

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ines Rajkovača Latić

POVEZANOST MARKERA INTESTINALNE UPALE S MOTORIČKIM I
NEMOTORIČKIM SIMPTOMIMA U BOLESNIKA S PARKINSONOVOM BOLESTI

Doktorska disertacija

Osijek, 2024.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ines Rajkovača Latić

POVEZANOST MARKERA INTESTINALNE UPALE S MOTORIČKIM I
NEMOTORIČKIM SIMPTOMIMA U BOLESNIKA S PARKINSONOVOM BOLESTI

Doktorska disertacija

Osijek, 2024.

Mentor rada: doc. dr. sc. Svetlana Tomić, prim. dr. med., spec.neurologije

Komentor rada: prof. dr. sc. Blaženka Miškić, prim. dr. med., spec. interne medicine, subspec. endokrinologije i dijabetologije

Rad ima 99 stranica.

ZAHVALE

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Svetlani Tomić na vođenju kroz cijeli proces izrade ove disertacije. Od početne ideje, provođenja istraživanja do konačnog pisanja disertacije Vaši savjeti i pomoć bili su mi iznimno vrijedni.

Zahvaljujem i komentorici prof. dr. sc. Blaženki Miškić na potpori i idejama tijekom svih ovih godina rada. Vaša podrška i pomoć puno su mi značile.

Nadalje, zahvaljujem magistri Ines Šahinović na pomoći pri izradi rezultata istraživanja te kolegama Zvonimiru Popoviću i Katici Mijatović na pomoći oko organizacije.

Zahvaljujem svim ispitanicima na odvojenom vremenu i volji za sudjelovanjem u istraživanju.

Disertaciju posvećujem svojoj obitelji.

Zahvaljujem roditeljima, bratu i sestri na bezgraničnoj podršci koju oduvijek imam kod vas.

Hvala Stjepanu na svemu.

Našoj djeci, Teu i Dori.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Parkinsonova bolest	1
1.1.1. Definicija Parkinsonove bolesti.....	1
1.1.2. Epidemiologija i etiologija	1
1.1.3. Patogeneza bolesti	2
1.1.4. Klinička slika i dijagnoza	3
1.1.5. Liječenje bolesti.....	4
1.2. Gastrointestinalni simptomi u Parkinsonovoj bolesti	5
1.2.1. Pregled gastrointestinalnih simptoma bolesti.....	5
1.2.2. Simptomi gornjeg dijela probavnog sustava	5
1.2.3. Simptomi donjeg dijela probavnog sustava.....	6
1.2.4. Malnutricija	6
1.3 Patogeneza gastrointestinalne disfunkcije u Parkinsonovoj bolesti.....	6
1.3.1. Braakova hipoteza	6
1.3.2. Alfa-sinuklein u enteričkom živčanom sustavu	7
1.3.3. Anatomske putevi širenja depozita alfa-sinukleina.....	8
1.3.4. Osovina crijevo-mozak.....	8
1.4. Značaj intestinalne upale u Parkinsonovoj bolesti	10
1.4.1. Upalni odgovor u Parkinsonovoj bolesti	10
1.4.2. Intestinalna upala u Parkinsonovoj bolesti	12
1.5. Markeri intestinalne upale u Parkinsonovoj bolesti	15
1.5.1. Markeri intestinalne upale	15
1.5.2. Kalprotektin.....	16
1.5.3. Beta-defenzin 2.....	17
1.5.4. Sekretorni IgA	18

1.5.5. Zonulin	199
1.5.6. Alfa-1-antitripsin	19
1.5.7. Laktoferin	20
1.6. Očekivani znanstveni doprinos istraživanja	20
2. HIPOTEZA	222
3. CILJEVI	233
4. ISPITANICI I METODE	244
4.1. Ustroj studije	244
4.2. Ispitanici	244
4.3. Metode	255
4.3.1. Upitnici za provođenje istraživanja	255
4.3.2. Definiranje kliničkog podtipa bolesti	299
4.3.3. Određivanje vrijednosti markera intestinalne upale	30
4.4. Statističke metode	366
5. REZULTATI	377
5.1. Opća i klinička obilježja bolesnika s Parkinsonovom bolesti i kontrolne skupine	377
5.1.1. Uloga markera intestinalne upale u uzorcima stolice u predviđanju Parkinsonove bolesti (regresijska analiza)	40
5.2. Obilježja bolesnika s Parkinsonovom bolesti	41
5.3. Povezanost vrijednosti markera intestinalne upale u uzorku stolice s kliničkim podtipovima Parkinsonovom bolesti	489
5.4. Povezanost vrijednosti markera intestinalne upale u uzorku stolice kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti s kliničkim obilježjima bolesnika, dobi i duljinom trajanja bolesti	56
6. RASPRAVA	63
6.1. Opće odlike ispitanika	63
6.2. Povezanost markera intestinalne upale s motoričkim i nemotoričkim simptomima, dobi i duljinom trajanja bolesti	65
6.2.1. Kalprotektin	65

6.2.2. Laktoferin	66
6.2.3. Beta-defenzin.....	67
6.2.4. Sekretorni imunoglobulin A	67
6.2.5. Zonulin	68
6.2.6. Alfa-1-antitripsin	70
6.3. Povezanost markera intestinalne upale s kliničkim podtipovima Parkinsonove bolezni	71
6.4. Međusobna povezanost vrijednosti markera intestinalne upale	73
6.5. Ograničenja istraživanja	75
7. ZAKLJUČCI.....	76
8. SAŽETAK	77
9. SUMMARY	799
10. LITERATURA	81
11. ŽIVOTOPIS.....	97

POPIS KRATICA

BAI – engl. *Beck Anxiety Inventory*

BDI-II – engl. *Beck Depression Inventory II*

CRP – C-reaktivni protein

EGFR – receptor epidermalnog čimbenika rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*)

ELISA – enzimski povezani imunosorbentni test (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

H&Y – engl. *Hoehn&Yahr*

MDS – engl. *Movement Disorder Society*

MDS-UPDRS – engl. *Movement Disorder Society Unified Parkinson's Disease Rating Scale*

MDS-NMS – engl. *Movement Disorder Society Nonmotor Rating Scale*

MoCa – engl. *Montreal Cognitive Assessment*

NF- κ B – nuklearni čimbenik κ B (engl. *nuclear factor κ B*)

PAR₂ – proteinaza aktivirajući receptor (engl. *proteinase activated receptors*)

PDSS-2 – engl. *Parkinson Disease Sleep Scale-2*

RBDSQ – engl. *REM sleep behavior disorder screening questionnaire*

SCOPA-AUT – engl. *Scales for Outcomes in Parkinson's Disease-Autonomic Dysfunction*

RBD – engl. *REM behavior disorder*

REM – engl. *rapid eye movement*

TGF- β 1 – transformirajući čimbenik rasta- β 1 (engl. *transforming growth factor- β 1*)

TNF- α – čimbenik nekroze tumora-alfa (engl. *tumor necrosis factor α*)

SAS – engl. *stool preparation system*

sIgA – sekretorni imunoglobulin A

STAT3 – prijenosnik signala i aktivator transkripcije (engl. *signal transducer and activator of transcription 3*)

TMB – tetrametilbenzidin

POPIS TABLICA

Tablica 4. 1. Percentilne vrijednosti za procjenu kliničkog podtipa Parkinsonove bolesti, prema preporukama Fereshtehnejad i suradnika	30
Tablica 4. 2. Patološke vrijednosti markera intestinalne upale.....	311
Tablica 5.1. Osnovna obilježja ispitanika	377
Tablica 5.2. Razlike u dobi (godine) u odnosu na skupine	377
Tablica 5.3. Razlike u vrijednostima markera intestinalne upale u uzorku stolice bolesnika s Parkinsonovom bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu	388
Tablica 5.4. Raspodjela ispitanika prema referentnim vrijednostima markera intestinalne upale u uzorcima stolice	39
Tablica 5.5. Predviđanje vjerojatnosti nastanka Parkinsonove bolesti (bivarijatna i multivarijatna logistička regresija)	40
Tablica 5.6. Raspodjela bolesnika po skupinama ljestvice H&Y	411
Tablica 5.7. Raspodjela ispitanika prema tipu bolesti i prvim simptomima u odnosu na spol	421
Tablica 5.8. Razlike u dobi bolesnika, trajanju bolesti i dobi kod postavljanja dijagnoze u odnosu na spol	42
Tablica 5.9. Medijan bodova po skupinama ljestvice MDS-UPDRS	442
Tablica 5.10. Raspodjela simptoma po skupinama upitnika MDS-NMS	443
Tablica 5.11. Raspodjela simptoma autonomne disfunkcije prema skupinama ljestvice SCOPA-AUT	504
Tablica 5.12. Medijan vrijednosti MoCa, BAI, BDI-II, PDSS-2 i upitnika RBDSQ	514
Tablica 5.13. Nemotorički simptomi prema MDS-UPDRS ljestvici u odnosu na spol.....	525
Tablica 5.14. Ocjena izraženosti simptoma u odnosu na spol prema MDS-NMS ljestvici.....	536
Tablica 5.15. Razlike u težini autonomnih simptoma u odnosu na spol	547
Tablica 5.16. Medijan vrijednosti MoCa, PDSS-2, BAI i BDI-II u odnosu na spol bolesnika.....	54
7	
Tablica 5.17. Povezanost dobi kod dijagnoze i trajanja bolesti s domenama RBDSQ, MDS-NMS i MDS-UPDRS	558
Tablica 5.18. Povezanost dobi kod dijagnoze i trajanja bolesti s kliničkim obilježjima bolesnika oboljelih od Parkinsonove bolesti	56

Tablica 5.19. Razlike u vrijednostima markera intestinalne upale u uzorku stolice bolesnika s Parkinsonovom bolesti u odnosu spol bolesnika	58
Tablica 5.20. Razlike u vrijednostima markera intestinalne upale u uzorku stolice bolesnika s Parkinsonovom bolesti u odnosu na početak bolesti	590
Tablica 5.21. Razlike u vrijednostima markera intestinalne upale u uzorku stolice bolesnika s Parkinsonovom bolesti u odnosu na vrstu početnih simptoma	601
Tablica 5.22. Markeri intestinalne upale u odnosu na spol.....	612
Tablica 5.23. Markeri intestinalne upale prema dobi početka bolesti	622
Tablica 5.24. Markeri intestinalne upale u odnosu na pojavu prvih simptoma.....	623
Tablica 5.25. Razlike markera intestinalne upale u uzorcima stolice prema ljestvici H&Y...	624
Tablica 5.26. Povezanost markera intestinalne upale u uzorku stolice bolesnika s Parkinsonovom bolesti s kliničkim podtipom bolesti.....	624
Tablica 5.27. Raspodjela ispitanika prema referentnim vrijednostima markera intestinalne upale u uzorcima stolice kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti u odnosu na klinički podtip bolesti.....	562
Tablica 5.28. Povezanost kalprotektina, beta-defenzina-2 i sIgA s kliničkim obilježjima oboljelih od Parkinsonove bolesti	627
Tablica 5.29. Povezanost zonulina, alfa-1-antitripsina i laktoferina s kliničkim obilježjima oboljelih od Parkinsonove bolesti.....	628
Tablica 5.30. Povezanost markera intestinalne upale u uzorcima stolice s dobi bolesnika, dobi kod početka bolesti i s trajanjem bolesti.....	629
Tablica 5.31. Međusobna povezanost markera intestinalne upale u uzorcima stolice u kontrolnoj skupini i u skupini bolesnika oboljelih od Parkinsonove bolesti.....	60
Tablica 5.32. Međusobna povezanost markera intestinalne upale u uzorcima stolice u skupinama bolesnika oboljelih od Parkinsonove bolesti s obzirom na dob početka bolesti....	61
Tablica 5.33. Međusobna povezanost markera intestinalne upale u uzorcima stolice u skupinama bolesnika oboljelih od Parkinsonove bolesti s obzirom na pojavnost prvih simptoma.....	62

POPIS SLIKA

Slika 4. 1. Algoritam uključivanja ispitanika u istraživanje.....	255
--	-----

1. UVOD

1.1. Parkinsonova bolest

1.1.1. Definicija Parkinsonove bolesti

Parkinsonova je bolest kronična neurodegenerativna bolest tipa sinukleopatije koja zahvaća strukture središnjeg i perifernog živčanog sustava s posljedičnim razvojem širokog spektra motoričkih i nemotoričkih simptoma (1). Dominantno patološko obilježje bolesti jest gubitak funkcije dopaminergičkih neurona u području *substantia nigra pars compacta* do kojega dolazi uslijed odlaganja Lewyevih tjelešaca i Lewyevih neurita u obliku intracitoplazmatskih inkluzija (2). One u sebi sadrže konformacijski izmijenjene netopive agregate alfa-sinukleina, proteina važnog za funkcionalnost sinapsi, čija se uloga u procesu neurodegeneracije i dalje istražuje (2, 3, 4). Osim struktura dopaminergičkog sustava bolest zahvaća i nedopaminergičke neurone u drugim regijama mozga, ali i strukture perifernog i autonomnog živčanog sustava u kojima je također uočeno odlaganje patoloških oblika alfa-sinukleina (5).

1.1.2. Epidemiologija i etiologija

Incidencija bolesti iznosi od 5/100 000 do 35/100 000 slučajeva godišnje ovisno o populaciji, a podaci iz 2016. godine ukazuju na globalnu prevalenciju od 6,1 milijuna pacijenata (6, 7). U Hrvatskoj je procijenjena prevalencija 15 000 oboljelih, a s obzirom na porast incidencije s dobi i starenje populacije, očekuje se daljnji porast broja oboljelih (7, 8). Osim dobi, važan rizični čimbenik za nastanak bolesti jest spol te je uočena 1,6 puta veća incidencija bolesti u muškaraca u odnosu na žene (9).

Etiologija bolesti multifaktorijalna je. Opisane genske mutacije koje obično uzrokuju ranu pojavu bolesti i atipične simptome nalaze se u manjeg broja bolesnika, dok je za veći dio značajan utjecaj okolišnih čimbenika (1, 10). Od okolišnih čimbenika spominje se izloženost toksičnim kemikalijama poput pesticida, kloriranih otapala, izloženost manganu kod radnika u industriji, život u ruralnoj sredini i rad na farmi te ozljede glave godinama prije pojave simptoma bolesti (1, 11, 12). Opisan je značajno snižen rizik za razvoj bolesti u pušača i osoba koje svakodnevno unose kofein, a povišen rizik zabilježen je u osoba s većim unosom mliječnih proizvoda u prehrani (1). Prehrana bogata voćem, povrćem i žitaricama uz fizičku aktivnost smanjuje rizik za razvoj bolesti, izraženije u muškaraca u odnosu na žene (1, 13).

Uloga gena u nastanku bolesti varijabilna je te su tako opisane visoko penetrantne mutacije s autosomno dominantnim nasljeđivanjem poput mutacije u genu za alfa-sinuklein SNCA koje dovode do pojave bolesti u nekim obiteljima, dok je zabilježen i širok spektar mutacija s autosomno recesivnim nasljeđivanjem u genima PARKIN i PINK1 povezanim s lizosomskom degradacijom disfunkcionalnih mitohondrija i mutacije u DJ-1 genu povezanom s antioksidativnom obranom (1, 14). Značajne su i mutacije u genu LRRK2 koje utječu na pojačanu aktivnost kinaze i mutacije gena GBA povezanog s Gaucherovom bolesti koje dovode do gubitka aktivnosti glukocerebrozidaze u lizosomima (1, 15). Sve je veći naglasak i na epigenetskim modifikacijama poput metilacije deoksiribonukleinske kiseline, posttranslacijske modifikacije histona, uloge mikroskopske ribonukleinske kiseline te remodeliranja kromatina koji mogu utjecati na proces neurodegeneracije regulacijom ekspresije gena (16).

1.1.3. Patogeneza bolesti

U patogenezi bolesti značajna je uloga odlaganja patoloških oblika alfa-sinukleina u zahvaćenim neuronima uz postojanje upalnog procesa i aktivaciju imunološkog sustava koji također pridonose nastanku bolesti (17). Alfa-sinuklein je protein normalno prisutan na presinaptičkom kraju neurona u obliku monomera čije funkcije nisu u potpunosti istražene (17). Poznato je da sudjeluje u regulaciji funkcije sinapsi, transportu vezikula i oslobađanju neurotransmitera (17, 18). Također u određenim uvjetima uslijed konformacijskih promjena oblikuje aggregate koji se nakupljaju u neuronima u obliku Lewyevih tjelešaca i Lewyevih neurita uzrokujući njihovu disfunkciju (17, 18). Brojni su dokazi koji ukazuju na postojanje upalnog procesa u zahvaćenim neuronima na temelju zabilježenog porasta razine proupalnih citokina i upalnih medijatora u uzorcima likvora i plazme pacijenata s Parkinsonovom bolesti (19). Upalnom procesu pridonosi i aktivacija mikroglija, stanica koje potiču induciranje imunološkog odgovora, aktivaciju monocita i T-limfocita, te astrocita, čija se uloga u procesu neurodegeneracije i dalje istražuje (19, 20).

Osim u središnjem živčanom sustavu, agregati alfa-sinukleina pronađeni su i u neuronima perifernog živčanog sustava, autonomnog i enteričkog živčanog sustava te u krvi i drugim organima poput kože, žlijezda slinovnica i retine, a klinički značaj tih depozita u patogenezi bolesti i dalje se istražuje (21, 22). Značajan je utjecaj osovine crijevo-mozak za koju se pokazalo da utječe na proces neurodegeneracije disbiozom crijeвне mikrobiote, posljedične upale u području intestinalne mukoze koja se neuronima enteričkog živčanog sustava vagalnim živcem prenosi do središnjeg živčanog sustava, zbog čega brojna istraživanja upućuju na

hipotezu o početku Parkinsonove bolesti u crijevima sa širenjem patološkog procesa prema mozgu (21).

1.1.4. Klinička slika i dijagnoza

Klinička slika odlikuje se širokim spektrom motoričkih i nemotoričkih simptoma čiji je utjecaj na sve pokazatelje kvalitete života značajan, osobito na mentalno zdravlje i fizičke funkcije (23). Od motoričkih simptoma prisutni su bradikinezija ili hipokinezija uz tremor i/ili pojavu rigora (24 - 27). Ti su simptomi obično progresivnog tijeka, što posljedično u dijela bolesnika dovodi i do pojave invaliditeta (24 - 27). Od nemotoričkih simptoma prisutni su psihijatrijski poremećaji, autonomne disfunkcije, poremećaji spavanja, bolni sindrom, osjetni ispadi (hiposmija, anosmija), kronični umor, edemi uz promjene lokomotornog sustava (4, 25). Njihova pojava može prethoditi pojavi motoričkih simptoma i nekoliko godina unaprijed (4, 25). Pojava motoričkih simptoma povezuje se s degeneracijom neurona u području središnjeg živčanog sustava, dok se nemotorički simptomi povezuju s pojavom neurodegenerativnih promjena u neuronima perifernog i autonomnog živčanog sustava (26).

Dijagnoza bolesti postavlja se na temelju anamnestičkih podataka i kliničkog pregleda uz pomoć kriterija Međunarodnog društva za poremećaje pokreta (engl. *Movement Disorder Society*, MDS), koji osim utvrđivanja tipičnih znakova bolesti sadržavaju i potporne te isključujuće kriterije (27). Prisutnost neuobičajenih znakova bolesti korištenjem isključujućih kriterija usmjerava kliničara na isključenje atipičnih uzroka parkinsonizma poput multiple sistemske atrofije, progresivne supranuklearne paralize i kortikobazalne degeneracije (27, 28). Izazov u postavljanju dijagnoze jest i heterogena klinička prezentacija bolesti te se tako bolest može podijeliti u više kliničkih podtipova s različitim mehanizmima nastanka, kliničke prezentacije, progresije simptoma i odgovora na terapiju (28).

Često se u kliničkoj praksi koristi podjela prema dobi početka bolesti te se bolesnike klasificira u grupe s ranim ili kasnim početkom ovisno o dobi, pri čemu se kao rani početak bolesti u većini studija koristi dob od 40 ili 50 godina (28). U toj skupini bolesnika uočava se sporija progresija simptoma uz očuvane kognitivne funkcije u odnosu na bolesnike s kasnim početkom bolesti (28). Brojne su podjele prema težini motoričkih i nemotoričkih simptoma, poput primjerice podjele koju su definirali Fereshtehnejad i suradnici, prema kojoj se bolesnike može klasificirati u tri podtipa ovisno o težini motoričkih oštećenja i prisutnosti nemotoričkih obilježja bolesti poput kognitivnog oštećenja, disautonomije i poremećaja REM-faze spavanja (engl. *rapid eye movement*), pri čemu se definiraju blagi motorički-predominantni podtip, intermedijarni i

difuzni maligni podtip bolesti (29). Kod pacijenata s difuznim malignim podtipom bolesti uočena je brža progresija motoričkih i nemotoričkih simptoma bolesti čija je prisutnost bila teža u trenutku dijagnoze u odnosu na druge podtipove bolesti te češće prisutna kognitivna disfunkcija (29). Blagi motorički-predominantni podtip bolesti odlikuju dominantno prisutni motorički simptomi bolesti i sporija progresija, a intermedijarni tip definiran je ako se bolesnici ne uklapaju u kriterije za prethodna dva (28, 29). Berg i suradnici definiraju bolesnike ovisno o mjestu početnog nakupljanja depozita alfa-sinukleina na *brain-first* i *body-first*-podtip bolesti, pri čemu *brain-first*-podtip bolesti odlikuje prisutnost patoloških depozita alfa-sinukleina u prodromalnoj fazi na razini središnjeg živčanog sustava s anterogradnim širenjem prema periferiji mehanizmom sličnim širenju priona, dok *body-first*-podtip bolesti odlikuje prisutnost neurodegenerativnih promjena u neuronima enteričkog živčanog sustava s retrogradnim širenjem vagalnim živcem i simpatičkim spletom u strukturu središnjeg živčanog sustava (30). *Brain-first*-podtip bolesti uslijed primarnog zahvaćanja struktura središnjeg živčanog sustava odlikuje prvotna pojava motoričkih simptoma bolesti, a s progresijom bolesti prema periferiji u kasnijem tijeku pojavljuju se autonomne disfunkcije i REM-poremećaj spavanja, dok je *body-first*-podtip bolesti odlikuje pojava REM-poremećaja spavanja i autonomne disfunkcije u prodromalnoj fazi bolesti s kasnijim nastupom motoričkih simptoma (30).

1.1.5. Liječenje bolesti

Liječenje bolesti kompleksno je i temelji se na farmakoterapiji čiji je cilj učinkovita kontrola širokog spektra motoričkih i nemotoričkih simptoma (9). U ranoj fazi bolesti primjenjuje se peroralna i transdermalna terapija, dok se u uznapredovaloj bolesti primjenjuju specifične metode liječenja poput duboke moždane stimulacije, intratekalne primjene levodope perkutanom jejunostomom i pumpom, primjene apomorfina injekcijama ili pumpom te foslevodope supkutano pumpom (9, 31, 32). Uglavnom se koriste lijekovi različitog mehanizma djelovanja na ravnotežu neurotransmitera s naglaskom na dopamin i acetilkolin, poput prekursora dopamina levodope, dopaminskih agonista, lijekova koji blokiraju razgradnju dopamina (inhibitori monoaminoooksidaze B i katehol-o-metiltransferaze), antikolinergika i lijekova za kontrolu nemotoričkih simptoma (anksiolitici, antidepresivi, antipsihotici) (9, 31). Potpornu terapiju čini unos prehrane bogate antioksidansima za koju se pokazalo da djeluje neuroprotektivno i individualni programi rehabilitacije s ciljem postizanja maksimalnih funkcionalnih sposobnosti bolesnika (9, 32). U pretkliničkim i kliničkim studijama su i nove terapijske opcije poput genske terapije, terapije matičnim stanicama, biotehničkim lijekovima, ultrazvučnim tretmanom i aktivnom imunizacijom usmjerenom na alfa-sinuklein

(9). Budući da do sada nije utvrđen jasan etiološki čimbenik koji dovodi do nastanka bolesti, uzročno liječenje trenutno nije moguće te su sve terapijske mogućnosti usmjerene na kontrolu simptoma s ciljem postizanja najveće moguće kvalitete života bolesnika. Međutim boljim razumijevanjem patogeneze bolesti očekuju se novi terapijski ciljevi i pomaci s naglaskom na preventivne i neuroprotektivne mjere (33).

1.2. Gastrointestinalni simptomi u Parkinsonovoj bolesti

1.2.1. Pregled gastrointestinalnih simptoma bolesti

Široki spektar nemotoričkih simptoma Parkinsonove bolesti obuhvaća i gastrointestinalne simptome za koje se procjenjuje da su prisutni u 60 do 80 % bolesnika, često se javljaju rano tijekom bolesti i imaju značajan negativan utjecaj na kvalitetu života bolesnika (34). Kontrola te skupine simptoma važna je i zbog rizika od potencijalnog razvoja komplikacija koje ponekad mogu biti životno ugrožavajuće za bolesnike (34). Zahvaćenost gornjeg dijela probavnog sustava očituje se smetnjama poput sijaloreje, disfagije, gastropareze, mučnine i povraćanja, a zahvaćenost donjeg dijela očituje se najčešće konstipacijom i smetnjama defekacije (35).

1.2.2. Simptomi gornjeg dijela probavnog sustava

Sijaloreja je najčešće prisutan nemotorički simptom Parkinsonove bolesti, a nastaje uslijed zahvaćenosti autonomnog živčanog sustava i dorzalne motoričke jezgre vagalnog živca te moguće uslijed zahvaćenosti žlijezda slinovnica u kojima su također pronađena Lewyjeva tjelešca (34). Najčešće se uočava u kasnijim stadijima bolesti kao posljedica razvoja disfagije, ometa bolesnike u svakodnevnim funkcijama poput hranjenja i govora, a u slučaju neodgovarajuće kontrole može dovesti i do asfiksije ili aspiracije sline (34, 36).

Disfagija je simptom prisutan u približno 50 % bolesnika, a ima složenu patofiziološku podlogu koja se sastoji od motoričke disfunkcije akta gutanja, poremećaja pokreta grkljana, aperistaltike jednjaka kombinirane s istovremenim ezofagealnim spazmom, a posljedica je zahvaćenosti struktura autonomnog i enteričkog živčanog sustava (34, 36). Također se javlja u kasnijim stadijima bolesti, a može uzrokovati komplikacije poput gušenja, razvoja malnutricije, dehidracije, gubitka na težini i aspiracijske pneumonije (34, 36).

Odgodeno pražnjenje želuca ili gastropareza pojavljuje se u 90 % bolesnika, a povezuje se sa zahvaćanjem moždanog debla i autonomnih neurona mijenteričkog spleta te može rezultirati

različitim kliničkim manifestacijama poput mučnine, povraćanja, bolova u trbuhu, nadutosti, osjećaja rane sitosti i gubitka na težini (34, 37).

1.2.3. Simptomi donjeg dijela probavnog sustava

Konstipacija je simptom često prisutan u prodromalnoj fazi bolesti, a nastaje primarno uslijed usporenog motiliteta probavnog sustava uzrokovanog neurodegeneracijom intermediolateralnih jezgara leđne moždine te neurona enteričkog živčanog sustava od gornjeg dijela jednjaka do rektuma (38). Više istraživanja ukazuje i na rizik od razvoja Parkinsonove bolesti u zdravih osoba s usporenim pražnjenjem crijeva i smetnjama u evakuaciji stolice (35, 39). Primjerice, u muškaraca srednje dobi s konstipacijom uočen je četiri puta veći rizik od razvoja Parkinsonove bolesti tijekom 20 do 25 godina praćenja (35, 39). Komplikacije neliječene konstipacije uključuju megakolon, razvoj intestinalne opstrukcije te, u rijetkim slučajevima, perforaciju crijeva ili volvulus (40).

Smetnje defekacije također su čest simptom, obično rano prisutan u tijeku bolesti, a nastaju kao posljedica poremećene relaksacije unutarnjeg i vanjskog analnog sfinktera i poremećaja koordinacije mišića koji sudjeluju u defekaciji (35).

1.2.4. Malnutricija

Simptomi poput disfagije, mučnine, povraćanja i bolova u trbuhu mogu uzrokovati smetnje hranjenja, smanjenje apetita te rezultirati gubitkom na težini i malnutricijom koja je značajan prediktor razvoja komplikacija, brže progresije bolesti i smrtnosti bolesnika, što posljedično ukazuje na važnost ranog prepoznavanja i liječenja gastrointestinalnih simptoma u bolesnika s Parkinsonovom bolesti (41).

1.3 Patogeneza gastrointestinalne disfunkcije u Parkinsonovoj bolesti

1.3.1. Braakova hipoteza

Genska podloga uzrok je Parkinsonove bolesti u dijela bolesnika, međutim etiologija je u većeg dijela bolesnika sporadična te se smatra da u toj skupini okolišni čimbenici imaju značajnu ulogu u patogenezi bolesti (42). Uočavanjem gastrointestinalnih simptoma u kliničkoj slici velikog dijela bolesnika poraslo je zanimanje za istraživanje patogeneze gastrointestinalne disfunkcije u Parkinsonovoj bolesti, osobito nakon što su u neuronima enteričkog živčanog sustava pronađena Lewyjeva tjelešca (42).

Braakova hipoteza nastala na temelju istraživanja istoimenog autora 2003. godine upućuje na nepoznati patogen, moguće virus ili bakteriju, koji ulazi u organizam posredstvom crijevne sluznice, gdje uzrokuje upalno zbivanje, oštećenje neurona enteričkog živčanog sustava i, posljedično, širenje patološkog procesa agregacije alfa-sinukleina prema središnjem živčanom sustavu mehanizmom sličnom širenju priona (43). Dodatno je 2007. godine postavljena hipoteza „dvostrukog udarca“, prema kojoj sporadični oblik Parkinsonove bolesti može započeti na dva mjesta, ulaskom nepoznatog patogena posredstvom nazalne sluznice s posljedičnim širenjem olfaktornim traktom do središnjeg živčanog sustava ili posredstvom crijevne sluznice progutanim sekretom ili slinom, gdje je glavna veza između enteričkog i središnjeg živčanog sustava vagalni živac (44).

U prilog toj hipotezi govori i uočena rana pojava oštećenja njuha i gastrointestinalnih simptoma te autonomne disfunkcije u velikog dijela bolesnika koja prethodi pojavi motoričkih simptoma, kao i prisutnost Lewyjeve patologije u neuronima olfaktornog trakta i enteričkog živčanog sustava (45, 46).

1.3.2. Alfa-sinuklein u enteričkom živčanom sustavu

Prisutnost depozita alfa-sinukleina u neuronima enteričkog živčanog sustava potvrđena je u više animalnih i kliničkih istraživanja. Primjerice, nakon učinjene kolonoskopije analiza bioptičkih uzoraka u pacijenata s Parkinsonovom bolesti ukazala je na prisutnost tih depozita u području živčanih vlakana crijevne submukoze, a na životinjskom modelu potvrđena je i povezanost depozita alfa-sinukleina s oštećenjem epitelne barijere crijevne sluznice (47, 48). Dodatno, u istraživanju Lebouvier i suradnika dokazano je da gustoća Lewyevih tjelešaca i neurita u biopstatima kolona pozitivno korelira s pojavom konstipacije i neodgovarajućim odgovorom na terapiju levodopom, što upućuje na povezanost Lewyjeve patologije s kliničkim manifestacijama bolesti (49).

U probavnom sustavu kod pacijenata s Parkinsonovom bolesti dokazan je i promijenjeni sastav crijevnog mikrobioma te postojanje intestinalne upale uz povećanu propusnost crijevne barijere, što zajedno pridonosi oksidativnom stresu i nakupljanju alfa-sinukleina (50). Smatra se da promjene crijevnog mikrobioma potiču oksidativni stres i upalu sluznice crijeva, što posljedično pridonosi nakupljanju alfa-sinukleina i širenju patoloških depozita iz enteričkog živčanog sustava prema mozgu (42).

1.3.3. Anatomske putevi širenja depozita alfa-sinukleina

Enterički živčani sustav sastoji se od mreže neurona organiziranih u spletove od kojih su najvažniji *plexus myentericus Auerbachii*, smješten između unutarnjeg kružnog i vanjskog uzdužnog mišićnog sloja važan u regulaciji crijevnog motiliteta, vanjski submukozni splet *plexus Schabadasch*, smješten uz kružni mišićni sloj, i unutarnji submukozni splet *plexus submucosus Meissneri*, koji regulira sekreciju (51, 52, 53). Braak i suradnici dokazali su prisutnost patologije alfa-sinukleina u neuronima enteričkog živčanog sustava i ukazali na daljnji put širenja patologije retrogradno (43, 51, 54). Taj put širenja počinje zahvaćanjem preganglijskih parasimpatičkih neurona dorzalne motoričke jezgre vagusa, potom postganglijskih i preganglijskih simpatičkih neurona celijačnog ganglija, kralježnične moždine posljedičnim širenjem prema središnjem živčanom sustavu ranije opisanim prionskim mehanizmom putem aksonskog i transsinaptičnog prijenosa (43, 51, 54). Širenje patologije u središnjem živčanom sustavu odvija se iz nižih regija poput amigdale prema *substantia nigra pars compacta* te konačno do moždanog korteksa (42, 54).

Ulogu vagusa u širenju sinukleopatije dodatno ističe studija Svensson i suradnika koja ukazuje na smanjeni rizik od razvoja Parkinsonove bolesti u bolesnika kojima je učinjena vagotomija (55). Studija Beach i suradnika također opisuje prisutnost sinukleopatije u uzorcima vagusa uzetim iz želuca u preko 80 % pacijenata s Parkinsonovom bolesti i u niti jednog ispitanika iz skupine zdravih kontrola, što upućuje na zahvaćenost vagusa i gastrointestinalnog trakta u patogenezi bolesti (56). Nadalje, animalne studije ukazuju na moguću pojavu patologije alfa-sinukleina u neuronima središnjeg živčanog sustava nakon što se on aplicira na sluznicu želuca i dvanaesnika, a širenje tog procesa nije uočeno u životinja kojima je učinjena vagotomija (57, 58).

Važno je istaknuti da, iako je u velikog dijela bolesnika uočena patologija u skladu s Braakovom hipotezom, dio bolesnika kod kojih su zahvaćeni viši moždani centri ima očuvanu dorzalnu motoričku jezgru vagusa, a u dijela bolesnika s Parkinsonovom bolesti nije uočena nikakva patologija u enteričkom živčanom sustavu, što upućuje na to da se ti mehanizmi patogeneze bolesti ne mogu smatrati jedinstvenim za sve pacijente s Parkinsonovom bolesti (42, 59).

1.3.4. Osovina crijevo-mozak

Pojam osovina crijevo-mozak podrazumijeva mrežu dvosmjerno organiziranih komunikacijskih veza između gastrointestinalnog i središnjeg živčanog sustava koju, osim anatomske veze s vagusom u središtu, čini i imunološki sustav te endokrine i metaboličke

komponente (60). Zanimanje za taj put komunikacije poraslo je tumačenjem Braakove hipoteze i otkrićem sinukleopatije u neuronima enteričkog živčanog sustava, a daljnja istraživanja ukazala su da su opisane patološke promjene u probavnom sustavu prisutne već u ranoj fazi Parkinsonove bolesti (61).

U ranoj fazi bolesti opisana je i pojava poremećaja spavanja u velikog dijela pacijenata (62). Naprimjer, poremećaj ponašanja tijekom REM-faze spavanja (engl. *REM Behavior Disorder*, RBD) pripada u skupinu parasomnija koje odlikuju živi snovi (62, 63). Prospektivne studije s desetogodišnjim praćenjem kod takvih poremećaja ukazuju na konverziju u neurodegenerativne bolesti poput Parkinsonove bolesti, multiple sistemske atrofije i demencije Lewyevih tjelešaca u do 80 % pacijenata (62, 63). Uočeno je također da je kod pacijenta s REM-poremećajem spavanja prisutna Lewyeva patologija u biopstatima kolona na razini submukoznih žlijezda ili ganglija, isto kao i u pacijenata s Parkinsonovom bolesti prije pojave motoričkih simptoma, gdje su takve promjene uočene u biopstatima želuca, duodenuma i kolona, što ukazuje na značaj tog oblika patologije u prodromalnoj fazi bolesti (61).

Osim navedenih promjena, u ranoj fazi Parkinsonove bolesti i u skupini pacijenata s REM-poremećajem spavanja uočeno je oštećenje kolinergičke inervacije na razini crijeva mjerenjem gustoće acetilkolinesteraze u perifernim organima (64, 65). Također pacijenti s Parkinsonovom bolesti koji su imali poremećaj REM-faze spavanja u prodromalnoj fazi imali su zabilježenu oštećenu simpatičku inervaciju srca, kao i povećan volumen debelog crijeva s odgođenim vremenom prolaska sadržaja kroz crijevo u odnosu na pacijente s Parkinsonovom bolesti kod kojih nije bio prisutan REM-poremećaj spavanja (61, 66). Kako je u pacijenata bez REM-poremećaja spavanja u ranoj fazi Parkinsonove bolesti zabilježeno i primarno zahvaćanje središnjeg živčanog sustava smanjenjem skladištenja dopamina u putamenu s kasnijim gubitkom simpatičke i parasimpatičke inervacije, predloženo je da se ta skupina pacijenata definira kao *brain-first*-podtip Parkinsonove bolesti, odnosno podtip s prvim simptomima na mozgu (66). S druge strane pacijenti s poremećajem REM-faze spavanja u ranoj fazi bolesti kod kojih se primarno bilježi gubitak enteričke potom i parasimpatičke te simpatičke inervacije sa zahvaćanjem vagusa i kasnijim zahvaćanjem struktura središnjeg živčanog sustava definirani su kao *body-first*-podtip Parkinsonove bolesti, odnosno podtip kod kojega su prvi simptomi tjelesni, te se u njih očekuje rana pojava gastrointestinalnih simptoma i autonomne disfunkcije s kasnijim razvojem motoričkih simptoma slijedeći anatomske puteve razvoja bolesti (66). Iako neuropatološke studije na uzorcima autopsija govore u prilog navedenom načinu širenja patologije Lewyevih tjelešaca te podupiru postojanje dvaju fenotipova bolesti, ovisno o početku

u mozgu ili na periferiji, autori te podjele naglašavaju da izolirane varijacije ili multifokalni oblici nakupljanja alfa-sinukleina u manjeg broja pacijenata teoretski mogu izazivati atipičnu kliničku sliku koja ne slijedi opisane obrasce (66).

Važna je komponenta komunikacije na osovini crijevo-mozak, osim opisanih anatomskih puteva, i crijevni mikrobiom, čije promjene utječu na sastav intestinalne barijere i intestinalnu permeabilnost, a značajno je izmijenjen u Parkinsonovoj bolesti (21, 67). Čine ga bakterije, virusi, gljivice i jednostanični prokarioti, a modificiran je različitim čimbenicima poput dobi, spola, prehrane i lijekova (21, 67). Zbog brojnosti crijevnog mikrobioma koji sadrži oko 35 000 različitih vrsta i individualnih razlika, vrlo je zahtjevno utvrditi sastav zdravog mikrobioma i definirati stanje narušene ravnoteže, poznato i kao disbioza (68). Ipak postoje razlike specifične za pojedine bolesti, te je tako u Parkinsonovoj bolesti uočen smanjen sastav bakterija koje proizvode kratkolančane masne kiseline važne u regulaciji crijevne barijere, upalnog odgovora i opskrbi energije za kolonocite (69). Također su uočene smanjene razine maslačne i propionske kiseline iz skupine kratkolančanih masnih kiselina uz inverznu povezanost razina tih spojeva s težinom simptoma Parkinsonove bolesti (69).

Nije poznato je li crijevna disbioza posljedica bolesti ili ju potiče, ali je dokazano da uslijed porasta sastava potencijalno štetnih bakterija s promjenama u metabolizmu kratkolančanih masnih kiselina disbioza pridonosi oštećenju crijevne barijere, uslijed čega je olakšana translokacija bakterija i endotoksina kroz stijenku crijeva, a posljedično dolazi do promijenjenog imunološkog odgovora i aktivacije proupalnih puteva s konačnim oštećenjem epitelnih stanica crijevne sluznice (70). Više studija ukazuje i na značaj lipopolisaharida, sastavne komponente stanične stijenke bakterija, koji u uvjetima oštećene crijevne barijere prodire u sistemsku cirkulaciju, gdje potiče aktivaciju proupalnih citokina, neuropalu, a na životinjskim modelima uočeno je i da inducira nastanak strukturalnih promjena u alfa-sinukleinu, uslijed čega se razvija sinukleopatija kakva se uočava i u Parkinsonovoj bolesti (71, 72).

1.4. Značaj intestinalne upale u Parkinsonovoj bolesti

1.4.1. Upalni odgovor u Parkinsonovoj bolesti

Istraživanja usmjerena na osovину crijevo-mozak s naglaskom na promjene u crijevnom mikrobiomu potvrđuju značajnu ulogu tih komponenata u patogenezi Parkinsonove bolesti te,

iako nije jasno što je početni događaj u kaskadi koja dovodi do nastanka bolesti, zajedničko obilježje je obilježje tih čimbenika postojanje upalnog procesa koji je prisutan na lokalnoj i sistemskoj razini i pridonosi razvoju sinukleopatije (69).

Prepoznavanje upalnog procesa kao središnjeg događaja u patogenezi bolesti potvrdila su brojna istraživanja, primjerice, Chen i suradnici ukazuju na povišene razine proupalnih citokina interleukina 6, interleukina 1 β i transformirajućeg faktora rasta TGF- β 1 (engl. *transforming growth factor- β 1*) u uzorcima cerebrospinalnog likvora u pacijenata s Parkinsonovom bolesti, dok je u istraživanju Qin i suradnika opisan širok spektar povišenih razina proupalnih citokina interleukina 6, čimbenika nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*, TNF), interleukina 1 β , C reaktivnog proteina (CRP), interleukina 10 i interleukina 2 u uzorcima periferne krvi (73, 74). Uočena je i povećana ekspresija gena važnih za sintezu kemokina te povećan broj CD3+ T-limfocita u tkivu crijeva uz povišene markere intestinalne upale poput kalprotektina, zonulina i alfa-1-antitripsina, što ukazuje na postojanje upalnog procesa i na lokalnoj razini (75, 76).

Dodatno, različiti imunološki mehanizmi koji uključuju i urođenu i specifičnu imunost izmijenjeni su te pridonose napredovanju upalnog procesa poput aktivacije mikroglija stanica, čiji se broj povećava kako napreduje degeneracija neurona, a važne su u produkciji citokina, poticanju agregacije alfa-sinukleina i fagocitozi (77). Pojačana je i aktivacija CD4+ i CD8+ T-limfocita koji se nalaze u većim količinama u mozgu pacijenata s Parkinsonovom bolesti, dok je broj B-limfocita u krvi smanjen, ali rezultati među pojedinim istraživanjima nisu usuglašeni (77).

Utvrđen je i povećan rizik od razvoja Parkinsonove bolesti u pacijenata s autoimunim bolestima poput multiple skleroze, Gravesove bolesti, Hashimoto tireoiditisa, perniciozne anemije i reumatske polimialgije te je genetičkim studijama utvrđeno nekoliko zajedničkih lokusa s šećernom bolesti 1. tipa, ulceroznim kolitisom, Crohnovom bolesti i celijakijom (77). Osim genetičke podloge, uočeno je još poveznica s upalnim bolestima crijeva, primjerice metaanaliza Zhu i suradnika ukazuje na 28 – 30 % veći rizik od razvoja Parkinsonove bolesti kod pacijenata s upalnim bolestima crijeva, a istraživanjem unutar skupine oboljelih od upalnih bolesti crijeva uočeno je da pacijenti koji su na terapiji blokatorima TNF- α imaju 78 % manji rizik od razvoja Parkinsonove bolesti u odnosu na pacijente koji ne koriste navedene lijekove, što sve ukazuje na doprinos upalnog procesa patogenezi bolesti s naglaskom na intestinalnu upalu, čija se uloga sve više istražuje (78, 79).

1.4.2. Intestinalna upala u Parkinsonovoj bolesti

Intestinalna barijera predstavlja mjesto susreta sluznice crijeva s okolišnim čimbenicima poput kemikalija, prehrambenih komponenti i crijevnog mikrobioma te kao takva čini prvu obrambenu liniju organizma u susretu s vanjskim patogenima aktivacijom zaštitnih mehanizama čija je svrha očuvanje integriteta barijere i prevencija daljnjeg prodora patogena u dublje slojeve crijeva i sistemsku cirkulaciju (80).

Glavnu komponentu intestinalne barijere čine enterociti, najbrojnije stanice crijevnog epitela, čija je dominantna uloga apsorpcija hranjivih tvari, a međusobno su usko povezani spojevima kao što su dezmosomi, *zonula ocludens* i *zonula adherens* koji čine mehaničku barijeru crijeвне sluznice (80). U upalnim stanjima narušen je integritet tih međustaničnih spojeva te je omogućen lakši prolazak patogena u krvotok (81). Crijevna sluznica sadrži i Panethove stanice u dnu kripti čija je svrha proizvodnja antimikrobnih peptida poput defenzina i lizozima u odgovoru na bakterije i bakterijske produkte kao što je lipopolisaharid (80). Na sluznici se nalaze i vrčaste stanice koje luče sluz te intraepitelni limfociti i dendritičke stanice čija je svrha moduliranje imunološkog odgovora (80).

Ispod sloja epitela nalazi se *lamina propria* bogata limfocitima, makrofazima i plazma-stanicama koji sudjeluju u prirođenom i stečenom imunološkom odgovoru te izlučuju citokine, kemokine i sekretorni imunoglobulin A (sIgA) (82). Važna komponenta intestinalne barijere jest i sloj sluzi koji prekriva crijevni epitel, a građen je od vanjskog sloja bogatog mikroorganizmima te unutarnjeg sloja usko vezanog za epitel u kojemu su mikroorganizmi slabije zastupljeni, a bogat je antimikrobnim peptidima i sIgA (80). U stanjima intestinalne upale dolazi do narušavanja komponenata intestinalne barijere pojedinačno ili na razini više različitih mehanizama, čime je omogućen prodor štetnih komponenata iz okoliša u organizam, a upravo je u Parkinsonovoj bolesti intestinalna upala prepoznata kao jedan od važnih čimbenika u patogenezi bolesti (69).

Istraživanja na animalnom modelu ukazala su na povezanost intestinalne upale s dopaminergičkom degeneracijom. Primjerice, u studiji Villarán i suradnika na modelu štakora s Parkinsonovom bolesti i ulceroznim kolitisom uočena je pojačana degeneracija dopaminergičkih neurona u *substantia nigra* u odnosu na skupinu bez ulceroznog kolitisa (83). Nadalje, studija Garrido-Gill i suradnika, također na animalnom modelu, ukazuje da je moguć i obrnuti slijed događaja uočavanjem porasta markera upale i oksidativnog stresa na sluznici crijeva u životinja s centralnom dopaminergičkom degeneracijom (84). Navedeni rezultati

ukazuju na usku povezanost centralne i periferne upale i mogućnost dvosmjernе komunikacije na razini osovine crijevo-mozak.

Patologija alfa-sinukleina također je povezana s upalnim zbivanjima na crijevnoj sluznici. Primjerice, na modelu štakora izloženog niskim dozama lipopolisaharida uočeno je povećanje ekspresije alfa-sinukleina u neuronima mijenteričnog spleta u debelom crijevu koje je za posljedicu imalo i povećanje crijeвне propusnosti, dok u uzorcima iz tankog crijeva takve promjene nisu zabilježene (84). Tijekom petomjesečnog razdoblja praćenja uočene su i konformacijski izmijenjene forme alfa-sinukleina također u mijenteričnom spletu u uzorcima iz debelog crijeva, a, iako nije došlo do dopaminergične degeneracije u neuronima nigrostrijatalnog puta, primijećeno je naglo povećanje ekspresije alfa-sinukleina u području moždanog debla koje je bilo povezano s povećanjem crijeвне propusnosti (84).

S druge strane studija Kishimoto i suradnika također na animalnom modelu ukazala je da u životinja s upalom na sluznici kolona dolazi do brže pojave motoričkog deficita, smanjenja broja neurona u području *substantia nigra*, porasta odlaganja alfa-sinukleina u enteričkom i središnjem živčanom sustavu te porasta upalnih markera u kolonu i mozgu, ali ne i u krvi, što upućuje na širenje patologije alfa-sinukleina posredstvom živčanog sustava ranije opisanim mehanizmima (85).

Povezanost alfa-sinukleina s crijevnom propusnosti dokazana je i u kliničkoj studiji Forsyth i suradnika, gdje su uzorci biopsije sa sluznice sigmoidnog kolona bili pozitivni na alfa-sinuklein, a odlaganje tih depozita pozitivno je koreliralo s crijevnom propusnosti i oksidativnim stresom sluznice (86). Dodatno je studija na pedijatrijskoj populaciji potvrdila povezanost odlaganja alfa-sinukleina u neuritima enteričkog živčanog sustava na biopsijama iz želuca i duodenuma koje su pozitivno korelirale sa stupnjem upale u ispitivanim uzorcima (87). Na modelu štakora uočena je i povećana količina makrofaga i monocita u neposrednoj blizini neurona enteričkog živčanog sustava koji su bili bogati alfa-sinukleinom, što upućuje da te stanice mogu inducirati imunološki odgovor u takvim neuronima i poticati proces neuropale (88).

Dodatno, važna je i uloga glija-stanica u enteričkom živčanom sustavu koje se nalaze neposredno ispod epitelnih stanica te, poput glija-stanica u mozgu, imaju ulogu u potpori i zaštiti neurona, utječu i na funkciju intestinalne barijere, a njihova aktivacija dokazana je u Parkinsonovoj bolesti u studiji Devos i suradnika, u kojoj je uočena pojačana ekspresija glijalnih proteina Sox-10 i glijalnog fibrilarnog kiselog proteina u uzorcima uzlaznog kolona

kod pacijenata s Parkinsonovom bolesti (89, 90). Uočena je i povezanost tih markera s količinom proupalnih citokina poput interleukina 6, što upućuje na njihovu ulogu u neuroupalnim procesima (89, 90).

Crijevni mikrobiom i crijevna disbioza također čine važne komponente intestinalne upale, a dokazano je da mikrobiota i metaboliti mikrobiote poput lipopolisaharida mogu poticati agregaciju alfa-sinukleina u crijevima u uvjetima upale i povećane crijevne propusnosti (91). Poznato je i da određene bakterijske vrste, poput *Bacteroides fragilis*, mogu potaknuti kolitis aktivacijom prijenosnika signala i aktivatora transkripcije (engl. *signal transducer and activator of transcription 3*, STAT3) i Th17 limfocita putem nuklearnog faktora NF- κ B (engl. *nuclear factor κ B*) signalnog puta i porast koncentracije proupalnih citokina u pacijenata s upalnim bolestima crijeva, a kod pacijenata s Parkinsonovom bolesti također je zabilježen porast te vrste, što upućuje na slične mehanizme u indukciji upalnog procesa (92). U intestinalnoj upali dokazan je i porast bakterija iz roda *Enterobacteriaceae*, koje također mogu inducirati porast razine proupalnih citokina, a zabilježeno je smanjenje broja bakterija iz roda *Prevotellaceae*, koje su jedan od glavnih izvora kratkolančanih masnih kiselina, supstrata koji osigurava energiju za enterocite i pridonosi održavanju integriteta crijevne barijere, što sve upućuje na aktivnu ulogu crijevne mikrobiote u upalnim procesima na crijevnoj sluznici (93, 94).

Dodatno u prilog tim spoznajama govori i studija Zhao i suradnika u kojoj je učinjena transplantacija fekalne mikrobiote na modelu štakora s Parkinsonovom bolesti (95). Rezultati studije ukazuju da je u životinja s disbiozom uočena pojava gastrointestinalne disfunkcije, a u skupini životinja kojima je učinjena transplantacija mikrobiote zabilježeno je ublažavanje intestinalne upale i smanjeno oštećenje crijevne barijere. Posljedično je došlo do smanjenja neuroupale u području *substantia nigra* i smanjenja degeneracije dopaminergičnih neurona (95). Također je uočeno smanjenje razine lipopolisaharida u debelom crijevu, serumu i *substantia nigra*, što je uzrokovalo smanjenje razine proupalnih produkata u crijevu i *substantia nigra*, a upućuje na važnost lipopolisaharida u složenoj kaskadi upalnih procesa na crijevnoj sluznici (95).

Iz navedenih spoznaja i rezultata dosadašnjih istraživanja nije jasno što je početni događaj u kaskadi upalnih procesa na crijevnoj sluznici, dolazi li prvo do unosa egzogenog okolišnog čimbenika ili do promjene crijevnog mikrobioma te se posljedično razvija upalni proces u crijevu, ili upalna zbivanja na sluznici potaknu razvoj crijevne disbioze i pojavu

gastrointestinalne disfunkcije, ali je potvrđeno da periferna upala ima značajnu ulogu u Parkinsonovoj bolesti te da može inducirati neurodegeneraciju i upalni proces na razini središnjeg živčanog sustava s posljedičnim promjenama u kliničkoj prezentaciji bolesti.

1.5. Markeri intestinalne upale u Parkinsonovoj bolesti

1.5.1. Markeri intestinalne upale

Prepoznavanjem značaja intestinalne upale u Parkinsonovoj bolesti proizašao je niz istraživanja u kojima su mjereni markeri intestinalne upale po uzoru na pacijente s upalnim bolestima crijeva. Ti se markeri koriste za praćenje aktivnosti bolesti i usporedbu s endoskopskim i kliničkim nalazima. Prednost markera koji se mjere iz uzorka stolice jest u neinvazivnosti i jednostavnosti postupka uzorkovanja, a studije su ukazale da biomarkeri u stolici reprezentativno odražavaju upalna zbivanja na crijevnoj sluznici i više su specifični za to u odnosu na serumske markere (96, 97). Naprimjer, za fekalni kalprotektin uočena je pozitivna korelacija s endoskopskim i kliničkim indeksima aktivnosti bolesti, isto kao i s vrijednostima serumskog albumina, CRP-a, sedimentacije eritrocita i hemoglobina, što ga čini pouzdanim biomarkerom (96). Osim kalprotektina često su u primjeni i laktoferin kao produkt degranulacije leukocita, alfa-1-antitripsin koji je pokazatelj oštećenja crijevnih barijera, eozinofilni kationski protein i lizozim, uz stalno uvođenje novih markera čija su ispitivanja u pretkliničkim i kliničkim studijama u tijeku (97, 98).

Među prvim istraživanjima koja se bave tom problematikom bila je studija Devos i suradnika, koji su ukazali na povišene razine glijalnih proteina i proupalnih citokina TNF- α , interleukina 1 β , interleukina 6 u uzorku stolice kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti (89). U studiji Mulak i suradnika ispitivane su vrijednosti fekalnog kalprotektina i zonulina te su opisane povišene vrijednosti kalprotektina u uzorku stolice bolesnika s Parkinsonovom bolesti, dok za zonulin nisu pronađene razlike između bolesnika i kontrolne skupine (99). Studija Aho i suradnika također ukazuje na povišene vrijednosti kalprotektina u uzorku stolice bolesnika s Parkinsonovom bolesti, izraženije kod ženskog spola, a za zonulin, iako nisu utvrđene povišene koncentracije u bolesnika, dokazana je negativna korelacija s težinom motoričkih i nemotoričkih simptoma bolesti i povezanost s raznolikošću i sastavom mikrobiote (69). Razine upalnih markera u tom istraživanju mjerene su i u serumu te nije utvrđena povezanost s

razinama markera u stolici (69). Studija Dumitrescu i suradnika također opisuje povišene razine kalprotektina i zonulina u uzorcima seruma i stolice kod bolesnika u odnosu na kontrole (100).

Širi spektar markera intestinalne upale mjeren je u studiji Schwiertz i suradnika u kojoj su uočene povišene vrijednosti kalprotektina u bolesnika s Parkinsonovom bolesti te povišene vrijednosti alfa-1-antitripsina i zonulina, markera koji se koriste u procjeni crijevne permeabilnosti, dok su vrijednosti laktoferina pokazivale trend prema povišenim vrijednostima iako nisu nađene značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu (76). Na slične rezultate ukazuje i studija Hor i suradnika u kojoj su uočene povišene vrijednosti kalprotektina u stolici kod bolesnika u odnosu na kontrole, uz značajne razlike u vrijednostima kalprotektina s porastom dobi, dok povezanost s kliničkom slikom i težinom motoričkih i nemotoričkih simptoma nije utvrđena (101). U istoj studiji napravljena je usporedba prosječnih vrijednosti kalprotektina s vrijednostima koje se nalaze u bolesnika s aktivnom upalnom bolesti crijeva te su uočene niže vrijednosti u bolesnika s Parkinsonovom bolesti, zbog čega autori ukazuju na postojanje upale niskog tipa, odnosno supkliničku upalu u Parkinsonovoj bolesti (101).

Nastavno na istraživanja koja su ukazala na postojanje intestinalne upale u bolesnika s Parkinsonovom bolesti, recentne studije bave se i proučavanjem komponenti metaboloma u uzorcima stolice bolesnika te su tako utvrđene snižene vrijednosti nikotinamida, aktivne forme vitamina B3, koji ima neuroprotektivnu ulogu, djeluje protuupalno i kao antioksidans, a proizvodi ga i crijevna mikrobiota (102). Opisane su i snižene vrijednosti alanin betaina, dok su vrijednosti esencijalne aminokiseline valina bile povišene u uzorku stolice bolesnika (102). Usporedbu metaboličkih komponenti s vrijednostima fekalnog kalprotektina opisuju Augustin i suradnici koji su potvrdili povišene vrijednosti kalprotektina u bolesnika s Parkinsonovom bolesti, a utvrđena je i pozitivna korelacija između unosa šećera maltoze u prehrani s vrijednostima kalprotektina (103). Autori te studije naglašavaju utjecaj komponenata prehrane na metabolom, što posljedično dovodi do promjena sastava crijevne mikrobiote i nastanka intestinalne upale koja prethodi neuroupali i razvoju Parkinsonove bolesti (103).

1.5.2. Kalprotektin

Kalprotektin je protein u obliku dimera sastavljen od podjedinica S100A8 i S100A9 koje vežu cink i kalcij (104). Najveći dio kalprotektina u organizmu nalazi se u citosolu neutrofila, a sadrže ga i monociti, makrofazi, dendritičke stanice, oralni keratociti i skvamozni mukozni epitel (104). U uvjetima upale, kao odgovor na upalne medijatore ili bakterijske antigene, leukociti pojačano luče kalprotektin, dominantno neutrofili te on tada ostvaruje svoja

antimikrobna svojstva (104, 105). Kalprotektin se može pronaći u serumu, stolici, likvoru, urinu, sinovijalnoj tekućini, a koncentracije u stolici do šest su puta veće nego u plazmi, zbog čega se često koristi kao marker upalnih procesa u probavnom sustavu (104). Funkcije kalprotektina u modulaciji upalnog odgovora brojne su, počevši od kemotaksije neutrofila i regrutiranja leukocita te transporta arahidonske kiseline iz krvi do mjesta upale, potiče ekspresiju proupalnih i protuupalnih medijatora te u kroničnim upalnim procesima djeluje na staničnu proliferaciju, diferencijaciju i proces apoptoze (104, 105).

Iako se klinička primjena kalprotektina najčešće spominje u kontekstu dijagnoze i praćenja bolesnika s upalnim bolestima crijeva, važno je naglasiti da nije specifičan marker za te bolesti, već se može naći u povišenim koncentracijama i u drugim stanjima poput kolorektalnog karcinoma, gastrointestinalnih infekcija i nekrotizirajućeg enterokolitisa (104, 105). Ipak u bolesnika s upalnim bolestima crijeva vrijednosti kalprotektina pozitivno koreliraju s endoskopskim nalazom i težinom kliničke slike (104, 105). Određivanje kalprotektina neinvazivno je, jednostavno, a s obzirom na to da se nalazi homogeno raspoređen u uzorku stolice uz stabilnost na sobnoj temperaturi i do tri dana, vrlo je pouzdan marker za svakodnevnu kliničku primjenu (104, 105).

Vrijednosti u zdravih osoba su do 50 $\mu\text{g/g}$, a za dijagnosticiranje upalnih bolesti crijeva nema jasno definirane granice jer se značajno povišene vrijednosti mogu pronaći i u sklopu infektivnih zbivanja (105). Ipak većina autora sugerira ako je kalprotektin iznad 250 $\mu\text{g/g}$ da postoji visoka vjerojatnost za dijagnozu upalnih bolesti crijeva (105). S druge strane blago povišene vrijednosti do 90 $\mu\text{g/g}$ često se nalaze u stanjima subkliničke upale, virusnim infekcijama, gastrointestinalnim krvarenjima te kod uzimanja lijekova poput inhibitora protonske pumpe, nesteroidnih protuupalnih lijekova ili levodope, što je potrebno sagledati kod tumačenja rezultata (105).

1.5.3. Beta-defenzin 2

Beta-defenzini s alfa-defenzinima pripadaju skupini antimikrobnih peptida, komponenata urođenog imunološkog odgovora, čija je primarna uloga eliminacija mikroba uključujući bakterije, viruse i gljive (106). Za razliku od alfa-defenzina koji su prisutni u neutrofilima i Panethovim stanicama na dnu Lieberkühnovih kripti, beta-defenzini nalaze se raspoređeni po svim epitelnim površinama poput kože, crijeva i urogenitalnog trakta (106). Opisane su četiri različite vrste beta-defenzina, za podtip 2 svojstvena je aktivacija proupalnim citokinima, proizvode ga epitelne stanice crijeva (106,107). Točni mehanizmi aktivacije nisu u potpunosti

poznati. Većina istraživanja upućuje na to da se izlučuju kao odgovor na prisutnost bakterijskih lipopolisaharida posredovano citokinima i stanicama CD-14 (106, 107).

Učinci beta-defenzina višestruki su, a najznačajniji je izravni baktericidni učinak koji se očituje formiranjem propusnih spojeva na staničnoj membrani bakterije posljedično dovodeći do narušavanja integriteta i propadanja stanica (108). Deficit beta-defenzina uočen je u bolesnika s upalnim bolestima crijeva, što ukazuje na primarno protektivnu ulogu tih peptida (108). Također je opisana i protuupalna uloga beta-defenzina putem smanjenja proizvodnje proupalnih citokina poput TNF- α te su pronađene povišene koncentracije beta-defenzina u ulkusima stopala kod dijabetičara, što je potaknulo razmišljanja o njihovoj ulozi u cijeljenju rana i ulkusa (108).

Beta-defenzin 2 u stolici jedan je od markera intestinalne upale čija je klinička primjena rijetka te se uglavnom koristi u svrhu istraživanja, a normalnom koncentracijom smatra se vrijednost od 8 do 60 ng/ml (108, 109). Kod bolesnika s upalnim bolestima crijeva opisane su povišene koncentracije beta-defenzina 2 u stolici kod obje skupine bolesnika s upalnim bolestima crijeva, te pozitivna prediktivna vrijednost za dijagnozu upalnih bolesti crijeva samostalno ili u kombinaciji s kalprotektinom, što ukazuje i na njegovu moguću primjenu u kliničkoj praksi (109).

1.5.4. Sekretorni IgA

Lamina propria crijevne sluznice bogata je plazma-stanicama koje izlučuju sIgA, antitijelo u obliku dimera međusobno povezanih J-proteinom na koji je vezana sekretorna komponenta koju čini polimerični imunoglobulinski receptor (110). Djelovanje sIgA usmjereno je na zaštitu crijevne sluznice od vanjskih patogena, a osim na crijevnoj sluznici takvi se kompleksi mogu pronaći i na sluznici urogenitalnog trakta, respiratornoj sluznici, u suzama, slini i kolostrumu (110, 111). Vezanjem na viruse i bakterije formira s njima komplekse te tako sprječava prodor patogena prema epitelnim stanicama i pridonosi očuvanju integriteta crijevne barijere (110). Dodatno, i bakterije mogu ulaziti u interakcije s kompleksima sIgA i posredstvom antitijela modulirati imunološki odgovor na sluznici, što je dokazano u novijim studijama (111, 112). Obično se radi o interakciji komenzalnih bakterija koje tako potiču imunološku toleranciju u normalnim uvjetima (112). Referentne vrijednosti u stolici kreću se od 510 do 2040 μ g/ml, smanjuju se s godinama, a procjenjuje se da se dnevno iz enterocita u lumen crijeva izluči oko 3 g sIgA (110, 112).

1.5.5. Zonulin

Zonulin je protein otkriven 2000. godine koji nastaje u jetri i stanicama crijevnog epitela kao prekursor u proizvodnji haptoglobina 2 (113). Prvi je poznati protein koji na razini crijevnog epitela reverzibilno regulira propusnost međustaničnih spojeva transaktivacijom receptora epidermalnog čimbenika rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) uz pomoć proteinaza aktivirajućeg receptora (engl. *proteinase activated receptors*, PAR₂) te tako pridonosi povećanju crijeвне permeabilnosti (113). U takvim uvjetima narušen je integritet crijeвне barijere uz olakšanu translokaciju bakterija i stranih antigena iz lumena crijeva u krvotok, što posljedično dovodi do aktivacije sustavnog upalnog odgovora uz porast razine CRP-a, interleukina 6 i TNF- α (113, 114).

Mehanizmi koji dovode do aktivacije zonulina nisu u potpunosti istraženi, ali je poznato da izloženost sluznice tankog crijeva bakterijama ili glutenu može potaknuti njegovo otpuštanje (113, 115). Normalne vrijednosti razlikuju se ovisno o autorima. Prema studiji Jendraszak i suradnika, kao referentne korištene su vrijednosti 61 ng/ml ($\pm$ 46 ng/ml) (110). Povišene koncentracije zonulina u serumu ili stolici dokazane su u različitim bolestima poput celijakije, šećerne bolesti, pretilosti, drugim autoimunim bolestima, malignim bolestima, u upalnim bolestima crijeva i Parkinsonovoj bolesti (113, 115).

1.5.6. Alfa-1-antitripsin

Alfa-1-antitripsin je cirkulirajući glikoprotein sintetiziran dominantno u hepatocitima, dok manji dio proizvode i monociti, makrofazi, enterociti i stanice endotela, alveolarne stanice pluća i gušterača (116). Ima višestruke funkcije u organizmu, od protuupalnog, imunomodulatornog do antiinfektivnog djelovanja, reaktant je akutne faze upale i inhibitor djelovanja proteaza (116).

Uočene su povišene vrijednosti alfa-1-antitripsina u stolici kod bolesnika s ulceroznim kolitisom i Crohnovom bolesti, gdje je dokazana i pozitivna korelacija s endoskopskim bodovnim sustavima aktivnosti bolesti (117). Također povišene koncentracije ukazuju na oštećenje crijeвне barijere i povećan gubitak proteina u probavnom sustavu, zbog čega se mjerenje vrijednosti alfa-1-antitripsina u stolici koristi u procjeni intestinalne upale kod bolesnika s upalnim bolestima crijeva, ali i drugim stanjima sa sumnjom na enteropatiju s gubitkom proteina, a povišenima se smatraju vrijednosti veće od 54 mg/dl (117, 118).

1.5.7. Laktoferin

Laktoferin je funkcionalni glikoprotein fleksibilne strukture koja mu omogućava različite funkcije u organizmu poput inhibicije rasta tumora, obrane domaćina, antimikrobne aktivnosti, antioksidativnog djelovanja i regulacije stanične proliferacije i diferencijacije te sposobnosti vezanja iona željeza (119). Može se pronaći u serumu, slini, uzorku stolice, majčinom mlijeku, suzama i drugim sekretima, a važan je biomarker u procjeni aktivnosti intestinalne upale kod bolesnika s Crohnovom bolesti i ulceroznim kolitisom, gdje su uočene pozitivne korelacije s histološkim i endoskopskim procjenama upalne aktivnosti (119, 120).

U probavnom sustavu nalazi se pohranjen u granulama neutrofila iz kojih se otpušta u uvjetima intestinalne upale kada se bilježi porast broja neutrofila u području mukoze uz porast koncentracije laktoferina u lumenu crijeva (121). Nalazi se visoko stabilan u uzorku stolice i do sedam dana na sobnoj temperaturi, a većina autora definira normalne vrijednosti do 7,25 µg/ml (120, 121).

Dosadašnje studije su ukazale da porast koncentracije fekalnog laktoferina pouzdano odražava upalna zbivanja na razini crijevne sluznice čak i u stanjima kada markeri sistemske upale poput CRP-a i sedimentacije eritrocita pokazuju uredne vrijednosti (120,121). Dodatno, sistemska upalna zbivanja ne dovode do porasta koncentracije fekalnog laktoferina zbog čega je ovaj marker široko prihvaćen i u kliničkoj praksi s ciljem detekcije intestinalne upale (120, 121).

1.6. Očekivani znanstveni doprinos istraživanja

Dosadašnje spoznaje o Parkinsonovoj bolesti ukazuju na sve veći značaj periferne upale koja putem osovine crijevo-mozak potiče neurodegenerativne procese kako na periferiji tako i na razini središnjeg živčanog sustava (60). Iako etiologija bolesti i dalje nije jasna, više je studija ukazalo na disbiozu crijevnog mikrobioma i postojanje upalnog procesa na razini crijevne sluznice kao važne čimbenike u patogenezi bolesti (60, 61).

U velikog dijela bolesnika s Parkinsonovom bolesti upravo bi promjene na razini crijevne sluznice mogle biti pokretač upalnih zbivanja koja potom dovode do klasične prezentacije bolesti. Definiranjem različitih kliničkih podtipova bolesti pojavila su se i razmišljanja o različitim patofiziološkim procesima u podlozi i posljedično tomu primjeni terapijskih opcija individualno prilagođenih svakom bolesniku (30).

Primjenom neinvazivnih markera intestinalne upale postoji mogućnost definiranja skupina bolesnika kod kojih upalni proces na crijevnoj sluznici ima značajnu ulogu. Također, definiranjem povezanosti upalnog procesa na periferiji s kliničkom prezentacijom bolesti otvaraju se nove ciljane terapijske opcije poput terapije probioticima ili transplantacije mikrobiote uz mogućnost uočavanja bolesti u prodromalnoj fazi i prevencije daljnjeg napredovanja simptoma.

2. HIPOTEZA

1. Bolesnici s Parkinsonovom bolesti imaju povišene razine markera intestinalne upale u uzorku stolice u odnosu na zdrave ispitanike.
2. Bolesnici kod kojih su povišeni markeri intestinalne upale imaju odlike tzv. *body-first*-podtipa Parkinsonove bolesti.
3. Bolesnici s malignim podtipom Parkinsonove bolesti imaju veće vrijednosti markera intestinalne upale u odnosu na ostale podskupine bolesnika.

3. CILJEVI

1. Usporediti vrijednosti markera intestinalne upale u uzorku stolice bolesnika s Parkinsonovom bolesti u odnosu na zdrave ispitanike. Ispitivanje će obuhvatiti određivanje vrijednosti kalprotektina, zonulina, laktoferina, alfa-1-antitripsina, beta-defenzina 2, lizozima i sIgA.
2. U ispitivanom uzorku bolesnika s Parkinsonovom bolesti cilj je odrediti klinički podtip bolesti, procijeniti težinu motoričkih simptoma, pojavnost motoričkih komplikacija bolesti, težinu nemotoričkih simptoma i aktivnosti dnevnog življenja, procijeniti autonomne i kognitivne funkcije, utvrditi pojavnost depresije, anksioznosti i poremećaja sna.
3. Ispitati povezanost vrijednosti markera intestinalne upale u stolici bolesnika s Parkinsonovom bolesti s kliničkim podtipom bolesti, težinom motoričkih simptoma, pojavnosti motoričkih komplikacija bolesti, težinom nemotoričkih simptoma, autonomnim i kognitivnim funkcijama te pojavnosti depresije, anksioznosti i poremećaja sna u bolesnika s Parkinsonovom bolesti.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ustroj studije

Istraživanje je provedeno kao presječna studija (engl. *case-control study*) na Klinici za neurologiju i Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek od srpnja 2021. godine do rujna 2023. godine. Za istraživanje je dobiveno odobrenje Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Osijek (R1/6414/2021, 11. 5. 2021.) i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (klasa 602-04/21-08/07, broj: 2158-61-07-21-158, 14. 7. 2021.).

4.2. Ispitanici

U istraživanju je sudjelovalo ukupno 128 ispitanika, od čega 64 ispitanika u skupini bolesnika s Parkinsonovom bolesti i 64 zdrava ispitanika u kontrolnoj skupini.

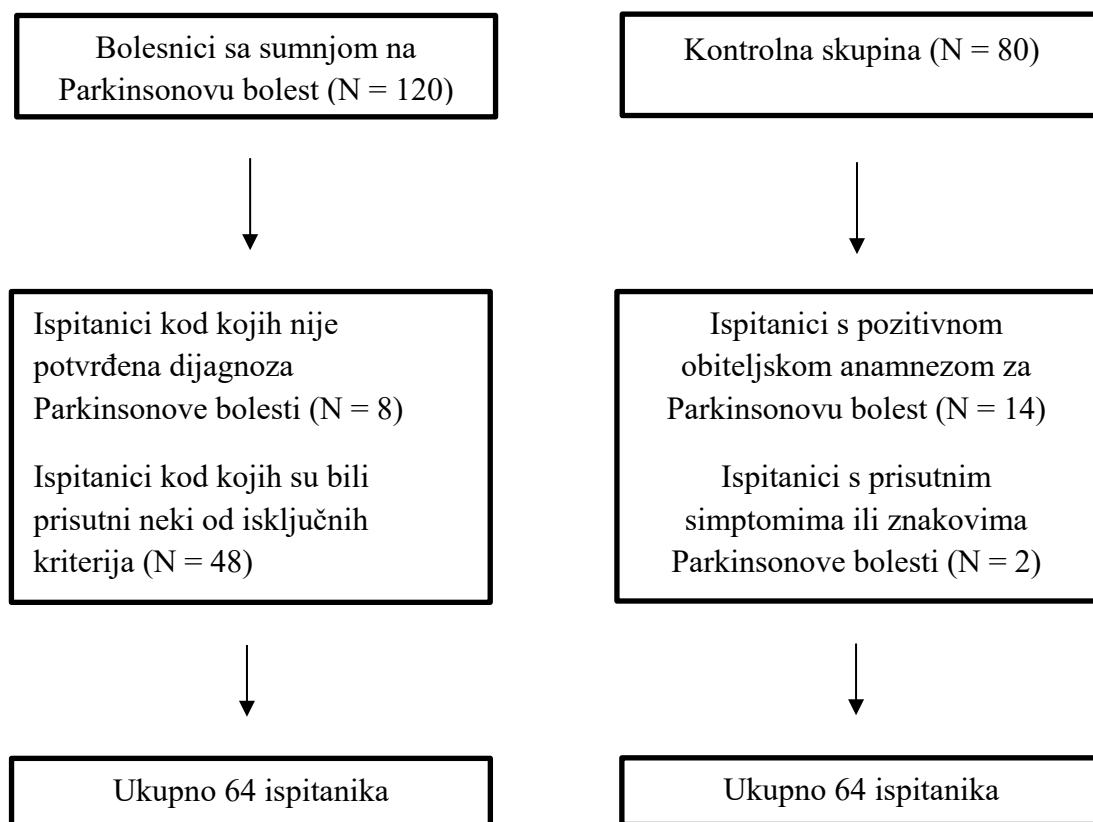
U skupinu bolesnika s Parkinsonovom bolesti uključeni su pacijenti koji su tijekom provođenja istraživanja liječeni na Klinici za neurologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek te kojima je dijagnoza bolesti postavljena u skladu s MDS-dijagnostičkim kriterijima (27).

Kriteriji za isključivanje iz studije u skupini bolesnika s Parkinsonovom bolesti bili su prisutnost upalnih, malignih, autoimunih ili infektivnih bolesti te bolesti gastrointestinalnog sustava. Dodatno, iz istraživanja su isključeni bolesnici koji su u prethodnih mjesec dana liječeni antibioticima, nesteroidnim antireumaticima, antibioticima, probioticima ili inhibitorima protonske pumpe, kao i bolesnici s organskim bolestima mozga, demencijom i nepokretni bolesnici zbog nemogućnosti odgovarajuće procjene kliničkih parametara.

Kontrolnu skupinu činili su zdravi odrasli ispitanici slične raspodjele dobi i spola kao skupina bolesnika s Parkinsonovom bolesti.

Kriteriji za isključivanje ispitanika iz kontrolne skupine bili su jednaki kao i za skupinu bolesnika. Dodatno, iz kontrolne skupine isključeni su ispitanici s pozitivnom obiteljskom anamnezom za Parkinsonovu bolest i ispitanici kod kojih su u trenutku provođenja istraživanja bili prisutni simptomi ili znakovi Parkinsonove bolesti.

Algoritam uključivanja ispitanika u skupini bolesnika s Parkinsonovom bolesti i kontrolnoj skupini prikazan je na slici 4.1.



Slika 4. 1. Algoritam uključivanja ispitanika u istraživanje

4.3. Metode

4.3.1. Upitnici za provođenje istraživanja

Svi ispitanici su nakon ishođenja suglasnosti za provođenje istraživanja popunili opći sociodemografski upitnik koji je osmislila autorica istraživanja, u kojemu su u skupini bolesnika s Parkinsonovom bolesti ispitivani dob i spol, duljina trajanja bolesti koja se odnosila na vrijeme od uočenih prvih simptoma bolesti do trenutka provođenja istraživanja te komorbiditeti ako su bili prisutni, kao i terapija koju su bolesnici uzimali u proteklih mjesec dana.

Ispitanici iz kontrolne skupine također su popunili opći sociodemografski upitnik koji je osmislila autorica istraživanja, u kojemu su ispitivani dob, spol, komorbiditeti i lijekovi koje su ispitanici uzimali u proteklih mjesec dana. Nadalje, ispitanici kontrolne skupine ispitani su o

eventualnoj prisutnosti simptoma i znakova Parkinsonove bolesti u trenutku istraživanja te prisutnosti bolesti u obiteljskoj anamnezi.

Bolesnike s Parkinsonovom bolesti nakon općeg dijela istraživanja pregledao je specijalist neurologije kako bi se procijenila prisutnost motoričkih znakova bolesti pomoću ocjenskog upitnika MDS-UPDRS III i IV (engl. *Movement Disorder Society Unified Parkinson's Disease Rating Scale*), a preostali dio istraživanja koji se sastojao od procjene motoričkih i nemotoričkih simptoma provela je autorica istraživanja (122).

Za procjenu težine motoričkih i nemotoričkih simptoma bolesti korištena je ocjenska ljestvica MDS-UPDRS, a za procjenu stadija bolesti ocjenska ljestvica H&Y (engl. *Hoehn&Yahr*) (122, 123). Prisutnost nemotoričkih simptoma dodatno je procijenjena pomoću ocjenske ljestvice MDS-NMS (engl. *Movement Disorder Society Nonmotor Rating Scale*), a testiranje autonomnih funkcija učinjeno je pomoću ocjenske ljestvice SCOPA-AUT (engl. *Scales for Outcomes in Parkinson's Disease-Autonomic Dysfunction*) (124, 125). Za testiranje kognitivnih funkcija korištena je ocjenska ljestvica MoCa (engl. *Montreal Cognitive Assessment*), za testiranje poremećaja spavanja ocjenska ljestvica PDSS-2 (engl. *Parkinson Disease Sleep Scale-2*) i ocjenski upitnik RBDSQ (engl. *REM sleep behavior disorder screening questionnaire*), za procjenu postojanja simptoma depresije ocjenska ljestvica BDI-II (engl. *Beck Depression Inventory II*), a za anksioznost ocjenska ljestvica BAI (engl. *Beck Anxiety Inventory*) (126 - 130). Za sve navedene ljestvice ishoda je suglasnost za korištenje u istraživanju izdana od strane samih autora.

Ljestvica MDS-UPDRS sastoji se od 4 dijela, pri čemu se za svako pitanje težina simptoma boduje na ljestvici od 0 do 4. Nula označava odsutnost ispitivanih simptoma, 1 bod vrlo blage simptome, 2 boda blage simptome, 3 boda simptome srednjeg intenziteta i 4 boda za simptome težeg intenziteta.

Prvi dio ljestvice ispituje nemotoričke aspekte svakodnevnog života, a sastoji se od ukupno 13 pitanja s rasponom mogućeg rezultata od 0 do 52 kojima se ispituje prisutnost kognitivnog oštećenja, psihoze ili halucinacija, depresije, anksioznosti, apatije, dopaminske disregulacije, problema sa spavanjem, dnevne pospanosti, bolova, problema s mokrenjem, konstipacije, sinkope, vrtoglavice ili omaglice te umora, a provodi se uzimanjem anamnestičkih podataka.

Drugi dio ljestvice ispituje motoričke aspekte svakodnevnog života također uzimanjem anamnestičkih podataka, a sastoji se od 13 pitanja s rasponom mogućeg rezultata od 0 do 52.

Pitanja obuhvaćaju sljedeće aspekte: smetnje govora, sijaloreju, smetnje gutanja, poteškoće pri hranjenju, odijevanju, obavljanju higijene, promjene rukopisa, poteškoće pri obavljanju hobija, okretanje u krevetu, tremor, smetnje hoda i ukočenost pri kretanju.

Treći dio ljestvice ocjenjuje neurolog na temelju kliničkog pregleda, a sastoji se od 18 pitanja s rasponom mogućeg rezultata od 0 do 132. Pitanjima su obuhvaćene procjene oštećenja govora, ekspresije lica, rigora, tapkanja prstima, pokreta ruku, izvođenja pokreta pronacije i supinacije, tapkanja nogama, okretnosti nogu, ustajanja sa stolca, održavanja ravnoteže, ukočenosti pri hodu, stabilnosti i držanja, bradikinezije, posturalnog tremora ruku, kinetičkog tremora ruku, amplitude tremora u mirovanju i konstantnosti tremora u mirovanju. Pitanja koja obuhvaćaju procjenu motoričkog oštećenja na razini svih ekstremiteta ili lijeve i desne strane tijela nose više bodova zbog zasebnih ocjena svakog ispitivanog segmenta.

Četvrti dio ljestvice također ocjenjuje neurolog pri kliničkom pregledu, sastoji se od 6 pitanja s rasponom mogućeg rezultata od 0 do 24 kojim se procjenjuje prisutnost motoričkih komplikacija nastalih kao posljedica terapije, a obuhvaća procjenu diskinezije ocjenjivanjem vremena provedenog s diskinezijama i funkcionalnog utjecaja diskinezija na svakodnevni život, procjenu motoričkih fluktuacija ocjenjivanjem vremena u kojemu su prisutne tijekom dana, funkcionalnog utjecaja i kompleksnosti fluktuacija te procjenu vremena distonije. Ljestvica nema granični broj bodova (engl. *cut-off*), te se analizira ukupan zbroj bodova svakog segmenta (122).

Za procjenu stadija Parkinsonove bolesti korištena je ocjenska ljestvica H&Y koja se sastoji od 6 mogućih stadija bolesti, pri čemu 0 označava asimptomatske bolesnike, 1 bolesnike s unilateralnom zahvaćenošću, 2 bolesnike s bilateralnom zahvaćenošću bez smetnji ravnoteže, 3 bolesnike s bilateralnom zahvaćenošću kod kojih je prisutna posturalna nestabilnost ali su i dalje fizički neovisni o pomoći, 4 bolesnike s teškim disabilitetom koji još mogu hodati ili stajati bez asistencije te 5 bolesnike koji su vezani za krevet ili kolica ako nemaju pomoć (123).

Dodatno, za procjenu nemotoričkih simptoma korišten je upitnik MDS-NMS kojim se na 13 različitih polja procjenjuje težina i prosječno trajanje simptoma u rasponu od 0 do 4. Ako simptomi nisu prisutni tijekom dana dodaje se 0, 1 ako su rijetko prisutni ($\leq 10\%$ ukupnog vremena), 2 ako su ponekad prisutni ($11 - 25\%$ vremena), 3 ako su često prisutni ($26 - 50\%$ vremena) i 4 ako su prisutni većinu vremena ($\geq 51\%$ vremena). Težina simptoma ocjenjuje se s 0 ako nisu prisutni, 1 za minimalne simptome, 2 za blage, 3 za simptome srednjeg intenziteta i 4 za simptome težeg intenziteta. Ukupna vrijednost komponente težine i trajanja simptoma

množi se tako da je mogući raspon rezultata za svaki simptom od 0 do 16. Tom ljestvicom ocjenjuje se prisutnost simptoma depresije, anksioznosti, apatije, psihoze, poteškoće kontrole impulsa, kognitivnih oštećenja, prisutnost ortostatske hipotenzije, smetnji mokrenja, seksualne disfunkcije, gastrointestinalnih simptoma, smetnji spavanja, bolova uz zadnje polje koje obuhvaća ostale simptome poput gubitka na težini, smetnji njuha, umora i prekomjernog znojenja. Ljestvica nema granični broj bodova (engl. *cut-off*), te se analizira ukupan zbroj bodova svakog segmenta (124).

Za testiranje autonomnih funkcija korištena je ljestvica SCOPA-AUT koja se sastoji od 26 pitanja, pri čemu se svako pitanje označava brojem bodova od 0 do 3. Nula označava nepostojanje simptoma, 1 bod dodaje se ako su simptomi ponekad prisutni, 2 boda ako su redovito prisutni i 3 boda ako su često prisutni. Pitanja od 0 do 7 odnose se na gastrointestinalne simptome, pitanja od 8 do 13 na smetnje mokrenja, pitanja od 14 do 16 na kardiovaskularne disfunkcije, pitanja 17, 18, 20 i 21 na smetnje termoregulacije, pitanje 19 na prisutnost pupilomotorne disfunkcije, a pitanja od 22 do 25 na seksualne disfunkcije. Dodatno, pitanje 26 odnosi se na korištenje lijekova za konstipaciju, probleme s mokrenjem, krvni tlak ili druge simptome u proteklih mjesec dana. Ljestvica nema granični broj bodova (engl. *cut-off*), te se analizira ukupan zbroj bodova svakog segmenta (125).

Ljestvicom MoCa testirane su kognitivne funkcije ocjenjivanjem 7 različitih polja koja se odnose na vizuospacijalne vještine, imenovanje predmeta, pamćenje, testiranje pažnje, jezika, apstraktnog mišljenja i odgođenog prisjećanja te orijentacije. Maksimalni broj bodova ljestvice iznosi 30, pri čemu je potrebno dodati 1 bod za sve ispitanike koji imaju ≤ 12 godina školovanja. Ljestvica nema granični broj bodova (engl. *cut-off*), te se analizira ukupan zbroj bodova (126).

Za testiranje poremećaja spavanja korištena je ljestvica PDSS-2 koja se sastoji od 15 pitanja s mogućim rasponom bodova od 0 do 4 za svako pitanje, ovisno o prisutnosti tegoba. Ako su ispitivane tegobe prisutne 6 do 7 dana u tjednu, označavaju se kao vrlo česte, 4 do 5 dana u tjednu kao često, 2 do 3 dana u tjednu kao ponekad prisutne, 1 dan u tjednu kao povremeno prisutne i nikada ako tegobe nisu prisutne te im se u skladu s tim dodjeljuje odgovarajući broj bodova. Ljestvica nema granični broj bodova (engl. *cut-off*), te se analizira ukupan zbroj bodova (127).

Dodatno, korišten je i upitnik RBDSQ kako bi se procijenila prisutnost poremećaja spavanja u REM-fazi. Upitnik sadrži 10 pitanja s ukupno 13 tvrdnji koje se ocjenjuju pozitivnim ili

negativnim odgovorom. Vrijednost od 6 ili više bodova ocijenjena je kao pozitivna za postojanje REM-poremećaja spavanja (128).

Za procjenu simptoma depresije korišten je upitnik BDI-II koji sadrži 21 pitanje s rasponom bodova od 0 do 3 za svako pitanje. Ukupni broj bodova od 0 do 13 označava minimalnu depresiju, 14 do 19 blagu, 20 do 28 depresiju srednjeg intenziteta i 29 do 63 tešku depresiju (129).

Za procjenu anksioznosti korišten je BAI sastavljen od 21 pitanja s rasponom bodova od 0 do 3 za svako pitanje ovisno o intenzitetu ispitivanih tegoba. Ako je zbroj svih bodova od 0 do 7, rezultat označava minimalnu anksioznost, od 8 do 15 blagu, od 16 do 25 srednju i od 26 do 63 tešku anksioznost (130).

4.3.2. Definiranje kliničkog podtipa bolesti

Klinički podtipovi bolesti definirani su prema dobi, mjestu početka bolesti i dominantnim simptomima.

Podjela prema dobi početka bolesti bolesnike svrstava u one s ranim početkom bolesti kod kojih su prvi simptomi počeli prije 50. godine života te one s kasnim početkom bolesti kod kojih su prvi simptomi uočeni tijekom 50. ili nakon 50. godine života (131, 132).

Prema mjestu početka bolesti, bolesnici su podijeljeni na one s početkom bolesti na periferiji (engl. *body-first*) i one s početkom bolesti centralno (engl. *brain-first*) (30). Koristeći upitnik RBDSQ, pacijenti su retrospektivno ispitani o postojanju simptoma REM-poremećaja spavanja u premotoričkoj fazi bolesti. Bolesnici kod kojih je poremećaj ponašanja u REM-fazi spavanja zabilježen u premotoričkoj fazi bolesti kategorizirani su kao podtip Parkinsonove bolesti s početkom bolesti na periferiji, dok su bolesnici kod kojih nisu bili prisutni poremećaji REM faze spavanja kategorizirani kao podtip Parkinsonove bolesti s početkom bolesti centralno (128).

Prema dominantnim simptomima, bolesnici su podijeljeni na blagi motorički-predominantni podtip, intermedijarni i difuzni maligni podtip bolesti u skladu s podjelom koju su predložili Fereshtehnejad i suradnici.

Podjela je ustrojena tako da su procijenjeni težina motoričkog oštećenja pomoću upitnika MDS-UPDRS II i MDS-UPDRS III, te težina nemotoričkih oštećenja koristeći se upitnikom RBDSQ

za procjenu oštećenja spavanja i ljestvicom SCOPA-AUT za procjenu autonomnog oštećenja (29).

Za svaku komponentu procijenjeno je kojoj percentili rezultat pripada u skladu s vrijednostima koje su koristili i autori, a prikazane su u tablici 4.1. (29).

Tablica 4. 1. Percentilne vrijednosti za procjenu kliničkog podtipa Parkinsonove bolesti, prema preporukama Fereshtehnejad i suradnika

Korištene ljestvice i upitnici	25. percentila	50. percentila	75. percentila
MDS-UPDRS II	3	5	8
MDS-UPDRS III	14	20	26
RBDSQ	1	3	5
SCOPA-AUT	5	8	12

Bolesnici kod kojih su ukupni motorički bodovi i svi nemotorički bodovi bili ispod 75. percentile definirani su kao blagi motorički-predominantni podtip, a difuzni maligni podtip definiran je kod svih bolesnika kod kojih su ukupni motorički bodovi bili iznad 75. percentile uz minimalno jedan nemotorički segment također iznad 75. percentile. Svi bolesnici s vrijednostima koje nisu ispunjavale kriterije za navedene podtipove definirani su kao intermedijarni podtip bolesti.

4.3.3. Određivanje vrijednosti markera intestinalne upale

Unutar tjedan dana od kliničke evaluacije svi ispitanici pripremili su uzorak stolice prikupljen u jednokratnu sterilnu posudu s navojem i čepom. Uzorci su čuvani u hladnjaku na temperaturi 4 – 8 °C i unutar 24 sata transportirani u prijenosnom hladnjaku istog raspona temperature u Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostičku Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Nakon primitka uzorka u laboratorij, učinjena je ekstrakcija analita iz uzorka stolice u tubama za ekstrakciju (engl. *stool preparation system*, SAS) (Immundiagnostik AG, Bensheim, Njemačka) pomoću odgovarajućeg pufera specifičnog za svaki od analita.

Nakon ekstrakcije uzorci su pohranjeni na -20 °C do analize koja je obavljena u sljedećih 6 tjedana. U ekstraktu stolice potom su ELISA-metodom (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) određeni sljedeći analiti: kalprotektin, laktoferin, beta-defenzin 2, sIgA, alfa-1-

antitripsin i zonulin. Patološke vrijednosti za pojedine markere prikazane su u tablici 4.2 (133 - 138).

Tablica 4. 2. Patološke vrijednosti markera intestinalne upale

Kalprotektin	$\geq 50 \mu\text{g/ml}$	sIgA	510 – 2040 $\mu\text{g/ml}$
Laktoferin	$\geq 7,25 \mu\text{g/ml}$	Alfa-1-antitripsin	$> 540 \mu\text{g/ml}$
Beta-defenzin 2	8 – 60 ng/ml	Zonulin	$< 107 \mu\text{U/ml}$

Kalprotektin je određen u uzorku ekstrakta stolice „sendvič“ ELISA-metodom pomoću reagensa Calprotectin ELISA (ImmuChrom, Heppenheim, Njemačka). Nakon uzorkovanja uzorak stolice ekstrahiran je upotrebom tuba za ekstrakciju proizvođača ImmuChrom (Heppenheim, Njemačka). Tube i potrebne otopine nabavljene su u sklopu ELISA-reagensa. Uranjanjem štapića za uzorkovanje u utore na njegovom vrhu prikupljeno je 15 mg uzorka stolice. Štapić se potom vratio u tubu u koju se dodalo 1,5 mL pufera za razrjeđenje uzoraka stolice. Tuba se potom miješala na mješaču dok se sav sadržaj stolice nije otopio u puferu. Tuba s uzorkom stolice potom se centrifugirala na 2000 g tijekom 10 min i odvojena su dva alikvota ekstrakta koji su zamrznuti na -20°C do analize. Kalprotektin u uzorku stolice nakon pripreme u tubama za ekstrakciju razrijeđen je 100 puta.

Uzorci ekstrakta stolice nakon odmrzavanja razrijeđeni su u omjeru 1 : 38,5 s puferom za razrjeđenje uzoraka stolice. Na dnu mikrotitarske pločice vezano je protutijelo koje specifično veže kalprotektin. Nakon dodatka otopina standarda i razrijeđenih uzoraka ispitanika, kalprotektin vezao se na specifično protutijelo. Nakon inkubacije reakcijske smjese tijekom 1 h na sobnoj temperaturi na *Thermoshake* miješalici (C. Gerhardt Analytical Systems, Königswinter, Njemačka), u tri koraka ispiranja uklonjene su moguće interferencije iz uzoraka ekstrakta stolice. U sljedećem koraku dodano je 100 μL sekundarnog protutijela koje također prepoznaje kalprotektin, a vezano je s enzimom peroksidazom. Reakcijska smjesa inkubirana je 1 h na sobnoj temperaturi na *Thermoshake* miješalici. Nastao je kompleks primarno protutijelo – kalprotektin – sekundarno protutijelo s enzimom peroksidazom. Nakon ponovnog ispiranja u tri koraka uklonio se višak sekundarnog protutijela i u reakcijsku smjesu dodao se supstrat 3,3', 5,5'-TMB (tetrametilbenzidin). Enzim peroksidaza oksidira TMB u radikal-kation koji boji reakcijsku smjesu u plavo. Enzimska reakcija mora se odvijati u mraku, tijekom 15 min, na horizontalnoj miješalici. Dodatkom stop-otopine (1M fosfatna kiselina), TMB radikal-kation oksidira u diimin koji boji reakcijsku smjesu u žuto. Apsorbancija nastalog obojenja mjerena je na 450 nm na ELISA-procesoru EtiMax 3000 (DiaSorin, Saluggia, Italija).

Laktoferin je određen u uzorku ekstrakta stolice „sendvič“ ELISA-metodom pomoću reagensa Human Lactoferrin ELISA (BioVendor – Laboratorni medicina a.s., Brno, Češka).

Nakon uzorkovanja uzorak stolice ekstrahiran je upotrebom tuba za ekstrakciju proizvođača ImmuChrom (Heppenheim, Njemačka). Tube i potrebne otopine nabavljene su u sklopu ELISA-reagensa. Uranjanjem štapića za uzorkovanje u utore na njegovom vrhu prikupljeno je 15 mg uzorka stolice. Štapić se potom vratio u tubu u koju se dodalo 0,75 mL pufera za ispiranje. Tuba se potom miješala na mješaču dok se sav sadržaj stolice nije otopio u puferu. Tuba s uzorkom stolice potom je centrifugirana na 2000 g tijekom 10 min i odvojena su dva alikvota ekstrakta koji su zamrznuti na -20 °C do analize. Laktoferin u uzorku stolice nakon pripreme u tubama za ekstrakciju razrijeđen je 50 puta.

Uzorci ekstrakta stolice nakon odmrzavanja razrijeđeni su u omjeru 1 : 3 s puferom za razrjeđenje uzoraka ekstrakta stolice. Na dnu mikrotitarske pločice vezano je protutijelo koje specifično veže laktoferin. Nakon dodatka otopina standarda i razrijeđenih uzoraka ispitanika, laktoferin vezao se na specifično protutijelo. Nakon inkubacije reakcijske smjese na 37 °C kroz 1 h na *Thermoshake* miješalici, u pet koraka ispiranja uklonjene su moguće interferencije iz uzoraka ekstrakta stolice. U sljedećem koraku dodano je 100 µL sekundarnog protutijela koje također prepoznaje laktoferin, a vezano je s biotinom. Reakcijska smjesa inkubirana je 1 h na 37 °C na *Thermoshake* miješalici. Ponovljen je postupak ispiranja u pet koraka kako bi se uklonilo sve nevezano sekundarno protutijelo s biotinom. Nastao je kompleks primarno protutijelo – laktoferin – sekundarno protutijelo s vezanim biotinom. U reakcijsku smjesu potom se dodalo 100 µL reagensa koji sadrži streptavidin vezan s enzimom peroksidazom. Reakcijska smjesa inkubirala se 30 min na 37 °C. Nakon ponovnog ispiranja u pet koraka uklonio se višak sekundarnog protutijela i u reakcijsku smjesu dodao se supstrat 3,3', 5,5'-TMB. Enzim peroksidaza oksidira TMB u radikal-kation koji boji reakcijsku smjesu u plavo. Enzimska reakcija mora se odvijati u mraku, tijekom 10 min, na horizontalnoj miješalici. Dodatkom stop-otopine (1M fosfatna kiselina), TMB radikal-kation oksidira u diimin koji boji reakcijsku smjesu u žuto. Apsorbancija nastalog obojenja mjerena je na 450 nm na ELISA procesoru EtiMax 3000 (DiaSorin, Saluggia, Italija).

Beta-defenzin 2 određen je u uzorku ekstrakta stolice „sendvič“ ELISA-metodom pomoću reagensa beta-defensin-2 ELISA (ImmuChrom, Heppenheim, Njemačka).

Nakon uzorkovanja uzorak stolice ekstrahiran je upotrebom tuba za ekstrakciju proizvođača ImmuChrom (Heppenheim, Njemačka). Tube i potrebne otopine nabavljene su u sklopu

ELISA-reagensa. Uranjanjem štapića za uzorkovanje u utore na njegovom vrhu prikupljeno je 15 mg uzorka stolice. Štapić se potom vratio u tubu u koju se dodalo 0,75 mL pufera za ispiranje. Tuba se potom miješala na mješaču dok se sav sadržaj stolice nije otopio u puferu. Tuba s uzorkom stolice potom je centrifugirana na 2000 g tijekom 10 min i odvojena su dva alikvota ekstrakta koji su zamrznuti na -20 °C do analize. Beta-defenzin 2 u uzorku stolice nakon pripreme u tubama za ekstrakciju razrijeđen je 50 puta.

Uzorci ekstrakta stolice nakon odmrzavanja razrijeđeni su u omjeru 1 : 4 s puferom za razrjeđenje ekstrakta stolice. Na dnu mikrotitrarske pločice vezano je protutijelo koje specifično veže beta-defenzinom 2. Nakon dodatka otopina standarda i razrijeđenih uzoraka ispitanika, beta-defenzin 2 vezao se na specifično protutijelo. Nakon inkubacije reakcijske smjese tijekom 1 h na sobnoj temperaturi na *Thermoshake* miješalici (C. Gerhardt Analytical Systems, Königswinter, Njemačka), u tri koraka ispiranja uklonjene su moguće interferencije iz uzoraka ekstrakta stolice. U sljedećem koraku dodano je 100 µL sekundarnog protutijela koje također prepoznaje beta-defenzin 2, a vezano je s enzimom peroksidazom. Reakcijska smjesa inkubirana je 1 h na sobnoj temperaturi na *Thermoshake* miješalici. Nastao je kompleks primarno protutijelo – sIgA – sekundarno protutijelo s enzimom peroksidazom. Nakon ponovnog ispiranja u tri koraka uklonio se višak sekundarnog protutijela i u reakcijsku smjesu dodao se supstrat 3,3', 5,5'-TMB. Enzim peroksidaza oksidira TMB u radikal-kation koji boji reakcijsku smjesu u plavo. Enzimska reakcija mora se odvijati u mraku, tijekom 15 min, na horizontalnoj miješalici. Dodatkom stop-otopine (1M fosfatna kiselina), TMB radikal-kation oksidira u diimin koji boji reakcijsku smjesu u žuto. Apsorbancija nastalog obojenja mjerena je na 450 nm na ELISA-procesoru EtiMax 3000 (DiaSorin, Saluggia, Italija).

Analit sIgA određen je u uzorku ekstrakta stolice „sendvič“ ELISA-metodom pomoću reagensa Secretory IgA ELISA (ImmuChrom, Heppenheim, Njemačka).

Nakon uzorkovanja uzorak stolice ekstrahiran je upotrebom tuba za ekstrakciju proizvođača ImmuChrom (Heppenheim, Njemačka). Tube i potrebne otopine nabavljene su u sklopu ELISA-reagensa. Uranjanjem štapića za uzorkovanje u utore na njegovom vrhu prikupljeno je 15 mg uzorka stolice. Štapić se potom vratio u tubu u koju se dodalo 0,75 mL pufera za ispiranje. Tuba se potom miješala na mješaču dok se sav sadržaj stolice nije otopio u puferu. Tuba s uzorkom stolice potom je centrifugirana na 2000 g tijekom 10 min i odvojena su dva alikvota ekstrakta koji su zamrznuti na -20 °C do analize. sIgA u uzorku stolice nakon pripreme u tubama za ekstrakciju razrijeđen je 50 puta.

Uzorci ekstrakta stolice nakon odmrzavanja razrijeđeni su u omjeru 1 : 250 s puferom za ispiranje. Na dnu mikrotitarske pločice vezano je protutijelo koje specifično veže sIgA. Nakon dodatka otopina standarda i razrijeđenih uzoraka ispitanika, sIgA vezao se na specifično protutijelo. Nakon inkubacije reakcijske smjese tijekom 1 h na sobnoj temperaturi na *Thermoshake* miješalici (C.Gerhardt Analytical Systems, Königswinter, Njemačka), u pet koraka ispiranja uklonjene su moguće interferencije iz uzoraka ekstrakta stolice. U sljedećem koraku dodano je 100 μ L sekundarnog protutijela koje također prepoznaje sIgA, a vezano je s enzimom peroksidazom. Reakcijska smjesa inkubirana je 1 h na sobnoj temperaturi na *Thermoshake* miješalici. Nastao je kompleks primarno protutijelo – sIgA – sekundarno protutijelo s enzimom peroksidazom. Nakon ponovnog ispiranja u pet koraka uklonio se višak sekundarnog protutijela i u reakcijsku smjesu dodao se supstrat 3,3', 5,5'-TMB. Enzim peroksidaza oksidira TMB u radikal-kation koji boji reakcijsku smjesu u plavo. Enzimska reakcija mora se odvijati u mraku, tijekom 15 min, na horizontalnoj miješalici. Dodatkom stop-otopine (1M fosfatna kiselina), TMB radikal-kation oksidira u diimin koji boji reakcijsku smjesu u žuto. Apsorbancija nastalog obojenja mjerena je na 450 nm na ELISA-procesoru EtiMax 3000 (DiaSorin, Saluggia, Italija).

Alfa-1-antitripsin određen je u uzorku ekstrakta stolice „sendvič“ ELISA-metodom (engl. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) pomoću reagensa Alpha-1-Antytrypsin ELISA (ImmuChrom, Heppenheim, Njemačka).

Nakon uzorkovanja uzorak stolice ekstrahiran je upotrebom tuba za ekstrakciju proizvođača ImmuChrom (Heppenheim, Njemačka). Tube i potrebne otopine nabavljene su u sklopu ELISA-reagensa. Uranjanjem štapića za uzorkovanje u utore na njegovom vrhu prikupljeno je 15 mg uzorka stolice. Štapić se potom vratio u tubu u koju se dodalo 0,75 mL pufera za ispiranje. Tuba se potom miješala na mješaču dok se sav sadržaj stolice nije otopio u puferu. Tuba s uzorkom stolice potom je centrifugirana na 2000 g tijekom 10 min i odvojena su dva alikvota ekstrakta koji su zamrznuti na -20 °C do analize. Alfa-1-antitripsin u uzorku stolice nakon pripreme u tubama za ekstrakciju razrijeđen je 50 puta.

Uzorci ekstrakta stolice nakon odmrzavanja razrijeđeni su u omjeru 1 : 250 s puferom za ispiranje. Na dnu mikrotitarske pločice vezano je protutijelo koje specifično veže alfa-1-antitripsin. Nakon dodatka otopina standarda i razrijeđenih uzoraka ispitanika, alfa-1-antitripsin vezao se na specifično protutijelo. Nakon inkubacije reakcijske smjese tijekom 1 h na sobnoj temperaturi na *Thermoshake* miješalici (C. Gerhardt Analytical Systems, Königswinter,

Njemačka), u pet koraka ispiranja uklonjene su moguće interferencije iz uzoraka ekstrakta stolice. U sljedećem koraku dodano je 100 μ L sekundarnog protutijela koje također prepoznaje alfa-1-antitripsin, a vezano je s enzimom peroksidazom. Reakcijska smjesa inkubirana je 1 h na sobnoj temperaturi na *Thermoshake* miješalici. Nastao je kompleks primarno protutijelo – alfa-1-antitripsin – sekundarno protutijelo s enzimom peroksidazom. Nakon ponovnog ispiranja u pet koraka uklonio se višak sekundarnog protutijela i u reakcijsku smjesu dodao se supstrat 3,3', 5,5'-TMB. Enzim peroksidaza oksidira TMB u radikal-kation koji boji reakcijsku smjesu u plavo. Enzimska reakcija mora se odvijati u mraku, tijekom 15 min, na horizontalnoj miješalici. Dodatkom stop-otopine (1M fosfatna kiselina), TMB radikal-kation oksidira u diimin koji boji reakcijsku smjesu u žuto. Apsorbancija nastalog obojenja mjerena je na 450 nm na ELISA-procesoru EtiMax 3000 (DiaSorin, Saluggia, Italija).

Zonulin je određen u uzorku ekstrakta stolice kompetitivnom ELISA-metodom pomoću reagensa *ELISA for determination of a Zonulin fragment in stool* (ImmuChrom, Heppenheim, Njemačka).

Nakon uzorkovanja uzorak stolice ekstrahiran je upotrebom tuba za ekstrakciju proizvođača ImmuChrom (Heppenheim, Njemačka). Tube i potrebne otopine nabavljene su u sklopu ELISA-reagensa. Uranjanjem štapića za uzorkovanje u utore na njegovom vrhu prikupljeno je 15 mg uzorka stolice. Štapić se potom vratio u tubu u koju se dodalo 0,75 mL pufera za ispiranje. Tuba se potom miješala na mješaču dok se sav sadržaj stolice nije otopio u puferu. Tuba s uzorkom stolice potom je centrifugirana na 2000 g tijekom 10 min i odvojena su dva alikvota ekstrakta koji su zamrznuti na -20 °C do analize. Zonulin u uzorku stolice nakon pripreme u tubama za ekstrakciju razrijeđen je 50 puta.

Uzorci ekstrakta stolice nakon odmrzavanja razrijeđeni su u omjeru 1 : 40 s *tracer*-otopinom koja sadržava zonulin vezan s molekulom biotina. Na dnu mikrotitarske pločice vezano je protutijelo koje specifično veže zonulin. Nakon dodatka otopina standarda i razrijeđenih uzoraka ispitanika, zonulin iz uzorka stolice ispitanika i zonulin vezan s biotinom natječu se za vezna mjesta na specifičnom primarnom protutijelu. Nakon inkubacije reakcijske smjese tijekom 1 h na sobnoj temperaturi na *Thermoshake* miješalici (C. Gerhardt Analytical Systems, Königswinter, Njemačka), u tri koraka ispiranja uklonjene su moguće interferencije iz uzoraka ekstrakta stolice i višak zonulina vezanog s biotinom iz *tracer*-reagensa. U sljedećem koraku dodano je 100 μ L sekundarnog protutijela koje također prepoznaje zonulin, a vezano je streptavidinom koji nosi enzim peroksidazu. Reakcijska smjesa inkubirana je 1 h na sobnoj

temperaturi na *Thermoshake* miješalici. Nastao je kompleks primarno protutijelo – zonulin vezan s biotinom – sekundarno protutijelo s enzimom peroksidazom. Nakon ponovnog ispiranja u tri koraka uklonio se višak sekundarnog protutijela i u reakcijsku smjesu dodao se supstrat 3,3', 5,5'-TMB. Enzim peroksidaza oksidira TMB u radikal-kation koji boji reakcijsku smjesu u plavo. Enzimska reakcija mora se odvijati u mraku, tijekom 15 min, na horizontalnoj miješalici. Dodatkom stop-otopine (1M fosfatna kiselina), TMB radikal-kation oksidira u diimin koji boji reakcijsku smjesu u žuto. Apsorbancija nastalog obojenja mjerena je na 450 nm na ELISA-procesoru EtiMax 3000 (DiaSorin, Saluggia, Italija). Budući da se radi o kompetitivnom testu, intenzitet nastalog obojenja i apsorbancija obrnuto su proporcionalni koncentraciji zonulina u uzorku ispitanika.

4.4. Statističke metode

Kategorički podaci izraženi su kao apsolutne i relativne frekvencije. Numerički podaci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju normalnih distribucija, a u ostalim slučajevima medijanom i interkvartilnim rasponom. Normalnost distribucije numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Razlike u kategoričkim varijablama testirane su χ^2 -testom i po potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Mann-Whitneyev U test korišten je za testiranje razlika u razinama markera između skupina. Dodatno, korištena je logistička regresija za ispitivanje učinka markera u predviđanju vjerojatnosti razvoja Parkinsonove bolesti. Povezanost normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli procijenjena je Pearsonovim koeficijentom korelacije r , a u slučaju odstupanja od normalne distribucije Spearmanovim koeficijentom korelacije ρ (rho). Sve p vrijednosti bile su dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na $\alpha = 0,05$. Za statističku analizu korišteni su statistički programi MedCalc® Statistical Software verzija 20.100 (MedCalcSoftware Ltd., Ostend, Belgija) i SPSS Statistics for Windows, verzija 23.0 (izdana 2015., IBM Corporation, Armonk, NY, SAD).

5. REZULTATI

5.1. Opća i klinička obilježja bolesnika s Parkinsonovom bolesti i kontrolne skupine

Istraživanje je provedeno na ukupno 128 ispitanika, od kojih su 64 (50 %) bolesnika s Parkinsonovom bolesti, a 64 (50 %) su zdravi ispitanici (kontrolna skupina). S obzirom na spol, 91 (71,1 %) je muškarac, a 37 (28,9 %) je žena, bez značajne razlike u odnosu na promatrane skupine (tablica 5.1).

Tablica 5.1. Osnovna obilježja ispitanika

	Broj (%) ispitanika			p [*]
	Bolesnici s Parkinsonovom bolesti	Kontrolna skupina	Ukupno	
Spol				
Muškarci	48 (75)	43 (67,2)	91 (71,1)	0,33
Žene	16 (25)	21 (32,8)	37 (28,9)	

* χ^2 test

Medijan dobi bolesnika s Parkinsonovom bolesti iznosi 66 godina, u rasponu od najmanje 38 do najviše 80 godina bez značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu s medijanom dobi od 61 godinu, u rasponu od najmanje 50 do najviše 80 godina (tablica 5.2).

Tablica 5.2. Razlike u dobi (godine) u odnosu na skupine

	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika	95% raspon pouzdanosti	p [*]
	Bolesnici s Parkinsonovom bolesti	Kontrolna Skupina			
Dob (godine)	66 (57 – 70)	61 (58 – 65)	-4	-7 do -1	0,08

* Mann-Whitneyev U test

U skupini bolesnika s Parkinsonovom bolesti medijan dobi kod dijagnoze iznosi 60 godina s rasponom od 53 do 67 godina, a medijan trajanja bolesti 3 godine s rasponom od 2 do 6 godina.

U obje skupine ispitanika iz ekstrakta stolice odredili su se sljedeći analiti: kalprotektin, zonulin, slgA, alfa-1-antitripsin, beta-defenzin 2 i laktoferin.

U skupini bolesnika s Parkinsonovom bolesti, u odnosu na zdrave ispitanike, značajno su više vrijednosti beta-defenzina 2 (Mann-Whitneyev U test, $p = 0,004$), zonulina (Mann-Whitneyev U test, $p = 0,001$) i laktoferina (Mann-Whitneyev U test, $p < 0,001$), dok su kod kontrolne skupine značajno više vrijednosti alfa-1-antitripsina (Mann-Whitneyev U test, $p = 0,002$) (tablica 5.3).

Tablica 5.3. Razlike u vrijednostima markera intestinalne upale u uzorku stolice bolesnika s Parkinsonovom bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu

	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika †	95 % raspon pouzdanosti	p*
	Bolesnici s Parkinsonovom bolesti	Kontrolna Skupina			
Kalprotektin [µg/ml]	5,02 (2,62 – 15,42)	8,19 (3,42 – 19,65)	1,24	-0,54 – 3,97	0,20
Beta-defenzin 2 [ng/ml]	20,31 (10,05 – 49,05)	11,24 (6,91 – 31,52)	-6,35	-13,2 – -1,89	0,004*
Sekretorni imunoglobulin A (sIgA)[µg/ml]	542,5 (119,4 – 1739,5)	1062,5 (336,3 – 3220,6)	295,4	-1,37 – 798,9	0,05
Zonulin [µU/ml]	116,0 (49,5 – 299,1)	28,85 (6,24 – 306,55)	-42,1	-82,2 – -16,2	0,001*
Alfa-1- antitripsin [µg/ml]	348,75 (104,5 – 939,6)	976,25 (315,6 – 1282,5)	311,3	65,6 – 587,5	0,002*
Laktoferin [µg/ml]	25,75 (18,8 – 255,0)	13,13 (11,25 – 28,3)	-11,0	-34 – -7,5	< 0,001*

* Mann-Whitneyev U test; †Hodges-Lehmannova razlika medijana

S obzirom na vrijednosti markera intestinalne upale u uzorku stolice, uočava se da normalne vrijednosti kalprotektina ($< 50 \mu\text{g/ml}$) ima 116 (90 %) ispitanika, normalne vrijednosti beta-defenzina 2 ($8 - 60 \text{ ng/ml}$) njih 76 (60 %), a slgA 34 (27 %) ispitanika. Također 83 (65 %) ispitanika ima vrijednosti zonulina u referentnom rasponu ($< 170 \mu\text{U/ml}$), bez značajne razlike u odnosu na promatrane skupine. Svi ispitanici imaju povišene vrijednosti laktoferina ($\geq 7,2 \mu\text{g/ml}$). Od ukupno 64 (50 %) ispitanika s patološkim vrijednostima alfa-1-antitripsina značajno je manje, njih 22 (35 %), iz skupine s Parkinsonovom bolesti (χ^2 test, $p = 0,001$) (tablica 5.4).

Tablica 5.4. Raspodjela ispitanika prema referentnim vrijednostima markera intestinalne upale u uzorcima stolice

	Broj (%) ispitanika			p [*]
	Bolesnici s Parkinsonovom bolesti	Kontrolna skupina	Ukupno	
Kalprotektin				
Normalne vrijednosti	56 (88)	60 (92)	116 (90)	0,40
Patološke vrijednosti	8 (13)	5 (8)	13 (10)	
Beta-defenzin 2				
Normalne vrijednosti	38 (60)	38 (59)	76 (60)	0,91
Patološke vrijednosti	25 (40)	26 (41)	51 (40)	
Sekretorni imunoglobulin A (slgA)				
Normalne vrijednosti	19 (30)	15 (23)	34 (27)	0,39
Patološke vrijednosti	44 (70)	49 (77)	93 (73)	
Zonulin				
Normalne vrijednosti	38 (60)	45 (70)	83 (65)	0,24
Patološke vrijednosti	25 (40)	19 (30)	44 (35)	
Alfa-1-antitripsin				
Normalne vrijednosti	41 (65)	22 (34)	63 (50)	0,001
Patološke vrijednosti	22 (35)	42 (66)	64 (50)	
Laktoferin				
Patološke vrijednosti	63 (100)	64 (100)	127(100)	-

* χ^2 test

5.1.1. Uloga markera intestinalne upale u uzorcima stolice u predviđanju Parkinsonove bolesti (regresijska analiza)

Logističkom regresijom ocijenjen je utjecaj markera intestinalne upale u uzorcima stolice u predviđanju Parkinsonove bolesti.

Bivarijatnom logističkom regresijom uočava se da na pojavnost Parkinsonove bolesti značajan utjecaj ima beta-defenzin 2 (OR = 1,02), laktoferin (OR = 1,006), a protektivni utjecaj ima alfa-1-antitripsin (OR = 0,99).

Za izvođenje modela predviđanja Parkinsonove bolesti primijenjena je multivarijatna logistička regresija. Koristila se kod odabira prediktora (engl. *Stepwise*) logistička regresija, primijenio se kriterij statističke značajnosti veće od 0,10, a kao kriterij u istraživanju odabrana je granična vrijednost od 0,20. Tri nezavisna prediktora značajno doprinose predikciji Parkinsonove bolesti, a to su beta-defenzin 2 (OR = 1,012), laktoferin (OR = 1,006), a protektivni utjecaj ima alfa-1-antitripsin (OR = 0,998). Model je u cijelosti statistički značajan ($\chi^2 = 33,3$; df = 3; $p < 0,001$) i objašnjava između 23 % (po Cox & Snell) do 31 % (po Nagelkerke) varijance Parkinsonove bolesti i točno klasificira 71 % slučajeva (tablica 5.5).

Tablica 5.5. Predviđanje vjerojatnosti nastanka Parkinsonove bolesti (bivarijatna i multivarijatna logistička regresija)

Čimbenik	β	Wald	P	Omjer vjerojatnosti (OR)	95% raspon pouzdanosti
Bivarijatna regresija					
Kalprotektin	0,004	0,82	0,37	1,004	0,99 do 1,01
Beta-defenzin 2	0,01	4,52	0,03	1,01	1,0007 do 1,02
Sekretorni imunoglobulin A (slgA)	-	2,21	0,14	0,99	0,99 do 1,0
Zonulin	0,0002	0,629	0,43	1,0003	0,99 do 1,001
Alfa-1-antitripsin	-0,001	10,25	0,001	0,99	0,998 do 0,999
Laktoferin	0,007	4,65	0,005	1,01	1,002 do 1,01
Multivarijatna regresija					
Beta-defenzin 2	0,01	3,94	0,04	1,012	1,0002 do 1,02
Alfa-1-antitripsin	-0,001	8,51	0,004	0,998	0,998 do 0,999
Laktoferin	0,006	5,18	0,02	1,006	1,001 do 1,01
Konstanta	-0,002	0	0,99		

β – regresijski koeficijent

5.2. Obilježja bolesnika s Parkinsonovom bolešću

Bolesnike (n = 64) s Parkinsonovom bolešću dijelimo prema tipu u odnosu na početak bolesti, na 13 (20,3 %) bolesnika s ranim početkom i 51 (79,7 %) bolesnik s kasnim početkom bolesti. Prema pojavnosti prvih simptoma, ukupno je 51 (80 %) bolesnik kojima je početak bolesti centralno i 13 (20 %) bolesnika s početkom bolesti na periferiji. Prema ljestvici H&Y, u ispitivanom uzorku bolesnika najviše je bolesnika s bilateralnom bolešću 30 (47 %) te unilateralnom bolešću 19 (30 %), dok je najmanje teško onesposobljenih bolesnika 1 (2 %) (tablica 5.6). Nema značajne razlike u pojavnosti ispitivanih podtipova Parkinsonove bolesti u odnosu na spol bolesnika (tablica 5.7). Također, nema značajne razlike u dobi bolesnika, dobi kod postavljanja dijagnoze i u trajanju bolesti u odnosu na spol bolesnika (tablica 5.8).

Tablica 5.6. Raspodjela bolesnika po skupinama ljestvice H&Y

Hoehn&Yahr ljestvica	Broj (%) ispitanika
Nema znakova bolesti (0)	9 (14)
Unilateralna bolest (1)	19 (30)
Bilateralna bolest (2)	30 (47)
Bolest zahvaća i posturalne reflekse (3)	5 (8)
Teška onesposobljenost (4)	1 (2)

Tablica 5.7. Raspodjela ispitanika prema tipu bolesti i prvim simptomima u odnosu na spol

	Broj (%) ispitanika			p [*]
	Muški spol	Ženski spol	Ukupno	
Tip bolesti prema početku				
Rani početak bolesti	11 (23)	2 (13)	13 (20)	0,49
Kasni početak bolesti	37 (77)	14 (88)	51 (80)	
Prvi simptomi				
Centralno	37 (77)	14 (88)	51 (80)	0,49
Na periferiji	11 (23)	2 (13)	13 (20)	
Ukupno	48 (100)	16 (100)	64 (100)	
Tip bolesti				
Blago motorni predominantni	2 / 15	1 / 8	3 / 23 (13)	0,14
Intermedijarni tip	13 / 15	5 / 8	18 / 23 (78)	
Difuzni/maligni tip	0	2 / 8	2 / 23 (9)	

*Fisherov egzaktni test

Tablica 5.8. Razlike u dobi bolesnika, trajanju bolesti i dobi kod postavljanja dijagnoze u odnosu na spol

	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika	95% raspon pouzdanosti	p*
	Muški spol	Ženski spol			
Dob bolesnika (godine)	65 (57 – 70)	70 (59 – 74)	4,5	-1 do 11	0,08
Dob kod dijagnoze (godine)	58 (53 – 65)	66 (57 – 72)	7	0 do 13	0,05
Trajanje bolesti (godine)	4 (2 – 6)	2,5 (1,5 – 5)	-1	-3 do 0	0,18

*Mann Whitney U test

Medijan broja bodova po skupinama ljestvice MDS-UPDRS u ispitivanom uzorku bolesnika prikazan je u tablici 5.9.

Tablica 5.9. Medijan bodova po skupinama ljestvice MDS-UPDRS

MDS-UPDRS	Medijan (interkvartilni raspon)	min – max
UPDRS I – Procjena mentalne aktivnosti, ponašanja i raspoloženja bolesnika	7 (4 – 11)	0 – 32
UPDRS II – Bolesnikova samoprocjena sposobnosti izvršavanja svakodnevnih aktivnosti	8,5 (5 – 13)	1 – 31
UPDRS III – Procjena motoričkih znakova i simptoma	13,5 (9 – 19)	2 – 51
UPDRS IV – Procjena motoričkih komplikacija kao posljedica liječenja antiparkinsonicima	0 (0 – 0)	0 – 9
UPDRS – ukupno	30 (22 – 41)	14 – 71

Prema ljestvici MDS-NMS, u ispitivanom uzorku bolesnika najčešće se bilježe simptomi kognitivnog oštećenja, poteškoće s mokrenjem, gastrointestinalni simptomi, poremećaji spavanja, bolovi i simptomi iz ostalih skupina (tablica 5.10).

Tablica 5.10. Raspodjela simptoma po skupinama upitnika MDS-NMS

MDS-NMS	Medijan (interkvartilni raspon)	min – max
Depresija	1 (0 – 9)	0 – 48
Anksioznost	2 (0 – 8)	0 – 24
Apatija	0 (0 – 4)	0 – 25
Halucinacije i psihoza	0 (0 – 0)	0 – 15
Kontrola impulsa i srodni poremećaji	0 (0 – 1)	0 – 16
Kognitivno oštećenje	8,5 (2 – 20)	0 – 60
Ortostatska hipotenzija	0 (0 – 2)	0 – 18
Urinarni problemi	4,5 (1 – 14)	0 – 48
Seksualno funkcioniranje	0 (0 – 7)	0 – 32
Probavne smetnje	5,5 (0 – 11)	0 – 45
Poremećaj spavanja	4 (1 – 14)	0 – 75
Bol	6,5 (0 – 16)	0 – 42
Drugo	8,5 (3 – 19)	0 – 48
MDS-NMS – ukupni broj bodova	69 (30 – 112)	0 – 338

Prema ljestvici SCOPA-AUT, najizraženiji simptomi u skupini autonomnih disfunkcija kod ispitivanog uzorka bolesnika bili su poteškoće s mokrenjem i gastrointestinalni simptomi (tablica 5.11).

Kognitivne funkcije, pojavnost simptoma depresije, anksioznosti, poremećaja spavanja i REM-faze spavanja testirane su MoCa, BAI, BDI-II, PDSS-2 i upitnikom RBDSQ, čiji su medijani ukupnih vrijednosti prikazani u tablici 5.12.

S obzirom na vrijednosti upitnika RBDSQ, poremećaj ponašanja u REM-fazi spavanja (zbroj > 5) bilježi se kod 17 (26,6 %) bolesnika, dok kod 47 (73,4 %) bolesnika nema poremećaja u ponašanju u REM-fazi spavanja.

Tablica 5.11. Raspodjela simptoma autonomne disfunkcije prema skupinama ljestvice SCOPA-AUT

Autonomni simptomi (SCOPA-AUT)	Medijan (interkvartilni raspon)	min – max
Gastrointestinalne funkcije	3,5 (1 – 6)	0 – 15
Urinarne funkcije	7 (3 – 9)	0 – 18
Kardiovaskularne funkcije	0 (0 – 2)	0 – 4
Termoregulatorne funkcije	1 (0 – 3)	0 – 8
Pupilomotorne funkcije	0 (0 – 1)	0 – 3
Seksualne funkcije	1 (0 – 3)	0 – 9
SCOPA-AUT ukupno	15,5 (9 – 21)	0 – 39

Tablica 5.12. Medijan vrijednosti MoCa, BAI, BDI-II, PDSS-2 i upitnika RBDSQ

	Medijan (interkvartilni raspon)	min – max
MoCA ljestvica kognitivnog statusa	28 (26 – 29)	22 – 30
Anksioznost (BAI)	7 (3 – 11)	0 – 29
Depresija (BDI-II)	7,5 (4 – 13)	0 – 34
PDSS – 2	11 (5 – 18)	0 – 32
RBDSQ	3 (2–6)	1 – 13

Promatrajući raspodjelu prema spolu kod ocjene nemotoričkih simptoma (MDS – UPDRS ljestvica) i procjene motoričkih komplikacija kao posljedice liječenja antiparkinsonicima, značajnije se više bilježe komplikacije kod muškaraca u odnosu na žene (medijan 1 vs. 0) (UPDRS IV) (Mann Whitney U test, $p = 0,03$), dok u ostalim procjenama nema značajnih razlika u odnosu na spol (tablica 5.13).

Tablica 5.13. Nemotorički simptomi prema MDS-UPDRS ljestvici u odnosu na spol

MDS – UPDRS	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika	95% raspon pouzdanosti	p*
	Muški Spol	Ženski Spol			
UPDRS I – Procjena mentalne aktivnosti, ponašanja i raspoloženja bolesnika	6 (4 – 11)	9 (7 – 11)	2	-1 do 4	0,13
UPDRS II – Bolesnikova samoprocjena spособnosti izvršavanja svakodnevnih aktivnosti	9 (6 – 13)	7,5 (5 – 13)	-1	-4 do 2	0,55
UPDRS III – Procjena motoričkih znakova i simptoma	14 (9 – 19)	12,5 (8 – 17)	-1	-5 do 3	0,64
UPDRS IV – Procjena motoričkih komplikacija kao posljedica liječenja antiparkinsonicima	1 (0 – 1) [min 0 max 9]	0 (0 – 0) [min 0 max 0]	0	0 do 0	0,03
UPDRS – ukupno	30 (22 – 44)	31 (23 – 40)	0	-8 do 7	0,94

Prema MDS-NMS ljestvici žene, u odnosu na muškarce, imaju značajno više izražene simptome depresije (Mann Whitney U test, $p = 0,02$), anksioznosti (Mann Whitney U test, $p = 0,02$), ortostatske hipotenzije (Mann Whitney U test, $p = 0,001$), seksualne disfunkcije (Mann Whitney U test, $p = 0,009$), jače izražene probavne smetnje (Mann Whitney U test, $p = 0,04$), jače je izražena bol (Mann Whitney U test, $p = 0,01$), neki drugi simptomi (Mann Whitney U test, $p = 0,04$) i ukupni nemotorički simptomi (Mann Whitney U test, $p = 0,004$) (tablica 5.14).

Tablica 5.14. Ocjena izraženosti simptoma u odnosu na spol prema MDS-NMS ljestvici

MDS – NMS	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika	95% raspon pouzdanosti	p*
	Muški spol	Ženski spol			
Depresija	0 (0 – 7)	7 (2 – 15)	4	0 do 9	0,02
Anksioznost	1 (0 – 6)	7 (2 – 9)	4	0 do 7	0,02
Apatija	0 (0 – 3)	2 (0 – 7)	1	0 do 2	0,05
Halucinacije i psihoza	0 (0 – 0) [min 0 max 15]	0 (0 – 0) [min 0 max 4]	0	0 do 0	0,43
Kontrola impulsa i srodni poremećaji	0 (0 – 1) [min 0 max 16]	0 (0 – 0) [min 0 max 10]	0	0 do 0	0,66
Kognitivno oštećenje	5 (2 – 19)	15 (7 – 25)	6	-1 do 12	0,08
Ortostatska hipotenzija	0 (0 – 1)	3 (1 – 8)	2	0 do 5	0,001
Urinarni problemi	4 (1 – 10)	12 (2 – 27)	5	-1 do 14	0,11
Seksualno funkcioniranje	0 (0 – 4)	8 (3 – 31)	8	0 do 28	0,009
Probavne smetnje	4 (0 – 10)	11 (3 – 26)	6	0 do 14	0,04
Poremećaj spavanja	4 (1 – 13)	9 (4 – 18)	4	-1 do 8	0,13
Bol	6 (0 – 13)	15 (9 – 18)	8	1 do 13	0,01
Drugo	6 (2 – 16)	16 (7 – 20)	7	0 do 13	0,04
MDS-NMS – ukupno nemotorički simptomi	61,5 (26,5 – 93)	99,5 (79 – 168)	49	14 do 78	0,004

*Mann Whitney U test

Prema SCOPA-AUT ljestvici, žene u odnosu na muškarce imaju značajno jače izražene simptome vezane uz kardiovaskularne funkcije (Mann Whitney U test, $p < 0,001$), termoregulatorne funkcije (Mann Whitney U test, $p = 0,007$) i seksualne disfunkcije (Mann Whitney U test, $p = 0,04$). Također, ukupna ocjena težine autonomnih simptoma značajnije je jače izražena kod žena u odnosu na muškarce (Mann Whitney U test, $p = 0,03$) (tablica 5.15).

Tablica 5.15. Razlike u težini autonomnih simptoma u odnosu na spol

Autonomni simptomi (SCOPA-AUT)	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika	95% raspon pouzdanosti	p*
	Muškarci	Žene			
Gastrointestinalne funkcije	3 (1 – 6)	6,5 (2 – 9)	2	0 do 5	0,06
Urinarne funkcije	7 (3 – 9)	6 (2 – 10)	0	-3 do 3	0,84
Kardiovaskularne funkcije	0 (0 – 1)	2 (0,5 – 2)	1	0 do 2	<0,001
Termoregulatorne funkcije	1 (0 – 2,5)	3 (0,5 – 6,5)	2	0 do 4	0,007
Pupilomotorne funkcije	0 (0 – 1)	0 (0 – 1,5)	0	0 do 0	0,38
Seksualne funkcije	1 (0 – 3)	3 (2 – 5,5)	2	0 do 4	0,04
SCOPA-AUT ukupno	14 (8,5 – 19)	22 (10,5 – 26)	6	1 do 12	0,03

*Mann Whitney U test

Nema značajnih razlika u procjeni kognitivnog statusa u odnosu na spol bolesnika dok su poremećaji spavanja jače izraženi kod žena u odnosu na muškarce (medijan 14 vs. 10) (Mann Whitney U test, $p = 0,04$). Anksioznost i depresija procijenjene su Beck-ovim ljestvicama prema kojima žene, u odnosu na muškarce, značajnije više imaju izraženu i anksioznost (Mann Whitney U test, $p = 0,002$) i depresiju (Mann Whitney U test, $p = 0,002$). Medijani vrijednosti navedenih ljestvica prikazani su u tablici 5.16.

Tablica 5.16. Medijan vrijednosti MoCa, PDSS-2, BAI i BDI-II u odnosu na spol bolesnika

	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika	95% raspon pouzdanosti	p*
	Muškarci	Žene			
MoCA ljestvica kognitivnog statusa	28 (26 – 29)	28 (26 – 29)	0	-1 do 1	0,75
PDSS-2	10 (4,5 -17)	14 (9 – 19,5)	4	0 do 9	0,04
Anksioznost (BAI)	5 (3 – 8,5)	9,5 (8 – 15,5)	5	2 do 7	0,002
Depresija(BDI-II)	6 (3 – 11)	11 (7,5 – 15)	4,5	1 do 8	0,01

*Mann Whitney U test

Spearmanovim koeficijentom korelacije ocijenila se povezanost dobi kod dijagnoze i trajanja bolesti s obilježjima bolesnika oboljelih od Parkinsonove bolesti. Uočava se da postoji negativna i značajna povezanost trajanja bolesti s domenom seksualnog funkcioniranja ($Rho = -0,343$). Što je veća dob kod dijagnoze, manje su izražene komplikacije kao posljedica liječenja antiparkinsonicima (UPDRS IV) ($Rho = -0,336$). Što je dulje trajanje bolesti to su jače izraženi problemi vezani uz bolesnikovu samoprocjenu sposobnosti izvršavanja svakodnevnih aktivnosti ($Rho = 0,331$) i veće su komplikacije kao posljedica liječenja antiparkinsonicima ($Rho = 0,314$). Uz dulje trajanje bolesti manji je stupanj seksualne disfunkcije ($Rho = -0,310$) (tablica 5.17. i tablica 5.18).

Tablica 5.17. Povezanost dobi kod dijagnoze i trajanja bolesti s domenama RBDSQ, MDS-NMS i MDS-UPDRS

	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (P vrijednost)	
	Dob kod dijagnoze	Trajanje Bolesti
RBDSQ	-0,059 (0,64)	-0,035 (0,78)
MDS – NMS		
Depresija	0,077 (0,54)	-0,189 (0,14)
Anksioznost	0,021 (0,87)	-0,054 (0,67)
Apatija	0,117 (0,36)	-0,081 (0,52)
Halucinacije i psihoza	-0,075 (0,56)	-0,092 (0,47)
Kontrola impulsa i srodni poremećaji	-0,194 (0,13)	0,150 (0,24)
Kognitivno oštećenje	0,135 (0,29)	-0,134 (0,29)
Ortostatska hipotenzija	-0,040 (0,76)	-0,084 (0,51)
Urinarni problemi	0,229 (0,07)	-0,066 (0,60)
Seksualno funkcioniranje (n = 49)	0,044 (0,77)	-0,343 (0,02)
Probavne smetnje	0,103 (0,42)	0,013 (0,92)
Poremećaj spavanja	-0,187 (0,14)	0,090 (0,48)
Bol	-0,113 (0,37)	-0,004 (0,97)
Drugo	-0,040 (0,76)	-0,029 (0,82)
MDS-NMS – ukupno nemotorički simptomi	0,063 (0,62)	-0,105 (0,41)
MDS – UPDRS	-0,054 (0,67)	-0,109 (0,39)
UPDRS I - Procjena mentalne aktivnosti, ponašanja i raspoloženja bolesnika	-0,245 (0,05)	0,331 (0,01)
UPDRS II - Bolesnikova samoprocjena sposobnosti izvršavanja svakodnevnih aktivnosti	-0,060 (0,64)	0,013 (0,92)
UPDRS III - Procjena motoričkih znakova i simptoma	-0,336 (0,01)	0,314 (0,01)
UPDRS IV - Procjena motoričkih komplikacija kao posljedica liječenja antiparkinsonicima	-0,159 (0,21)	0,122 (0,34)
UPDRS – ukupno	-0,054 (0,67)	-0,109 (0,39)

Tablica 5.18. Povezanost dobi kod dijagnoze i trajanja bolesti s kliničkim obilježjima bolesnika oboljelih od Parkinsonove bolesti

	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (p vrijednost)	
	Dob kod dijagnoze	Trajanje Bolesti
PDSS-2	-0,025 (0,85)	0,128 (0,31)
SCOPA-AUT		
Gastrointestinalne funkcije	0,076 (0,55)	0,081 (0,52)
Urinarne funkcije	0,081 (0,53)	-0,083 (0,51)
Kardiovaskularne funkcije	-0,143 (0,26)	0,022 (0,86)
Termoregulatorne funkcije	-0,078 (0,54)	0,082 (0,52)
Pupilomotorne funkcije	-0,013 (0,92)	-0,072 (0,57)
Seksualne funkcije	0,038 (0,79)	-0,310 (0,03)
SCOPA-AUT ukupno	0,044 (0,73)	-0,094 (0,46)
MoCA ljestvica kognitivnog statusa	-0,222 (0,08)	-0,110 (0,39)
Anksioznost (BAI)	-0,087 (0,50)	0,062 (0,62)
Depresija (BDI-II)	0,100 (0,43)	-0,104 (0,42)

5.3. Povezanost vrijednosti markera intestinalne upale u uzorku stolice s kliničkim podtipovima Parkinsonovom bolesti

Izmjerene vrijednosti markera intestinalne upale u uzorku stolice bolesnika oboljelih od Parkinsonove bolesti ne razlikuju se značajno u izmjerenim vrijednostima prema spolu (tablica 5.19), prema tome radi li se o ranom ili kasnom početku bolesti (tablica 5.20), jesu li početni simptomi vezani uz mozak ili su tjelesni (tablica 5.21).

Tablica 5.19. Razlike u vrijednostima markera intestinalne upale u uzorku stolice bolesnika s Parkinsonovom bolesti u odnosu spol bolesnika

	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika [†]	95% raspon pouzdanosti	p*
	Muškarci (n = 48)	Žene (n = 16)			
Kalprotektin [μg/ml]	7,5 (2,7 – 19,4)	5,8 (3,7 – 11,9)	-0,16	-3,2 do 1,6	0,88
Beta - defenzin 2 [ng/ml]	12,9 (7,8 – 38)	18 (11,1 – 42,6)	3,4	-1,5 do 8,2	0,15
Sekretorni imunoglobulin A (slgA)[μg/ml]	606,1 (143,8 - 2301,3)	827,5 (374,4 – 3061,7)	205,1	-111,9 do 620,3	0,20
Zonulin [μU/ml]	58,3 (17,4 – 310,0)	95,6 (17,5 – 262,5)	3,6	-25,7 do 34,7	0,66
Alfa-1- antitripsin [μg/ml]	522,3 (180,4 – 1231,3)	700,0 (170,3 – 1210,9)	1,25	-170 do 184,1	0,98
Laktoferin [μg/ml]	21,5 (12 – 67,5)	17,3 (11,6 – 76,4)	-0,75	-7,3 do 2	0,46

*Mann Whitney U test; [†]Hodges-Lehmannova razlika medijana**Tablica 5.20.** Razlike u vrijednostima markera intestinalne upale u uzorku stolice bolesnika s Parkinsonovom bolesti u odnosu na početak bolesti

	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika [†]	95 % raspon pouzdanosti	p*
	Rani početak bolesti (n = 13)	Kasni početak bolesti (n = 51)			
Kalprotektin [μg/ml]	3,58 (2,5 – 21,9)	5,39 (2,7 – 14,0)	0,14	-3,8 – 3,7	0,90
Beta-defenzin 2 [ng/ml]	23,3 (9,5 – 112,3)	20,2 (10,7 – 44,5)	-4	-57 – 8	0,58
Sekretorni imunoglobulin A (slgA)[μg/ml]	1634,3 (518,8 – 3117,9)	391,7 (104,1 – 1404,5)	-595,9	-1695,5 – 29,5	0,07
Zonulin [μU/ml]	66,8 (45,9 – 217,6)	123,1 (49,2 – 308,4)	21,1	-30,8 – 113,7	0,46
Alfa-1-antitripsin [μg/ml]	604,3 (169,7 – 1303,4)	278,1 (92,5 – 878,8)	-192,3	-567,5 – 49,3	0,14
Laktoferin [μg/ml]	88,5 (17,6 – 381,5)	24,1 (18,8 – 247,5)	-6,1	-113 – 12,3	0,54

* Mann-Whitneyev U test; [†]Hodges-Lehmannova razlika medijana

Tablica 5.21. Razlike u vrijednostima markera intestinalne upale u uzorku stolice bolesnika s Parkinsonovom bolesti u odnosu na vrstu početnih simptoma

	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika [†]	95 % raspon pouzdanosti	p*
	Prvi simptomi centralno (n = 51)	Prvi simptomi tjelesni (n = 13)			
Kalprotektin [μg/ml]	44,3 (19,6 – 331,9)	21,5 (17,5 – 27,6)	-11,3	-158 – 1	0,08
Beta-defenzin 2 [ng/ml]	20,3 (10 – 49,1)	19,9 11,5 – 53,7)	1,1	-14 – 13	0,85
Sekretorni imunoglobulin A (slgA)[μg/ml]	645,9 (107,4 – 2113,8)	331,6 (164,9 – 1318,6)	-85,4	-765 – 217,8	0,53
Zonulin [μU/ml]	97,2 (48,9 – 294,7)	134,7 (55,5 – 935,6)	12,9	-49,9 – 120,1	0,59
Alfa-1- antitripsin [μg/ml]	326,3 (92,8 – 957,8)	465,0 (163,6 – 780,6)	48,3	-229,1 – 326,3	0,71
Laktoferin [μg/ml]	44,3 (19,6 – 331,9)	21,5 (17,5 – 27,6)	-11,3	-158 – 1	0,08

* Mann-Whitneyev U test; [†]Hodges-Lehmannova razlika medijana

S obzirom na referentne ili patološke vrijednosti markera, ne uočavaju se značajne razlike u raspodjeli bolesnika s obzirom na spol (tablica 5.22), početak bolesti i mjesto početka bolesti (tablica 5.23, tablica 5.24).

Tablica 5.22. Markeri intestinalne upale u odnosu na spol

	Broj (%) ispitanika			p [*]
	Muškarci	Žene	Ukupno	
Kalprotektin				
Normalne vrijednosti	41 (85)	15 (94)	56 (88)	0,67
Patološke vrijednosti	7 (15)	1 (6)	8 (13)	
Beta - defenzin 2				
Normalne vrijednosti	27 (57)	11 (69)	38 (60)	0,56
Patološke vrijednosti	20 (43)	5 (31)	25 (40)	
Sekretorni imunoglobulin A (slgA)				
Normalne vrijednosti	14 (30)	5 (31)	19 (30)	>0,99
Patološke vrijednosti	33 (70)	11 (69)	44 (70)	
Zonulin				
Normalne vrijednosti	26 (55)	12 (75)	38 (60)	0,24
Patološke vrijednosti	21 (45)	4 (25)	25 (40)	
Alfa-1-antitripsin				
Normalne vrijednosti	30 (64)	11 (69)	41 (65)	0,77
Patološke vrijednosti	17 (36)	5 (31)	22 (35)	
Laktoferin				
Patološke vrijednosti	47 (100)	16 (100)	63(100)	-

*Fisherov egzaktni test

Tablica 5.23. Markeri intestinalne upale prema dobi početka bolesti

	Broj (%) ispitanika			p [*]
	Rani početak bolesti	Kasni početak bolesti	Ukupno	
Kalprotektin				
Normalne vrijednosti	11 (85)	45 (88)	56 (88)	0,66
Patološke vrijednosti	2 (15)	6 (12)	8 (13)	
Beta-defenzin 2				
Normalne vrijednosti	5 (38)	33 (66)	38 (60)	0,11
Patološke vrijednosti	8 (62)	17 (34)	25 (40)	
Sekretorni imunoglobulin A (slgA)				
Normalne vrijednosti	5 (38)	14 (28)	19 (30)	0,51
Patološke vrijednosti	8 (62)	36 (72)	44 (70)	
Zonulin				
Normalne vrijednosti	9 (69)	29 (58)	38 (60)	0,54
Patološke vrijednosti	4 (31)	21 (42)	25 (40)	
Alfa-1-antitripsin				
Normalne vrijednosti	6 (46)	35 (70)	41 (65)	0,19
Patološke vrijednosti	7 (54)	15 (30)	22 (35)	
Laktoferin				
Patološke vrijednosti	13 (100)	50 (100)	63 (100)	-

*Fisherov egzaktni test

Tablica 5.24. Markeri intestinalne upale u odnosu na pojavu prvih simptoma

		Broj (%) ispitanika			p [*]
		Prvi simptomi u mozgu (n = 51)	Prvi simptomi tjelesni (n = 13)	Ukupno (n = 64)	
Kalprotektin					
	Normalne vrijednosti	46 (90)	10 (77)	56 (88)	0,34
	Patološke vrijednosti	5 (10)	3 (23)	8 (13)	
Beta-defenzin 2					
	Normalne vrijednosti	30 (59)	8 (67)	38 (60)	0,75
	Patološke vrijednosti	21 (41)	4 (33)	25 (40)	
Sekretorni imunoglobulin A (slgA)					
	Normalne vrijednosti	15 (29)	4 (33)	19 (30)	>0,99
	Patološke vrijednosti	36 (71)	8 (67)	44 (70)	
Zonulin					
	Normalne vrijednosti	31 (61)	7 (58)	38 (60)	>0,99
	Patološke vrijednosti	20 (39)	5 (42)	25 (40)	
Alfa-1-antitripsin					
	Normalne vrijednosti	34 (67)	7 (58)	41 (65)	0,74
	Patološke vrijednosti	17 (33)	5 (42)	22 (35)	
Laktoferin					
	Patološke vrijednosti	51 (100)	12 (100)	63 (100)	-

*Fisherov egzaktni test

S obzirom na podjelu prema ljestvici H&Y, nema značajnih razlika u markerima intestinalne upale u uzorcima stolice kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti (tablica 5.25).

Podjela prema dominantnim simptomima obuhvaća blago motorni predominantni podtip, intermedijarni i difuzni/maligni podtip bolesti. Promatrajući navedenu podjelu, uočava se da nema značajnih razlika u vrijednostima markera intestinalne upale u uzorcima stolice kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti u odnosu na klinički podtip bolesti (tablica 5.26).

Kod raspodjele bolesnika prema referentnim vrijednostima markera intestinalne upale uočava se da nema značajnih razlika s obzirom na klinički podtip Parkinsonove bolesti (tablica 5.27).

Tablica 5.25. Razlike markera intestinalne upale u uzorcima stolice prema ljestvici H&Y

	Medijan (interkvartilni raspon) prema ljestvici Hoehn & Yahr					p*
	Nema znakova bolesti (0)	Unilateralna bolest (1)	Bilateralna bolest (2)	Bolest zahvaća i posturalne reflekse (3)	Teška onesposobljenost (4) (n = 1)	
Kalprotektin [µg/ml]	11,9 (3 – 45)	3 (2 – 6)	6,1 (3 – 15)	6,2 (3 – 90)	13,7	0,20
Beta-defenzin 2 [ng/ml]	66 (28 – 144)	20 (16 – 50)	12,3 (8 – 35)	14 (11 – 58)	44,5	0,06
Sekretorni imunoglobulin A (slgA)[µg/ml]	357,3 (194 – 1319)	256,6 (88 – 1513)	798,8 (241 – 2630)	125,4 (40 – 1415)	16	0,14
Zonulin [µU/ml]	271,2 (51 – 1600)	139,6 (48 – 310)	84,4 (37 – 239)	78,4 (38 – 867)	96,7	0,55
Alfa-1- antitripsin [µg/ml]	878,8 (333 – 1291)	241,3 (6 – 604)	308,8 (142 – 1035)	181,3 (49 – 878)	1029,6	0,14
Laktoferin [µg/ml]	31,5 (20 – 171)	22,3 (18 – 353)	50,3 (19 – 311)	21,5 (16 – 567)	22,3	0,92

*Kruskal Wallisov test (post hoc Conover) (Teška onesposobljenost nije ušla u analizu zbog samo jednog bolesnika)

Tablica 5.26. Povezanost markera intestinalne upale u uzorku stolice bolesnika s Parkinsonovom bolešću s kliničkim podtipom bolesti

	Medijan (interkvartilni raspon)			p*
	Blago motorni predominantni (n = 3)	Intermedijarni tip (n = 18)	Difuzni/maligni tip (n = 2)	
Kalprotektin	2,7 (1,7 – 3,8)	3,7 (2,5 – 9,7)	20,4 (min 4,4; max 35,3)	0,27
Beta-defenzin 2	7,9 (6,5 – 13,9)	18 (10 – 41)	298,1 (min 42; max 554,2)	0,05
Sekretorni imunoglobulin A (slgA)	64 (59,1 – 185,2)	527,1 (186,1 – 1404,5)	417 (min 100; max 734)	0,29
Zonulin	44 (29 – 371,6)	112,7 (39,2 – 223,2)	85,02 (min 53,6; max 116,4)	0,90
Alfa-1-antitripsin	326,3 (83,7 – 458,4)	210,9 (56,3 – 682,5)	854,4 (min 210; max 1498,8)	0,58
Laktoferin	24,5 (14,2 – 621,9)	21,6 (18,8 – 434,0)	363,1 (min 10; max 716,3)	0,91

*Kruskal-Wallisov test (post hoc Conover)

Tablica 5.27. Raspodjela ispitanika prema referentnim vrijednostima markera intestinalne upale u uzorcima stolice kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti u odnosu na klinički podtip bolesti

	Broj (%) ispitanika prema podtipu				p *
	Blago motorni predominantni (n = 3)	Intermedijarni tip (n = 18)	Difuzni/ maligni tip (n = 2)	Ukupno (n = 23)	
Kalprotektin					
Normalne vrijednosti	3 / 3	16 / 18	2 / 2	21 / 23	>0,99
Patološke vrijednosti	0	2 / 18	0	2 / 23	
Beta-defenzin 2					
Normalne vrijednosti	1 / 3	12 / 18	1 / 2	14 / 32	0,61
Patološke vrijednosti	2 / 3	6 / 18	1 / 2	9 / 23	
Sekretorni imunoglobulin A (slgA)					
Normalne vrijednosti	0	7 / 18	1 / 2	8 / 23	0,58
Patološke vrijednosti	3 / 3	1 / 18	1 / 2	15 / 23	
Zonulin					
Normalne vrijednosti	2 / 3	12 / 18	2 / 2	16 / 32	>0,99
Patološke vrijednosti	1 / 3	6 / 18	0	7 / 23	
Alfa-1-antitripsin					
Normalne vrijednosti	3 / 3	13 / 18	1 / 2	17 / 32	0,38
Patološke vrijednosti	0	5 / 18	1 / 2	6 / 23	
Laktoferin					
Patološke vrijednosti	3 / 3	18 / 18	2 / 2	23 / 23	-

*Fisherov egzaktni test

5.4. Povezanost vrijednosti markera intestinalne upale u uzorku stolice kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti s kliničkim obilježjima bolesnika, dobi i duljinom trajanja bolesti

Uz više vrijednosti kalprotektina izraženija je anksioznost (MDS-UPDRS I, $Rho = 0,319$) i depresija (BDI) ($Rho = 0,255$), probavne smetnje ($Rho = 0,315$), izraženije su motoričke komplikacije kao posljedica liječenja antiparkinsonicima ($Rho = 0,318$), a od autonomnih simptoma izraženiji su problemi vezani uz gastrointestinalne funkcije ($Rho = 0,384$) (tablica 5.28).

Ako su više vrijednosti beta-defenzina 2, viša je ocjena kontrole impulsa i srodnih poremećaja ($Rho = 0,260$) i jače su izraženi problemi vezani za termoregulatorne funkcije ($Rho = 0,281$) (tablica 5.28).

Uz više vrijednosti sIgA manje je izražena ortostatska hipotenzija ($Rho = -0,258$), manje je izražena bol ($Rho = -0,293$), dok je jače izražena depresija (BDI) ($Rho = 0,255$) (tablica 5.28). Zonulin je u negativnoj i značajnoj vezi s ukupnom ljestvicom MDS-UPDRS ($Rho = -0,353$) (tablica 5.29).

Ako alfa-1-antitripsin poprima više vrijednosti, jače su izraženi simptomi anksioznosti ($Rho = 0,257$), halucinacije i psihoze ($Rho = 0,316$) te kontrole impulsa i srodnih poremećaja ($Rho = 0,33$), a veće su poteškoće kod kognitivnog funkcioniranja (MoCA) ($Rho = -0,275$) (tablica 5.29).

Ako su niže vrijednosti laktoferina, više je izražena domena halucinacija i psihoza (MDS) i obrnuto ($Rho = -0,310$) (tablica 5.29).

Spearmanovim koeficijentom korelacije (Rho) ocijenila se povezanost dobi bolesnika, dobi kod početka bolesti i duljine trajanja bolesti s markerima intestinalne upale u uzorcima stolice kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti.

Uočava se da su kod starijih bolesnika ($Rho = -0,255$) i kod bolesnika s većom starosnom dobi kod početka bolesti ($Rho = -0,315$) niže vrijednosti sIgA i obrnuto. Što bolest traje dulje, to su više vrijednosti kalprotektina ($Rho = 0,252$) i obrnuto (tablica 5.30).

Tablica 5.28. Povezanost kalprotektina, beta-defenzina-2 i sIgA s kliničkim obilježjima oboljelih od Parkinsonove bolesti

	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (p vrijednost)		
	Kalprotektin	Beta-defenzin 2	Sekretorni imunoglobulin A (sIgA)
RBDSQ	0,189 (0,13)	0,217 (0,09)	0,123 (0,34)
MDS – NMS			
Depresija	0,082 (0,52)	0,124 (0,33)	-0,063 (0,62)
Anksioznost	0,319 (0,01)	0,177 (0,17)	0,130 (0,31)
Apatija	0,192 (0,13)	-0,081 (0,53)	-0,095 (0,46)
Halucinacije i psihoza	0,199 (0,12)	0,020 (0,88)	-0,005 (0,97)
Kontrola impulsa i srodni poremećaji	0,196 (0,12)	0,260 (0,04)	0,0180 (0,89)
Kognitivno oštećenje	0,052 (0,68)	0,009 (0,94)	-0,163 (0,20)
Ortostatska hipotenzija	0,002 (0,99)	0,053 (0,68)	-0,258 (0,04)
Urinarni problemi	0,127 (0,32)	0,138 (0,28)	-0,071 (0,58)
Seksualni problemi	0,043 (0,77)	0,054 (0,71)	-0,130 (0,37)
Probavne smetnje	0,315 (0,01)	0,188 (0,14)	-0,136 (0,29)
Poremećaj spavanja	0,230 (0,07)	0,046 (0,72)	0,026 (0,84)
Bol	-0,064 (0,62)	-0,194 (0,13)	-0,293 (0,02)
Drugo	0,205 (0,10)	0,018 (0,89)	-0,118 (0,36)
MDS - NMS – ukupno nemotorički simptomi	0,232 (0,07)	0,143 (0,26)	-0,109 (0,40)
UPDRS			
UPDRS I – mentalna aktivnost, ponašanje i raspoloženje	0,069 (0,59)	0,067 (0,60)	0,066 (0,61)
UPDRS II – Samoprocjena sposobnosti izvršavanja svakodnevnih aktivnosti	0,095 (0,46)	-0,103 (0,42)	-0,134 (0,30)
UPDRS III – Procjena motoričkih znakova i simptoma	-0,055 (0,67)	-0,174 (0,17)	-0,135 (0,29)
UPDRS IV – Procjena motoričkih komplikacija kao posljedica liječenja antiparkinsonicima	0,318 (0,01)	0,078 (0,54)	0,089 (0,49)
UPDRS – ukupno	0,084 (0,51)	-0,094 (0,47)	-0,106 (0,41)
PDSS-2	0,207 (0,10)	0,077 (0,55)	0,014 (0,91)
Autonomni simptomi			
GI funkcije	0,384 (<0,001)	0,197 (0,12)	-0,059 (0,65)
Urinarne funkcije	0,022 (0,86)	0,071 (0,58)	-0,091 (0,48)
Kardiovaskularne funkcije	0,154 (0,23)	0,217 (0,09)	-0,124 (0,33)
Termoregulatorne funkcije	0,146 (0,25)	0,281 (0,03)	0,171 (0,18)
Pupilomotorne funkcije	0,120 (0,35)	0,012 (0,93)	0,223 (0,08)
Seksualne funkcije	0,081 (0,58)	0,032 (0,83)	-0,138 (0,35)
SCOPA-AUT ukupno	0,223 (0,08)	0,235 (0,06)	-0,021 (0,87)
MoCA ljestvica kognitivnog statusa	-0,201 (0,11)	-0,179 (0,16)	0,055 (0,67)
Anksioznost (BAI)	0,251 (0,05)	0,207 (0,10)	0,251 (0,05)
Depresija (BDI-II)	0,255 (0,04)	0,117 (0,36)	0,255 (0,04)

Tablica 5.29. Povezanost zonulina, alfa-1-antitripsina i laktoferina s kliničkim obilježjima oboljelih od Parkinsonove bolesti

	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (p vrijednost)		
	Zonulin	Alfa-1-antitripsin	Laktoferin
RBDSQ	0,044 (0,73)	0,131 (0,31)	-0,121 (0,34)
MDS-NMS			
Depresija	-0,205 (0,11)	0,085 (0,51)	-0,111 (0,39)
Anksioznost	-0,245 (0,05)	0,257 (0,04)	-0,129 (0,31)
Apatija	-0,156 (0,22)	0,116 (0,36)	0,142 (0,27)
Halucinacije i psihoza	-0,168 (0,19)	0,316 (0,01)	-0,310 (0,01)
Kontrola impulsa i srodni poremećaji	-0,020 (0,88)	0,333 (0,01)	-0,220 (0,08)
Kognitivno oštećenje	-0,039 (0,76)	0,065 (0,61)	-0,072 (0,57)
Ortostatska hipotenzija	-0,185 (0,15)	-0,152 (0,24)	-0,048 (0,71)
Urinarni problemi	-0,064 (0,62)	0,150 (0,24)	-0,051 (0,69)
Seksualni problemi	-0,153 (0,29)	0,110 (0,45)	-0,078 (0,59)
Probavne smetnje	-0,049 (0,70)	0,089 (0,49)	-0,090 (0,48)
Poremećaj spavanja	-0,171 (0,18)	0,023 (0,86)	-0,161 (0,21)
Bol	-0,280 (0,03)	-0,188 (0,14)	0,082 (0,52)
Drugo	-0,189 (0,14)	-0,058 (0,65)	0,045 (0,73)
MDS - NMS – ukupno nemotorički simptomi	-0,199 (0,12)	0,103 (0,42)	-0,056 (0,66)
UPDRS			
UPDRS I – mentalna aktivnost, ponašanje i raspoloženje	-0,101 (0,43)	0,022 (0,86)	-0,174 (0,17)
UPDRS II – Bolesnikova samoprocjena sposobnosti izvršavanja svakodnevnih aktivnosti	-0,294 (0,02)	0,022 (0,86)	-0,065 (0,61)
UPDRS III – Procjena motoričkih znakova i simptoma	-0,248 (0,05)	0,010 (0,94)	-0,04 (0,76)
UPDRS IV – Procjena motoričkih komplikacija kao posljedica liječenja antiparkinsonicima	-0,117 (0,36)	0,210 (0,10)	-0,025 (0,85)
UPDRS – ukupno	-0,353 (0,01)	0,056 (0,66)	-0,063 (0,62)
PDSS – Ljestvica spavanja	-0,277 (0,03)	0,126 (0,32)	-0,055 (0,67)
Autonomni simptomi			
GI funkcije	-0,101 (0,43)	0,192 (0,13)	-0,224 (0,08)
Urinarne funkcije	-0,152 (0,23)	0,150 (0,24)	0,011 (0,93)
Kardiovaskularne funkcije	-0,122 (0,34)	0,032 (0,81)	-0,010 (0,94)
Termoregulatorne funkcije	-0,070 (0,59)	0,055 (0,67)	0,189 (0,14)
Pupilomotorne funkcije	0,142 (0,27)	-0,005 (0,97)	0,116 (0,37)
Seksualne funkcije	-0,205 (0,16)	0,193 (0,18)	-0,106 (0,47)
SCOPA-AUT ukupno	-0,119 (0,36)	0,223 (0,08)	-0,020 (0,88)
MoCA ljestvica kognitivnog statusa	0,045 (0,73)	-0,275 (0,03)	0,010 (0,94)
Anksioznost (BAI)	-0,220 (0,08)	0,183 (0,15)	-0,198 (0,12)
Depresija (BDI-II)	-0,192 (0,13)	0,163 (0,20)	-0,060 (0,64)

Tablica 5.30. Povezanost markera intestinalne upale u uzorcima stolice s dobi bolesnika, dobi kod početka bolesti i s trajanjem bolesti

	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (P vrijednost)		
	Dob	Dob kod početka bolesti	Trajanje bolesti
Kalprotektin	0,035 (0,79)	-0,069 (0,59)	0,252 (0,04)
Beta-defenzin 2	-0,121 (0,35)	-0,186 (0,14)	0,094 (0,46)
Sekretorni imunoglobulin A (sIgA)	-0,255 (0,04)	-0,315 (0,01)	0,196 (0,13)
Zonulin	0,072 (0,58)	0,052 (0,69)	-0,006 (0,96)
Alfa-1-antitripsin	-0,060 (0,64)	-0,115 (0,37)	0,175 (0,17)
Laktoferin	0,008 (0,95)	-0,069 (0,59)	0,126 (0,33)

U kontrolnoj skupini ispitanika uz povišene vrijednosti kalprotektina povišene su vrijednosti alfa-1-antitripsina ($Rho = 0,363$) i laktoferina ($Rho = 0,625$); uz povišene vrijednosti alfa-1-antitripsina povišen je i laktoferin ($Rho = 0,278$), a uz povišene vrijednosti sIgA više su vrijednosti zonulina ($Rho = 0,579$) i alfa-1-antitripsina ($Rho = 0,255$) (tablica 5.31).

Kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti uz povišene vrijednosti kalprotektina povišene su vrijednosti i beta-defenzina-2 ($Rho = 0,343$), sIgA ($Rho = 0,4339$) i alfa-1-antitripsina ($Rho = 0,659$).

Beta-defenzin 2 je u pozitivnoj vezi s alfa-1-antitripsinom ($Rho = 0,321$), a sIgA s alfa-1-antitripsinom ($Rho = 0,300$) i laktoferinom ($Rho = 0,323$) (tablica 5.31).

Tablica 5.31. Međusobna povezanost markera intestinalne upale u uzorcima stolice u kontrolnoj skupini i u skupini bolesnika oboljelih od Parkinsonove bolesti

	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (P vrijednost)				
	Kalprotektin	Beta – defenzin 2	Sekretorni imunoglobulin A	Zonulin	Alfa-1-Antitripsin
Kontrola					
Kalprotektin	1				
Beta-defenzin 2	0,172 (0,17)	1			
Sekretorni imunoglobulin A (sIgA)	0,057 (0,66)	0,011 (0,93)	1		
Zonulin	0,170 (0,18)	0,050 (0,70)	0,579 (0,001)	1	
Alfa-1-antitripsin	0,363 (0,003)	0,108 (0,40)	0,255 (0,04)	-0,037 (0,77)	1
Laktoferin	0,625 (0,001)	0,111 (0,38)	0,218 (0,08)	0,231 (0,07)	0,278 (0,03)
Bolesnici s Parkinsonovom bolesti					
Kalprotektin	1				
Beta-defenzin 2	0,343 (0,01)	1			
Sekretorni imunoglobulin A (sIgA)	0,433 (<0,001)	0,204 (0,11)	1		
Zonulin	-0,025 (0,85)	0,149 (0,25)	0,181 (0,16)	1	
Alfa-1-antitripsin	0,659 (<0,001)	0,321 (0,01)	0,300 (0,02)	-0,006 (0,96)	1
Laktoferin	0,064 (0,62)	0,123 (0,34)	0,323 (0,01)	0,102 (0,43)	-0,125 (0,33)

U bolesnika s ranim početkom bolesti uz povišene vrijednosti kalprotektina niže su vrijednosti zonulina (Rho = -0,773), a više su vrijednosti alfa-1-antitripsina (Rho = 0,753). Uz povišene vrijednosti sekretornog imunoglobulina A više su vrijednosti laktoferina (Rho = 0,588), a kod viših vrijednosti alfa-1-antitripsina niže su vrijednosti laktoferina (Rho = -0,802). Kod bolesnika s kasnim početkom bolesti, uz povišene vrijednosti kalprotektina povišene su vrijednosti beta-defenzina-2 (Rho = 0,379), sekretornog imunoglobulina A (Rho = 0,593) i alfa-1-antitripsina (Rho = 0,643). Beta-defenzin 2 je u pozitivnoj vezi s alfa-1-antitripsinom (Rho = 0,367) i sekretornim imunoglobulinom A (Rho = 0,308). Uz više vrijednosti sekretornog imunoglobulina A povišene su vrijednosti alfa-1-antitripsina (Rho = 0,410) (tablica 5.32).

Tablica 5.32. Međusobna povezanost markera intestinalne upale u uzorcima stolice u skupinama bolesnika oboljelih od Parkinsonove bolesti s obzirom na dob početka bolesti

	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (P vrijednost)				
	Kalprotektin	Beta – defenzin 2	Sekretorni imunoglobulin A	Zonulin	Alfa-1-antitripsin
Rani početak bolesti					
Kalprotektin	1				
Beta-defenzin 2	0,330 (0,27)	1			
Sekretorni imunoglobulin A (sIgA)	0,060 (0,84)	0,055 (0,86)	1		
Zonulin	-0,773 (<0,001)	0,041 (0,89)	-0,143 (0,64)	1	
Alfa-1-antitripsin	0,753 (< 0,001)	0,110 (0,72)	-0,297 (0,32)	-0,539 (0,06)	1
Laktoferin	-0,549 (0,05)	-0,077 (0,80)	0,588 (0,03)	0,432 (0,14)	-0,802 (< 0,001)
Kasni početak bolesti					
Kalprotektin	1				
Beta-defenzin 2	0,379 (0,01)	1			
Sekretorni imunoglobulin A (sIgA)	0,593 (< 0,001)	0,308 (0,03)	1		
Zonulin	0,201 (0,16)	0,208 (0,15)	0,279 (0,05)	1	
Alfa-1-antitripsin	0,643 (< 0,001)	0,367 (0,01)	0,410 (<0,001)	0,140 (0,33)	1
Laktoferin	0,258 (0,07)	0,203 (0,16)	0,231 (0,11)	0,044 (0,76)	0,039 (0,79)

Kod bolesnika s prvim simptomima na mozgu, kalprotektin je u značajnoj i pozitivnoj vezi s beta-defenzinom-2 (Rho = 0,377), sekretornim imunoglobulinom A (Rho = 0,460) i alfa-1-antitripsinom (Rho = 0,654). Beta-defenzin 2 je u pozitivnoj vezi s alfa-1-antitripsinom (Rho = 0,308), a uz više vrijednosti sIgA više su vrijednosti i laktoferina (Rho = 0,292). Kod bolesnika s prvim simptomima koji su tjelesni, samo je značajna pozitivna veza između kalprotektina i alfa-1-antitripsina (Rho = 0,771), odnosno uz više vrijednosti kalprotektina više su vrijednosti i alfa-1-antitripsina i obrnuto (tablica 5.33).

Tablica 5.33. Međusobna povezanost markera intestinalne upale u uzorcima stolice u skupinama bolesnika oboljelih od Parkinsonove bolesti s obzirom na pojavnost prvih simptoma

Početak bolesti centralno					
Kalprotektin	1				
Beta-defenzin 2	0,377 (0,01)	1			
Sekretorni imunoglobulin A (sIgA)	0,460 (< 0,001)	0,208 (0,14)	1		
Zonulin	0,051 (0,72)	0,207 (0,14)	0,213 (0,13)	1	
Alfa-1-antitripsin	0,654 (< 0,001)	0,308 (0,03)	0,281 (0,05)	0,064 (0,66)	1
Laktoferin	0,055 (0,7)	0,180 (0,21)	0,292 (0,04)	0,123 (0,39)	- 0,102 (0,47)
Početak bolesti na periferiji					
Kalprotektin	1				
Beta-defenzin 2	0,242 (0,45)	1			
Sekretorni imunoglobulin A (sIgA)	0,446 (0,15)	0,217 (0,50)	1		
Zonulin	-0,441 (0,15)	-0,169 (0,60)	-0,049 (0,88)	1	
Alfa-1-antitripsin	0,771 (< 0,001)	0,420 (0,17)	0,543 (0,07)	-0,324 (0,30)	1
Laktoferin	0,219 (0,49)	0,046 (0,89)	0,518 (0,08)	-0,138 (0,67)	0,053 (0,87)

6. RASPRAVA

U ovom istraživanju ispitivane su vrijednosti markera intestinalne upale kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti u odnosu na zdrave kontrole te je analizirana njihova povezanost s motoričkim i nemotoričkim simptomima i kliničkim podtipovima Parkinsonove bolesti. Intestinalna upala prepoznata je kao važan čimbenik u patogenezi Parkinsonove bolesti u brojnim životinjskim i kliničkim studijama, a s obzirom na to da je utvrđeno da nije prisutna u svih bolesnika, pojavio se interes za definiranjem podskupina bolesnika kod kojih taj proces doprinosi početku ili progresiji bolesti (70). Iako je endoskopija s uzimanjem uzoraka za biopsiju najpouzdaniji način otkrivanja upalnih događanja na sluznici crijeva, metoda je invazivna i zahtijeva pripremu za pretragu koja može biti iznimno zahtjevna za pacijente, posebice one starije životne dobi i ograničenih fizičkih sposobnosti (137). Zbog toga su u uzorcima seruma i stolice ispitivani različiti biomarkeri koji pouzdano odražavaju upalne događaje na crijevnoj sluznici. Istraživanja su pokazala da markeri iz uzorka stolice pouzdano odražavaju intenzitet upale na sluznici crijeva u usporedbi s endoskopskim nalazima, iako se uzorkuju i neinvazivni su uz prednost višestrukog uzorkovanja tijekom praćenja bolesnika (137). Sve to dovelo je do njihove rastuće uporabe u kliničkoj praksi, ali i u studijama koje ispituju upalne događaje na crijevnoj sluznici u različitim kroničnim bolestima, uključujući i Parkinsonovu bolest.

6.1. Opće odlike ispitanika

U ovom su istraživanju u uzorcima stolice izmjerene vrijednosti različitih markera intestinalne upale od kojih su neki, poput zonulina i alfa-1-antitripsina, pokazatelji crijeвне permeabilnosti. Istraživanje je obuhvaćalo jednak broj ispitanika u skupini bolesnika s Parkinsonovom bolesti i u kontrolnoj skupini zdravih ispitanika koji su bili slične raspodjele dobi i spola.

Za usporedbu, u našem je istraživanju sudjelovao nešto veći broj ispitanika u odnosu na većinu ranijih studija iz ovog područja. Naprimjer, studije Schwiertz i suradnika te Mulak i suradnika obuhvaćale su u skupini bolesnika i kontrolnoj skupini od 20 do 35 ispitanika (76, 99). Nešto veći broj ispitanika zabilježen je u studiji Hor i suradnika, čija je veličina uzorka usporediva s veličinom uzorka u ovom istraživanju (101).

Medijan dobi kod bolesnika u našem istraživanju bio je 66 godina, a kontrolne skupine 61 godina, što je usporedivo s drugim istraživanjima iz ovog područja, gdje je prosječna dob

ispitanika bila slična, kao naprimjer u studiji Hor i suradnika, gdje su bolesnici bili prosječne dobi 67 godina, a ispitanici kontrolne skupine 64 godine (101). Medijan trajanja bolesti u skupini bolesnika u našem istraživanju bio je 3 godine, dok su u istraživanjima drugih autora bolesnici bili nešto duljeg trajanja bolesti, naprimjer, u studiji Mulak i suradnika medijan trajanja bolesti iznosio je 9 godina, a u studiji Hor i suradnika 10 godina (99, 101).

Također, i u tim je studijama sudjelovao nešto veći postotak ispitanika muškog spola, što je očekivano u kontekstu veće incidencije bolesti kod osoba muškog spola. U našem istraživanju u skupini bolesnika bilo je 75 % bolesnika muškog spola, dok je, naprimjer, u istraživanju Hor i suradnika slične veličine uzorka sudjelovalo u skupini bolesnika 69 % ispitanika muškog spola (101).

Kada se promatra raspodjela prema ljestvici H&Y, u ovoj je studiji sudjelovalo najmanje teško onespособljenih bolesnika zbog dizajna istraživanja iz kojega su bili isključeni teško pokretni bolesnici. Slična je raspodjela bila i u drugim studijama iz ovog područja, naprimjer, u studiji Mulak i suradnika od 35 bolesnika s Parkinsonovom bolesti 17 je bilo H&Y stadija 2, a 18 bolesnika H&Y stadija 3, dok bolesnici iz ostalih podskupina ljestvice H&Y nisu bili uključeni u istraživanje.

Promatrajući težinu ispitivanih simptoma, naprimjer, prema ukupnom broju bodova upitnika MDS-UPDRS, bolesnici u našem istraživanju imali su manji medijan ukupnog broja bodova, tj. 30, u odnosu na bolesnike iz istraživanja Hor i suradnika, gdje je medijan iznosio 60. Navedenom može pridonositi i činjenica da su bolesnici u našem istraživanju imali kraće trajanje bolesti u odnosu na navedenu studiju te samim time i nešto manje izražene motoričke i nemotoričke simptome.

Uspoređujući rezultate ljestvica za procjenu nemotoričkih simptoma, MDS-NMS i SCOPA-AUT, bolesnici su u ovom istraživanju najčešće prijavljivali simptome iz skupine poteškoća s mokrenjem i gastrointestinalne simptome. Za usporedbu, simptome po skupinama opisuju i Dumitrescu i suradnici, gdje su bolesnici najčešće prijavljivali hiposmiju i konstipaciju (100).

Promatrajući raspodjelu prema spolu, klinički parametri bolesnika u ovom istraživanju poput dobi, trajanja bolesti, dobi kod dijagnoze i kliničkog podtipa bolesti nisu se značajno razlikovali, dok su uočene razlike u težini pojedinih simptoma. Na primjer, kod žena je uočena više izražena pojavnost depresije, anksioznosti, seksualne disfunkcije, probavnih smetnji i nemotoričkih simptoma općenito, dok su kod muškaraca bile izraženije motoričke komplikacije

bolesti. Navedeno je u skladu s rezultatima drugih autora gdje se također kod žena bilježe jače izraženi simptomi autonomne disfunkcije i poremećaja raspoloženja (138).

Uspoređujući dob bolesnika kod dijagnoze i trajanje bolesti s težinom simptoma uočavaju se jače izražene motoričke komplikacije i poteškoće u svakodnevnom funkcioniranju s duljim trajanjem bolesti što je u skladu s očekivanjima. Rezultati prethodnih studija su imali slična zapažanja, te ukazuju na jače izražene simptome autonomne disfunkcije s porastom dobi bolesnika (138, 139).

Zaključno, opća obilježja uzorka bolesnika u ovom istraživanju poput dobi, spola i težine simptoma slična su uzorcima drugih studija za usporedbu (100, 138, 139). S druge strane, promatrajući istraživanja koja obuhvaćaju ispitivanje markera intestinalne upale kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti, u našem je istraživanju zabilježen nešto veći broj ispitanika u odnosu na većinu studija iz ovog područja (76,99).

6.2. Povezanost markera intestinalne upale s motoričkim i nemotoričkim simptomima, dobi i duljinom trajanja bolesti

6.2.1. Kalprotektin

Kalprotektin je najčešće korišten marker intestinalne upale, čija je klinička primjena unazad nekoliko desetljeća neizostavna u dijagnostici i praćenju bolesnika s upalnim bolestima crijeva poput ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti (104, 105). Kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti nekoliko je studija do sada koje ukazuju na povišene vrijednosti kalprotektina u odnosu na zdrave kontrole (76, 99, 100). Naprimjer, u studiji Schwiertz i suradnika opisane su povišene vrijednosti kalprotektina u stolici kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti u odnosu na zdrave kontrole, a povezanost s drugim kliničkim parametrima poput simptoma, podtipova bolesti ili terapije koju su bolesnici uzimali nije uočena (76). U studiji Mulak i suradnika također su opisane povišene vrijednosti kalprotektina kod pacijenata s Parkinsonovom bolesti u odnosu na kontrole, dok povezanost s trajanjem bolesti, težinom simptoma i terapijom nije uočena (99). Rezultate s povišenim kalprotektinom opisuju i Aho i suradnici, uz nešto izraženije vrijednosti kod ženskog spola te Dumitrescu i suradnici (69, 100). Dodatno, studija Hor i suradnika također opisuje povišene koncentracije kalprotektina u stolici kod pacijenata s Parkinsonovom bolesti u odnosu na kontrole, ali bez značajne povezanosti s kliničkim parametrima bolesnika (101).

U ovom istraživanju vrijednosti kalprotektina u odnosu na zdrave ispitanike nisu bile povišene. S druge strane, promatrajući kliničke parametre pacijenata, nađeno je nekoliko značajnih

pozitivnih korelacija s vrijednostima kalprotektina poput, naprimjer, gastrointestinalnih simptoma prema objema ljestvicama u kojima su ispitivani. Dodatno, utvrđena je i pozitivna korelacija vrijednosti kalprotektina s pojavnosti depresije, anksioznosti, motoričkih komplikacija nastalih kao posljedica liječenja antiparkinsonicima te s duljinom trajanja bolesti. Navedeni rezultati razlikuju se od dosadašnjih studija u kojima nije utvrđena povezanost vrijednosti kalprotektina s težinom motoričkih i nemotoričkih simptoma (76, 99, 100).

Kada se promatra duljina trajanja bolesti, Dumitrescu i suradnici ukazali su na povezanost povišenih vrijednosti kalprotektina s blagim parkinsonizmom prema ljestvici H&Y, ukazujući na izraženiju prisutnost intestinalne upale u ranim fazama bolesti, što je u kontrastu s rezultatima ovog istraživanja koji ukazuju na prisutnost intestinalne upale i kod bolesnika s duljim trajanjem bolesti (100). Također, Dumitrescu i suradnici opisali su negativnu korelaciju vrijednosti kalprotektina s hiposmijom podupirući ranije predložene hipoteze o različitom mjestu početka bolesti centralno ili periferno na razini crijevne sluznice (100).

Navedeno je u skladu s rezultatima ovog istraživanja, gdje su uz povišene vrijednosti kalprotektina bili prisutni jače izraženi gastrointestinalni simptomi, podupirući hipotezu o povezanosti te grupe simptoma s intestinalnom upalom.

6.2.2. Laktoferin

Uz kalprotektin, laktoferin je također marker intestinalne upale aktiviran putem neutrofila te je često korišten u kliničkoj praksi kod praćenja bolesnika s upalnim bolestima crijeva (120, 121). U Parkinsonovoj bolesti do sada su mjerene koncentracije fekalnog laktoferina u studiji Schwartz i suradnika koji, iako nisu pronašli značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu, ukazuju na trend prema povišenim vrijednostima kod bolesnika, dok povezanost sa simptomima, težinom ili suptipovima bolesti nije uočena (76).

S druge strane rezultati ovog istraživanja ukazuju na značajno povišene vrijednosti laktoferina u odnosu na kontrolnu skupinu uz određeni značaj i u predikciji nastanka Parkinsonove bolesti, što upućuje na važan put aktivacije neutrofila u sklopu upalnih procesa na crijevnoj sluznici kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti. Potrebno je kod interpretacije tih rezultata napomenuti da su vrijednosti dobivene regresijskom analizom kojima je ispitivan značaj markera intestinalne upale u predikciji nastanka bolesti bile granične, tj. blizu 1.

S druge strane uočena je negativna povezanost sa simptomima koji se odnose na psihozu i halucinacije, uz napomenu da je vrlo mali broj bolesnika u cijelom uzorku imao prisutne simptome iz te skupine.

6.2.3. Beta-defenzin

Beta-defenzin je antimikrobni peptid iz porodice defenzina čija je važna uloga održavanje funkcije epitelne barijere, sudjelovanje u procesima prirođene, ali i stečene imunosti, a od širokog spektra poznatih alfa i beta-defenzina, rastući je interes za beta-defenzin 2, čije su povišene koncentracije uočene kod bolesnika s upalnim bolestima crijeva, ali i funkcionalnim poremećajima poput sindroma iritabilnog kolona (107). Kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti pretraživanjem dostupne literature nisu pronađene studije za usporedbu koje uključuju taj marker, a s obzirom na to da je sve više dokaza o crijevnoj disbiozi i mogućem gubitku integriteta crijevnih sluznica kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti, patofiziološki mehanizmi aktivacije beta-defenzina 2 mogli bi biti značajni u ispitivanju patogeneze bolesti, zbog čega je kao marker intestinalne upale uključen u istraživanje.

Rezultati ovog istraživanja u skladu su s očekivanjima te ukazuju na značajno povišene koncentracije beta-defenzina 2 kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti uz doprinos u predikciji bolesti uz napomenu, kao i za laktoferin, da su vrijednosti dobivene regresijskom analizom bile blizu 1. Od skupina simptoma uočena je pozitivna povezanost vrijednosti beta-defenzina 2 s težinom simptoma kontrole impulsa i smetnjama termoregulacije, što ukazuje na prisutnost autonomne disfunkcije u bolesnika s povišenim vrijednostima tog markera. Dodatno, promatrajući puteve aktivacije beta-defenzina-2, može se zaključiti o pojačanoj mikrobnj stimulaciji na razini crijevnih sluznica u Parkinsonovoj bolesti jer se radi o antimikrobnom peptidu čiji su glavni podražaj za aktivaciju alteracije crijevnog mikrobioma (120, 121).

6.2.4. Sekretorni imunoglobulin A

Na razini crijevnih sluznica nalazi se mnoštvo imunološki aktivnih stanica među kojima važnu ulogu imaju plazma stanice koje na vanjski antigenski podražaj izlučuju sIgA, protektivna antitijela koja svojim lokalnim djelovanjem predstavljaju važnu barijeru u prodoru vanjskih patogena kroz crijevnu sluznicu (82). Pretraživanjem dostupne literature nisu pronađene studije u kojima su ispitivane vrijednosti sekretornog imunoglobulina A u uzorcima stolice kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti.

Naši rezultati pokazali su razliku između vrijednosti sIgA u ispitivanim uzorcima kod bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu uz graničnu značajnost te trend prema nižim vrijednostima tog markera u bolesnika s Parkinsonovom bolesti. Dodatno, uočena je negativna korelacija s ortostatskom hipotenzijom i bolom, a pozitivna korelacija s težinom depresivnih simptoma. Kada se promatra dob bolesnika i dob početka bolesti, za oba parametra bila je prisutna negativna korelacija s vrijednostima sIgA.

Navedeni rezultati upućuju na postojanje autonomne disfunkcije kod bolesnika s manjim vrijednostima sIgA, tj. slabijim lokalnim imunološkim odgovorom na razini crijevne sluznice. Veza sa simptomom depresije nejasna je s obzirom na to da pokazuje obrnuti trend u odnosu na simptome autonomne disfunkcije te se eventualno može promatrati u kontekstu različite kliničke slike kod pacijenata s prisutnom crijevnom upalom kod koje je autonomna disfunkcija očekivana u odnosu na podtip bolesti s primarnim zahvaćanjem centralnih struktura.

Poveznica s dobi bolesnika i dobi početka bolesti značajna je, osobito kada se usporedi s rezultatima Jendraszak i suradnika, koji su u uzorcima stolice zdravih osoba ispitivali vrijednosti kalprotektina, zonulina i sIgA ovisne o dobi (110). Praćenjem tih markera u 160 zdravih ispitanika uočene su značajne razlike u koncentracijama sIgA u stolici kod ispitanika do 55 godina te onih starijih od 55 godina, uz značajan opadajući trend u koncentraciji sIgA s dobi (110).

Naši rezultati također ukazuju na sniženje koncentracije sIgA u stolici s porastom dobi, što bi moglo predstavljati jedan od mehanizama obrane koji su narušeni, osobito u starijoj populaciji. Kako s dobi raste i prevalencija Parkinsonove bolesti, gubitak lokalnog imunološkog odgovora na razini crijevne sluznice bi, u kontekstu tih rezultata, mogao biti jedan od važnijih mehanizama koji pridonose nastanku i napredovanju bolesti. Dodatno, u našem uzorku veća dob pri dijagnozi bolesti također je bila povezana s nižim koncentracijama sIgA u stolici, što dodatno naglašava važnost tih mehanizama u nastanku Parkinsonove bolesti kod starijih osoba.

6.2.5. Zonulin

Jedna od glavnih obrambenih barijera crijevne sluznice prema sistemskom prodoru vanjskih patogena jest njezin očuvan integritet koji se odnosi i na crijevnu permeabilnost, komponentu koja je u upalnim stanjima često narušena i kao takva omogućuje fizički prodor patogena između uskih spojeva enterocita, čime se olakšava njihov prodor u sistemsku cirkulaciju (140,141).

Iako intestinalna upala i narušena permeabilnost uglavnom dolaze udruženo, markeri crijevne permeabilnosti postaju od osobitog značaja u novijim studijama jer omogućuju dodatni uvid u upalna zbivanja na crijevnoj sluznici. Najčešće korišteni u te svrhe jesu alfa-1-antitripsin i zonulin, protein otkriven u proteklih 20-ak godina koji reverzibilnim djelovanjem regulira propusnost međustaničnih spojeva enterocita (115, 116).

U Parkinsonovoj bolesti nekoliko je studija do sada ispitivalo vrijednosti zonulina u uzorcima stolice bolesnika. Naprimjer, studija Mulak i suradnika koja je uključivala 35 ispitanika s Parkinsonovom bolesti i 20 zdravih kontrola čiji rezultati nisu ukazali na značajne razlike između navedenih skupina u koncentracijama zonulina (21). Ranije opisana studija Schwiertz i suradnika također je ispitivala vrijednosti zonulina koje su bile povišene u bolesnika s Parkinsonovom bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu, bez značajne povezanosti sa simptomima ili stadijem bolesti (76). Važna je za istaknuti i studija Dumitrescu i suradnika u kojoj su vrijednosti zonulina uspoređivane kod bolesnika i zdravih kontrola u uzorcima seruma i stolice te su u obje vrste uzoraka zabilježene povišene koncentracije tog markera permeabilnosti u odnosu na kontrole, te studiju Ulaş i suradnika, koji su na većem broju ispitanika, ukupno 139 bolesnika i 33 kontrolna ispitanika, utvrdili prisutnost povišenih koncentracija fekalnog zonulina kod bolesnika uz značajnu pozitivnu povezanost sa smetnjama mokrenja (100, 140).

Naši su rezultati također potvrdili značajno povišene vrijednosti zonulina u uzorcima stolice kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu uz negativnu povezanost vrijednosti zonulina s težinom motoričkih i nemotoričkih simptoma utvrđenu ukupnim zbrojem bodova ljestvice MDS-UPDRS. Slične rezultate opisuju Aho i suradnici, koji su uz vrijednosti fekalnih markera upale i permeabilnosti ispitivali i povezanost s koncentracijama kratkolančanih masnih kiselina te sastavom crijevne mikrobiote i, iako nije pronađena značajna razlika između vrijednosti fekalnog zonulina kod bolesnika i kontrola, uočena je negativna povezanost s težinom motoričkih i nemotoričkih simptoma također mjerena ljestvicom MDS-UPDRS i pozitivna povezanost s različitosti mikrobiote (69).

Ovi rezultati upućuju na povezanost povišenih vrijednosti fekalnog zonulina i povećane crijevne permeabilnosti kod pacijenata s blagim motoričkim i nemotoričkim simptomima te ih je potrebno promatrati u studijama koje bi uključivale veći broj ispitanika, osobito onih u ranijim fazama bolesti kako bi se utvrdilo je li povećana crijevna permeabilnost mjerena tim markerom prisutna kao jedan od početnih mehanizama u patogenezi intestinalne disfunkcije

kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti. Također niže vrijednosti zonulina kod uznapredovale kliničke slike mogu upućivati da u daljnjem tijeku bolesti crijevna permeabilnost može biti očuvana, a progresija bolesti razvija se drugim mehanizmima.

6.2.6. Alfa-1-antitripsin

Alfa-1-antitripsin je protein široko zastupljen u organizmu čija važnost u procjeni crijevne propusnosti proizlazi iz činjenice da se u lumenu crijeva ne apsorbira te je količina izmjerena u stolici pouzdan pokazatelj gubitka proteina putem probavnog trakta, zbog čega se taj marker u kliničkoj primjeni koristi i kao neizravni pokazatelj crijevne permeabilnosti (118).

Nekoliko je studija koje su ispitivale ulogu alfa-1-antitripsina u Parkinsonovoj bolesti. Naprimjer, u studiji Dufek i suradnika, gdje su ispitivani serumski upalni biomarkeri, praćene su i vrijednosti alfa-1-antitripsina koje kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti nisu bile povišene (140,141). S druge strane vrijednosti alfa-1-antitripsina ispitivane u uzorku stolice bile su značajno povišene u studiji Schwiertz i suradnika, međutim nije zabilježena povezanost sa simptomima ili podtipovima bolesti (76).

Naši rezultati u kontrastu su s drugim autorima pokazali niže vrijednosti alfa-1-antitripsina u uzorku stolice u odnosu na ispitanike kontrolne skupine te protektivan utjecaj u predikciji nastanka Parkinsonove bolesti. Potrebno je naglasiti da je za konačnu procjenu gubitka alfa-1-antitripsina važna i usporedba vrijednosti u serumu s vrijednostima u stolici te konačan izračun klirensa alfa-1-antitripsina jer su vrijednosti promatrane samo u uzorku stolice neizravan pokazatelj gubitka proteina probavnim traktom (142). Budući da u ovoj studiji, a ni u studiji Schwiertz i suradnika nisu rađene usporedbe s koncentracijom alfa-1-antitripsina u serumu, smatramo da te rezultate treba promatrati u tom kontekstu. Također, vrijednosti dobivene regresijskom analizom koje su ispitivale prediktivan utjecaj pojedinih markera u nastanku Parkinsonove bolesti su, kao i za beta-defenzin i laktoferin, iako statistički značajne, bile blizu 1, zbog čega je klinički značaj tih rezultata ograničen. Ipak, s obzirom na to da su rezultati više studija, kao i rezultati ovog istraživanja, ukazali na povišene vrijednosti markera crijevne permeabilnosti, alfa-1-antitripsin svakako treba biti dodatno ispitivan kod pacijenata s Parkinsonovom bolesti, ali uz preporuku usporedbe s vrijednostima u serumu.

Kad se promatraju usporedbe povezanosti tih vrijednosti s različitim spektrom motoričkih i nemotoričkih simptoma, naši su rezultati ukazali na pozitivnu vezu između koncentracije alfa-1-antitripsina u stolici s anksioznosti, pojavom halucinacije i psihoze te težine simptoma

kontrole impulsa, dok je negativna povezanost uočena s kognitivnim sposobnostima. Navedeni rezultati također ukazuju na klinički značaj praćenja vrijednosti tog markera s obzirom na povezanost s više grupa nemotoričkih simptoma te niže kognitivne sposobnosti bolesnika kod kojih su uočene visoke vrijednosti alfa-1-antitripsina.

6.3. Povezanost markera intestinalne upale s kliničkim podtipovima Parkinsonove bolesti

U ranijim studijama koje su ispitivale markere intestinalne upale u uzorcima stolice kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti utvrđene su značajne razlike među pojedinim markerima kod bolesnika u odnosu na zdrave kontrole (69, 76, 99, 100, 101). Iako u navedenim studijama nije pronađena povezanost s kliničkim parametrima bolesnika ili podtipovima bolesti, zaključci svih navedenih istraživanja vodili su prema potrebi definiranja dodatnih podtipova bolesnika kod kojih se pojavljuje intestinalna upala. Također se pokušalo uz definiranje podskupina definirati i kliničku sliku tih bolesnika te bi osim kliničkih manifestacija značajno bilo utvrditi i prognostičke čimbenike povezane s upalnim procesima na periferiji kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti.

Prva istraživanja u tom području uključivala su manji broj ispitanika, zbog čega je bila otežana procjena podskupina bolesnika kod kojih je prisutna intestinalna upala. Nešto veći broj ispitanika obuhvaćalo je opisano istraživanje Hor i suradnika, u kojemu su ispitivani markeri intestinalne upale u uzorcima stolice kod ukupno 71 pacijenta s Parkinsonovom bolesti i 60 ispitanika kontrolne skupine te 38 bolesnika s multiplom sistemskom atrofijom, a naše istraživanje također je uključivalo sličan broj ispitanika uz usporedbu vrijednosti markera intestinalne upale kod pojedinih podtipova Parkinsonove bolesti (101).

U ovom istraživanju bolesnici su podijeljeni prema spolu, dobi početka bolesti, podtipovima prema ljestvici H&Y, dominantnim simptomima te mjestu početka prvih simptoma na tzv. *body-first* i *brain-first*-podtip Parkinsonove bolesti. Navedene podjele nisu ukazale na značajne razlike između vrijednosti markera intestinalne upale kod pacijenata s Parkinsonovom bolesti.

Potrebno je naglasiti da, iako je ukupna veličina uzorka ovog istraživanja bila veća od većine dosadašnjih studija, kod podjele prema podtipovima u pojedinim skupinama zabilježen je vrlo mali broj ispitanika. Naprimjer, kod podjele prema dobi početka bolesti vrlo mali udio

ispitanika bilo je s ranim početkom bolesti. Također, u ukupnom uzorku bolesnika bilo je značajno više muškaraca u odnosu na žene uslijed veće incidencije bolesti kod muškog spola.

Također, promatrajući raspodjelu bolesnika prema ljestvici H&Y, najveći broj ispitanika obuhvaćen je u skupinama 0, 1 ili 2, dok su skupine 3 ili 4 obuhvaćale manji broj ispitanika. Tome dodatno pridonosi i činjenica da su bolesnici većih stadija bili isključeni iz istraživanja zbog nemogućnosti odgovarajuće procjene motoričkih funkcija uslijed otežane pokretljivosti.

Podjela prema tzv. *body-first* i *brain-first*-podtipu uključivala je manji dio ispitanika koji su zadovoljavali kriterije za *body-first*-podtip bolesti za koji je na temelju patogenetskih mehanizama koji ga uzrokuju pretpostavljeno da odgovara bolesnicima s prisutnom intestinalnom upalom.

Kada se promatra raspodjela prema dominantnim simptomima, ukupni broj ispitanika koji je zadovoljavao kriterije za uključivanje u taj tip raspodjele bio je 23 od 64 ispitanika, čemu pridonosi nekoliko razloga. Primarno, prema preporuci autora Fereshtehnejad podjela bolesnika na kliničke podtipove treba obuhvatiti isključivo bolesnike čiji simptomi traju do godinu dana, koji su novodijagnosticirani te do sada nisu koristili nikakvu terapiju (29). Budući da uvođenjem terapije dolazi do promjene kliničke slike, a samim time i do moguće promjene podtipa bolesti, u bolesnika koji su do sada liječeni kriteriji za taj tip raspodjele nisu bili pouzdani, zbog čega nisu uključeni u konačnu procjenu.

Dodatno, stupnjevanje bolesnika koje su autori predstavili u radu obuhvaćalo je veći broj ljestvica i upitnika, međutim sami su autori radi pojednostavljenja postupka definiranja kliničkih podtipova preporučili korištenje manjeg broja ljestvica i upitnika, što je i učinjeno u ovom istraživanju. Tako je domena kognitivnog oštećenja procijenjena na temelju upitnika MoCa uslijed nedostupnosti širokog spektra upitnika koje su autori koristili u izvornom radu prema izdanim preporukama samih autora (29).

Uzimajući u obzir navedene kriterije, od ukupnog broja ispitanika koji su zadovoljavali kriterije za raspodjelu prema Fereshtehnejad i suradnicima, najveći dio ispitanika zadovoljavao je kriterije za intermedijarni tip bolesti. Difuzni/maligni podtip bolesti, prema navedenoj podjeli, najmanje je učestao, a dodatno je bilo od interesa u ovom istraživanju usporediti bolesnike tog podtipa bolesti uslijed pretpostavke da će imati izraženije markere intestinalne upale zbog ranijeg početka bolesti, brže progresije simptoma, izraženije autonomne disfunkcije i nemotoričkih simptoma. Iako su u ovom istraživanju zabilježene više vrijednosti svih markera

intestinalne upale kod bolesnika s difuznim/malignim podtipom bolesti, prema kriterijima za taj podtip samo su dva bolesnika bila uključena u analizu, zbog čega dobiveni rezultati nisu bili značajni.

Iz navedenog se može zaključiti kako su dosadašnji radovi iz ovog područja obuhvaćali manji broj ispitanika. Naše istraživanje i studija Hor i suradnika, iako su uključivali nešto veći broj ispitanika u odnosu na prethodne studije, ipak nisu obuhvaćali dovoljno ispitanika iz pojedinih podskupina kako bi se pouzdano procijenile eventualne razlike između ispitivanih podtipova bolesnika (101). Stoga je potrebno navedene spoznaje proširiti dodatnim istraživanjima koja bi obuhvaćala veći broj ispitanika kako bi zastupljenost pojedinih podskupina bila odgovarajuća za daljnje analize.

6.4. Međusobna povezanost vrijednosti markera intestinalne upale

S ciljem dodatnog uvida u patogenetske mehanizme intestinalne upale kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti učinjena je međusobna usporedba pojedinih vrijednosti markera intestinalne upale u ovom istraživanju. Usporedba je obuhvaćala kontrolnu skupinu i bolesnike s Parkinsonovom bolesti uz kasnije usporedbe prema ranom i kasnom početku bolesti te usporedbu prema mjestu prvih simptoma – tzv. *body-first* i *brain-first*-podtip. Slična usporedba vrijednosti intestinalnih markera u stolici i serumu učinjena je u studiji Aho i suradnika, gdje je pronađeno više korelacija između vrijednosti markera analiziranih iz seruma i uzorka stolice, a od komponenata analiziranih isključivo u uzorcima stolice pronađene su značajne korelacije između vrijednosti kalprotektina i zonulina, zbog čega autori upućuju na vezu između intestinalne upale i crijeвне permeabilnosti (69).

U ovom istraživanju pronađeno je nekoliko međusobnih korelacija markera s naglaskom na pozitivnu povezanost između vrijednosti kalprotektina i alfa-1-antitripsina u svim ispitivanim skupinama, što je ujedno bila i jedina uočena veza između markera u skupini *body-first*-podtipa bolesnika. Uočena je i pozitivna povezanost kalprotektina i laktoferina u kontrolnoj skupini te kalprotektina s beta-defenzinom 2 i sIgA kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti te u skupini s kasnim početkom bolesti i *brain-first*-podtipom.

Povezanost kalprotektina i laktoferina očekivana je s obzirom na to da su obje komponente markeri upalne aktivnosti u crijevima koji se aktiviraju putem neutrofila, dok veza s vrijednostima beta-defenzina i sIgA u više ispitivanih skupina bolesnika upućuje na vezu

između upalne aktivnosti na sluznici crijeva s mikrobiotom i imunološkim mehanizmima koje predstavljaju ta dva markera. S druge strane povezanost alfa-1-antitripsina s kalprotektinom, osobito zbog činjenice da je uočena u svim ispitivanim podskupinama te povezanost alfa-1-antitripsina i laktoferina u kontrolnoj skupini upućuje na povezanost intestinalne upale s povećanom crijevnom permeabilnosti, što su pretpostavili i Aho i suradnici (69).

Promatrajući vrijednosti zonulina koji je također marker povećane crijevne permeabilnosti nije uočena veza između vrijednosti tog markera s bilo kojim od drugih analiziranih markera. Kako je ranije naglašeno, zonulin je bio povezan s blagim kliničkim manifestacijama Parkinsonove bolesti kako u našoj studiji tako i u studiji Aho i suradnika, što može biti razlog zbog čega taj marker nije bio povezan s vrijednostima ostalih analiziranih markera (69). Povišene vrijednosti zonulina u ranijim fazama bolesti mogu predstavljati tek blaže promjene permeabilnosti, dok alfa-1-antitripsin može biti pokazatelj izraženije upalne aktivnosti koju prati porast vrijednosti upalnih markera poput kalprotektina uz gubitak proteina probavnim sustavom, na što upućuju rezultati. Od markera permeabilnosti uočena je i negativna veza između vrijednosti zonulina i kalprotektina te laktoferina i alfa-1-antitripsina u skupini s ranim početkom bolesti, ali kako je ukupna veličina uzorka u toj skupini bila mala, upitan je klinički značaj navedenih rezultata.

Beta-defenzin 2 bio je također pozitivno povezan s vrijednostima alfa-1-antitripsina u skupini bolesnika s Parkinsonovom bolesti, skupini s kasnim početkom bolesti i *brain-first*-podtipom bolesti te s vrijednostima sIgA u skupini s kasnim početkom bolesti. Promatrajući vrijednosti sIgA uočavaju se pozitivne povezanosti tog markera s vrijednostima zonulina i alfa-1-antitripsina u kontrolnoj skupini, alfa-1-antitripsinom u skupini bolesnika s Parkinsonovom bolesti i skupini s kasnim početkom bolesti te laktoferinom u skupini bolesnika s Parkinsonovom bolesti, ranim početkom i *brain-first*-podtipom bolesti. Kako su i beta-defenzin i sIgA inducirani antimikrobnom aktivnošću, navedeno upućuje na neizostavnu ulogu crijevne mikrobiote u upalnim procesima na crijevnoj sluznici.

Navedeni rezultati upućuju na višestruke komponente koje pridonose upalnoj aktivnosti na razini crijevne sluznice kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti, od kojih su mnoge međusobno povezane. Osobito se ističe povećana crijevna permeabilnost mjerena vrijednostima alfa-1-antitripsina kao značajna komponenta intestinalne upale, dok za vrijednosti zonulina nije nađena međusobna povezanost s bilo kojom drugom komponentom upalne aktivnosti upućujući na eventualnu ranu aktivnost zonulina u upalnim procesima crijevne sluznice koju ne prati porast vrijednosti ostalih markera. Također beta-defenzin i sIgA, markeri čiju aktivnost inducira

crijevna mikrobiota, bili su značajno povezani s ostalim ispitivanim markerima upale i permeabilnosti, što dodatno potvrđuje značaj alteracija crijevnog mikrobioma kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti.

6.5. Ograničenja istraživanja

Nakon provedenog istraživanja i usporedbe s rezultatima sličnih studija iz ovog područja, mogu se uočiti određena ograničenja ovog istraživanja. Primarno, potrebno je naglasiti da je veličina uzorka u našem istraživanju bila nešto veća u odnosu na većinu sličnih studija iz ovog područja. Ipak kada se promatra usporedba prema podskupinama, u odnosu na ukupan broj ispitanika bilo je malo ispitanika koji su obuhvaćali manje zastupljene podskupine, poput onih s ranim početkom ili *body-first*-podtipom bolesti te ispitanika ženskog spola. Zbog toga bi svakako bilo potrebno, u daljnjim studijama iz ovog područja dodatno povećati broj ispitanika kako bi zastupljenost svih ispitivanih podskupina bila dovoljna za dodatne analize.

Nadalje, u našem istraživanju nisu rađene dodatne raspodjele ispitanika po terapiji koju su uzimali niti su ispitanici podijeljeni na one bez terapije i ispitanike koji su uzimali bilo kakav oblik terapije kako bi se isključio utjecaj tih čimbenika.

Također, kako je u kontekstu intestinalne upale neizostavan utjecaj crijevne mikrobiote koja se sve češće istražuje ne samo u Parkinsonovoj bolesti već i u drugim kroničnim bolestima, potrebno je naglasiti da u ovom istraživanju nisu rađene analize crijevnog mikrobioma za usporedbu.

Navedeni limiti mogu se koristiti kao smjernice za buduća istraživanja u ovom području koja bi svakako trebala uključivati veći broj ispitanika s ciljem obuhvaćanja svih podskupina od interesa uz detaljniju usporedbu s komorbiditetima bolesnika kao i terapijskim opcijama koje koriste. Također, usporedba korištenih markera upale i permeabilnosti sa sastavom crijevnog mikrobioma mogla bi dodatno pridonositi spoznajama o utjecaju zdravlja crijevne sluznice na nastanak i progresiju Parkinsonove bolesti.

7. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Bolesnici s Parkinsonovom bolesti imaju povišene vrijednosti većine izmjerenih markera intestinalne upale u odnosu na zdrave ispitanike u kontrolnoj skupini.
- Kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti u odnosu na ispitanike kontrolne skupine zabilježene su značajno povišene vrijednosti beta-defenzina-2, zonulina i laktoferina, a snižene vrijednosti alfa-1-antitripsina.
- Vrijednosti kalprotektina i sekretornog imunoglobulina A nisu se značajnije razlikovale u skupini bolesnika s Parkinsonovom bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu.
- Nisu uočene značajne razlike u vrijednosti markera intestinalne upale u odnosu na spol, dob početka bolesti, *body-first* i *brain-first*-podtip Parkinsonove bolesti, podtipove prema dominantnim simptomima te podtipove bolesnika prema ljestvici H&Y.
- Kalprotektin je značajno povezan s težinom gastrointestinalnih simptoma i duljinom trajanja bolesti kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti.
- Niže vrijednosti sekretornog imunoglobulina A kod starijih bolesnika i bolesnika s duljim trajanjem bolesti ukazuju na smanjenje lokalnog imunološkog odgovora na razini crijevne sluznice u tim skupinama bolesnika.
- Zonulin je pokazatelj ranijih promjena crijevne permeabilnosti kod bolesnika s blagim kliničkim manifestacijama bolesti.

8. SAŽETAK

Uvod i cilj istraživanja: Intestinalna upala uz alteracije crijevnog mikrobioma prepoznata je kao jedan od važnih čimbenika u patogenezi Parkinsonove bolesti. Cilj ove studije bio je ispitati vrijednosti markera intestinalne upale i permeabilnosti kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti uz usporedbu s kontrolnom skupinom. Dodatno, ispitivana je povezanost markera s težinom motoričkih i nemotoričkih simptoma te kliničkim podtipovima Parkinsonove bolesti.

Nacrt studije: Studija je organizirana kao presječno istraživanje.

Ispitanici i metode: Kod 64 ispitanika s Parkinsonovom bolesti i 64 zdrava ispitanika kontrolne skupine određene su vrijednosti markera intestinalne upale i permeabilnosti u uzorku stolice ELISA-metodom. Kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti procijenjena je težina motoričkih i nemotoričkih simptoma pomoću ljestvica MDS-UPDRS, H&Y, MDS-NMS, SCOPA-AUT, PDSS-2, MoCa, BAI i BDI-II. Dodatno, učinjena je procjena povezanosti markera intestinalne upale s težinom motoričkih i nemotoričkih simptoma, kliničkim podtipovima Parkinsonove bolesti, dobi i spolom bolesnika, duljinom trajanja bolesti, kao i procjena međusobne povezanosti pojedinih markera.

Rezultati: Kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti uočene su značajno povišene vrijednosti beta-defenzina-2, zonulina i laktoferina, snižene vrijednosti alfa-1-antitripsina, dok za kalprotektin i sekrecijski imunoglobulin A nisu pronađene značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu. Pozitivna korelacija uočena je između vrijednosti kalprotektina i duljine trajanja bolesti, gastrointestinalnih simptoma, anksioznosti, depresije te težine motoričkih komplikacija bolesti, beta-defenzina-2 s težinom kontrole impulsa i poremećajima termoregulacije, sekrecijskog imunoglobulina A i depresije, alfa-1-antitripsina i anksioznosti, halucinacija i psihoze te kontrole impulsa. Negativna korelacija uočena je između vrijednosti sekrecijskog imunoglobulina A i dobi bolesnika, dobi početka bolesti, ortostatske hipotenzije i bolova, zonulina i ukupnog broja bodova ljestvice MDS-UPDRS, alfa-1-antitripsina s kognitivnim smetnjama i laktoferina s težinom simptoma halucinacija i psihoze. Nisu uočene značajne razlike u vrijednostima markera intestinalne upale s obzirom na spol bolesnika, između skupina s ranim ili kasnim početkom bolesti, stadijem bolesti prema ljestvici H&Y, podtipom bolesti prema dominantnim simptomima te *body-first* i *brain-first*-podtipom Parkinsonove bolesti.

Zaključak: Kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti uočene su razlike između većine ispitivanih markera intestinalne upale u odnosu na kontrolnu skupinu uz značajnu povezanost pojedinih markera s težinom simptoma, dobi ili duljinom trajanja bolesti. Buduća istraživanja s većim brojem ispitanika mogla bi ukazati na podskupine bolesnika kod kojih je intestinalna upala klinički značajna.

Ključne riječi: crijeva; intestinalna permeabilnost; markeri intestinalne upale; Parkinsonova bolest

9. SUMMARY

Association of intestinal inflammation markers with motor and non-motor symptoms in patients with Parkinson's disease

Introduction: Intestinal inflammation associated with changes in the intestinal microbiome is considered to be one of the crucial factors in the pathogenesis of Parkinson's disease. This study aimed to investigate the levels of markers of intestinal inflammation and permeability in patients with Parkinson's disease compared to a control group. Additionally, the correlation of the markers with the severity of motor and non-motor symptoms and the clinical subtypes of Parkinson's disease was investigated.

Study design: The study was organized as a cross-sectional study.

Subjects and methods: In 64 subjects with Parkinson's disease and 64 healthy subjects in the control group, the markers of intestinal inflammation and permeability were determined in stool samples using the ELISA method. In patients with Parkinson's disease, the severity of motor and non-motor symptoms was assessed using the MDS-UPDRS, H&Y, MDS-NMS, SCOPA-AUT, PDSS-2, MoCa, BAI, and BDI-II scales. In addition, an assessment of the correlation of markers of intestinal inflammation with the severity of motor and non-motor symptoms, the clinical subtypes of Parkinson's disease, the patients' age, gender, the duration of the disease, and an assessment of the mutual association of the individual markers was carried out.

Results: In patients with Parkinson's disease, significantly increased levels of beta-defensin-2, zonulin, and lactoferrin and decreased levels of alpha-1-antitrypsin were observed. At the same time, no significant differences were found for calprotectin and secretory immunoglobulin A compared to the control group. A positive correlation was found between the levels of calprotectin and the duration of the disease, gastrointestinal symptoms, anxiety, depression and the severity of motor complications of the disease; between beta-defensin-2 with the severity of disorders of impulse control and thermoregulation; between secretory immunoglobulin A and depression; between alpha-1-antitrypsin and anxiety, hallucinations and psychosis, and impulse control. A negative correlation was observed between the levels of secretory immunoglobulin A and patients' age, age of onset, orthostatic hypotension, and pain; between zonulin and the total score on the MDS-UPDRS scale; between alpha-1-antitrypsin with cognitive impairment; and between lactoferrin with the severity of symptoms of hallucinations and psychosis. No significant differences were found in the levels of the markers for intestinal

inflammation regarding the gender, between groups with early or late onset of the disease, the stage of the disease according to the H&Y scale, and the subtypes of Parkinson's disease (body-first and brain-first and subtype of the disease according to dominant symptoms).

Conclusion: In patients with Parkinson's disease, differences were found between most of the markers of intestinal inflammation studied compared to the control group, with a significant association between individual markers and symptom severity, age, or duration of Parkinson's disease. Future research with more subjects could identify subgroups of patients in which intestinal inflammation is clinically significant.

Keywords: intestinal permeability; intestines; markers of intestinal inflammation; Parkinson's disease

10. LITERATURA

1. Simon DK, Tanner CM, Brundin P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clin Geriatr Med*. 2020 Feb;36(1):1-12. doi: 10.1016/j.cger.2019.08.002. Epub 2019 Aug 24. PMID: 31733690; PMCID: PMC6905381.
2. Forloni G. Alpha Synuclein: Neurodegeneration and Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 21;24(6):5914. doi: 10.3390/ijms24065914. PMID: 36982988; PMCID: PMC10059798.
3. Shahnawaz M, Mukherjee A, Pritzkow S, Mendez N, Rabadia P, Liu X, i sur. Discriminating α -synuclein strains in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Nature*. 2020 Feb;578(7794):273-277. doi: 10.1038/s41586-020-1984-7. Epub 2020 Feb 5. PMID: 32025029; PMCID: PMC7066875.
4. Chen Z, Li G, Liu J. Autonomic dysfunction in Parkinson's disease: Implications for pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Neurobiol Dis*. 2020 Feb;134:104700. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104700. Epub 2019 Dec 3. PMID: 31809788.
5. Borghammer P, Van Den Berge N. Brain-First versus Gut-First Parkinson's Disease: A Hypothesis. *J Parkinsons Dis*. 2019;9(s2):S281-S295. doi: 10.3233/JPD-191721. PMID: 31498132; PMCID: PMC6839496.
6. Twelves D, Perkins KS, Counsell C. Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2003 Jan;18(1):19-31. doi: 10.1002/mds.10305. PMID: 12518297.
7. GBD 2016 Neurology Collaborators. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*. 2019 May;18(5):459-480. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30499-X. Epub 2019 Mar 14. PMID: 30879893; PMCID: PMC6459001.
8. Nastavni zavod za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar. Svjetski dan Parkinsonove bolesti, 11. travnja 2020. Dostupno na adresi: <https://stampar.hr/hr/novosti/svjetski-dan-parkinsonove-bolesti-11-travnja-2020>. Datum pristupa:01.09.2024.
9. Jagadeesan AJ, Murugesan R, Vimala Devi S, Meera M, Madhumala G, Vishwanathan Padmaja M, i sur. Current trends in etiology, prognosis and therapeutic aspects of Parkinson's disease: a review. *Acta Biomed*. 2017 Oct 23;88(3):249-262. doi: 10.23750/abm.v88i3.6063. PMID: 29083328; PMCID: PMC6142835.

10. Blauwendraat C, Nalls MA, Singleton AB. The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2020 Feb;19(2):170-178. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30287-X. Epub 2019 Sep 11. PMID: 31521533; PMCID: PMC8972299.
11. Tanner CM, Goldman SM, Ross GW, Grate SJ. The disease intersection of susceptibility and exposure: chemical exposures and neurodegenerative disease risk. *Alzheimers Dement.* 2014 Jun;10(3 Suppl):S213-25. doi: 10.1016/j.jalz.2014.04.014. PMID: 24924672.
12. Kenborg L, Rugbjerg K, Lee PC, Ravnskjaer L, Christensen J, Ritz B, i sur. Head injury and risk for Parkinson disease: results from a Danish case-control study. *Neurology.* 2015 Mar 17;84(11):1098-103. doi: 10.1212/WNL.0000000000001362. Epub 2015 Feb 13. PMID: 25681453; PMCID: PMC4371406.
13. Yang F, Trolle Lagerros Y, Bellocco R, Adami HO, Fang F, Pedersen NL, i sur. Physical activity and risk of Parkinson's disease in the Swedish National March Cohort. *Brain.* 2015 Feb;138(Pt 2):269-75. doi: 10.1093/brain/awu323. Epub 2014 Nov 18. PMID: 25410713.
14. Day JO, Mullin S. The Genetics of Parkinson's Disease and Implications for Clinical Practice. *Genes (Basel).* 2021 Jun 30;12(7):1006. doi: 10.3390/genes12071006. PMID: 34208795; PMCID: PMC8304082.
15. Balestrino R, Schapira AHV. Glucocerebrosidase and Parkinson Disease: Molecular, Clinical, and Therapeutic Implications. *Neuroscientist.* 2018 Oct;24(5):540-559. doi: 10.1177/1073858417748875. Epub 2018 Feb 4. PMID: 29400127.
16. Song H, Chen J, Huang J, Sun P, Liu Y, Xu L, i sur. Epigenetic modification in Parkinson's disease. *Front Cell Dev Biol.* 2023 Jun 7;11:1123621. doi: 10.3389/fcell.2023.1123621. PMID: 37351278; PMCID: PMC10283008.
17. Tansey MG, Wallings RL, Houser MC, Herrick MK, Keating CE, Joers V. Inflammation and immune dysfunction in Parkinson disease. *Nat Rev Immunol.* 2022 Nov;22(11):657-673. doi: 10.1038/s41577-022-00684-6. Epub 2022 Mar 4. PMID: 35246670; PMCID: PMC8895080.
18. Estaun-Panzano J, Arotcarena ML, Bezard E. Monitoring α -synuclein aggregation. *Neurobiol Dis.* 2023 Jan;176:105966. doi: 10.1016/j.nbd.2022.105966. Epub 2022 Dec 15. PMID: 36527982; PMCID: PMC9875312.
19. Gelders G, Baekelandt V, Van der Perren A. Linking Neuroinflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *J Immunol Res.* 2018 Apr 16;2018:4784268. doi: 10.1155/2018/4784268. PMID: 29850629; PMCID: PMC5926497.

20. Kannarkat GT, Boss JM, Tansey MG. The role of innate and adaptive immunity in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis.* 2013;3(4):493-514. doi: 10.3233/JPD-130250. PMID: 24275605; PMCID: PMC4102262.
21. Mulak A, Bonaz B. Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease. *World J Gastroenterol.* 2015 Oct 7;21(37):10609-20. doi: 10.3748/wjg.v21.i37.10609. PMID: 26457021; PMCID: PMC4588083.
22. Ganguly U, Singh S, Pal S, Prasad S, Agrawal BK, Saini RV, i sur. Alpha-Synuclein as a Biomarker of Parkinson's Disease: Good, but Not Good Enough. *Front Aging Neurosci.* 2021 Jul 8;13:702639. doi: 10.3389/fnagi.2021.702639. PMID: 34305577; PMCID: PMC8298029.
23. Zhao N, Yang Y, Zhang L, Zhang Q, Balbuena L, Ungvari GS, i sur. Quality of life in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis of comparative studies. *CNS Neurosci Ther.* 2021 Mar;27(3):270-279. doi: 10.1111/cns.13549. Epub 2020 Dec 28. PMID: 33372386; PMCID: PMC7871788.
24. Vieira de Moraes Filho A, Chaves SN, Martins WR, Tolentino GP, de Cássia Pereira Pinto Homem R, Landim de Farias G, i sur. Progressive Resistance Training Improves Bradykinesia, Motor Symptoms and Functional Performance in Patients with Parkinson's Disease. *Clin Interv Aging.* 2020 Jan 23;15:87-95. doi: 10.2147/CIA.S231359. PMID: 32158202; PMCID: PMC6986410.
25. Schapira AHV, Chaudhuri KR, Jenner P. Non-motor features of Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci.* 2017 Jul;18(7):435-450. doi: 10.1038/nrn.2017.62. Epub 2017 Jun 8. Erratum in: *Nat Rev Neurosci.* 2017 Aug;18(8):509. PMID: 28592904.
26. Gelpi E, Navarro-Otano J, Tolosa E, Gaig C, Compta Y, Rey MJ, i sur. Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Mov Disord.* 2014 Jul;29(8):1010-8. doi: 10.1002/mds.25776. Epub 2014 Jan 2. PMID: 24395122.
27. Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, i sur. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2015 Oct;30(12):1591-601. doi: 10.1002/mds.26424. PMID: 26474316.
28. Tolosa E, Garrido A, Scholz SW, Poewe W. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2021 May;20(5):385-397. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00030-2. PMID: 33894193; PMCID: PMC8185633.
29. Fereshtehnejad SM, Zeighami Y, Dagher A, Postuma RB. Clinical criteria for subtyping Parkinson's disease: biomarkers and longitudinal progression. *Brain.* 2017 Jul 1;140(7):1959-1976. doi: 10.1093/brain/awx118. PMID: 28549077.

30. Berg D, Borghammer P, Fereshtehnejad SM, Heinzel S, Horsager J, Schaeffer E, i sur. Prodromal Parkinson disease subtypes - key to understanding heterogeneity. *Nat Rev Neurol*. 2021 Jun;17(6):349-361. doi: 10.1038/s41582-021-00486-9. Epub 2021 Apr 20. PMID: 33879872.
31. Williams ZM. Good vibrations with deep brain stimulation. *Nat Neurosci*. 2015 May;18(5):618-9. doi: 10.1038/nn.4007. PMID: 25919960.
32. Abbruzzese G, Marchese R, Avanzino L, Pelosin E. Rehabilitation for Parkinson's disease: Current outlook and future challenges. *Parkinsonism Relat Disord*. 2016 Jan;22 Suppl 1:S60-4. doi: 10.1016/j.parkreldis.2015.09.005. Epub 2015 Sep 3. PMID: 26360239.
33. Elsworth JD. Parkinson's disease treatment: past, present, and future. *J Neural Transm*. 2020 May;127(5):785-791. doi: 10.1007/s00702-020-02167-1. Epub 2020 Mar 14. PMID: 32172471; PMCID: PMC8330829.
34. Poirier AA, Aubé B, Côté M, Morin N, Di Paolo T, Soulet D. Gastrointestinal Dysfunctions in Parkinson's Disease: Symptoms and Treatments. *Parkinsons Dis*. 2016;2016:6762528. doi: 10.1155/2016/6762528. Epub 2016 Dec 6. PMID: 28050310; PMCID: PMC5168460.
35. Yemula N, Dietrich C, Dostal V, Hornberger M. Parkinson's Disease and the Gut: Symptoms, Nutrition, and Microbiota. *J Parkinsons Dis*. 2021;11(4):1491-1505. doi: 10.3233/JPD-212707. PMID: 34250955; PMCID: PMC8609682.
36. Srivanitchapoom P, Pandey S, Hallett M. Drooling in Parkinson's disease: a review. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014 Nov;20(11):1109-18. doi: 10.1016/j.parkreldis.2014.08.013. Epub 2014 Aug 27. PMID: 25200111; PMCID: PMC4252747.
37. Postuma R, Romenets SR, Rakheja R. Physician Guide: Non-Motor Symptoms of Parkinson's Disease. Montreal, Canada: McGill University Health Centre; 2012.
38. Yu QJ, Yu SY, Zuo LJ, Lian TH, Hu Y, Wang RD, i sur. Parkinson disease with constipation: Clinical features and relevant factors. *Sci Rep*. 2018;567.
39. Svensson E, Henderson VW, Borghammer P, Horváth-Puhó E, Sørensen HT. Constipation and risk of Parkinson's disease: A Danish population-based cohort study. *Parkinsonism Relat. Disord*. 2016;28:18–22.
40. Bharucha AE, Lacy BE. Mechanisms, Evaluation, and Management of Chronic Constipation. *Gastroenterology*. 2020 Apr;158(5):1232-1249.e3. doi:

- 10.1053/j.gastro.2019.12.034. Epub 2020 Jan 13. PMID: 31945360; PMCID: PMC7573977.
41. Kacprzyk KW, Milewska M, Zarnowska A, Panczyk M, Rokicka G, Szostak-Wegierek D. Prevalence of Malnutrition in Patients with Parkinson's Disease: A Systematic Review. *Nutrients*. 2022 Dec 6;14(23):5194. doi: 10.3390/nu14235194. PMID: 36501224; PMCID: PMC9738273.
 42. Rietdijk CD, Perez-Pardo P, Garssen J, van Wezel RJ, Kraneveld AD. Exploring Braak's Hypothesis of Parkinson's Disease. *Front Neurol*. 2017 Feb 13;8:37. doi: 10.3389/fneur.2017.00037. PMID: 28243222; PMCID: PMC5304413.
 43. Braak H, Rüb U, Gai WP, Del Tredici K. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm (Vienna)*. 2003 May;110(5):517-36. doi: 10.1007/s00702-002-0808-2. PMID: 12721813.
 44. Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2007 Dec;33(6):599-614. doi: 10.1111/j.1365-2990.2007.00874.x. Epub 2007 Oct 24. PMID: 17961138; PMCID: PMC7194308.
 45. Beach TG, White CL 3rd, Hladik CL, Sabbagh MN, Connor DJ, Shill HA, i sur. Olfactory bulb alpha-synucleinopathy has high specificity and sensitivity for Lewy body disorders. *Acta Neuropathol*. 2009 Feb;117(2):169-74. doi: 10.1007/s00401-008-0450-7. Epub 2008 Nov 4. PMID: 18982334; PMCID: PMC2631085.
 46. Shannon KM, Keshavarzian A, Mutlu E, Dodiya HB, Daian D, Jaglin JA, i sur. Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2012 May;27(6):709-15. doi: 10.1002/mds.23838. Epub 2011 Jul 15. PMID: 21766334.
 47. Shannon KM, Keshavarzian A, Dodiya HB, Jakate S, Kordower JH. Is alpha-synuclein in the colon a biomarker for premotor Parkinson's disease? Evidence from 3 cases. *Mov Disord*. 2012 May;27(6):716-9. doi: 10.1002/mds.25020. Epub 2012 May 1. PMID: 22550057.
 48. Pellegrini C, D'Antongiovanni V, Miraglia F, Rota L, Benvenuti L, Di Salvo C, i sur. Enteric α -synuclein impairs intestinal epithelial barrier through caspase-1-inflammasome signaling in Parkinson's disease before brain pathology. *NPJ Parkinsons Dis*. 2022 Jan 12;8(1):9. doi: 10.1038/s41531-021-00263-x. Erratum in: *NPJ Parkinsons Dis*. 2023 Jun 2;9(1):83. PMID: 35022395; PMCID: PMC8755783.
 49. Lebouvier T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, Coron E, Drouard A, N'Guyen JM, i sur. Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its

- relationship with symptoms. *PLoS One*. 2010 Sep 14;5(9):e12728. doi: 10.1371/journal.pone.0012728. PMID: 20856865; PMCID: PMC2939055.
50. Forsyth CB, Shannon KM, Kordower JH, Voigt RM, Shaikh M, Jaglin JA, i sur. Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease. *PLoS One*. 2011;6(12):e28032. doi: 10.1371/journal.pone.0028032. Epub 2011 Dec 1. PMID: 22145021; PMCID: PMC3228722.
 51. Braak H, Sastre M, Bohl JR, de Vos RA, Del Tredici K. Parkinson's disease: lesions in dorsal horn layer I, involvement of parasympathetic and sympathetic pre- and postganglionic neurons. *Acta Neuropathol*. 2007 Apr;113(4):421-9. doi: 10.1007/s00401-007-0193-x. Epub 2007 Feb 9. PMID: 17294202.
 52. Natale G, Ryljestvicin L, Morucci G, Lazzeri G, Frati A, Fornai F. The Baseline Structure of the Enteric Nervous System and Its Role in Parkinson's Disease. *Life (Basel)*. 2021 Jul 22;11(8):732. doi: 10.3390/life11080732. PMID: 34440476; PMCID: PMC8400095.
 53. Ohlsson B, Englund E. Atrophic Myenteric and Submucosal Neurons Are Observed in Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis*. 2019 Jun 19;2019:7935820. doi: 10.1155/2019/7935820. PMID: 31321021; PMCID: PMC6607708.
 54. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003 Mar-Apr;24(2):197-211. doi: 10.1016/s0197-4580(02)00065-9. PMID: 12498954.
 55. Svensson E, Horváth-Puhó E, Thomsen RW, Djurhuus JC, Pedersen L, Borghammer P, i sur. Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2015 Oct;78(4):522-9. doi: 10.1002/ana.24448. Epub 2015 Jul 17. PMID: 26031848.
 56. Beach TG, Adler CH, Sue LI, Shill HA, Driver-Dunckley E, Mehta SH, i sur. Vagus Nerve and Stomach Synucleinopathy in Parkinson's Disease, Incidental Lewy Body Disease, and Normal Elderly Subjects: Evidence Against the "Body-First" Hypothesis. *J Parkinsons Dis*. 2021;11(4):1833-1843. doi: 10.3233/JPD-212733. PMID: 34151862; PMCID: PMC10082635.
 57. Holmqvist S, Chutna O, Bousset L, Aldrin-Kirk P, Li W, Björklund T, i sur. Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. *Acta Neuropathol*. 2014 Dec;128(6):805-20. doi: 10.1007/s00401-014-1343-6. Epub 2014 Oct 9. PMID: 25296989.

58. Pan-Montojo F, Schwarz M, Winkler C, Arnhold M, O'Sullivan GA, Pal A, i sur. Environmental toxins trigger PD-like progression via increased alpha-synuclein release from enteric neurons in mice. *Sci Rep*. 2012;2:898. doi: 10.1038/srep00898. Epub 2012 Nov 30. PMID: 23205266; PMCID: PMC3510466.
59. Attems J, Jellinger KA. The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2008 Aug;34(4):466-7. doi: 10.1111/j.1365-2990.2008.00937.x. Epub 2008 Feb 13. PMID: 18282157.
60. Rutsch A, Kantsjö JB, Ronchi F. The Gut-Brain Axis: How Microbiota and Host Inflammasome Influence Brain Physiology and Pathology. *Front Immunol*. 2020 Dec 10;11:604179. doi: 10.3389/fimmu.2020.604179. PMID: 33362788; PMCID: PMC7758428.
61. Menozzi E, Macnaughtan J, Schapira AHV. The gut-brain axis and Parkinson disease: clinical and pathogenetic relevance. *Ann Med*. 2021 Dec;53(1):611-625. doi: 10.1080/07853890.2021.1890330. PMID: 33860738; PMCID: PMC8078923.
62. Postuma RB, Gagnon JF, Bertrand JA, Génier Marchand D, Montplaisir JY. Parkinson risk in idiopathic REM sleep behavior disorder: preparing for neuroprotective trials. *Neurology*. 2015 Mar 17;84(11):1104-13. doi: 10.1212/WNL.0000000000001364. Epub 2015 Feb 13. PMID: 25681454; PMCID: PMC4371408.
63. Schenck CH, Boeve BF, Mahowald MW. Delayed emergence of a parkinsonian disorder or dementia in 81% of older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder: a 16-year update on a previously reported series. *Sleep Med*. 2013 Aug;14(8):744-8. doi: 10.1016/j.sleep.2012.10.009. Epub 2013 Jan 22. PMID: 23347909.
64. Fedorova TD, Seidelin LB, Knudsen K, Schacht AC, Geday J, Pavese N, i sur. Decreased intestinal acetylcholinesterase in early Parkinson disease: An ¹¹C-donepezil PET study. *Neurology*. 2017 Feb 21;88(8):775-781. doi: 10.1212/WNL.0000000000003633. Epub 2017 Jan 18. PMID: 28100726.
65. Knudsen K, Fedorova TD, Hansen AK, Sommerauer M, Otto M, Svendsen KB, i sur. In-vivo staging of pathology in REM sleep behaviour disorder: a multimodality imaging case-control study. *Lancet Neurol*. 2018 Jul;17(7):618-628. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30162-5. Epub 2018 Jun 1. PMID: 29866443.
66. Horsager J, Andersen KB, Knudsen K, Skjærbæk C, Fedorova TD, Okkels N, Schaeffer E, i sur. Brain-first versus body-first Parkinson's disease: a multimodal imaging case-

- control study. *Brain*. 2020 Oct 1;143(10):3077-3088. doi: 10.1093/brain/awaa238. PMID: 32830221.
67. Bai F, You L, Lei H, Li X. Association between increased and decreased gut microbiota abundance and Parkinson's disease: A systematic review and subgroup meta-analysis. *Exp Gerontol*. 2024 Jun 15;191:112444.
 68. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, i sur. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*. 2019 Jan 10;7(1):14. doi: 10.3390/microorganisms7010014. PMID: 30634578; PMCID: PMC6351938.
 69. Aho VTE, Houser MC, Pereira PAB, Chang J, Rudi K, Paulin L, i sur. Relationships of gut microbiota, short-chain fatty acids, inflammation, and the gut barrier in Parkinson's disease. *Mol Neurodegener*. 2021 Feb 8;16(1):6. doi: 10.1186/s13024-021-00427-6. PMID: 33557896; PMCID: PMC7869249.
 70. Klann EM, Dissanayake U, Gurralla A, Farrer M, Shukla AW, Ramirez-Zamora A, i sur. The Gut-Brain Axis and Its Relation to Parkinson's Disease: A Review. *Front Aging Neurosci*. 2022 Jan 7;13:782082. doi: 10.3389/fnagi.2021.782082. PMID: 35069178; PMCID: PMC8776990.
 71. Ghosh SS, Wang J, Yannie PJ, Ghosh S. Intestinal Barrier Dysfunction, LPS Translocation, and Disease Development. *J Endocr Soc*. 2020 Feb 20;4(2):bvz039. doi: 10.1210/jendso/bvz039. PMID: 32099951; PMCID: PMC7033038.
 72. Kim C, Lv G, Lee JS, Jung BC, Masuda-Suzukake M, Hong CS, i sur. Exposure to bacterial endotoxin generates a distinct strain of α -synuclein fibril. *Sci Rep*. 2016 Aug 4;6:30891. doi: 10.1038/srep30891. PMID: 27488222; PMCID: PMC4973277.
 73. Chen X, Hu Y, Cao Z, Liu Q, Cheng Y. Cerebrospinal Fluid Inflammatory Cytokine Aberrations in Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Immunol*. 2018 Sep 19;9:2122. doi: 10.3389/fimmu.2018.02122. PMID: 30283455; PMCID: PMC6156158.
 74. Qin XY, Zhang SP, Cao C, Loh YP, Cheng Y. Aberrations in peripheral inflammatory cytokine levels in Parkinson disease: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Neurol*. 2016;73(11):1316–1324. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.2742.
 75. Perez-Pardo P, Dodiya HB, Engen PA, Forsyth CB, Huschens AM, Shaikh M, i sur. Role of TLR4 in the gut-brain axis in Parkinson's disease: a translational study from men to mice. *Gut*. 2019;68(5):829–843. doi: 10.1136/gutjnl-2018-316844.

76. Schwartz A, Spiegel J, Dillmann U, Grundmann D, Bürmann J, Faßbender K, i sur. Fecal markers of intestinal inflammation and intestinal permeability are elevated in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2018 May;50:104-107. doi: 10.1016/j.parkreldis.2018.02.022. Epub 2018 Feb 12. PMID: 29454662.
77. Tansey MG, Wallings RL, Houser MC, Herrick MK, Keating CE, Joers V. Inflammation and immune dysfunction in Parkinson disease. *Nat Rev Immunol.* 2022 Nov;22(11):657-673. doi: 10.1038/s41577-022-00684-6. Epub 2022 Mar 4. PMID: 35246670; PMCID: PMC8895080.
78. Zhu F, Li C, Gong J, Zhu W, Gu L, Li N. The risk of Parkinson's disease in inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *Dig Liver Dis.* 2019 Jan;51(1):38-42. doi: 10.1016/j.dld.2018.09.017. Epub 2018 Sep 21. PMID: 30309751.
79. Park S, Kim J, Chun J, Han K, Soh H, Kang EA, i sur. Patients with Inflammatory Bowel Disease Are at an Increased Risk of Parkinson's Disease: A South Korean Nationwide Population-Based Study. *J Clin Med.* 2019 Aug 8;8(8):1191. doi: 10.3390/jcm8081191. PMID: 31398905; PMCID: PMC6723604.
80. Camilleri M. Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans. *Gut.* 2019 Aug;68(8):1516-1526. doi: 10.1136/gutjnl-2019-318427. Epub 2019 May 10. PMID: 31076401; PMCID: PMC6790068.
81. Odenwald MA, Turner JR. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14:9–21.
82. Keita AV, Soderholm JD. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterol Motil.* 2010;22:718–33.
83. Villarán RF, Espinosa-Oliva AM, Sarmiento M, De Pablos RM, Argüelles S, Delgado-Cortés MJ, i sur. Ulcerative colitis exacerbates lipopolysaccharide-induced damage to the nigral dopaminergic system: potential risk factor in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2010 Sep;114(6):1687-700. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06879.x. Epub 2010 Aug 19. PMID: 20584104.
84. Kelly LP, Carvey PM, Keshavarzian A, Shannon KM, Shaikh M, Bakay RA, i sur. Progression of intestinal permeability changes and alpha-synuclein expression in a mouse model of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2014 Jul;29(8):999-1009. doi: 10.1002/mds.25736. Epub 2013 Nov 4. PMID: 24898698; PMCID: PMC4050039.
85. Kishimoto Y, Zhu W, Hosoda W, Sen JM, Mattson MP. Chronic Mild Gut Inflammation Accelerates Brain Neuropathology and Motor Dysfunction in α -

- Synuclein Mutant Mice. *Neuromolecular Med.* 2019 Sep;21(3):239-249. doi: 10.1007/s12017-019-08539-5. Epub 2019 May 11. PMID: 31079293; PMCID: PMC6701950.
86. John LJ, Fromm M, Schulzke JD. Epithelial barriers in intestinal inflammation. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Sep 1;15(5):1255-70. doi: 10.1089/ars.2011.3892. Epub 2011 May 11. PMID: 21294654.
 87. Stolzenberg E, Berry D, Yang D, Lee EY, Kroemer A, Kaufman S, i sur. A Role for Neuronal Alpha-Synuclein in Gastrointestinal Immunity. *J Innate Immun.* 2017;9(5):456-463. doi: 10.1159/000477990. Epub 2017 Jun 27. Erratum in: *J Innate Immun.* 2018;10(1):82. PMID: 28651250; PMCID: PMC5865636.
 88. Allen Reish HE, Standaert DG. Role of α -synuclein in inducing innate and adaptive immunity in Parkinson disease. *J Parkinsons Dis.* 2015;5(1):1-19. doi: 10.3233/JPD-140491. PMID: 25588354; PMCID: PMC4405142.
 89. Devos D, Lebouvier T, Lardeux B, Biraud M, Rouaud T, Pouclet H, i sur. Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2013 Feb;50:42-8. doi: 10.1016/j.nbd.2012.09.007. Epub 2012 Sep 24. PMID: 23017648.
 90. Rühl A, Franzke S, Collins SM, Stremmel W. Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001 Jun;280(6):G1163-71. doi: 10.1152/ajpgi.2001.280.6.G1163. PMID: 11352809.
 91. Chen QQ, Haikal C, Li W, Li JY. Gut Inflammation in Association With Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Front Mol Neurosci.* 2019 Sep 13;12:218. doi: 10.3389/fnmol.2019.00218. PMID: 31572126; PMCID: PMC6753187.
 92. Keshavarzian A, Green SJ, Engen PA, Voigt RM, Naqib A, Forsyth CB, i sur. Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2015 Sep;30(10):1351-60. doi: 10.1002/mds.26307. Epub 2015 Jul 16. PMID: 26179554.
 93. Zeng MY, Inohara N, Nuñez G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunol.* 2017 Jan;10(1):18-26. doi: 10.1038/mi.2016.75. Epub 2016 Aug 24. PMID: 27554295; PMCID: PMC5788567.
 94. Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes.* 2016 May 3;7(3):189-200. doi: 10.1080/19490976.2015.1134082. Epub 2016 Mar 10. PMID: 26963409; PMCID: PMC4939913.
 95. Zhao Z, Ning J, Bao XQ, Shang M, Ma J, Li G, i sur. Fecal microbiota transplantation protects rotenone-induced Parkinson's disease mice via suppressing inflammation

- mediated by the lipopolysaccharide-TLR4 signaling pathway through the microbiota-gut-brain axis. *Microbiome*. 2021 Nov 17;9(1):226. doi: 10.1186/s40168-021-01107-9. PMID: 34784980; PMCID: PMC8597301.
96. Fukunaga S, Kuwaki K, Mitsuyama K, Takedatsu H, Yoshioka S, Yamasaki H, i sur. Detection of calprotectin in inflammatory bowel disease: Fecal and serum levels and immunohistochemical localization. *Int J Mol Med*. 2018 Jan;41(1):107-118. doi: 10.3892/ijmm.2017.3244. Epub 2017 Nov 7. PMID: 29115397; PMCID: PMC5746327.
 97. Sands BE. Biomarkers of Inflammation in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2015 Oct;149(5):1275-1285.e2. doi: 10.1053/j.gastro.2015.07.003. Epub 2015 Jul 9. PMID: 26166315.
 98. Kopylov U, Rosenfeld G, Bressler B, Seidman E. Clinical utility of fecal biomarkers for the diagnosis and management of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2014 Apr;20(4):742-56. doi: 10.1097/01.MIB.0000442681.85545.31. PMID: 24562174.
 99. Mulak A, Koszewicz M, Panek-Jeziorna M, Koziowska-Gawron E, Budrewicz S. Calprotectin as a Marker of the Gut Immune System Activation Is Elevated in Parkinson's Disease. *Front Neurosci*. 2019 Sep 27;13:992. doi: 10.3389/fnins.2019.00992. PMID: 31611762; PMCID: PMC6776883.
 100. Dumitrescu L, Marta D, Dănaŭ A, Lefter A, Tulbă D, Cozma L, i sur. Serum and Fecal Markers of Intestinal Inflammation and Intestinal Barrier Permeability Are Elevated in Parkinson's Disease. *Front Neurosci*. 2021 Jun 18;15:689723. doi: 10.3389/fnins.2021.689723. PMID: 34220443; PMCID: PMC8249847.
 101. Hor JW, Lim SY, Khor ES, Chong KK, Song SL, Ibrahim NM, i sur. Fecal Calprotectin in Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy. *J Mov Disord*. 2022 May;15(2):106-114. doi: 10.14802/jmd.21085. Epub 2021 Dec 24. PMID: 34937162; PMCID: PMC9171316.
 102. Talavera Andújar B, Aurich D, Aho VTE, Singh RR, Cheng T, Zaslavsky L, i sur. Studying the Parkinson's disease metabolome and exposome in biological samples through different analytical and cheminformatics approaches: a pilot study. *Anal Bioanal Chem*. 2022 Oct;414(25):7399-7419. doi: 10.1007/s00216-022-04207-z. Epub 2022 Jul 13. PMID: 35829770; PMCID: PMC9482909.
 103. Augustin A, Guennec AL, Umamahesan C, Kendler-Rhodes A, Tucker RM, Chekmeneva E, i sur. Faecal metabolite deficit, gut inflammation and diet in Parkinson's

- disease: Integrative analysis indicates inflammatory response syndrome. *Clin Transl Med.* 2023 Jan;13(1):e1152. doi: 10.1002/ctm2.1152. PMID: 36588088; PMCID: PMC9806009.
104. Saviano A, Candelli M, Zanza C, Piccioni A, Migneco A, Ojetto V. Gastrointestinal Involvement in Extra-Digestive Disease: Which Is the Role of Fecal Calprotectin? *Medicina (Kaunas).* 2022 Oct 2;58(10):1384. doi: 10.3390/medicina58101384. PMID: 36295545; PMCID: PMC9608771.
 105. Jukic A, Bakiri L, Wagner EF, Tilg H, Adolph TE. Calprotectin: from biomarker to biological function. *Gut.* 2021 Oct;70(10):1978-1988. doi: 10.1136/gutjnl-2021-324855. Epub 2021 Jun 18. PMID: 34145045; PMCID: PMC8458070.
 106. Alam NH, Raqib R, Ashraf H, Qadri F, Ahmed S, Zasloff M, i sur. L-isoleucine-supplemented oral rehydration solution in the treatment of acute diarrhoea in children: a randomized controlled trial. *J Health Popul Nutr.* 2011 Jun;29(3):183-90. doi: 10.3329/jhpn.v29i3.7864. PMID: 21766553; PMCID: PMC3131118.
 107. Shulman RJ, Devaraj S, Heitkemper M. Activation of the Innate Immune System in Children With Irritable Bowel Syndrome Evidenced by Increased Fecal Human β -Defensin-2. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2021 Oct;19(10):2121-2127. doi: 10.1016/j.cgh.2020.09.034. Epub 2020 Sep 20. PMID: 32961343; PMCID: PMC8041153.
 108. Han F, Zhang H, Xia X, Xiong H, Song D, Zong X, i sur. Porcine β -defensin 2 attenuates inflammation and mucosal lesions in dextran sodium sulfate-induced colitis. *J Immunol.* 2015 Feb 15;194(4):1882-93. doi: 10.4049/jimmunol.1402300. Epub 2015 Jan 19. PMID: 25601921.
 109. Gacesa R, Vich Vila A, Collij V, Mujagic Z, Kurilshikov A, Voskuil MD, i sur. A combination of fecal calprotectin and human beta-defensin 2 facilitates diagnosis and monitoring of inflammatory bowel disease. *Gut Microbes.* 2021 Jan-Dec;13(1):1943288. doi: 10.1080/19490976.2021.1943288. PMID: 34313538; PMCID: PMC8317932.
 110. Jendraszak M, Gałęcka M, Kotwicka M, Schwiertz A, Regdos A, Pazgrat-Patan M, i sur. Impact of Biometric Patient Data, Probiotic Supplementation, and Selected Gut Microorganisms on Calprotectin, Zonulin, and sIgA Concentrations in the Stool of Adults Aged 18-74 Years. *Biomolecules.* 2022 Nov 29;12(12):1781. doi: 10.3390/biom12121781. PMID: 36551209; PMCID: PMC9775524.

111. Wells JM, Brummer RJ, Derrien M, MacDonald TT, Troost F, Cani PD, i sur. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 2017;312:G171–G193. doi: 10.1152/ajpgi.00048.2015.
112. Li Y, Jin L, Chen T. The Effects of Secretory IgA in the Mucosal Immune System. *Biomed Res Int.* 2020 Jan 3;2020:2032057. doi: 10.1155/2020/2032057. PMID: 31998782; PMCID: PMC6970489.
113. Fasano A. Intestinal permeability and its regulation by zonulin: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2012 Oct;10(10):1096-100. doi: 10.1016/j.cgh.2012.08.012. Epub 2012 Aug 16. PMID: 22902773; PMCID: PMC3458511.
114. Rahman MT, Ghosh C, Hossain M, Linfield D, Rezaee F, Janigro D, i sur. IFN- γ , IL-17A, or zonulin rapidly increase the permeability of the blood-brain and small intestinal epithelial barriers: Relevance for neuro-inflammatory diseases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Dec 9;507(1-4):274-279. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.11.021. Epub 2018 Nov 16. PMID: 30449598.
115. Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev.* 2011;91:151–175.
116. De Serres F, Blanco I. Role of alpha-1 antitrypsin in human health and disease. *J Intern Med.* 2014 Oct;276(4):311-35. doi: 10.1111/joim.12239. Epub 2014 May 13. PMID: 24661570.
117. Poullis A, Foster R, Northfield TC, Mendall MA. Review article: faecal markers in the assessment of activity in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002 Apr;16(4):675-81. doi: 10.1046/j.1365-2036.2002.01196.x. PMID: 11929384.
118. Boerlage TC, Westerink F, Poland DC, Huibregtse IL, Acherman YI, Gerdes VE. Fecal Calprotectin, Elastase, and Alpha-1-Antitrypsin Levels After Roux-en-Y Gastric Bypass; Calprotectin Is Significantly Elevated in the Majority of Patients. *Obes Surg.* 2016 Dec;26(12):2974-2980. doi: 10.1007/s11695-016-2222-0. PMID: 27216731; PMCID: PMC5118387.
119. Zhang Y, Lu C, Zhang J. Lactoferrin and Its Detection Methods: A Review. *Nutrients.* 2021 Jul 22;13(8):2492. doi: 10.3390/nu13082492. PMID: 34444652; PMCID: PMC8398339.
120. Zhou XL, Xu W, Tang XX, Luo LS, Tu JF, Zhang CJ, i sur. Fecal lactoferrin in discriminating inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome: a diagnostic

- meta-analysis. *BMC Gastroenterol.* 2014 Jul 7;14:121. doi: 10.1186/1471-230X-14-121. PMID: 25002150; PMCID: PMC4105129.
121. Däbritz J, Musci J, Foell D. Diagnostic utility of faecal biomarkers in patients with irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol.* 2014 Jan 14;20(2):363-75. doi: 10.3748/wjg.v20.i2.363. PMID: 24574706; PMCID: PMC3923012.
 122. Oliveira GN, Souza CP, Foss MP, Tumas V. An analysis of the cognitive items of the Movement Disorder Society checklist for the diagnosis of dementia in patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2015 Oct;21(10):1260-3.
 123. Goetz CG, Poewe W, Rascol O, Sampaio C, Stebbins GT, Counsell C, i sur. Movement Disorder Society Task Force on Rating Scales for Parkinson's Disease. Movement Disorder Society Task Force report on the Hoehn and Yahr staging scale: status and recommendations. *Mov Disord.* 2004 Sep;19(9):1020-8.
 124. Rodriguez-Blazquez C, Schrag A, Rizos A, Chaudhuri KR, Martinez-Martin P, Weintraub D. Prevalence of non-motor symptoms and non-motor fluctuations in Parkinson's disease using the MDS-NMS. *Mov Disord Clin Pract.* 2020 Dec 21;8(2):231-9.
 125. Visser M, Marinus J, Stiggelbout AM, Van Hilten JJ. Assessment of autonomic dysfunction in Parkinson's disease: the SCOPA-AUT. *Mov Disord.* 2004 Nov;19(11):1306-12.
 126. Aiello EN, D'Iorio A, Solca F, Torre S, Colombo E, Maranzano A, i sur. Ecological validity of the Montreal cognitive assessment in non-demented Parkinson's disease patients. *Neurodegener Dis.* 2022;22(3-4):159-63.
 127. Muntean ML, Benes H, Sixel-Döring F, Chaudhuri KR, Suzuki K, Hirata K, i sur. Clinically relevant cut-off values for the Parkinson's Disease Sleep Scale-2 (PDSS-2): a validation study. *Sleep Med.* 2016 Aug;24:87-92.
 128. Stiasny-Kolster K, Mayer G, Schäfer S, Möller JC, Heinzel-Gutenbrunner M, Oertel WH. The REM sleep behavior disorder screening questionnaire--a new diagnostic instrument. *Mov Disord.* 2007 Dec;22(16):2386-93. doi: 10.1002/mds.21740. PMID: 17894337.
 129. Wang YP, Gorenstein C. Psychometric properties of the Beck Depression Inventory-II: a comprehensive review. *Braz J Psychiatry.* 2013 Oct-Dec;35(4):416-31.
 130. Leentjens AF, Dujardin K, Marsh L, Richard IH, Starkstein SE, Martinez-Martin P. Anxiety rating scales in Parkinson's disease: a validation study of the Hamilton

- Anxiety Rating Scale, the Beck Anxiety Inventory, and the Hospital Anxiety and Depression Scale. *Mov Disord*. 2011 Feb 15;26(3):407-15.
131. Zhou F, Tan C, Song C, Wang M, Yuan J, Liu Y, i sur. Abnormal intra- and inter-network functional connectivity of brain networks in early-onset Parkinson's disease and late-onset Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci*. 2023 Mar 24;15:1132723. doi: 10.3389/fnagi.2023.1132723. PMID: 37032830; PMCID: PMC10080130.
 132. Mehanna R, Smilowska K, Fleisher J, Post B, Hatano T, Pimentel Piemonte ME, i sur. International Parkinson and Movement Disorder Society Task Force on Early Onset Parkinson's Disease. Age Cutoff for Early-Onset Parkinson's Disease: Recommendations from the International Parkinson and Movement Disorder Society Task Force on Early Onset Parkinson's Disease. *Mov Disord Clin Pract*. 2022 Sep 10;9(7):869-878. doi: 10.1002/mdc3.13523. PMID: 36247919; PMCID: PMC9547138.
 133. Khaki-Khatibi F, Qujeq D, Kashifard M, Moein S, Maniati M, Vaghari-Tabari M. Calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clin Chim Acta*. 2020 Nov;510:556-565. doi: 10.1016/j.cca.2020.08.025. Epub 2020 Aug 18. PMID: 32818491; PMCID: PMC7431395.
 134. Tyszka M, Maciejewska-Markiewicz D, Biliński J, Lubas A, Stachowska E, Basak GW. Increased Intestinal Permeability and Stool Zonulin, Calprotectin and Beta-Defensin-2 Concentrations in Allogenic Hematopoietic Cell Transplantation Recipients. *Int J Mol Sci*. 2022 Dec 15;23(24):15962. doi: 10.3390/ijms232415962. PMID: 36555600; PMCID: PMC9781277.
 135. Siddiqui I, Majid H, Abid S. Update on clinical and research application of fecal biomarkers for gastrointestinal diseases. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2017 Feb 6;8(1):39-46. doi: 10.4292/wjgpt.v8.i1.39. PMID: 28217373; PMCID: PMC5292605.
 136. Boone JH, DiPersio JR, Tan MJ, Salstrom SJ, Wickham KN, Carman RJ, i sur. Elevated lactoferrin is associated with moderate to severe *Clostridium difficile* disease, stool toxin, and 027 infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013 Dec;32(12):1517-23. doi: 10.1007/s10096-013-1905-x. Epub 2013 Jun 18. PMID: 23771554; PMCID: PMC3825630.
 137. Benitez JM, Meuwis MA, Reenaers C, Van Kemseke C, Meunier P, Louis E. Role of endoscopy, cross-sectional imaging and biomarkers in Crohn's disease monitoring. *Gut*. 2013 Dec;62(12):1806-16.

138. Maas BR, Göttgens I, Tijssen Klasen HPS, Kapelle WM, Radder DLM, Bloem BR et al. Age and gender differences in non-motor symptoms in people with Parkinson's disease. *Front Neurol*. 2024 Feb 1;15:1339716. doi: 10.3389/fneur.2024.1339716. PMID: 38361642; PMCID: PMC10867965.
139. Szewczyk-Krolikowski K, Tomlinson P, Nithi K, Wade-Martins R, Talbot K et al. The influence of age and gender on motor and non-motor features of early Parkinson's disease: initial findings from the Oxford Parkinson Disease Center (OPDC) discovery cohort. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014 Jan;20(1):99-105. doi: 10.1016/j.parkreldis.2013.09.025. Epub 2013 Oct 12. PMID: 24183678.
140. Boncuk Ulaş S, Güzey Aras Y, Irmak Gözükar S, Acar T, Acar BA. Correlates of Zonulin and Claudin-5, markers of intestinal and brain endothelial permeability, in Parkinson's Disease: A pilot study. *Parkinsonism Relat Disord*. 2023 May;110:105361. doi: 10.1016/j.parkreldis.2023.105361. Epub 2023 Mar 17. PMID: 36963340.
141. Dufek M, Hamanová M, Lokaj J, Goldmund D, Rektorová I, Michálková Z, i sur. Serum inflammatory biomarkers in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2009 May;15(4):318-20. doi: 10.1016/j.parkreldis.2008.05.014. Epub 2008 Jul 30. PMID: 18672391.
142. Erickson JA, Jensen RA, Grenache DG. Performance Evaluation of an ELISA for the Quantitative Measurement of α 1-Antitrypsin in Stool. *J Appl Lab Med*. 2016 Jul 1;1(1):60-66. doi: 10.1373/jalm.2016.020198. PMID: 33626810.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Ines Rajkovača Latić

Datum i mjesto rođenja: 28. 3. 1991., Slavonski Brod

Zvanje: doktorica medicine, specijalistica gastroenterologije

Adresa elektroničke pošte: ines.rajkovaca@gmail.com

Školovanje: 1997. – 2005. Osnovna škola Ivan Goran Kovačić, Slavonski Brod

2005. – 2009. Gimnazija Matija Mesić, Slavonski Brod

2009. – 2015. Medicinski fakultet Osijek

2018. do danas Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo, Medicinski fakultet Osijek

2021. – 2022. Poslijediplomski specijalistički studij Gastroenterologija, Medicinski fakultet Zagreb

Radno iskustvo: 2016. – 2017. Doktorica medicine u Timu T1, Zavod za hitnu medicinu Brodsko-posavske županije

2017. – 2024. Specijalizantica gastroenterologije, Opća bolnica „Dr. Josip Benčević“, Slavonski Brod

2024. do danas Specijalistica gastroenterologije, Opća bolnica „Dr. Josip Benčević“, Slavonski Brod

Članstva i aktivnosti u znanstvenim i stručnim udrugama:

Hrvatska liječnička komora: 2015. do danas

Hrvatsko gastroenterološko društvo: 2017. do danas

Stručna i znanstvena aktivnost:

Izvorni znanstveni radovi:

1.) Rajkovaca Latic I, Popovic Z, Mijatovic K, Sahinovic I, Pekic V, Vucic D, Cosic V, Miskic B, Tomic S. Association of intestinal inflammation and permeability markers with clinical

manifestations of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2024 Jun;123:106948. doi: 10.1016/j.parkreldis.2024.106948. Epub 2024 Mar 27. PMID: 38554664.

2.) Tomic S, Kuric I, Kuric TG, Popovic Z, Kragujevic J, Zubonja TM, Rajkovaca I, Matosa S. Seborrheic Dermatitis Is Related to Motor Symptoms in Parkinson's Disease. *J Clin Neurol*. 2022 Nov;18(6):628-634. doi: 10.3988/jcn.2022.18.6.628. PMID: 36367060; PMCID: PMC9669556.

3.) Miškić B, Ćosić V, Miškić K, Rajkovača Latić I, Vučić D, Kljaić Bukvić B i sur. Glycemic Control in Diabetes Type 2 Patients in Foster Families of Brod-Posavina County During the COVID-19 Pandemic. *Collegium antropologicum*. 2021;45(2):95-102. <https://doi.org/10.5671/ca.45.2.12>.

4.) Miškić B, Ćosić V, Včev A, Miškić K, Rajkovača-Latić I, Dujmić Ž. Recommendations for People with Osteoporosis and General Practitioners During COVID-19 Pandemic. *Collegium antropologicum*. 2020;44(3):165-170. <https://doi.org/10.5671/ca.44.3.9>.

5.) Takač B, Mihaljević S, Glavaš-Obrovac L, Kibel A, Suver-Stević M, Canecki-Varžić S, Samardžija M, Rajkovac I, Kovač D, Štefanić M. Interactions among Interleukin-6, C-reactive protein and Interleukin-6 (-174) G/C Polymorphism in the Pathogenesis of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Acta Clin Croat*. 2020;59(1):67-80. doi: 10.20471/acc.2020.59.01.09. PMID: 32724277; PMCID: PMC7382872.

6.) Miskic B, Rajkovača I, Ćosić V. Local anti-inflammatory effect of vitamin D in acute and chronic gouty arthritis. *Australasian Medical Journal*. 2019;12.10.21767/AMJ.2018.3546.

7.) Dujmic Z, Cosic V, Rajkovaca I, Vcev A, Miskic B et al. Cyberbullying in Early Adolescence: Is There a Difference Between Urban and Rural Environment?. *Am J Biomed Sci & Res*. 2019 - 1(5). AJBSR.MS.ID.000542. DOI: 10.34297/AJBSR.2019.01.000542.

8.) Miskic B, Rajkovaca I, Cosic V. Vitamin D3 as a Powerful Immunoregulator-Cause or Consequence of Disbalance? *Biomed J Sci&Tech Res*.2018;2;1-3. doi:10.26717/BJSTR.2018.09.001771.

9.) Tomic S, Rajkovaca I, Pekic V, Salha T, Misevic S. Impact of autonomic dysfunctions on the quality of life in Parkinson's disease patients. *Acta Neurol Belg*. 2017 Mar;117(1):207-211. doi: 10.1007/s13760-016-0739-6. Epub 2016 Dec 27. PMID: 28028676.

Objavljeni kongresni sažeci:

1. S.Tomic, I.Kuric, T.Gilman Kuric, Z.Popovic, J.Kragujevic, T.Mirosevic Zubonja, I.Rajkovaca, S. Matosa. The severity of motor symptoms is a risk factor for seborrheic dermatitis in Parkinson's disease patients. MDS Virtual Congress 2021., supplement Official Journal of the International Parkinson and Movement Disorder Society, September 2021.
- 2.Rajkovaca Latic I, Miskic B, Holik H, Vucic D. Relationship between C-reactive protein and albumin ratio with disease activity in Crohn's disease. 9.kongres Hrvatskoga gastroenterološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem, supplement 2. Acta clinica Croatica 2021.g.
3. Rajkovaca Latic I, Miskic B, Holik H, Vucic D. A rare cause of acute abdominal pain in a young male: Epiploic Appendagitis. 9.kongres Hrvatskoga gastroenterološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem, supplement 2. Acta clinica Croatica 2021.g.
4. Rajkovaca Latic I, Miskic B, Holik H, Vucic D. Lemmel syndrome as a rare cause of obstructive jaundice: A case report. 9.kongres Hrvatskoga gastroenterološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem, supplement 2. Acta clinica Croatica 2021.g.
5. Rajkovaca I, Miskic B, Cosic V, Vcev A, Mihaljevic S. Vitamin D deficiency and inflammation activity in Crohn's disease at the time of diagnosis. The First Mediterranean Symposium on Vitamin D, Društvo za osteoporozu u Federaciji Bosne i Hercegovine, 2019, 1-1.
6. Miskic B, Cosic V, Rajkovaca I. Immunomodulation effects of vitamin D in diabetes mellitus. The First Mediterranean Symposium on Vitamin D, Sarajevo, Bosna i Hercegovina, 2019.
7. Miskic B, Cosic V, Rajkovaca I, Cvitkusic Lukenda K, Knezevic Pravec M. Primary dismenorrhea and vitamin D insufficiency in young woman. 5th International Congress on Controversies in Rheumatology and Autoimmunity (CORA 2019) Florence.

Uredničke knjige:

1. Miškić Blaženka i sur. Priručnik za liječenje internističkih bolesti u COVID jedinicama. Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek; 2021.