Poremećaji proteostaze i nukleocitoplazmatskog transporta, ključni su u kontekstu mutacija u *TDP-43* i *FUS* (5). Akumulacija nepravilno savijenih proteina i poremećaji u transportu RNA i proteina između jezgre i citoplazme pogoršavaju staničnu disfunkciju i potiču neurodegeneraciju.



## 2 SVRHA RADA

Svrha ovog rada je istražiti utjecaj crijevne mikrobiote i njezinih metabolita na nastanak i progresiju ALS-a. Iako su postignuti značajni napreci u razumijevanju genetskih uzroka ALS-a, samo oko 10% slučajeva može se izravno povezati s naslijeđenim genetskim mutacijama. Preostalih 90% slučajeva klasificiraju se kao sporadični, što znači da se mogu pojaviti genetske mutacije koje se ne nasljeđuju prema uobičajenim Mendelovim obrascima ili nastaju *de novo*. Ovo ukazuje na složenost ALS-a kao bolesti s višestrukim uzrocima, uključujući genetske predispozicije i utjecaje okolišnih čimbenika. Osim toga, prisutna je varijabilnost u fenotipu među pacijentima s istim genetskim mutacijama, što sugerira da okolišni čimbenici, poput razlika u sastavu i funkciji crijevne mikrobiote, mogu imati ključnu ulogu u modulaciji tijeka bolesti i različitim ishodima ALS-a.

Kritički pregled literature stoga uključuje:

1. Razumijevanje sastava i funkcije crijevne mikrobiote u zdravlju domaćina te njezine povezanosti s osovnom crijevna mikrobiota-mozak (GMB, prema engl. *gut microbiota-brain axis*), koja uključuje dvosmjernu komunikaciju između crijeva i mozga. Pregled se usredotočuje na to kako disbioza, promjena u sastavu mikrobiote, može narušiti homeostazu i pridonijeti razvoju brojnih bolesti, uključujući neurodegenerativne, putem živčanih, imunskih i endokrinih putova.
2. Istraživanje utjecaja disbioze na ALS, uključujući narušavanje integriteta crijevne i BBB te posljedične patogenetske mehanizme zbog modulacije GMB. Posebna pažnja posvećena je ključnim metabolitima mikrobiote, poput kratkolančanih masnih kiselina (SCFA, prema engl. *short chain fatty acids*) i nikotinamid adenin dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) prekursora, zbog njihovih neuroprotektivnih učinaka.
3. Pregled ključnih istraživanja na modelima miševa i ljudskoj populaciji, koja pokazuju promjene u mikrobioti prije pojave simptoma ALS-a i

povezanost specifičnih bakterijskih sojeva s progresijom bolesti, čime se naglašava važnost daljnjeg istraživanja.

4. Pregled potencijalnih terapijskih pristupa usmjerenih na modulaciju mikrobiote, kao što su probiotici, prebiotici, sinbiotici, postbiotici i transplantacija fekalne mikrobiote, koji mogu utjecati na tijek bolesti i usporiti njezino napredovanje.

### 3 CRIJEVNA MIKROBIOTA

Ljudsko tijelo čini ekosustav s brojnim mikroorganizmima koji koegzistiraju s domaćinom (7). Cjelokupnost mikroorganizama koji koloniziraju neko stanište zove se mikrobiota. S druge strane, izraz „mikrobiom“, odnosi se na skup gena svih mikroorganizama (mikrobiota) koji nastanjuju gotovo sve dijelove ljudskog tijela. Mikrobiom se zato često naziva i „drugim genomom“, koji ima simbiotski odnos sa ljudskim genomom te sudjeluje u regulaciji tjelesnih procesa.

Mikrobiotu u ljudskom organizmu nalazimo na svakoj površini koja je u doticaju s vanjskim svijetom kao što su koža i mukozne membrane (8). Gastrointestinalni sustav ima daleko najveću površinu koja je izložena vanjskim utjecajima te posljedično najveći i najkompleksniji mikrobiom.

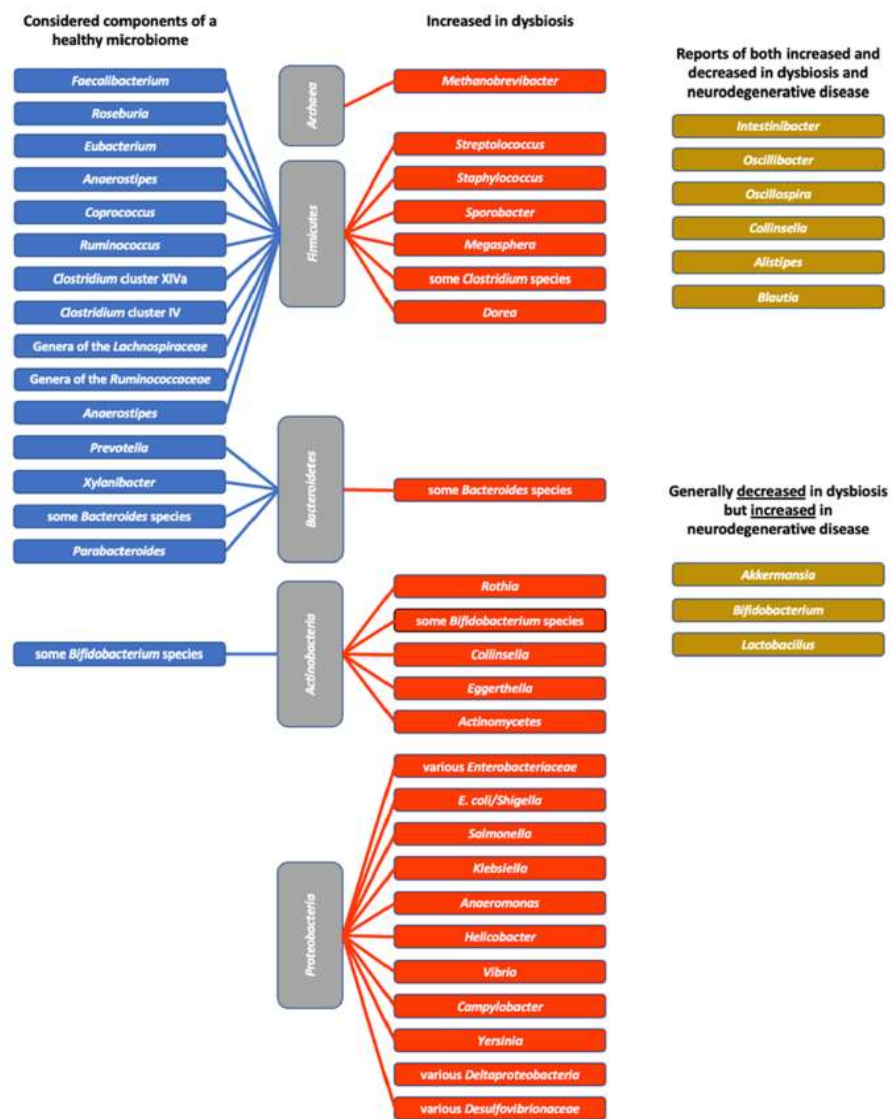
#### 3.1 Sastav

Crijevna mikrobiota sadrži oko  $10^{14}$  bakterija, virusa, arheja, parazita i gljivica, pri čemu su bakterije najzastupljenije i čine 95% ukupnog sastava (8). Broj prisutnih bakterija malo premašuje ili je sličan broju stanica koje izgrađuju naš organizam. Najčešći omjer naveden u literaturi je 10:1 u korist bakterijskih stanica. Još važnije, po nekim procjenama crijevni mikrobiom sadrži preko 22 milijuna gena, dok naš vlastiti genom ima nešto više od 23 tisuće.

Crijevna mikrobiota sastoji se od osam glavnih bakterijskih fila, od kojih je 90% obično kombinacija *Bacteroidetes* i *Firmicutes*, s manjim brojem *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* i *Verrucomicrobia* (9). Postoje još stotine zasebnih rodova koje se mogu naći u mikrobioti, najvjerojatnije s tisućama zasebnih vrsta i sojeva.

Poznato je da crijevna mikrobiota igra važnu ulogu u zdravlju, no još uvijek postoji mnogo nejasnoća što točno čini „zdravu“ mikrobiotu (8). Klasifikacija bakterija kao isključivo „dobrih“ i „loših“ nije jednostavna, međutim njihova uloga u proizvodnji metaboličkih produkata može pomoći u njihovom kategoriziranju (*Slika 3*). Primjerice, bakterije koje proizvode

SCFA pribrajaju se zdravoj mikrobioti, dok se bakterije koje proizvode toksine, kao što su lipopolisaharidi (LPS), smatraju patogenom i negativnom mikrobiotom. Također, bakterije koje su povezane s bolestima, mogu u niskim količinama postojati i u sklopu zdrave mikrobiote. Ono što je sigurno, je da zdravu mikrobiotu karakterizira visoka raznolikost i ravnoteža u sastavu bakterija. Ipak, crijevna mikrobiota je dinamična i podložna promjenama koje ovise o genetskim faktorima, zdravstvenom stanju, stresu, prehrani, lijekovima, infekcijama, životnim navikama i geografskoj lokaciji (10).



**Slika 3: Potencijalno 'zdrave' i 'štetne' bakterije pronađene u uravnoteženoj mikrobioti i disbiozi. Slika preuzeta od Bicknell et al. 2023. (8).**

## 3.2 Funkcije

Crijevna mikrobiota ima ključnu ulogu u održavanju ljudskog zdravlja kroz razne biološke procese (11). Istraživanja su pokazala da mikrobiota sudjeluje u ekstrakciji nutrijenata, metabolizmu, očuvanju integriteta crijevne barijere, razvoju i modulaciji imunosnog odgovora, kao i zaštiti crijeva od patogenih mikroorganizama. Naime, mikrobiota sprječava rast patogena natjecanjem za nutrijente i proizvodnjom antimikrobnih tvari. Osim zaštitne funkcije, mikrobiota pridonosi probavi i metabolizmu, razgrađujući polisaharide i proteine pomoću enzima koje proizvode različite bakterije. Primjerice, vrste *Bacteroides* u debelom crijevu igraju ključnu ulogu u iskorištavanju šećera. Također, crijevna mikrobiota je glavni izvor vitamina K i kompleksa vitamina B. Istraživanja na životinjama uzgajanim u sterilnim uvjetima pokazala su da bez mikrobiote organizmi trebaju veći unos vitamina K, B12 i B6 iz vanjskih izvora.

Velika važnost crijevne mikrobiote očituje se u održavanju integriteta crijevne barijere. Potonja se sastoji od vanjskog mukoznog sloja, sloja epitelnih stanica koje su povezane čvrstim spojevima i rahlog vezivnog tkiva (lamina propria) (Slika 4). Ova barijera, zajedno sa stanicama probavnog imunosnog sustava, predstavlja prvu liniju obrane od patogena u lumenu crijeva. U tome važnu ulogu igraju vrčaste stanice crijevnog epitela koje luče mucine. Ovi glikoproteini grade mukozni sloj te stvaraju fizičku zapreku kojom se sprječava prodor mikroorganizama. Pritom mikroorganizmi, koji naseljavaju crijeva, kao što su bakterije roda *Akkermansia* te sojevi *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* i *Prevotella*, igraju ključnu ulogu u poticanju proizvodnje mucina. Također, Panethove stanice dodatno pridonose obrani domaćina lučenjem antimikrobnih peptida (AMP) (8,12).

Interakcija između crijevne mikrobiote i imunosnog sustava ključna je za održavanje homeostaze u gastrointestinalnom traktu i cijelom organizmu (11). Imunosni odgovor dijeli se na urođeni i stečeni, a oba imaju značajne uloge u prepoznavanju i odgovoru na mikroorganizme

prisutne u crijevima (12). Istraživanja su pokazala da metaboliti crijevne mikrobiote utječu na funkciju stanica urođene imunosti, makrofaga i neutrofila. Na primjer, SCFA smanjuju upalne odgovore neutrofila, dok bakterijski peptidoglikani potiču neutrofile na ubijanje gram-pozitivnih bakterija. Međutim, najznačajniji utjecaj crijevne mikrobiote očituje se u regulaciji stečenog imunskog odgovora, posebice u proizvodnji imunoglobulina A (IgA), što predstavlja glavni način obrane od mikroorganizama koji prijeđu epitelnu barijeru. Antigeni komenzalne mikrobiote vežu se za receptore slične Tollu (TLR; prema engl. *Toll-like receptors*), što potiče crijevne epitelne stanice ili dendritičke stanice na izražaj čimbenika (BAFF (prema engl. *B cell activating factor*), APRIL (prema engl. *A proliferation-inducing ligand*) i retinske kiseline) koji su potrebni za prekapčanje u izotip IgA u B stanicama. IgA ograničava pristup komenzalnih bakterija epitelnoj barijeri, čime se smanjuje urođeni imunski odgovor na ove organizme, a istodobno se kontrolira lokalna i sistemska aktivacija B stanica te ograničava proizvodnja protutijela. Stečeni imunski odgovor dodatno doprinosi regulaciji mikrobiote putem diferencijacije i sazrijevanja B i T stanica. Ovisno o specifičnosti bakterijskih vrsta, CD4 T stanice mogu se diferencirati u različite podskupine, uključujući Th1, Th2, i Th17 stanice, koje zatim proizvode specifične citokine poput interferona- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) i interleukina-17 (IL-17) (11). Ovaj proces omogućuje prilagodbu imunskog odgovora na različite bakterijske podražaje, čime se održava ravnoteža između obrane od patogena i tolerancije prema komenzalnoj mikrobioti. Neravnoteža u mikrobioti može poremetiti ove procese, potencijalno dovodeći do autoimunih bolesti i kronične upale.

### **3.3 Disbioza i povezanost s bolestima**

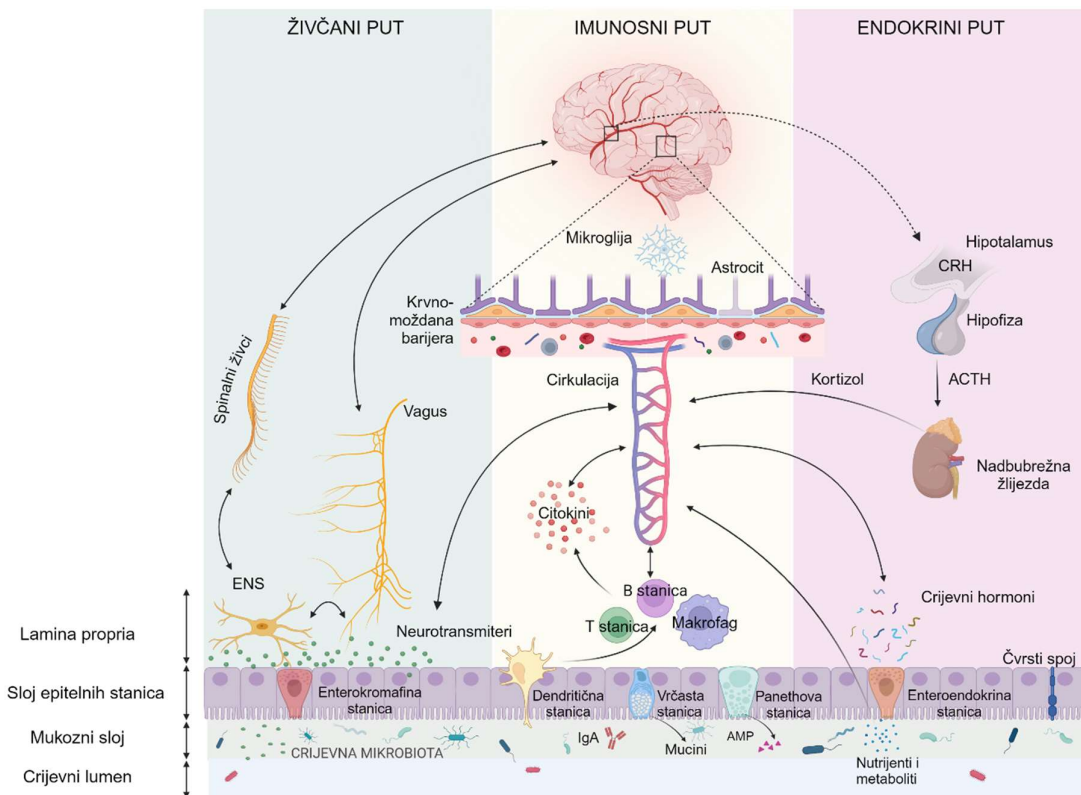
Očito je da crijevna mikrobiota pridonosi zdravlju domaćina, no disbioza može imati razne negativne posljedice za organizam. Disbiozom dolazi do smanjenja broja korisnih mikroorganizama, uz istodobno povećanje broja patogenih i proupalnih vrsta (13). Ovakva neravnoteža

povezuje se s nizom bolesti, uključujući gastrointestinalne poremećaje poput upalne bolesti crijeva i sindroma iritabilnog crijeva, metaboličke poremećaje kao što su pretilost i dijabetes, kardiovaskularne bolesti, pa čak i mentalne poremećaje poput depresije i anksioznosti (8).

U posljednje vrijeme, posebnu pažnju privlači uloga disbioze crijevne mikrobiote u neurodegenerativnim bolestima, gdje se povezuje s kroničnom upalom i promijenjenim imunskim odgovorima u mozgu (14). Disbioza može pridonijeti patogenezi bolesti poput Parkinsonove i Alzheimerove bolesti te ALS-a, stvaranjem upalnog okruženja koje negativno utječe na zdravlje mozga. Kod ALS-a, nova istraživanja sugeriraju da disbioza može ubrzati napredovanje bolesti utječući na GMBA i potičući neuroinflamaciju, što je čini potencijalnom metom za terapijske intervencije (9).

### **3.4 Osovina crijevna mikrobiota-mozak**

GMBA predstavlja dvosmjernu komunikaciju između crijeva i mozga te se uglavnom odvija putem živčanih, imunskih i endokrinih putova (*Slika 4*) (10,15).



**Slika 4: Putovi uključeni u dvosmjernu komunikaciju unutar GMBA.** GMBA predstavlja složenu dvosmjernu komunikacijsku mrežu koja povezuje crijevnu mikrobiotu s mozgom kroz tri glavna puta: živčani, imunوسي i endokrini put. Živčani put: omogućava izravnu komunikaciju između crijeva i mozga preko ANS, ENS i vagusnog živca. Signali se prenose od crijevne mikrobiote kroz neurotransmitere koji utječu na ponašanje, emocije i kognitivne funkcije. Vagusni živac također prenosi informacije iz crijeva do CNS-a, koji povratnim signalom može modulirati crijevnu funkciju i upalne odgovore; Imunosni put: uključuje imunosne stanice koje komuniciraju s mikrobiotom i CNS-om putem citokina, kemokina i drugih signalnih molekula. Neravnoteža crijevne mikrobiote može dovesti do povećane crijevne propusnosti, sustavne upale i oštećenja BBB, što omogućuje ulazak upalnih molekula u mozak, aktivaciju mikroglija i astrocita, te pogoršanje neuroinflamacije i neurodegenerativnih procesa; Endokrini put: uključuje hormone i osovinu HPA koja reagira na stres i regulira oslobađanje hormona (kortizola). Crijevni hormoni, koje proizvode enteroendokrine stanice kao odgovor na prisutnost hranjivih tvari i mikrobiotske metabolite, mogu utjecati na aktivnost vagusnog živca i izravno modulirati neuroendokrine odgovore mozga. Neurotransmiteri: dopamin, serotonin, noradrenalin, gama-aminobutanska kiselina (GABA), itd.; Citokini: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, faktor nekroze tumora- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), itd.; Nutrijenti i metaboliti: SCFA, amini, vitamini, itd.; HPA: osovina hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda; ACTH: adrenokortikotropni hormon; CRH: hormon koji oslobađa kortikotropin. Slika napravljena s [BioRender.com](https://www.biorender.com)



Živčani putovi uključuju enterički živčani sustav (ENS; prema engl. *enteric nervous system*), autonomni živčani sustav (ANS; prema engl. *autonomic nervous system*) i vagusni živac (10). Visceralna aferentna vlakna prenose osjetne informacije iz crijeva do CNS-a, koji zatim modulira funkcije gastrointestinalnog sustava putem eferentnih signala. ANS regulira crijevnu pokretljivost, apsorpciju, sekreciju i protok krvi. Zanimljivo je da ANS dijeli nekoliko medijatora (noradrenalin, acetilkolin, vazoaktivni intestinalni polipeptid, tvar P) i receptora s imunskim sustavom crijeva te na taj način može igrati ulogu u regulaciji lokalnih upalnih procesa (16). Primjerice, noradrenalin koji se oslobađa iz simpatičkih završetaka djeluje na adrenergične receptore na dendritičkim stanicama, čime se modulira njihova migracija, prezentacija antigena i diferencijacija T-stanica.

Imunosni putovi signalizacije prvenstveno uključuju epitelne stanice crijeva, lokalne imunosne stanice i metabolite crijevne mikrobiote. Epitelne stanice, kao i stanice probavnog imunosnog sustava, poput makrofaga, neutrofila i dendritičkih stanica, izražavaju TLR-e koji mogu prepoznati molekularne obrasce na površinama invazivnih patogena i pokrenuti urođeni imunosni odgovor (10). Kada se aktiviraju, ove stanice oslobađaju upalne citokine i kemokine koji ne samo da pomažu u regrutiranju dodatnih imunosnih stanica, već također pokreću signalne kaskade koje mogu komunicirati s CNS-om. Citokini mogu djelovati lokalno na vagusne receptore i na taj način utjecati na signalizaciju unutar GMBA (15).

Endokrini putovi uključuju hormone i osovinu hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda. Međutim, neuroaktivni proizvodi mikrobiote, poput SCFA i sekundarnih žučnih kiselina, također mogu prenijeti signale do CNS-a, bilo direktno, pristupom sistemskoj cirkulaciji, ili indirektno, interakcijom s enteroendokrinim, enterokromafinim stanicama i imunskim stanicama crijeva (15).

Iako ovaj odjeljak pruža pojednostavljen pregled ovih putova, važno je prepoznati kako različite komponente GMBA međusobno djeluju i surađuju u održavanju homeostaze crijeva. Nadalje, postaje očito da

poremećaj u bilo kojoj komponenti GMBA ne samo da može utjecati na crijeva, već može imati i posljedične učinke na CNS.

## 4 CRIJEVNA MIKROBIOTA I ALS

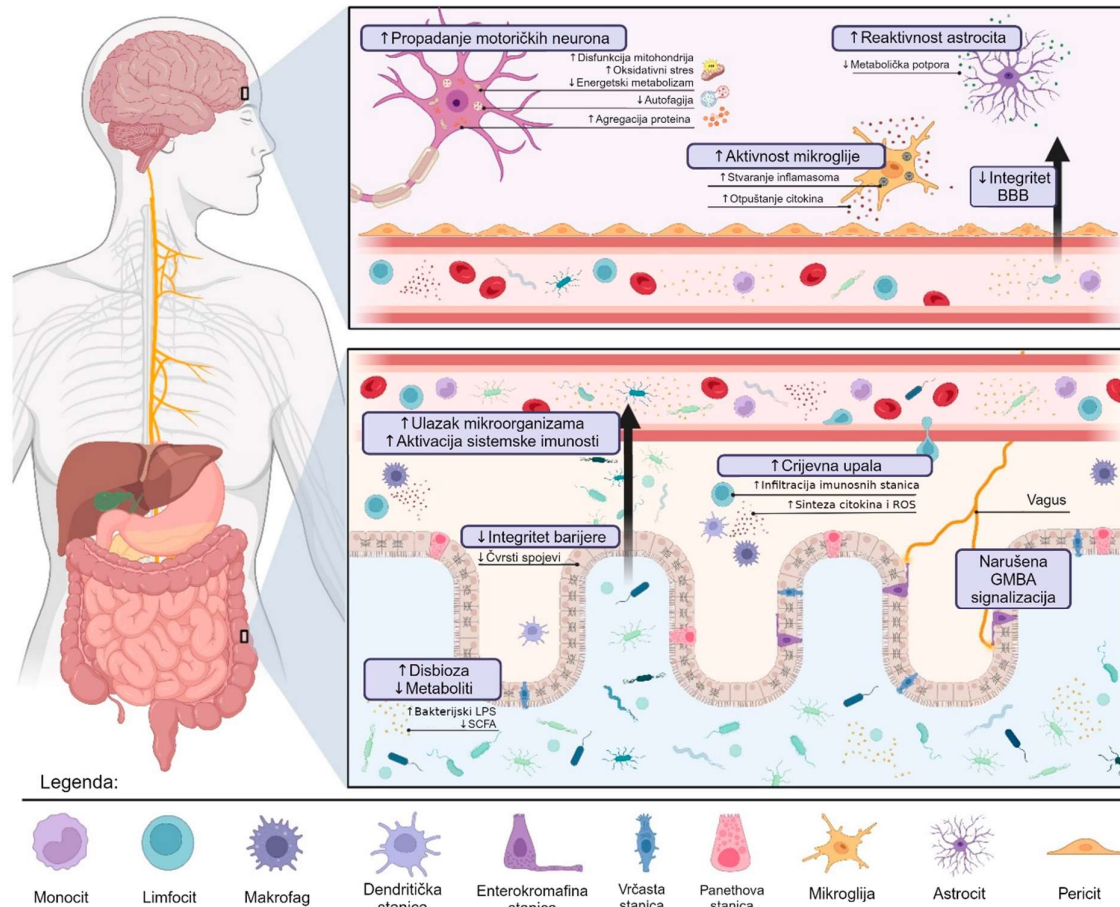
### 4.1 Disfunkcija tjelesnih barijera u ALS-u

Crijevna barijera ključna je za održavanje homeostaze unutar gastrointestinalnog trakta, ali i cjelokupnog organizma.

Disbioza crijevne mikrobiote može značajno narušiti integritet crijevne barijere. U ALS-u, disbioza može uzrokovati smanjenje izražaja proteina čvrstih spojeva poput zonula occludens-1 i kladin-1, koji su ključni za održavanje čvrstoće epitelne barijere (9). Smanjen izražaj ovih proteina povećava propusnost crijevne barijere. Zbog povećane permeabilnosti, bakterijski toksini poput LPS-a, puno lakše uđu u sistemsku cirkulaciju. Ovaj fenomen, poznat kao „leaky gut“, može dodatno potaknuti upalne procese u tijelu.

Endotoksemija, sekundarna posljedica „leaky gut“, može se proširiti na CNS putem narušene BBB (9). BBB regulira prolazak tvari između krvi i moždanog tkiva, održavajući stabilnost unutarnjeg okruženja mozga. Sastoji se od endotelnih stanica, bazalne membrane, pericita i astrocita, koji zajedno sprječavaju ulazak štetnih molekula u mozak. Integritet BBB može biti narušen u ALS-u (17). Mišji model sa *SOD1<sup>G93A</sup>* mutacijom pokazao je visoke razine vakuolizacije i propadanja endotelnih stanica. Također, struktura bazalne membrane je narušena. Uzrok tome je aktivacija metaloproteaza koji razgrađuju proteine bazalne membrane i dovode do oštećenja. Konačno, propadanje astrocita, smanjen izražaj proteina čvrstih spojeva i kapilarna propusnost dodatni su indikatori oštećenja. Smanjena permeabilnost BBB omogućuje imunskim stanicama prolazak u CNS, gdje potiču neuroinflamaciju i apoptozu neurona.

## 4.2 Utjecaj disbioze na GMBA i mehanizmi povezani s ALS-om



**Slika 5: Utjecaj disbioze na ALS.** Promjene u sastavu mikrobiote i patofiziologija ALS-a mogu se povezati kroz tri ključna mehanizma: narušen integritet crijevne barijere, metabolička disfunkcija i poremećaj imunostne ravnoteže. Smanjena ekspresija čvrstih spojeva u crijevnom epitelu omogućava invaziju mikroorganizama i posljedičnu upalu. Ovi mikroorganizmi mogu prodrijeti u cirkulaciju, izazivajući sistemski imunostni odgovor (npr. endotoksemija, proizvodnja proupalnih citokina i aktivacija perifernih monocita). Dugotrajna sistemska upala može oštetiti BBB i uzrokovati prekomjernu aktivaciju mikroglia i astrocita, što dodatno pogoršava neuroinflamaciju. Gubitak imunomodulatornih i neuroprotektivnih metabolita, poput SCFA (butirata), može pridonijeti propadanju motoričkih neurona kroz povećani oksidativni stres i disfunkciju mitohondrija. Veza između zdravlja crijeva i mozga ukazuje na terapijski potencijal modulacije GMBA u ALS-u. Slika preuzeta od Noor Eddin et al. 2024. (9) i modificirana.

### **4.2.1 Živčani putovi**

Iako je ALS primarno neurodegenerativna bolest koja pogađa motoričke neurone, sve je više istraživanja koja ukazuju na značajnu ulogu osovine GMBA u njezinoj patogenezi. Promjene u sastavu crijevne mikrobiote mogu utjecati na CNS i ENS, što sugerira mogućnost da mikrobiota igra ključnu ulogu u razvoju ALS-a.

Enterokromafine stanice i vagusni živac mogu igrati ključnu ulogu u prijenosu signala crijevne mikrobiote do CNS-a kod pacijenata s ALS-om (17). Enterokromafine stanice djeluju kao dvosmjerni pretvarači informacija između crijevne mikrobiote i enteričkih živaca (18). Luminalna strana ovih stanica može detektirati podražaje od crijevne mikrobiote i unesene hrane. Zatim, aferentni završeci vagusnog živca smješteni u lamina propriji mogu biti aktivirani molekulama poput serotonina i histamina, koje izlučuju enterokromafine stanice. Vagusni živac, koji se sastoji od 80% aferentnih i 20% eferentnih vlakana, predstavlja važan dio ANS-a i omogućuje prijenos ovih informacija iz crijeva do CNS-a, što znači da disbioza mikrobiote može izravno utjecati na CNS i izazvati neuroinflamaciju.

Poremećaji u crijevnoj peristaltici, poput konstipacije, česti su kod pacijenata s ALS-om (19). Ovi poremećaji mogu biti rezultat promjena u funkciji ENS-a, koji zajedno s ANS-om regulira motoričke funkcije crijeva. Metaboliti crijevne mikrobiote, kao što su SCFA i triptamin, mogu utjecati na brzinu crijevnog transporta, potencijalno poboljšavajući simptome konstipacije kod ALS pacijenata (17).

Osim što mikrobiota utječe na funkciju CNS-a i ENS-a, sama mikrobiota je podložna promjenama zbog progresije ALS-a (19). Kako se motoričke funkcije, poput žvakanja i gutanja, pogoršavaju, mijenja se i brzina unosa hrane, što može dovesti do promjena u sastavu mikrobiote. Smanjena pokretljivost crijeva može uzrokovati prekomjerno razmnožavanje određenih mikroorganizama, narušavajući ravnotežu mikrobiote. Također, disfunkcija sekrecije crijevne sluzi, bikarbonata i vode,

koja se javlja s napredovanjem ALS-a, može dodatno promijeniti okoliš u crijevima, utječući na sastav mikrobiote (17). Sve ove promjene stvaraju kompleksnu povratnu petlju između ALS-a i crijevne mikrobiote, gdje jedan čimbenik može dodatno pogoršati stanje drugoga, čime se stvara začarani krug koji može ubrzati progresiju bolesti.

#### **4.2.2 Imunosni put**

Istraživanje povezanosti između crijevne mikrobiote i imunskog sustava kod ALS-a sve je intenzivnije, a glavni fokus leži na GMBA i njezinim ulogama u moduliranju imunskih odgovora. Iako su mehanizmi ove interakcije samo djelomično razjašnjeni, postoje brojni dokazi koji ukazuju na ključne putove kojima mikrobiota crijeva može utjecati na progresiju ALS-a putem imunskih promjena (17,19).

Jedan od najvažnijih mehanizama kojim mikrobiota crijeva utječe na CNS jest preko regulacije funkcije mikroglije. Mikroglija ima važnu ulogu u fagocitozi, prezentaciji antigena, proizvodnji citokina i aktivaciji upalnih odgovora (20). Studije na mišjim modelima koji su uzgajani u sterilnim uvjetima (bez naseljene populacije crijevnih mikroorganizama) ili su tretirani antibioticima pokazuju abnormalnosti u sazrijevanju i funkciji mikroglije, što uključuje promjene u fenotipu i smanjenu reakciju na LPS te ukupno smanjenu imunsku aktivaciju (19). Ovo sugerira da je mikroglija snažno ovisna o signalima iz crijevne mikrobiote za svoju pravilnu funkciju i sazrijevanje. Abnormalna funkcija mikroglije može pridonijeti smrti motoričkih neurona, što je ključna karakteristika ALS-a (9). Mikrobiota crijeva također izravno utječe na omjer M1 (proupalnih) i M2 (protuupalnih) mikroglijalnih stanica, čime se mijenja ravnoteža između pro- i protuupalnih odgovora u mozgu (21). M1 mikroglija proizvodi ROS i brojne proupalne citokine poput IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ , dok M2 mikroglija proizvodi citokine poput IL-4, IL-10 i IL-13, koji imaju protuupalna svojstva. Promjena u omjeru ovih stanica može povećati neuroinflamaciju.

Astroцити, најбројније глијалне станице у живчаном систему, играју важну улогу у одржавању BBB те регулирању промета имунских станица и проупалних одговора (21). Осим тога, астрoцити активно судјелују у неурoинфламацијским процесима, гдје њихова улога мође бити корисна или штетна за поправак ткива, оvisно о сигналима из околине (22). Истраживања су показала да астрoцити изолирани из кортекса мишег модела с мутацијом *SOD1<sup>G93A</sup>* у раним стадијима болести имају неурoпрoтеktivна својства. Точније, забилежена је смањена пролиферација станица, ниски изражај NF-κB те ослабљени проупални путеви.

Као што се споменуло раније, дисбиоза criјевне микробиоте и повећана пропусност criјева могу довести до отпуштања микробних продуката, као што је LPS, у крвоток. Повишене рazine LPS-а, опажене код пацијената с ALS-ом, сугерирају да ти ендотоксини потјечу из criјевне микробиоте (17). Поремећај criјевне баријере, уoчен у *SOD1<sup>G93A</sup>* моделима ALS-а, додатно потврђује cureње LPS-а у циркулацију, што покреће периферни имунски одговор. LPS активира макрoфaге и неутроfile, које потом ослобађају проупалне цитокине (IL-1β, IL-6, TNF-α и IL-2). Иако BBB обично спрјечава израван улазак LPS-а у CNS, ови цитокини могу пријећи у мозак, доприносећи неурoинфламацији (21). Кронична изложеност LPS-у, вјерoјатно из criјева, доводи до трајне активације микрoглије у мозгу, што потенцијално потиче неурoдегенерацију код ALS-а. Овај континуирани периферни и средишњи упални процес не само да повећава рazine проупалних медијатора, већ и смањује прoтуупалне цитокине попут IL-10 и регулацијске твари као што је бутират, погоршавајући упално стање (22). Ова неравнотежа убрзава оштећење неурона и напредовање болести.

Уз прирођени имунски одговор, стечени имунски систем такође мође имати улогу у ALS-у (17). Нека истраживања показала су инфилтрацију неутрофила и Т-лимфоцита у кралјежничној мождини код *C9ORF72* модела мишева, док друга нису успјела детектирати те станице у *SOD1<sup>G93A</sup>* моделима мишева, што указује на могући утјечaј генетичких фактора на активацију имунског одговора.

### 4.2.3 Endokrini put

SCFA, prekursori NAD<sup>+</sup>, derivati aminokiselina i žučne kiseline su male molekule koje proizvodi crijevna mikrobiota (17). U nastavku ćemo se usredotočiti na nedavna otkrića vezana uz SCFA i prekursore NAD<sup>+</sup> u kontekstu ALS-a.

#### 4.2.3.1 Kratkolančane masne kiseline

SCFA su kratkolančane karboksilne kiseline koje sadrže između jednog i šest ugljikovih atoma. One su važni metaboliti crijevne mikrobiote koje nastaju u debelom crijevom, procesom anaerobne fermentacije neprobavljivih vlakana iz prehrane. Najveći udio čine acetat (C<sub>2</sub>), propionat (C<sub>3</sub>) i butirat (C<sub>4</sub>), te njihov omjer ovisi o dostupnosti supstrata kao i o sastavu bakterija u crijevima (23,24). *Firmicutes* su glavni proizvođači butirata, dok *Bacteroidetes* imaju vodeću ulogu u proizvodnji acetata i propionata (14). Nakon što se apsorbiraju kroz crijevnu stijenku u krvotok, SCFA mogu direktno dospjeti do CNS-a prolaskom kroz BBB (23). SCFA ulaze u stanice putem pasivne difuzije, preko monokarboksilnog transportera 1 (MCT1; prema engl. *monocarboxylate transporter 1*), monokarboksilnog transportera spregnutog s natrijem (SMCT1; prema engl. *sodium-dependent monocarboxylate transporter 1*) te putem kotransporta s bikarbonatom. Unutar stanica, ovi metaboliti mogu djelovati kao inhibitori histonske deacetilaza (HDAC) ili sudjelovati u energetsom metabolizmu stanica, što im omogućuje regulaciju različitih staničnih funkcija (14). Te učinke postižu vezanjem za specifične receptore na površini stanica, kao što su receptori spregnuti s G-proteinima (GPR): GPR41, GPR43 i GPR109A.

SCFA pomažu u očuvanju integriteta i permeabilnosti crijevne barijere djelujući na mukozni i epitelni sloj. Mnoge studije o ALS-u su pokazale da butirat pozitivno utječe na stabilnost, stimulirajući vrćaste stanice na izražaj mucina-2 (MUC-2) (17). MUC-2 može pokrenuti signalnu kaskadu kojom se inhibira transkripcijski čimbenik, nuklearni faktor κB (NF-κB). Rezultat toga je zaustavljanje imunskog odgovora dendritičkih stanica. Nadalje, butirat



regulira izražaj proteina čvrstih spojeva (npr. kladin-1), čime dodatno pridonosi normalnoj funkciji epitelne barijere (21). SCFA imaju ulogu i u diferencijaciji te proliferaciji stanica crijeva. Butirat predstavlja glavni izvor energije ovih stanica (8).

SCFA brojnim mehanizmima utječu na imunosne odgovore domaćina, crijevne i periferne, a najvažniji se odvijaju preko regulacijskih T stanica (Treg) te mikroglije. Treg inhibiraju proupalne T stanice, aktivirane makrofage i mikrogliju, čime uspješno kontroliraju periferne i središnje upalne odgovore (22). Pokazalo se da ALS pacijenti imaju snižene razine Treg, kao i slabiji izražaj transkripcijskog čimbenika Foxp3 koji je ključan za normalno funkcioniranje ovih imunosnih stanica. Smatra se da butirat djelovanjem na HDAC potiče njegov izražaj, što rezultira diferencijacijom Treg. Osim toga, do diferencijacije Treg dolazi i vezanjem za receptor GPR109A (17). Inhibicijskim djelovanjem na mikroglijalne HDAC, SCFA smanjuju izražaj proupalnih (IL1 $\beta$ , IL6 i TNF $\alpha$ ) i povećavaju izražaj protuupalnih citokina (transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  (TGF $\beta$ ) i IL4). Povezanost ovih metabolita i mikroglije, posebice je vidljiva kod mišjih modela ALS-a koji su uzgajani u sterilnim uvjetima ili onih koji su tretirani antibioticima (20,22). U ovih miševa dolazi do abnormalnog sazrijevanja mikroglije i smanjenja njihove funkcionalnosti, što se očituje promjenama u morfologiji, smanjenom osjetljivošću na LPS i sveukupno oslabljenom imunosnom aktivacijom.

#### 4.2.3.2 NAD<sup>+</sup> prekursori

NAD<sup>+</sup> je koenzim uključen u staničnu homeostazu, posebno u procesima energetskog metabolizma i snižavanja razina oksidativnog stresa (17). Njegova važnost za zdravlje neurona čini NAD<sup>+</sup> ključnim faktorom u patogenezi ALS-a (25).

NAD<sup>+</sup> se sintetizira kroz nekoliko metaboličkih putova, uključujući *de novo* sinteze iz triptofana i nikotinske kiseline te spasonosni put iz nikotinamida, koji omogućava regeneraciju NAD<sup>+</sup> u stanicama (26). Ovaj

mehanizam je posebno važan u neuronima, gdje nedostatak NAD<sup>+</sup> može dovesti do povećane osjetljivosti na oksidativni stres i staničnu smrt.

GMBA ima važnu ulogu u regulaciji razine NAD<sup>+</sup> u organizmu. Crijevna mikrobiota može sintetizirati prekursore NAD<sup>+</sup> koji ulaze u krvotok te se iskorištavaju za sintezu NAD<sup>+</sup> u različitim tkivima, uključujući mozak (17). Disbioza crijevne mikrobiote može narušiti ovaj proces, dodatno smanjujući razinu NAD<sup>+</sup> i pogoršavajući neurodegenerativne procese u ALS-u.

Poremećaj u metabolizmu NAD<sup>+</sup>, posebice u spasonosnoj sintezi, zabilježen je u pacijenata s ALS-om (17). Ovi nedostaci rezultiraju smanjenim razinama NAD<sup>+</sup> u organizmu i povećanim rizikom od neurodegeneracije. Obnavljanje razina NAD<sup>+</sup> može ublažiti simptome ALS-a na više načina, uključujući smanjenje štetne aktivnosti reaktivnih astrocita čime se štite neuroni, poticanje neurogeneze (stvaranje novih neurona), poboljšanje mišićne funkcije te reguliranje genskog izražaja.

Ova saznanja naglašavaju važnost održavanja ravnotežne koncentracije metabolita u organizmu, što je ujedno i jedan od fokusa mnogih istraživanja na mišjim modelima ALS-a.

## **4.3 Pregled istraživanja**

### **4.3.1 Istraživanja na mišjim modelima**

Kako istraživanja na mišjim modelima postaju sve važnija za razumijevanje ljudskih bolesti, tako i neurodegenerativnih poremećaja kao što je ALS, sve je više uvjerljivih pokazatelja povezanosti crijevne mikrobiote s razvojem i progresijom ALS-a.

SOD1<sup>G93A</sup> transgenični miš (nositelj velikog broja kopija ljudske mutacije *SOD1* gena, gdje je glicin zamijenjen alaninom na poziciji 93) je dobro karakteriziran model ALS-a, koji spontano razvija motoričke simptome oko četvrtog mjeseca života i dostiže terminalnu fazu bolesti oko šestog mjeseca života (27). Zbog mutacije u ovom genu, dolazi do stvaranja unutarstaničnih agregata proteina te je potaknuta

neurotoksičnost. Koristeći ovaj model Wu et al. su pokazali da i prije same pojave simptoma bolesti dolazi do smanjenja izražaja čvrstih spojeva i povećanja permeabilnosti crijevne barijere te su zapažene snižene razine bakterije *Butyrivibrio fibrisolvens* koja je izvor butirata (28). Također, primijećene su povećane razine proupalnog citokina IL-17 i veća zastupljenost abnormalnih Panethovih stanica. Ove promjene ne samo da mogu utjecati na proizvodnju SCFA, već mogu pojačati crijevnu upalu i potaknuti sistemski ili neuroinflamacijski odgovor (9). Ista skupina znanstvenika objavila je da kod miševa, koji su tretirani natrijevim butiratom, dolazi do ublažavanja simptoma ALS-a (29).

Nadalje, provedena je još jedna studija čiji cilj je bio proučiti promjene u crijevnoj mikrobioti i imunom sustavu tijekom vremena, u odnosu na početak simptoma ALS-a (30). Njihovo istraživanje također je pokazalo da nastaju značajne promjene u sastavu mikrobiote prije pojave neuromuskularnih simptoma. Točnije, za čovjeka korisne bakterije, *Akkermansia muciniphila* (*A. muciniphila*) i *Bacteroides caccae*, su bile manje zastupljene u debelom crijevu SOD1<sup>G93A</sup> miševa u odnosu na kontrolni divlji soj miševa (*WT*; engl. *wild-type*). Studija je zabilježila i promjene u imunom sustavu, koje su u ranijim fazama bolesti bile ograničene na periferni sustav, ali su kasnije tijekom bolesti zahvatile i CNS. Konkretno, u perifernom sustavu došlo je do povećanja broja CD8 T stanica u slezeni te povećanja ukupnog broja leukocita i CD4 T-stanica u krvi. U CNS-u, primijećeno je značajno povećanje ukupnog broja leukocita, aktivacija mikroglije, te infiltracija CD8 T-stanica i neutrofila u leđnoj moždini, posebice u kasnijim fazama bolesti.

Istraživanje iz 2019. godine ističe se po tome što je prvi put izravno povezaloz razine nikotinamida u CNS-u s motoričkom funkcijom kod ALS-a (3). Blacher i sur. pružaju ključne dokaze o potencijalnom terapijskom učinku manipulacije crijevne mikrobiote i njezinih metabolita na progresiju bolesti, čime otvara nove smjerove u istraživanju liječenja ALS-a. (3). Kao i do sada, u transgeničnim miševima je uočena disbioza i promjena u

sastavu bakterijskih metabolita prije pojave simptoma. Također, SOD1<sup>G93A</sup> miševi koji su uzgajani u sterilnim uvjetima ili tretirani antibioticima, pokazuju pogoršanje simptoma ALS-a. Ova opažanja upućuju na to da crijevna mikrobiota može imati pozitivan ili negativan utjecaj na regulaciju progresije ALS-a, ovisno o prisutnosti specifičnih bakterijskih sojeva. Daljnjom analizom kroz progresiju bolesti otkriveno je 11 bakterijskih sojeva koji su povezani s težinom ALS-a. Suplementacija sojem *A. muciniphila* je dovela do smanjenja, a sojevima *Ruminococcus torques* i *Parabacteroides distasonis* do pogoršanja simptoma bolesti. Prisutnost *A. muciniphila* dovela je do povećanja razine nikotinamida u CNS-u, što je bilo povezano s poboljšanom motoričkom funkcijom i promijenjenim obrascima izražaja gena u leđnoj moždini. Izravna suplementacija nikotinamida također je rezultirala sličnim poboljšanjima, što ukazuje na njegovu potencijalnu terapijsku ulogu.

U okviru iste studije, istraženi su i preliminarni podaci kod ljudi, gdje su pacijenti s ALS-om pokazali različite profile crijevne mikrobiote i metabolita u usporedbi sa zdravim kontrolnim osobama. Točnije, smanjene razine nikotinamida primijećene su kod oboljelih, što ukazuje na mogući nedostatak u metaboličkim putovima.

Zaključno, rad Blachera i sur. naglašava potencijal manipulacije crijevne mikrobiote kao terapijske strategije za ALS. Usmjeravanjem na specifične bakterijske sojeve ili njihove metabolite, kao što je nikotinamid, moguće je ublažiti neke od neurodegenerativnih učinaka ALS-a. Ova studija otvara nove putove za razumijevanje čimbenika iz okoliša koji utječu na progresiju ALS-a i naglašava potrebu za daljnjim istraživanjem u ljudskoj populaciji kako bi se potvrdili ti nalazi.

Sljedeća studija pokušala je istražiti učinke stimulacije vagusnog živca (VNS; prema engl. *vagus nerve stimulation*) na crijevnu mikrobiotu u mišjem ALS modelu (31). Cilj je bio dokučiti hoće li kratkoročna VNS utjecati na sastav crijevne mikrobiote u SOD1<sup>G93A</sup> miševima u odnosu na

WT. Za razliku od do sad navedenih istraživanja, rezultati ovog istraživanja ne pokazuju značajne razlike u sastavu, u odnosu na kontrolne skupine.

Uz SOD1<sup>G93A</sup> transgenične miševe, značajan je i mišji model s mutiranim *C9ORF72*. Transgenični mišji modeli *C9ORF72* oponašaju molekularna obilježja *C9ORF72* ALS-a u ljudi, ali uz jednu iznimku, ne pokazuju izražen motorički fenotip. (27). Zabilježena je infiltracija neutrofila i drugih imunskih stanica, kao i pojačana aktivacija mikroglije u leđnoj moždini miševa (32). Autori su također otkrili da proupalno okruženje (koje sadrži bakterije poput *Helicobacter* spp. i druge mikroorganizme koji stimuliraju imunski odgovor) smanjuje raznolikost crijevne mikrobiote kod miševa s mutacijom *C9ORF72*, u usporedbi s okruženjem koje podržava preživljavanje. Nadalje, pokazali su da smanjenje broja mikroorganizama antibioticima ili presađivanje mikrobiote iz povoljnijeg okruženja, može ublažiti upalne fenotipove i produžiti životni vijek miševa uzgojenih u proupalnom okruženju.

#### **4.3.2 Istraživanja na ljudskoj populaciji**

Istraživanja koja su se bavila utjecajem crijevne mikrobiote na rizik nastanka i tijek ALS-a donijela su različite i često nejasne rezultate (*Tablica 1*). Dok neka istraživanja sugeriraju razlike u sastavu mikrobiote između oboljelih od ALS-a i zdravih osoba, kao i promjene tijekom progresije bolesti, rezultati su nerijetko proturječni (27). Razlozi za to mogu se tražiti u malim uzorcima ispitanika, različitim pristupima u odabiru sudionika i kontrolnih skupina te varijacijama u metodama prikupljanja i obrade podataka. Ovi čimbenici značajno doprinose neujednačenim rezultatima, što otežava donošenje čvrstih zaključaka o ulozi crijevne mikrobiote u ALS-u. Ipak, određeni metaboliti mikrobiote, poput butirata i nikotinamida, pokazuju potencijal za usporavanje progresije bolesti, što otvara nova područja za daljnja istraživanja i mogući razvoj terapija. Rezultati istraživanja prikazani u tablici u nastavku dodatno oslikavaju ovu raznolikost, ukazujući na potrebu za daljnjim proučavanjem kako bi se bolje razumjela povezanost crijevne mikrobiote i ALS-a.

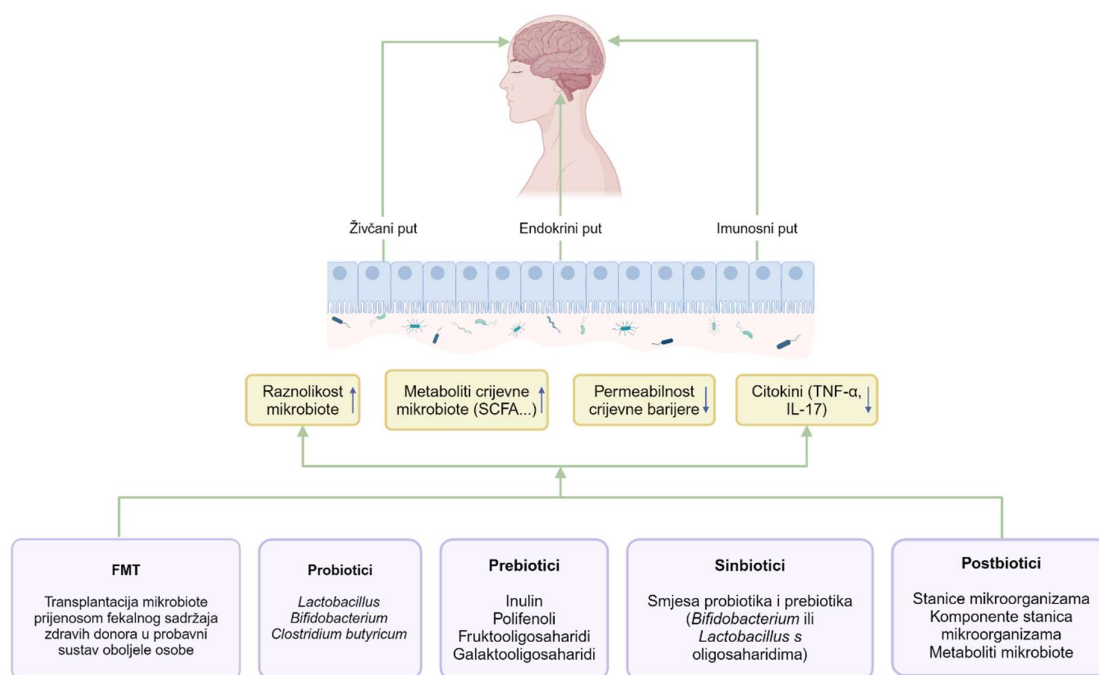
**Tablica 1: Istraživanja crijevne mikrobiote među oboljelima od ALS-a.** Preuzeto od Chen et al. 2024. (17) i modificirano.

Studija	Broj i fenotipi	Ishodi
<b>Fang X. et al. 2016. (33)</b>	6 ALS pacijenata; 5 zdravih kontrola	U ALS skupini (u usporedbi s kontrolom): smanjen omjer <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> ; značajno povećan rod <i>Dorea</i> ; značajno smanjeni <i>Oscillibacter</i> , <i>Anaerostipes</i> , <i>Lachnospiraceae</i> .
<b>Brenner D. et al. 2018. (34)</b>	25 ALS pacijenata spareno s 32 zdrave kontrole po spolu i godištu	Samo jedan rod se značajno razlikuje, <i>Ruminococcaceae</i> od 336 razmatranih; nije zabilježena veća raznolikost u ALS skupini.
<b>Zhai C.D. et al. 2019. (35)</b>	8 ALS pacijenata; 8 zdravih kontrola	Smanjena zastupljenost <i>Faecalibacterium</i> (bakterija koja proizvodi butirat).
<b>Sun J. et al. 2019. (36)</b>	2484 ALS pacijenta spareno s 12420 zdrave kontrole po spolu i godištu	Korištenje antibiotika povezano s većim rizikom od ALS-a bez obzira na razlog primjene antibiotika.
<b>Blacher E. et al. 2019. (3)</b>	37 ALS pacijenata; 29 zdravih kontrola	Sastav mikrobiote ALS skupine značajno se razlikovao od kontrolne grupe. Skupine su se značajno razlikovale u globalnom sadržaju bakterijskih gena, pri čemu ALS skupina ima manjak nekoliko gena povezanih s metabolizmom triptofana i nikotinamida. Predlaže se poveznica između nikotinamida koji potječe od bakterija i zaštite od ALS-a.
<b>Di Gioia D. et al. 2020. (37)</b>	50 ALS pacijenata; 50 kontrola	Različiti rodovi mikroba su značajno povećani ili smanjeni u ALS uzorcima u usporedbi sa zdravim kontrolama.
<b>Ngo et al. 2020. (38)</b>	49 pacijenata s bolesti motoričkih neurona (15 žena); 51 zdrava kontrola (21 žena).	Nije pronađena razlika među skupinama koje se uspoređuju.
<b>Zeng Q. et al. 2020. (39)</b>	20 vjerojatnih/definitivnih ALS pacijenata; 20 zdravih kontrola	Povećana regulacija <i>Bacteroidetes</i> , <i>Kineothrix</i> , <i>Parabacteroides</i> , <i>Odoribacter</i> , <i>Sporobacter</i> i neklasificiranih <i>Porphyromonadaceae</i> .
<b>Nicholson et al. 2021. (40)</b>	26 žena i 40 muškaraca dijagnosticirano s ALS-om; 36 zdravih kontrola su žene, a 25 muškarci; 7 žena i 5 muškaraca kao kontrole za neurodegenerativne bolesti	Smanjena zastupljenost <i>Roseburia intestinalis</i> i <i>Eubacterium rectale</i> (dvije glavne bakterije koje proizvode butirat); smanjena zastupljenost osam glavnih bakterija koje proizvode butirat.
<b>Guo et al. 2024. (41)</b>	75 ALS pacijenata; 110 kontrola	Značajno snižena raznolikost mikrobiote u ALS pacijenata u odnosu na kontrole. Povećana

		relativna zastupljenost određenih rodova ( <i>Bacteroides</i> , <i>Parasutterella</i> ) te smanjena zastupljenost <i>Faecalibacterium</i> i <i>Bifidobacterium</i> u ALS pacijentima. Razni lipidni metabolički putovi povezane s ALS što sugerira ulogu lipida kao potencijalnih biomarkera za ALS.
--	--	--

## 5 CRIJEVNA MIKROBIOTA KAO META TERAPIJE

Trenutno su od strane Američke Agencije za hranu i lijekove (FDA) za kliničko liječenje ALS-a odobrena samo tri lijeka: Riluzol, Edaravon i Tofersen (17). S obzirom da nijedan od ovih lijekova ne pokazuje značajan klinički učinak kod pacijenata s ALS-om, već produljuju životni vijek za otprilike dva do tri mjeseca, ističe se potreba za novim i učinkovitijim terapijama. Kako istraživanja sve više ukazuju na povezanost crijevne mikrobiote s bolestima CNS-a, raste interes za terapije koje bi regulacijom crijevne mikrobiote mogle pomoći u liječenju ALS-a. Trenutno predložene terapijske strategije uglavnom uključuju transplantaciju fekalne mikrobiote (FMT; prema engl. *fecal microbiota transplantation*), probiotike, prebiotike, sinbiotike i postbiotike.



**Slika 6: Potencijalne terapijske metode koje bi pozitivno utjecale na GMBA u ALS-u.** Potencijalne terapijske metode za ALS uključuju transplantaciju fekalne mikrobiote te primjenu probiotika, prebiotika, sinbiotika i postbiotika. S obzirom na povezanost GMBA s ALS-om, regulacija crijevne mikrobiote ili utjecaj na metabolite mikrobiote može poboljšati patofiziologiju ALS-a te usporiti napredovanje bolesti putem regulacije živčanih, imunskih i endokrinih putova. Do danas je većina relevantnih istraživanja provedena na životinjskim modelima. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se bolje shvatilo na koji način se rezultati dobiveni na životinjskim modelima mogu primijeniti na liječenje ALS pacijenata.



## 5.1 Transplantacija fekalne mikrobiote

Transplantacija fekalne mikrobiote podrazumijeva prijenos fekalnog materijala od zdravih donora u pacijente, kako bi se obnovila zdrava crijevna mikrobiota. Iako se FMT primarno koristi za gastrointestinalne poremećaje, pokazala je potencijal u liječenju neurodegenerativnih bolesti, uključujući ALS (17,21). Preliminarna istraživanja sugeriraju da FMT može modulirati sastav crijevne mikrobiote, smanjiti neuroinflamaciju i poboljšati motoričke simptome u modelima ALS-a. Međutim, potrebna su daljnja klinička ispitivanja kako bi se potvrdila njezina učinkovitost i sigurnost kod pacijenata s ALS-om.

## 5.2 Probiotici

Probiotici su živi nepatogeni mikroorganizmi koji, kada se konzumiraju u odgovarajućim količinama, pružaju brojne zdravstvene koristi za domaćina (10). Najčešće korišteni probiotici sadrže bakterije iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* te bakteriju *Clostridium butyricum* (17). Njihova primarna uloga uključuje regulaciju crijevne mikrobiote, proizvodnju korisnih spojeva (poput SCFA), smanjenje kolonizacije i invazije patogena, te poboljšanje proliferacije i diferencijacije epitelnih stanica, čime se ojačava crijevna barijera i smanjuje imunomodulacija. Upravo zbog ovih mehanizama, probiotici su prepoznati kao potencijalno korisna terapija za neurodegenerativne bolesti, uključujući ALS. Istraživanja su pokazala da probiotici mogu modulirati GMBA, smanjujući upalu i oksidativni stres, što je ključno za očuvanje funkcija CNS-a i odgađanje napredovanja neurodegenerativnih bolesti.

Konkretno, probiotički pripravak koji sadrži kombinaciju *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum*, i *Lactobacillus acidophilus* pokazao je značajne učinke u poboljšanju kognitivnih funkcija i smanjenju upalnih procesa u modelima starenja kod miševa (33). Uočen je pozitivan utjecaj na sastav mikrobiote, kao i na integritet crijevne i krvno-moždane barijere, čime se poboljšava opće zdravlje mozga.

Osim toga, studija na mišjem ALS modelu koji nosu ljudsku mutaciju *TDP43<sup>A315T</sup>*, pokazala je da probiotici mogu održavati funkcije barijere i neuromišićne funkcije te smanjiti nakupljanje proteina povezanih s progresijom bolesti, kao što je TDP-43 (34). Probiotici smanjuju upalu i oksidativno oštećenje te poboljšavaju funkciju crijeva, što usporava napredovanje ALS-a.

CRISPR (prema engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) tehnologija otvara nove mogućnosti u razvoju naprednih terapijskih probiotika za liječenje neurodegenerativnih bolesti poput ALS-a (35). CRISPR-Cas9 sustav precizno djeluje na specifične gene unutar mikrobiote, što omogućava povećanje izražaja korisnih proteina i enzima ili smanjenje štetnih bakterijskih toksina. Za razliku od tradicionalnih antibiotika, koji često nespecifično uništavaju široki spektar bakterija, CRISPR može ciljati točno određene sekvence unutar patogenih bakterija, smanjujući rizik od narušavanja ravnoteže korisnih mikroorganizama i sprječavajući razvoj disbioze. Ova strategija ne samo da bi omogućila liječenje mikrobiotskog disbalansa povezanih s neurodegeneracijom, već bi mogla i ciljano modulirati neuroimunski sustav, što je ključno za liječenje složenih bolesti poput ALS-a. CRISPR-probiotici stoga predstavljaju perspektivnu i inovativnu terapijsku metodu koja bi mogla nadopuniti ili čak zamijeniti tradicionalne metode liječenja neurodegenerativnih bolesti.

### **5.3 Prebiotici**

Prebiotici su neprobavljivi prehrambeni sastojci koji selektivno potiču rast i/ili aktivnost korisnih mikroorganizama u crijevima, čime doprinose zdravlju domaćina. Iako sami nisu probavljivi, prebiotici djelovanjem crijevne mikrobiote fermentiraju u debelom crijevu, stvarajući SCFA koje podupiru metabolizam i održavaju zdravu crijevnu mikrobiotu. Među najčešće korištene prebiotike ubrajaju se inulin, polifenoli, fruktooligosaharidi i galaktooligosaharidi (GOS). Upotreba prebiotika u

kontekstu ALS-a još uvijek je u ranoj fazi istraživanja, a rezultati su zasad ograničeni i nesigurni (9,17).

Unatoč tome, neka istraživanja ističu potencijal prebiotika u liječenju ALS-a (36). Na primjer, primjena GOS-a u SOD1<sup>G93A</sup> miševima pokazala je značajnu odgodu početka bolesti, ali i produljenje životnog vijeka. GOS je također smanjio gubitak motoričkih neurona i mišićnu atrofiju, uz istovremeno ublažavanje upalnih odgovora u CNS-u. Osim toga, suplementacija jogurtom obogaćenog GOS-om, poboljšao je mitohondrijsku funkciju u mišićima i smanjio neuroinflamaciju, čime je dodatno usporio napredovanje bolesti.

## 5.4 Sinbiotici

Sinbiotici su posebno formulirane kombinacije prebiotika i probiotika, gdje prebiotici ciljano potiču rast i metaboličku aktivnost probiotika (10). Time se poboljšava njihova održivost i korisnost, pozitivno utječu na sastav mikrobiote domaćina te povećavaju prisutnost korisnih mikroorganizama u probavnom traktu, što može donijeti zdravstvene koristi za domaćina. Najčešći sinbiotici uglavnom se sastoje od *Bifidobacterium* ili *Lactobacillus* bakterija u kombinaciji s fruktooligosaharidom (17). Sinbiotičke formulacije pokazale su bolje neuroprotektivne učinke u usporedbi s primjenom probiotika ili prebiotika samostalno. Na primjer, u modelima drugih neurodegenerativnih bolesti, poput Alzheimerove bolesti, sinbiotici su smanjili razine upalnog čimbenika TNF- $\alpha$ , poboljšali kognitivne funkcije i potaknuli neurogenezu (37). Iako su istraživanja o sinbioticima u ALS-u još uvijek u ranoj fazi, obećavajući rezultati iz istraživanja srodnih neurodegenerativnih poremećaja sugeriraju da bi ovaj pristup mogao biti koristan.

## 5.5 Postbiotici

Postbiotici su biološki aktivni spojevi koje proizvode mikroorganizmi, a uključuju mikrobne stanice, njihove komponente (npr. peptidoglikan i teikoična kiselina) te metabolite poput SCFA, vitamina, lipida i proteina (17).

U kontekstu ALS-a, postbiotici su pokazali značajan potencijal. Već spomenuto istraživanje (29), naglašava pozitivne učinke butirata kao postbiotika. Nadalje, kada se postbiotici koriste zajedno s drugim terapijama, poput riluzola, dolazi do pojačanog učinka gdje postbiotici ne samo da djeluju samostalno, već i povećavaju učinkovitost postojećih terapija (38). Ova kombinacija omogućuje djelovanje na više patogenih mehanizama istovremeno, što može poboljšati rezultate liječenja i potencijalno poboljšati kvalitetu života pacijenata. Integracija postbiotika u terapijske protokole mogla bi otvoriti nove mogućnosti u pristupu liječenju ALS-a, pružajući bolju kontrolu nad progresijom bolesti.

## **6 ZAKLJUČAK**

Na temelju provedenih istraživanja, smatra se da modulacija crijevne mikrobiote može predstavljati obećavajući terapijski pristup u liječenju amiotrofične lateralne skleroze. Iako su preliminarni rezultati na životinjskim modelima pokazali pozitivan utjecaj određenih bakterijskih sojeva i njihovih metabolita na progresiju bolesti, nužna su klinička ispitivanja u bolesnika kako bi se potvrdila učinkovitost i sigurnost ovih strategija kod ljudi. Razumijevanje kako genetski, prehrambeni i ostali okolišni čimbenici utječu na sastav crijevne mikrobiote moglo bi omogućiti razvoj novih terapija za pacijente s ALS-om.

## REFERENCE

1. Taylor JP, Brown RH, Cleveland DW. Decoding ALS: From genes to mechanism. Vol. 539, *Nature*. Nature Publishing Group; 2016. p. 197–206.
2. Brown RH, Al-Chalabi A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. Longo DL, editor. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2017 Jul 13;377(2):162–72. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1603471>
3. Blacher E, Bashiardes S, Shapiro H, Rothschild D, Mor U, Dori-Bachash M, et al. Potential roles of gut microbiome and metabolites in modulating ALS in mice. *Nature*. 2019 Aug 22;572(7770):474–80.
4. Mejzini R, Flynn LL, Pitout IL, Fletcher S, Wilton SD, Akkari PA. ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? Vol. 13, *Frontiers in Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2019.
5. Hu Y, Chen W, Wei C, Jiang S, Li S, Wang X, et al. Pathological mechanisms of amyotrophic lateral sclerosis. Vol. 19, *Neural Regeneration Research*. Wolters Kluwer Medknow Publications; 2024. p. 1036–44.
6. Motataianu A, Serban G, Barcutean L, Balasa R. Oxidative Stress in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Synergy of Genetic and Environmental Factors. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
7. Aggarwal N, Kitano S, Puaah GRY, Kittelmann S, Hwang IY, Chang MW. Microbiome and Human Health: Current Understanding, Engineering, and Enabling Technologies. Vol. 123, *Chemical Reviews*. American Chemical Society; 2023. p. 31–72.
8. Bicknell B, Liebert A, Borody T, Herkes G, McLachlan C, Kiat H. Neurodegenerative and Neurodevelopmental Diseases and the Gut-Brain Axis: The Potential of Therapeutic Targeting of the Microbiome. Vol. 24, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
9. Noor Eddin A, Alfuwais M, Noor Eddin R, Alkattan K, Yaqinuddin A. Gut-Modulating Agents and Amyotrophic Lateral Sclerosis: Current Evidence and Future Perspectives. Vol. 16, *Nutrients*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
10. Zheng Y, Bonfili L, Wei T, Eleuteri AM. Understanding the Gut–Brain Axis and Its Therapeutic Implications for Neurodegenerative Disorders. Vol. 15, *Nutrients*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
11. Hou K, Wu ZX, Chen XY, Wang JQ, Zhang D, Xiao C, et al. Microbiota in health and diseases. Vol. 7, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2022.
12. Abul K. Abbas AHLSP. *Stanična i molekularna imunologija*. 2018.
13. Gomaa EZ. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. Vol. 113, *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2020. p. 2019–40.

14. Nandwana V, Nandwana NK, Das Y, Saito M, Panda T, Das S, et al. The Role of Microbiome in Brain Development and Neurodegenerative Diseases. *Molecules*. 2022 Jun 1;27(11).
15. Mayer EA, Nance K, Chen S. The Gut-Brain Axis. 2021; Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042320->
16. de Jonge WJ. The Gut's Little Brain in Control of Intestinal Immunity. *ISRN Gastroenterol*. 2013 Apr 4;2013:1–17.
17. Chen S, Cai X, Lao L, Wang Y, Su H, Sun H. Brain-Gut-Microbiota Axis in Amyotrophic Lateral Sclerosis : A Historical Overview and Future Directions. Vol. 15, *Aging and Disease*. International Society on Aging and Disease; 2024. p. 74–95.
18. Cryan JF, O KJ, M Cowan CS, Sandhu K V, S Bastiaanssen TF, Boehme M, et al. The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol Rev* [Internet]. 2019;99:1877–2013. Available from: [www.prv.org](http://www.prv.org)
19. Boddy SL, Giovannelli I, Sassani M, Cooper-Knock J, Snyder MP, Segal E, et al. The gut microbiome: a key player in the complexity of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Vol. 19, *BMC Medicine*. BioMed Central Ltd; 2021.
20. Fung TC, Olson CA, Hsiao EY. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. Vol. 20, *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group; 2017. p. 145–55.
21. Hong D, Zhang C, Wu W, Lu X, Zhang L. Modulation of the gut–brain axis via the gut microbiota: a new era in treatment of amyotrophic lateral sclerosis. Vol. 14, *Frontiers in Neurology*. Frontiers Media S.A.; 2023.
22. Beers DR, Appel SH. Immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and emerging therapies. Vol. 18, *The Lancet Neurology*. Lancet Publishing Group; 2019. p. 211–20.
23. Dalile B, Van Oudenhove L, Vervliet B, Verbeke K. The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. Vol. 16, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group; 2019. p. 461–78.
24. Wang J, Zhu N, Su X, Gao Y, Yang R. Gut-Microbiota-Derived Metabolites Maintain Gut and Systemic Immune Homeostasis. Vol. 12, *Cells*. MDPI; 2023.
25. Obrador E, Salvador-Palmer R, López-Blanch R, Dellinger RW, Estrela JM. NAD<sup>+</sup> precursors and antioxidants for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. Vol. 9, *Biomedicines*. MDPI AG; 2021.
26. Xie N, Zhang L, Gao W, Huang C, Huber PE, Zhou X, et al. NAD<sup>+</sup> metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. Vol. 5, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2020.
27. Sun J, Huang T, Debelius JW, Fang F. Gut microbiome and amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review of current evidence. Vol. 290, *Journal of Internal Medicine*. John Wiley and Sons Inc; 2021. p. 758–88.

28. Wu S, Yi J, Zhang YG, Zhou J, Sun J. Leaky intestine and impaired microbiome in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Physiol Rep*. 2015;3(4).
29. Zhang Y guo, Wu S, Yi J, Xia Y, Jin D, Zhou J, et al. Target Intestinal Microbiota to Alleviate Disease Progression in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Clin Ther*. 2017 Feb 1;39(2):322–36.
30. Figueroa-Romero C, Guo K, Murdock BJ, Paez-Colasante X, Bassis CM, Mikhail KA, et al. Temporal evolution of the microbiome, immune system and epigenome with disease progression in ALS mice. *DMM Disease Models and Mechanisms*. 2020;13(2).
31. Haney MM, Ericsson AC, Lever TE. Effects of Intraoperative Vagal Nerve Stimulation on the Gastrointestinal Microbiome in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Comp Med*. 2018 Dec 1;68(6):452–60.
32. Burberry A, Wells MF, Limone F, Couto A, Smith KS, Keaney J, et al. C9orf72 suppresses systemic and neural inflammation induced by gut bacteria. *Nature*. 2020 Jun 4;582(7810):89–94.
33. Fang X, Wang X, Yang S, Meng F, Wang X, Wei H, et al. Evaluation of the microbial diversity in amyotrophic lateral sclerosis using high-throughput sequencing. *Front Microbiol*. 2016 Sep 20;7(SEP).
34. Brenner D, Hiergeist A, Adis C, Mayer B, Gessner A, Ludolph AC, et al. The fecal microbiome of ALS patients. *Neurobiol Aging*. 2018 Jan 1;61:132–7.
35. Zhai C Di, Zheng JJ, An BC, Huang HF, Tan ZC. Intestinal microbiota composition in patients with amyotrophic lateral sclerosis: Establishment of bacterial and archaeal communities analyses. *Chin Med J (Engl)*. 2019 Aug 5;132(15):1815–22.
36. Sun J, Zhan Y, Mariosa D, Larsson H, Almqvist C, Ingre C, et al. Antibiotics use and risk of amyotrophic lateral sclerosis in Sweden. *Eur J Neurol*. 2019 Nov 1;26(11):1355–61.
37. Di Gioia D, Bozzi Cionci N, Baffoni L, Amoruso A, Pane M, Mogna L, et al. A prospective longitudinal study on the microbiota composition in amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Med*. 2020 Jun 17;18(1).
38. Ngo ST, Restuadi R, McCrea AF, Van Eijk RP, Garton F, Henderson RD, et al. Progression and survival of patients with motor neuron disease relative to their fecal microbiota. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2020;549–62.
39. Zeng Q, Shen J, Chen K, Zhou J, Liao Q, Lu K, et al. The alteration of gut microbiome and metabolism in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Sci Rep*. 2020 Dec 1;10(1).
40. Nicholson K, Bjornevik K, Abu-Ali G, Chan J, Cortese M, Dedi B, et al. The human gut microbiota in people with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2021;22(3–4):186–94.
41. Guo K, Figueroa-Romero C, Noureldein MH, Murdock BJ, Savelieff MG, Hur J, et al. Gut microbiome correlates with plasma lipids in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 2024 Feb 1;147(2):665–79.



42. Yang X, Yu D, Xue L, Li H, Du J. Probiotics modulate the microbiota–gut–brain axis and improve memory deficits in aged SAMP8 mice. *Acta Pharm Sin B*. 2020 Mar 1;10(3):475–87.
43. Zhang Y, Xia Y, Sun J. Probiotics and microbial metabolites maintain barrier and neuromuscular functions and clean protein aggregation to delay disease progression in TDP43 mutation mice. *Gut Microbes*. 2024;16(1).
44. Obrenovich M, Jaworski H, Tadimalla T, Mistry A, Sykes L, Perry G, et al. The role of the microbiota–gut–brain axis and antibiotics in ALS and neurodegenerative diseases. Vol. 8, *Microorganisms*. MDPI AG; 2020.
45. Song L, Gao Y, Zhang X, Le W. Galactooligosaccharide improves the animal survival and alleviates motor neuron death in SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience*. 2013 Aug 29;246:281–90.
46. Deng SM, Chen CJ, Lin HL, Cheng IH. The beneficial effect of synbiotics consumption on Alzheimer’s disease mouse model via reducing local and systemic inflammation. In: *IUBMB Life*. John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 748–53.
47. Del Signore SJ, Amante DJ, Kim J, Stack EC, Goodrich S, Cormier K, et al. Combined riluzole and sodium phenylbutyrate therapy in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2009;10(2):85–94.

# ŽIVOTOPIS



## Barbara Copić

**Kućna** : Vanje Radauša 3, 10000, Zagreb, Hrvatska

**Adresa boravišta** : Ulica Braće Ružiča 17, 51000, Rijeka, Hrvatska

**E-adresa**: [bcopic@outlook.com](mailto:bcopic@outlook.com) **Telefonski broj**: (+385) 919290892

**Spol**: Žensko **Datum rođenja**: 21/05/1997 **Državljanstvo**: hrvatsko

### RADNO ISKUSTVO

[ 18/05/2018 – 10/09/2018 ]

#### Konobarica

*Na cesti b041 d.o.o.*

**Adresa**: Masarykova 25, 10000, Zagreb, Hrvatska

**Mjesto**: Zagreb

**Zemlja**: Hrvatska

[ 12/06/2021 ]

#### Promocija

*Designer outlet Croatia d.o.o.*

**Mjesto**: Zagreb

**Zemlja**: Hrvatska

Dijeljenje promotivnog materijala.

[ 14/04/2021 – 29/09/2021 ]

#### Rad u laboratoriju

*Poliklinika LabPlus*

**Mjesto**: Zagreb

**Zemlja**: Hrvatska

Antigensko testiranje uzoraka na prisutnost koronavirusa.

[ 13/05/2022 ]

#### Promocija i marketing - rad na događaju

*FORGEBIT D.O.O.*

**Mjesto**: Rijeka

**Zemlja**: Hrvatska

Schar food truck event

### OBRAZOVANJE I OSPO-SOBLJAVANJE

[ 2011 – 2015 ]

#### Srednjoškolsko obrazovanje

*XV. gimnazija - MIOC, Zagreb* <https://www.mioc.hr/wp/>

**Adresa**: Jordanovac, 8, 10000, Zagreb, Hrvatska

[ 2015 – 2020 ]

#### Doktor medicine

*Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu* <https://mef.unizg.hr/>

**Adresa**: Šalata 3, 10000, Zagreb, Hrvatska

[ 03/10/2021 – Trenutačno ]

**Sveučilišna prvostupnica (baccalaureus, baccalaurea) biotehnologije i istraživanja lijekova.**

*Odjel za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci* <https://www.biotech.uniri.hr/hr/>

**Adresa**: Radmile Matejčić 2, 51000, Rijeka, Hrvatska

**KONFERENCIJE I SEMI-****NARI**

[ 12/06/2013 – 14/06/2013 ]

**Comenius multilateral School partnership project - 'Ins and outs of the magic Möbius strip'**

Justus von Liebig Gymnasium, Neusäß, Germany

[ 23/04/2014 – 27/04/2014 ] **Euromath - European Student Conference in Mathematics** Nicosia, Cyprus**VOLONTIRANJE**[ 29/11/2020 – 21/12/2020 ] **Rad u pozivnom centru za praćenje kontakata oboljelih od koronavirusa**  
Škola narodnog zdravlja "Andrija Štampar", Rockefellerova ulica 4, 10 000 Zagreb**JEZIČNE VJEŠTINE****Materinski jezik/jezici:** hrvatski**Drugi jezici:****engleski**

SLUŠANJE C2 ČITANJE C2 PISANJE C2

GOVORNA PRODUKCIJA C2 GOVORNA INTERAKCIJA C2

**njemački**

SLUŠANJE B1 ČITANJE B1 PISANJE B1

GOVORNA PRODUKCIJA B1 GOVORNA INTERAKCIJA B1

**VOZAČKA DOZVOLA**

Automobili: B

04/02/2016 – 01/08/2026