

Analiza crijevnog mikrobioma u štakorskom modelu Alzheimerove bolesti

Ledinski, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:348567>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Maja Fabijanić

**ANALIZA CRIJEVNOG MIKROBIOMA
U ŠTAKORSKOM MODELU
ALZHEIMEROVE BOLESTI**

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić te je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u svrhu stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

Želim se zahvaliti prof.dr.sc. Nadi Oršolić za stručno vodstvo prilikom izrade i pisanja ovog rada i za njenu pratnju tokom cijelog mog fakultetskog obrazovanja. Draga profesorice, hvala Vam od srca za svu pažnju i brigu!

Hvala Marini i Dyani za svu pomoć prilikom izrade eksperimenata i za njihove upute kako čim kvalitetnije napisati rad. Hvala vam za strpljenje i podršku!

Veliku zahvalnost želim izraziti svojim sestrama Tei i Evi zbog bezuvjetne pomoći koju su mi pružale tokom cijelog školovanja i mom Robertu koji je vjerovao u mene i dao mi snagu koja mi je bila potrebna u zadnjoj i najtežoj godini fakulteta. Dragi moji, isplatilo se!

Ovaj rad želim posvetiti mami Božici i tati Zvonku koji su u mene ulagali od malih nogu, odgajajući me da iskoristim potencijal koji mi je od Boga darovan. Bez vaše pomoći, strpljenja i ljubavi ne bi bila na putu na kojem sam danas.

Također, rad posvećujem svim osobama oboljelim od Alzheimerove bolesti i njihovim obiteljima jer moraju prolaziti kroz teška razdoblja i jačati ljubav, požrtvornost i vjeru. Vjerujem u znanost i doista se nadam kako će jednog dana, uz Božju pomoć, lijek za Alzheimerovu bolest biti otkriven i dostupan svima kojima je potreban.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

ANALIZA CRIJEVNOG MIKROBIOMA U ŠTAKORSKOM MODELU
ALZHEIMEROVE BOLESTI

Maja Fabijanić

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Alzheimerova bolest (AB) je progresivna neurodegenerativna bolest i glavni uzrok kognitivnih poremećaja i poremećaja u ponašanju industrijaliziranog društva. Os mikrobiom-crijeva-mozak sastoji se od dvosmjernog komuniciranja između središnjeg i enteričkog živčanog sustava i povezuje emocionalne i kognitivne centre u mozgu s perifernom funkcijom crijeva. U ovom istraživanju je korišten štakorski model AB (n=10), koji je izazvan intraperitonealnim injiciranjem aluminijevog klorida (10 mg/kg štakora) i D-galaktoze (60 mg/kg štakora) tijekom 28 dana. Iz crijevnog sadržaja štakora analiziran je broj kolonija bakterija rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacter*, enzimska aktivnost mikrobioma te je sekvencirana DNA. Podaci sekvenciranja su obrađeni metodom hijerarhijskog klasteriranja i metodom analize glavnih komponenti. Dobiveni rezultati pokazali su: a) smanjeni broj probiotičkih bakterija u modelu AB u odnosu na kontrolnu skupinu; b) povećanu enzimsku aktivnost β -galaktozidaze, β -glukozidaze i β -glukuronidaze u modelu AB u odnosu na kontrolnu skupinu c) da nije došlo do velike promjene u sastavu crijevnog mikrobioma, ali je došlo do značajnih promjena u 46 vrsta bakterija koje ukupno čine 11,61% crijevnog mikrobioma kontrolne skupine. Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti da su smanjeni udio *Lactobacillus* i *Bifidobacter*, povećana enzimska aktivnost β -galaktozidaze, β -glukozidaze i β -glukuronidaze i smanjenje biomase crijevnog mikrobioma povezani s upalnim procesom izazvanim kod štakorskog modela AB.

(48 stranica, 15 slika, 3 tablice, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: Alzheimerova bolest, mikrobiom, probiotici, os mikrobiom-crijeva-mozak

Voditelj: prof. dr. sc. Nada Oršolić, red. prof.

Ocjenitelji:

Dr. sc. Nada Oršolić, red. prof.

Dr. sc. Biljana Balen, izv. prof.

Dr. sc. Tomislav Ivanković, doc.

Dr. sc. Ana Galov, izv. prof.

Rad prihvaćen: 7.9.2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation thesis

ANALYSIS OF INTESTINE MICROBIOME IN THE ALZHEIMER'S DISEASE RAT MODEL

Maja Fabijanić

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb

Alzheimer's disease (AD) is progressive neurodegenerative disease and leading cause of cognitive and behaviour impairments of industrialized society. Microbiome-gut-brain axis is bidirectional communication between central and enteric nervous system, thus connecting emotional and cognitive centers in brain with peripheral gut function. In this research rat model of AD (n=10) was induced by intraperitoneal injection of aluminium chloride (10 mg/kg rat) and D-galactose (60 mg/kg rat) during 28 days. Dilutions were made from rat's colon content and streaked on selective plates for isolation of *Lactobacillus* and *Bifidobacter*, activity of bacterial enzymes was analyzed and DNA isolated for sequencing. Sequencing data was analyzed by hierarchical clustering and principal component analysis. Results showed: a) reduced number of probiotic bacteria in AD model compared to control group; b) increased activity of β -galactosidase, β -glucosidase i β -glucuronidase in AD model compared to control group c) there was no great changes in composition of intestine microbiome, but 46 bacterial species, which make 11,61% of intestine microbiome of control group, significantly changed. Based on these results it can be concluded that reduced number of *Lactobacillus* and *Bifidobacter*, increased enzyme activity of β -galactosidase, β -glucosidase i β -glucuronidase and reduced intestine biomass are connected with inflammation induced in AD rat model.

(48 pages, 15 figures, 3 tables, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: Alzheimer's disease, microbiome, probiotics, microbiome-gut-brain axis

Supervisor: prof.dr. sc. Nada Oršolić, Prof.

Reviewers:

Dr. sc. Nada Oršolić, Prof.

Dr. sc. Biljana Balen, Assoc. Prof.

Dr. sc. Tomislav Ivanković, Asst. Prof.

Dr. sc. Ana Galov, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 7.9.2017.

Pregled sadržaja

1. UVOD	1
1.1. Patofiziologija i klinička slika Alzheimerove bolesti	1
1.1.1. Patofiziološke promjene.....	2
1.1.2. Klinička slika	4
1.2. Značaj mikrobioma za ljudski organizam	5
1.2.1. Uloga mikrobioma GI sustava u održavanju homeostaze	6
1.2.3. Os mikrobiom-crijeva-mozak.....	7
1.2.4. Probiotici	9
1.3. Štakorski model Alzheimerove bolesti	10
1.3.1. Štetnost aluminija	10
1.3.2. Utjecaj D-galaktoze	12
1.3.3. Štakorski model Alzheimerove bolesti.....	13
2 . MATERIJALI I METODE	14
2.1. MATERIJALI	14
2.1.1. Pokusne životinje.....	14
2.1.2. Kemikalije	14
2.1.3. Instrumenti.....	15
2.2. METODE	15
2.2.1. Praćenje promjena tjelesne mase	15
2.2.2. Obrada životinja	16
2.2.3. Prikupljanje uzoraka	16
2.2.4. Mjerenje aktivnosti enzima crijevnog mikrobioma.....	16
2.2.5. Priprema podloga za probiotičke kulture.....	17
2.2.6. Priprema agra za bakterije roda <i>Lactobacillus</i>	18
2.2.7. Priprema agra za bakterije roda <i>Bifidobacter</i>	18
2.2.8. Priprema hranjivog agra	18
2.2.9. Nasađivanje	19
2.2.10. Identifikacija bakterija.....	19
2.2.11. Izolacija DNA za sekvenciranje	19
2.2.12. Statistička obrada podataka	20
3. REZULTATI.....	22

3.1. Praćenje tjelesne mase.....	22
3.2. Rast kolonija <i>Lactobacillus</i> i <i>Bifidobacter</i> na selektivnim podlogama.....	22
3.3. Identifikacija bakterija roda <i>Lactobacillus</i>	23
3.4. Aktivnosti enzima crijevnog mikrobioma.....	23
3.5. Rezultati udjela bakterija u mikrobiomu dobivenih sekvenciranjem DNA iz sadržaja kolona štakora	24
3.5.1. Shannonov indeks.....	24
3.5.2. Udjeli bakterijskih razreda i vrsta u mikrobiomima pojedinih životinja.....	25
3.5.3. Određivanje bakterija značajno promijenjenih između kontrolne i obrađene skupine.....	28
3.5.4. Hijerarhijsko klasteriranje	30
3.5.5. Metoda analize glavnih komponenti.....	34
4. RASPRAVA	38
5. ZAKLJUČAK	43
6. LITERATURA	44
7. ŽIVOTOPIS.....	47

1.UVOD

Alzheimerova bolest (AB) je progresivna neurodegenerativna bolest i glavni uzrok kognitivnih poremećaja i poremećaja u ponašanju industrijaliziranog društva (Hill i sur. 2014). Ona je najpoznatiji oblik ireverzibilne demencije i nameće velik teret pacijentima, njihovim obiteljima, njegovateljima i društvu (Citron 2010). Naime, glavni rizični čimbenik za obolijevanje od AB je upravo starost (Hill i sur. 2014) i budući da očekivani životni vijek raste, raste i pojavnost AB u svijetu (Jiang i sur. 2017). Samo oko 5% svih slučajeva AB su genetički naslijeđeni, u 95% slučajeva do AB dolazi sporadično (Hill i sur. 2014). Istraživanjem obiteljskih slučajeva AB otkrivene su mutacije u tri gena: genu perkursora amiloidnog β -proteina (APP), presenilinu-1 (PS1) i preseinilinu-2 (PS2) (Xiao i sur. 2011). AB na različite ljude može djelovati drugačije, međutim najpoznatiji početni simptom je postepeno pogoršavanje pamćenja novih informacija. To se događa zato što do poremećaja funkcioniranja neurona dolazi primarno u regijama u kojima se formiraju novije uspomene (Thies i sur. 2011). Bolest je dobila ime po Aloisu Alzheimeru (1864-1915), koji je prvi opisao simptome na temelju višegodišnjeg promatranja Auguste Deter, pacijentice koja je u 51. godini počela pokazivati znakove demencije, naglog slabljenja pamćenja, gubitka orijentacije, nije mogla samostalno obavljati svakodnevne aktivnosti, a s godinama su se simptomi znatno pogoršali. Nakon njene smrti u 55. godini, Alzheimer je proveo biopsiju mozga i ustanovio kako je cerebralni korteks promijenjen. Regija koja je kontrolirala pamćenje, jezik, prosuđivanje i razmišljanje je bila znatno stanjena (Yang i sur. 2016).

1.1. Patofiziologija i klinička slika Alzheimerove bolesti

Povijesno je AB karakterizirana kao bolest s dvostrukim kliničko-patološkim simptomima. Da bi se potpuno dijagnosticirala potrebno je ustanoviti kliničku sliku koja odražava progresivnu demenciju s epizodnim poremećajima pamćenja uz poremećaje drugih kognitivnih domena i specifične neuropatološke promjene, koje uključuju nakupljanje neurofibrilarnih snopića (engl. *tangles*) unutar neurona i senilnih plakova u izvanstaničnom prostoru. Budući da se neuropatološka istraživanja ne mogu učiniti za života (osim biopsijom mozga u vrlo rijetkim slučajevima), AB se u potpunosti može dijagnosticirati tek *post mortem*. Zbog toga su dijagnoze AB ustanovljene za života većinom tek dijagnoze vjerojatnosti AB (Dubois i sur. 2010). Osim tih obilježja, dolazi do upalnog procesa i reakcije

urođenog imunološkog sustava (Citron 2010). Postoji više hipoteza koje objašnjavaju kako dolazi do ovakvog poremećaja na kojeg utječe više čimbenika, a neke od glavnih su kolinergična hipoteza, amiloidna hipoteza, tau hipoteza i hipoteza upale (Kumar i sur. 2015). Od kad je 1991. godine postavljena amiloidna hipoteza ona je bila glavna okosnica za mnoga istraživanja, međutim, 2009. godine Hardy, koji je sudjelovao u postavljanju amiloidne hipoteze, u revijalnom radu objašnjava kako je ne treba uzeti zdravo za gotovo, već potvrditi i provjeriti na više različitih načina (Hardy 2009).

1.1.1. Patofiziološke promjene

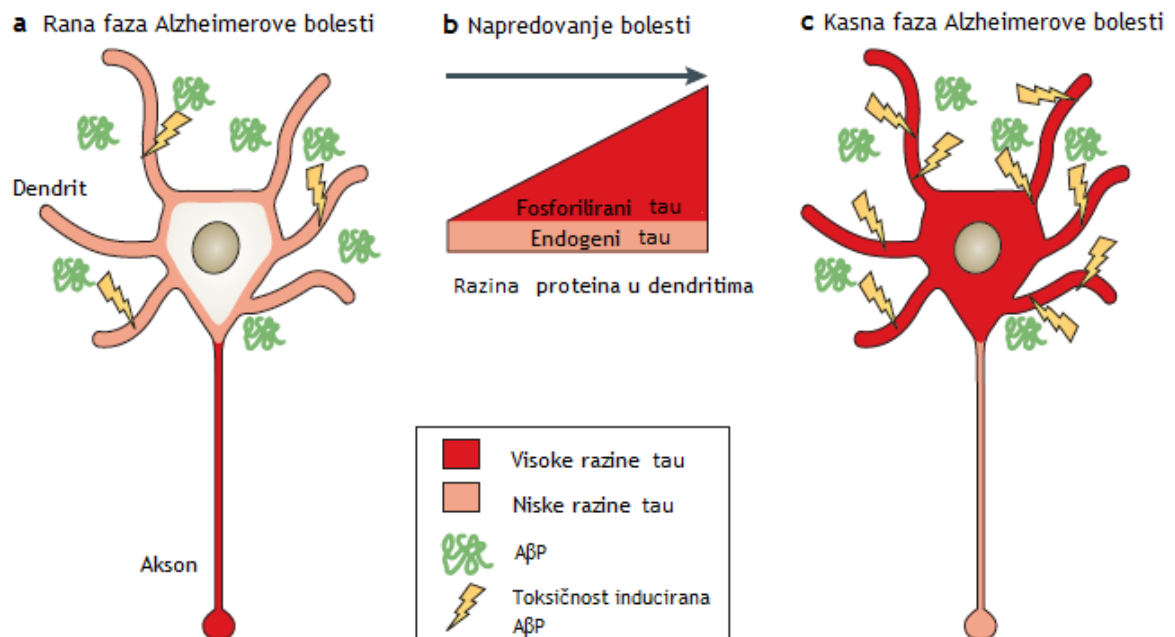
Još 1907. godine Alois Alzheimer je nakon biopsije mozga pacijentice ustvrdio da je došlo do stanjenja cerebralnog korteksa, formiranja senilnih plakova u neuronima i neurofibrilarnih snopića u izvanstaničnom prostoru. U to vrijeme je među liječnicima bio konsenzus da se senilni plakovi mogu naći u pacijenata starijih od 70 godina, ali je pojava neurofibrilarnih snopića bila novost. Budući da je pacijentica pri smrti imala 55. godina, obje pojave su bile neobične (Yang i sur. 2016). Na temelju tih i sličnih *post mortem* analiza je opisana Alzheimerova bolest. Karakteristike su joj bile senilni plakovi koji se sastoje od amiloid- β ($A\beta$) i neurofibrilarnih snopića koji se formiraju akumuliranjem abnormalnih filamenata tau proteina u regijama mozga koje služe pamćenju, stjecanju znanja i razumijevanju.

Napretkom znanosti prepoznate su i druge karakteristike AB. Javila se mogućnost otkrivanja AB *in vivo* pomoću nekih biomarkera specifičnih za bolest. Cerebrospinalna tekućina se može podvrgnuti testiranju kako bi se u njoj otkrili $A\beta$, povišeni ukupni tau, povišeni fosforilirani tau. Ovi biljezi vrlo dobro koreliraju s pojavnošću neuropatoloških lezija, $A\beta$ sa senilnim plakovima, a ukupni tau i fosforilirani tau s neurofibrilarnim snopićima (Dubois i sur. 2010).

$A\beta$ protein ($A\beta P$) je mali peptid koji sadrži 39-43 aminokiseline, a nastaje od amiloidnog prekursorskog proteina (APP), kojeg na N-terminalnom kraju cijepa β -sekretaza, a na C-terminalnom kraju γ -sekretaza (Kawahara i Kato-Negishi 2010). Iako su tijekom proteklih dvedeset godina znanstvenici postali svjesni kako amiloidna hipoteza ne može dati odgovore na cijelu patofiziologiju ove bolesti (Hardy 2009; Kumar i sur. 2015), nedavno je pokazano kako su $A\beta$ oligomeri odgovorni za sinaptičke poremećaje zbog čega se narušava funkcija mozga (Kumar i sur. 2015). $A\beta P$ je hidrofoban peptid i ima svojstvo da agregira u oligomere koji su stabilni u natrijevom dodecil sulfatu (engl. *sodium dodecyl sulphate*, SDS). Monomerni oblik $A\beta P$ ima strukturu zavojnice, dok oligomeri imaju strukturu β -nabranih

ploča. Na proces oligomerizacije može utjecati koncentracija peptida, pH, otapalo i temperatura (Kawahara i Kato-Negishi 2010). Iz navedenog je jasno da se s pojačanim stvaranjem A β P stvara i više agregata oligomera A β P koji se talože kao senilni plakovi. Zanimljivo je kako je A β P glodavaca *in vitro* manje sklon oligomerizaciji nego A β P primata, a također i da se akumulacije A β P rjeđe primjećuje u mozgovima glodavaca nego u mozgovima primata (Kumar i sur. 2015; Kawahara i Kato-Negishi 2010). Osim svojstva oligomerizacije, neki oblici A β P (dimeri, oligomeri, fibrili), iako još uvijek nije sigurno koji, su toksični. Prepoznato je kako najviše pate sinapse, odnosno receptori koji se nalaze na dendritu koji prima signal preko sinaptičke pukotine. Pokazano je kako toksičnost A β P može biti uzrokovana njegovim vezanjem za receptor ili neposrednim mijenjanjem funkcioniranja receptora (Ittner i Götz 2011).

Tau je protein koji stupa u međudjelovanje s mikrotubulima i stabilizira ih. Najviše ga ima upravo u aksonima neurona (Ballatore i sur. 2007). Sadrži tri domene – N-terminalnu projekcijsku domenu, C-terminalnu domenu kojom stupa u međudjelovanje s mikrotubulima i kratke slijedove repa. U ljudskom mozgu postoji šest izoformi proteina tau, a međusobno se razlikuju po broju tubulin-veznih motiva (Ballatore i sur. 2007). Širenje neurofibrilarnih plakova mozgom je u korelaciji s napredovanjem AB, a s tim dolazi i gubitak funkcionalnosti sinapsi kao jedna od prvih posljedica (Ittner i Götz 2011). Tau je jako važan za održavanje ispravne morfologije neurona i svih procesa koji ovise o mikrotubulima (prijenos organela, signalnih molekula, vezikula). Pri normalnim fiziološkim uvjetima, tau je u stalnoj ravnoteži između stanja u kojem je u međudjelovanju s mikrotubulima i stanja u kojem nije u međudjelovanju s njima. Ta ravnoteža se održava regulacijom fosforilacijskog stanja proteina tau, a za to su zadužene kinaze i fosfataze (Ballatore i sur. 2007). Za slučaj da dođe do hiperfosforilacije tau, kao što je to u pacijenata koji boluju od AB i u životinjskih modela AB, on se akumulira u somatodendritičnim dijelovima neurona, astrocita i oligodendroglia, stvaraju se agregati i formiraju neurofibrilarni snopići (Ittner i Götz 2011). Širenje neurofibrilarnih plakova mozgom je u korelaciji s napredovanjem AB (Slika 1.), a s tim dolazi i gubitak funkcionalnosti sinapsi kao jedna od prvih posljedica pretjerane fosforilacije tau (Ittner i Götz 2011).



Slika 1. Prikaz kako progresivni rast razine proteina tau koji se taloži na dendritima čini dendrite podložnima za taloženje AβP prema „tau axis“ hipotezi. a) Početak AB karakterizira blagi poremećaj kognitivnih sposobnosti, a do toga dolazi zbog formiranja plakova AβP u mozgu, ali zbog malih razina tau u dendritima smanjena je osjetljivost neurona na toksičnost AβP. b) Kako bolest napreduje tau postaje sve više fosforiliran i akumulira se u somatodendritima neurona. c) U kasnijim fazama AB visoke razine tau u dendritima su povezane s povećanom osjetljivošću neurona na toksični utjecaj AβP u postsinaptičkim pukotinama. Preuzeto i prilagođeno iz rada Ittner i Götz, 2011.

1.1.2. Klinička slika

Demenciju može uzrokovati više različitih bolesti koje rezultiraju oštećenjem stanica mozga i sinapsi. Kako bi dijagnosticirali demenciju, liječnici moraju ustanoviti pad memorije i pad u barem još jednoj kognitivnoj aktivnosti:

1. Mogućnost koherentnog govora ili razumijevanje govorenog ili pisanog jezika.
2. Mogućnost prepoznavanja objekata i identificiranje objekata, uz pretpostavku da su senzorne funkcije ispravne.
3. Mogućnost izvođenja motornih aktivnosti, uz pretpostavku da su motorne i osjetilne mogućnosti ispravne i razumijevanje zadatka
4. Mogućnost apstraktnog mišljenja, donošenja ispravnih prosudbi i planiranja i provedbe kompleksnih zadataka.

Kod AB, oštećenja moždanih stanica počinju u regijama u kojima se stvaraju nova sjećanja, a kako se oštećenje širi, tako pacijenti prolaze i kroz druge teškoće. Znakovi upozorenja da bi stanje pacijenta mogla biti upravo AB su:

1. Gubitak pamćenja koji utječe na svakodnevni život.
2. Izazovi u planiranju ili rješavanju problema.
3. Teškoće izvršavanja obiteljskih zadataka kod kuće, a poslu ili u slobodno vrijeme.
4. Nedostatak orijentacije u vremenu i prostoru.
5. Problemi s razumijevanjem vizualnih prikaza i prostornih odnosa.
6. Problemi s riječima u govoru i pisanju.
7. Gubljenje predmeta.
8. Smanjena mogućnost rasuđivanja.
9. Povlačenje s poslovnih i društvenih aktivnosti.
10. Promjene u ponašanju i osobnosti.

Pacijenti različitom brzinom stječu simptome. Kako bolest napreduje, padaju kognitivne i funkcionalne aktivnosti pacijenta. U uznapredovalim oblicima AB, pacijenti trebaju pomoć s osnovnim aktivnostima kao što su kupanje, presvlačenje, hranjenje. U najkasnijim stadijima bolesti, pacijenti gube mogućnost komuniciranja, ne prepoznaju one koje vole (članovi obitelji), postaju vezani uz krevet i ovisni o njegovateljima kroz cijeli dan i noć. Nemogućnost kretanja čini pacijente podležnim infekcijama, vrlo često dolazi do upale pluća. AB je fatalna bolest i upala pluća je vrlo često uzrok smrti (Thies i sur. 2011).

Godine 2011. predložen je novi leksikon za definiranje AB u kojem se nadopunjuje kriterij za postavljanje dijagnoze AB koji je donesen 1987. od strane američkog Nacionalnog instituta za neurološke i komunikacijske poremećaje i moždane udare (engl. *National Institute of Neurological and Communicative Disorders Association*) i Udruženja za Alzheimerovu bolest i povezane poremećaje (engl. *Alzheimer's disease and Related Disorders Association*).

1.2. Značaj mikrobioma za ljudski organizam

Nedavno je porasla svijest koliko je ljudski mikrobiom značajan za funkcioniranje organizma, a tek se otkriva kakve sve uloge ima u održavanju homeostaze. Naime, rezultati bioinformatičkih istraživanja na razini genoma (engl. *genome wide association studies*) su pokazala kako značajan broj gena za koje se uočila promjena ekspresije u ljudi oboljelih od AB nisu geni ljudskog genoma (Hill i sur. 2014). Svakim organom ljudskog organizma koji sadrži mikroorganizme dominiraju određena koljena mikrobiota. Tako na koži prevladavaju *Actinobacteria*, *Firmicutes* i *Proteobacteria*, dišnim sustavom *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i

Proterobacteria, a urogenitalnim sustavom *Firmicutes* (Wang i Kasper 2014). Gastrointestinalni (GI) sustav sadrži 95% ljudskog mikrobioma, sadrži otprilike 10^{14} mikroorganizama koje čini 1000 različitih vrsta mikroba i procijenjeno je da mikrobiom GI sustava kodira otprilike 4×10^6 različitih gena, a to je 150 puta više od kodirajućih gena koje sadrži genom čovjeka (Bhattacharjee i Lukiw 2013). Više od 99% GI mikrobioma čine anaerobne bakterije, gljive, praživotinje, arhebakterije i drugi mikroorganizmi. Samo dva koljena bakterija su prisutna u GI sustavu – *Firmicutes* (~51%) i *Bacteroidetes* (~48%), a ostalih 1% čine članovi koljena *Cyanobacteria*, *Fusobacteria*, *Proterobacteria*, *Spirochaetes* i *Verrucomicrobia* (Hill i sur. 2014). Pokazalo se kako mikroorganizmi koji su najmanje zastupljeni (1%) imaju najveći utjecaj na bolest i velika je uloga zdravog mikrobioma da drži pod kontrolom proliferaciju patogenih mikroba koji se nalaze u GI sustavu (Hill i sur. 2014).

1.2.1. Uloga mikrobioma GI sustava u održavanju homeostaze

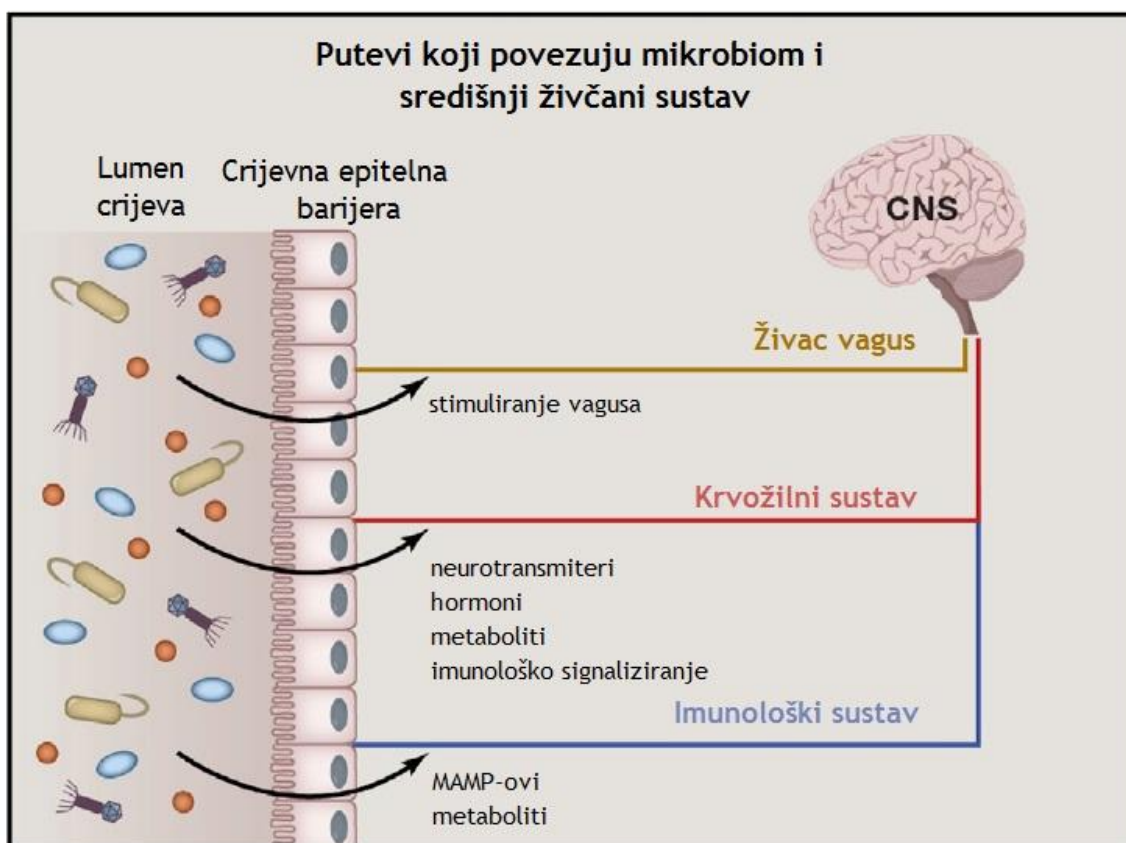
Mikrobiom GI sustava ima važnu ulogu održavanju cjelovitosti stijenke crijeva jer onemogućava adheziju patogenih mikroba na stijenke probavnog sustava kompeticijom za nutrijente i sintetiziranjem antimikrobnih spojeva (Wang i Kasper 2014). Također, osigurava proizvodnju mnogih esencijalnih vitamina, osobito iz skupina B i K. Iskorištava energiju iz neapsorbiranih ostataka hrane sintezom kratkolančanih masnih kiselina i time olakšava apsorpciju neprobavljivih sastojaka hrane (Wang i Kasper 2014; Jiang i sur 2017) i pomaže u razgradnji i apsorpciji kompleksnih ugljikohidrata (Bhattacharjee i Lukiw 2013). Osim toga, omogućava regulaciju i pravilno sazrijevanje imunološkog sustava zato što mikroorganizmi GI sustava razgrađuju kompleksne polisaharide koji apsorbiraju i važni su za stjecanje imunosti prema stranim antigenima (Foster i McVey Neufeld 2013). Ima važnu ulogu i u metaboliziranju i neutralizaciji karcinogena koji u tijelo uđu hranom (Bhattacharjee i Lukiw 2013).

Budući da je starija dob najvažniji rizični čimbenik za AB, promjene u tijelu do kojih dolazi zbog starosti su važne za proučiti budući da bi mogle imati ulogu u razvijanju AB. U starijih ljudi dolazi do promjena mikrobioma, naime *Firmicutes* i *Bacteroidetes* ostaju dominantni, međutim, raste relativni udio *Proterobacteria*, a smanjuje se relativni udio *Bifidobacterium* i *Lactoabacillus* (Caracciolo i sur. 2014). Sa starošću se smanjuje raznolikost mikrobioma, a na to se može utjecati prehranom, načinom života i rehabilitacijom (Jiang i sur. 2017). Starenje je povezano s prejakom stimulacijom urođenog i adaptivnog imunološkog sustava, a uz to nedostatak probiotika dovodi do smanjenja proizvodnje kratkolančanih masnih kiselina, osobito aminomaslačne kiseline koja ima važnu ulogu u

održavanju cjelovitosti crijevnog epitela i kontroli upale. To su razlozi zbog kojih dolazi do blage, ali stalne upale te raste permeabilnost crijevne stijenke i lakša je translokacija bakterija, a i sama upala je baza za široki spektar bolesti vezanih uz starost, uključujući i bolesti vezanih uz pad kognitivnih mogućnosti (Caracciolo i sur. 2014; Jiang i sur. 2017).

1.2.3. Os mikrobiom-crijeva-mozak

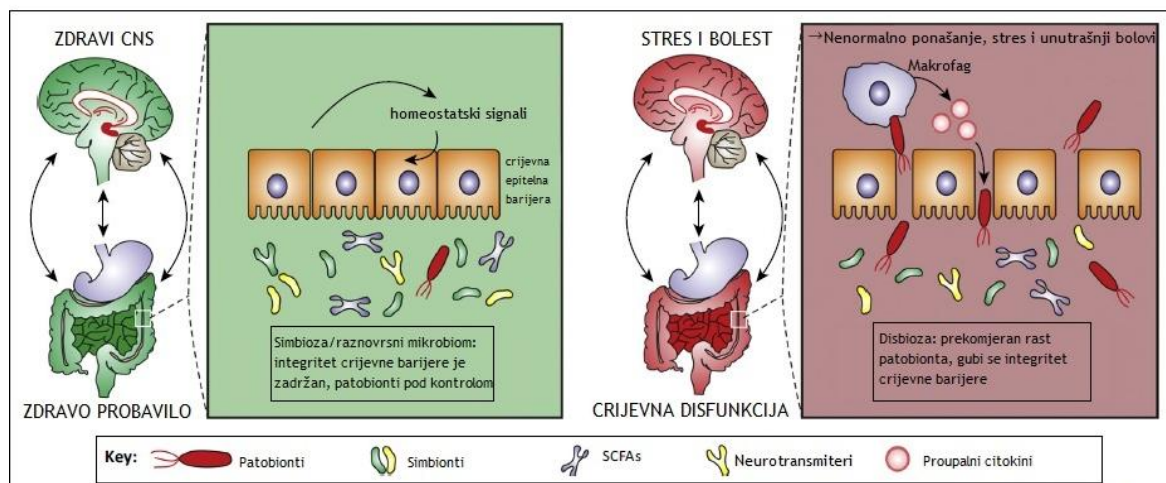
Os mikrobiom-crijeva-mozak je dvosmjerni komunikacijski sustav koji je povezan neuralnim, imunološkim, endokrinim i metaboličkim putevima (Slika 2.), a uloga mu je praćenje i integriranje funkcija crijeva i mijenjanje funkcija crijeva s obzirom na glad, stres i emocije (Saulnier i sur. 2013; Jiang i sur. 2017). Sastoji se od mozga i leđne moždine, enteričkog živčanog sustava, živaca hormona i drugih molekula kao što su neuropeptidi i citokini (Saulnier i sur. 2013). Enterički živčani sustav (engl. *enteric nervous system*, ENS) je ugrađen u stijenke crijevnog sustava od jednjaka do anusa, sadrži tisuće ganglija i oko 4×10^6 neurona, više neurona nego bilo koji drugi periferni organ, a otprilike jednako kao cijela leđna moždina (Saulnier i sur. 2013).



Slika 2. Putevi koji povezuju mikrobiom i središnji živčani sustav. Preko živca vagusa se ostvaruje izravna komunikacija enteričkog živčanog sustava i središnjeg živčanog sustava, bakterije mikrobioma mogu stvarati molekule koje se prenose krvožilnim sustavom i mogu prijeći krvno-moždanu barijeru ili MAMP-ovima (engl. *microbe associated molecular patterns*) i mikrobnim metabolitima koji signaliziraju imunološkim stanicama koje pak mogu utjecati na neurofiziologiju. Preuzeto i prilagođeno iz rada Sampson i Mazmanian, 2015.

Utjecaj mikrobioma na središnji živčani sustav (engl. *central nervous system*, CNS) se očituje pri normalnom stanju organizma kao za vrijeme bolesti (Slika 3.). Sve što utječe na promjene u sastavu mikrobioma posljedično može utjecati i na CNS, primjerice korištenje antibiotika, uzimanje probiotika, promjena prehrane, permeabilnost crijeva (Wang i Kasper 2014). Smatra se da su promjene u dvosmjernoj komunikaciji crijeva-mozak uključene u patogenezu više neuralnih poremećaja kao što su autizam i spektar bolesti sličan autizmu, Parkinsonova bolest, kronična bol (Mayer i sur. 2015), Alzheimerova bolest (Jiang i sur. 2017), multipla skleroza, Devicova bolest (*neuromyelitis optica*), Guillain-Barré sindrom, tjeskoba i stres (Wang i Kasper 2014). Predklinička istraživanja sugeriraju da su mikrobiom i njegovi metaboliti uključeni u moduliranje ponašanja i procesa u mozgu, uključujući odgovor na stres, emocije, nošenje s boli, probavu i biokemijske procese u mozgu (Mayer i sur. 2015).

Kako bi se proučio utjecaj crijevnog mikrobioma na os crijevo-mozak, korišteno je više različitih modela kao što su manipulacija antibioticima, zaraza mikrobima, transplantacija fecesa i korištenje modelnih životinja bez mikroorganizama (engl. *germ-free*) (Jiang i sur. 2017).



Slika 3. Os mikrobiom-crijeva-mozak u zdrave i bolesne osobe. (Lijevo) Kad je organizam zdrav, simbiotske bakterije, zdravi urođeni imunološki sustav i crijevna epitelna barijera kontroliraju patobionte i njihov rast u crijevima te se zbog zdrave funkcije crijeva omogućuje dobra komunikacija između CNS-a i crijevnog mikrobioma. (Desno) Pri patološkim stanjima crijevna disbioza dovodi do promjena u crijevnom mikrobiomu i poremećene signalizacije na osi crijeva-mozak. Zbog povećanog rasta patobionta može doći do upale, a makrofagi doprinose patogenezi lučenjem proupalnih citokina. Dolazi do gubitka funkcije crijevne barijere zbog čega je moguća translokacija patogenih bakterija i njihovih komponenti u krvožilni sustav gdje se aktivira urođeni imunitet kojeg karakteriziraju stvaranje proupalnih citokina, sustavna upala i poremećena funkcija crijeva. Ti mehanizmi mogu dovesti do poremećenih funkcija CNS-a kao što su ponašanje, odgovor na stres, spoznaja. Prevedeno i prilagođeno iz rada Borre i sur. 2014.

1.2.4. Probiotici

Probiotici su mikroorganizmi koji u određenim količinama mogu djelovati vrlo blagotvorno na zdravstveno stanje organizma (Jiang i sur. 2017). *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* su dva glavna roda probiotika koji se koriste za istraživanje učinka probiotika na ljudsko tijelo (Jiang i sur. 2017). γ -aminomaslačna kiselina (GABA) je glavni inhibitorski neurotransmiter CNS-a, a stvaraju je *Lactobacillus brevis* i *Bifidobacterium dentium* metabolizmom glutamata. Interesantno je kako su *post mortem* istraživanja frontalnih, temporalnih i parijetalnih regija mozga pokazala smanjene koncentracije GABA

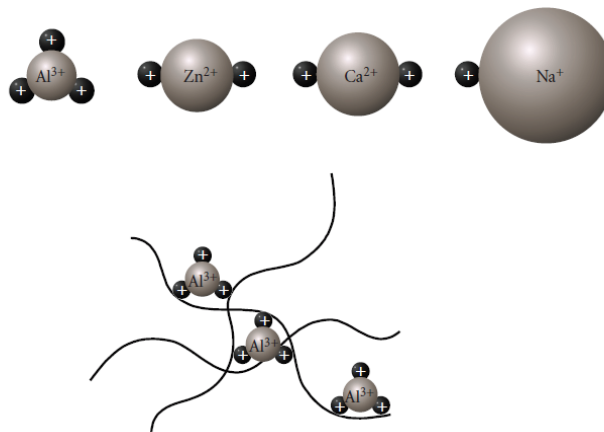
kod pacijenata oboljelih od AB (Jiang i sur. 2017). Ipak, nisu svi probiotici korisni, infekcija *Citrobacter rodentium* mijenja sastav mikrobioma i u miša uzrokuje stresom-inducirane poremećaje pamćenja (Jiang i sur. 2017). Vrlo važan rezultat je iznijelo kliničko istraživanje koje je pokazalo kako konzumiranje mješavine probiotika (*Lactobacillus acidophilus* + *Lactobacillus casei* + *Bifidobacterium bifidum* + *Lactobacillus fermentum*) kroz 12 tjedana imalo pozitivan utjecaj na kognitivne funkcije oboljelih od AB (Jiang i sur. 2017). Probiotici mogu ublažiti neuro-psihijatrijske poremećaje hormonalnim i neuro-kemijskim mehanizmima (Wang i sur., 2014).

1.3. Štakorski model Alzheimerove bolesti

Kako bi se istraživala AB potrebno je koristiti vjerne animalne modele koji će pokazivati patofiziološke promjene AB i omogućiti jednostavno izvođenje i ponavljanje eksperimenata.

1.3.1. Štetnost aluminija

Aluminij je kemijski element koji je jako raširen i, osim u prirodnom obliku, nalazi se u antacidima, dezodoransima, prehrambenim aditivima i nekim svakodnevnim predmetima (npr. aluminijska folija) (Ali i sur. 2016). On nije esencijalan za život (niti jedna enzimska reakcija ne zahtijeva Al), štoviše, on je neurotoksin i povezuje ga se s raznim neurodegenerativnim poremećajima uključujući AB te je 1960-ih i postavljena hipoteza aluminija (engl. *aluminium hypothesis*). Naime, Al^{3+} i drugi ioni metala (Slika 4.), kao što su Zn^{2+} , Cu^{2+} i Fe^{3+} , utječu na oligomerizaciju i konformacijske promjene A β P i pomažu stvaranje križnih (engl. *cross-link*) veza te su tako uključeni u patogenezu AB (Kawahara i Kato-Negishi 2010).



Slika 4. Ion aluminija u usporedbi s drugim ionima ima mali radijus i tri pozitivna naboja, što mu omogućuje lako i učinkovito stvaranje križnih veza između proteina. Preuzeto iz rada Kawahara i Kato-Negishi, 2011.

Tijekom povijesti je u više navrata potvrđena toksičnost aluminija za ljudski organizam. Veza između trovanja aluminijem i poremećaja pamćenja je prvi put zabilježena 1921. godine. Slučajna kontaminacije vode za piće aluminijem 1988. godine u Camelfordu (Cornwall, UK) je 20 000 stanovnika izložila visokim dozama aluminija i 10 godina kasnije su potvrđeni poremećaji poput gubitka koncentracije i kratkog pamćenja. Osamdesetih godina prošlog stoljeća je zabilježena visoka koncentracija aluminija u pitkoj vodi u Engleskoj i Walesu da bi kasnije mnoga istraživanja pokazala povezanost pojavnosti AB u ljudi koji su konzumirali toksičnu vodu. Također je i istraživanje u Kanadi pokazalo da je veći rizik od AB u kanadskim regijama gdje su prisutne veće doze aluminija, a manje doze fluorida. Navedeno ukazuje kako aluminij ima značajan utjecaj na funkcioniranje mozga i kako uzrokuje demenciju pri ulasku u mozak (Kawahara i Kato-Negishi 2010). Smatra se kako aluminij utječe na više od 200 biološki važnih reakcija u organizmu (aksonski transport, sinteza neurotransmitera, sinaptička transmisija, fosforilacija i defosforilacija proteina, degradacija proteina, ekspresija gena) i kako može značajno utjecati na funkcioniranje CNS-a sisavaca (Kawahara i Kato-Negishi 2010). Neka od svojstava Al i kako djeluje u tijelu (Kawahara i Kato-Negishi 2010):

- ima jaki pozitivni naboj i mali radijus zbog čega stvara jaku ionsku vezu s aminokiselinama koje vežu metale (npr. histidin, tirozin, arginin)
- ima vrlo malu brzinu izmjene liganada u odnosu na druge metale i zbog toga inhibira enzime kojima su potrebni neki drugi ionski kofaktori (npr. Mg^{2+} ili Ca^{2+})

- Al^{3+} ima afinitet za negativno nabijene ligande s kisikom donorom i zato stvara veze s anorganskim i organskim fosfatima, karboksilatima i hidroksilnim skupinama
- Al^{3+} veže fosfatne grupe molekula DNA i RNA, zbog čega mijenja njihovu topologiju i utječe na ekspresiju gena
- veže i fosfatne skupine nukleozid di- i trifosfata (kao što je ATP) i onemogućuje njihovo iskorištavanje u metabolizmu za dobivanje energije
- inhibira naponom regulirane Ca^{2+} kanale i neurotransmitterske receptore

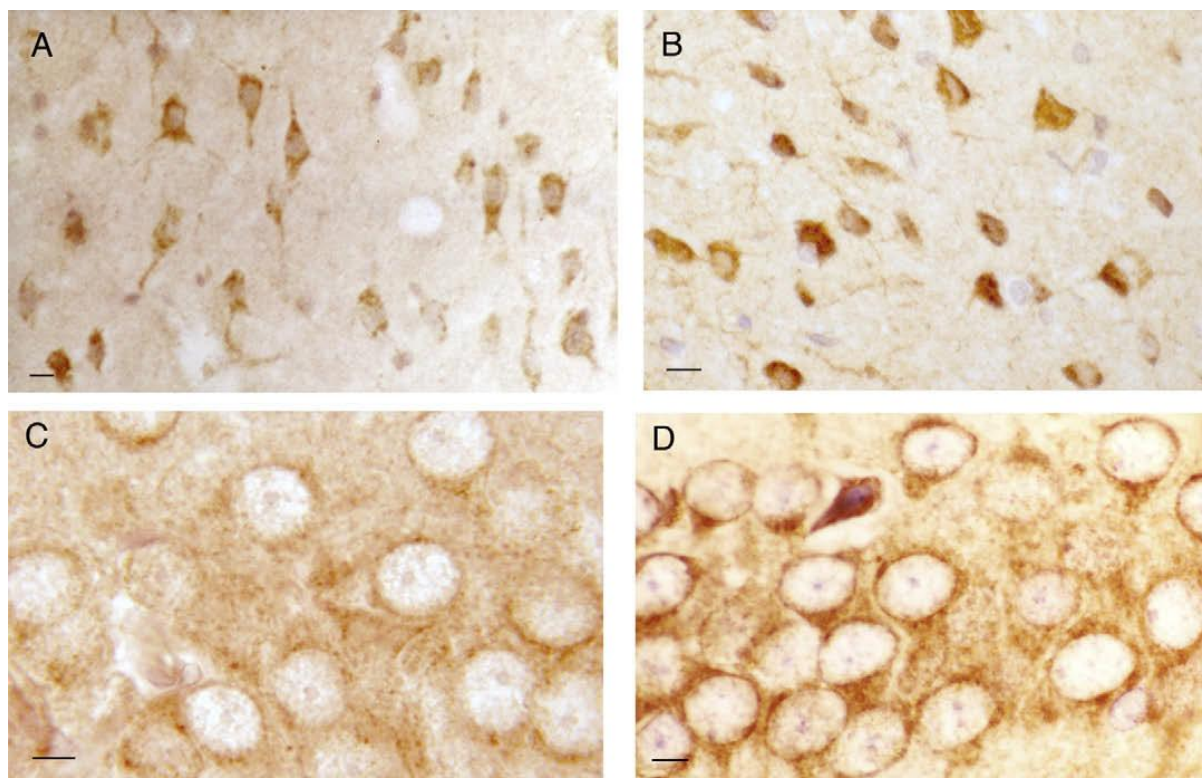
Svojstvo aluminija da se veže za različite proteine dovodi do toga da proteini oligomeriziraju, mijenja im se konformacija i ne bude moguća njihova razgradnja proteazama. Budući da se A β P izlučuje u cerebrospinalnu tekućinu (engl. *cerebrospinal fluid*, CSF) u ljudi svih dobi, čimbenici koji ubrzavaju oligomerizaciju, kao što je Al^{3+} mogu igrati važnu ulogu u patogenezi AB (Kawahara i Kato-Negishi 2010).

1.3.2. Utjecaj D-galaktoze

D-galaktoza (D-gal) je monosaharid koji u normalnim koncentracijama može biti metaboliziran, međutim u povišenim koncentracijama potiče proizvodnju reaktivnih oblika kisika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i naprednih glikacijskih krajnjih produkata (engl. *advanced glycation end products*, AGE). Pokazalo se kako kontinuirana obrada glodavaca D-gal dovodi do smanjene ekspresije proteina vezanih za pamćenje, pogoršanih sposobnosti učenja i pamćenja i patoloških promjena na astrocitama. Međudjelovanje AGE sa staničnim receptorima kao što je RAGE (engl. *receptor for advanced glycation endproducts*) potiče aktivaciju proteinskog kompleksa NF- κ B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), čime se povećava stvaranje signalnih molekula upale i aktivacija astrocita i mikroglia (Lu i sur. 2010). Veliki broj istraživanja već je pokazao kako ROS i AGE imaju veze s patološkim promjenama bolesti koje su vezane za starenje kao što su dijabetes, ateroskleroza, nefropatija, infekcija i AB (Lu i sur. 2010). Glodavci koji su obrađeni D-gal 6-10 tjedana imaju poremećaje u kolinergičnim neuronima baze velikog mozga i poremećaje u neurogenezi u hipokampusu. Također, neurotoksičnost koju izaziva D-gal ometa homeostazu kalcija i zbog toga dolazi do disfunkcija mitohondrija. Zbog navedenih razloga se dugotrajno injiciranje glodavaca D-gal koristi kao model za proučavanje mehanizama starenja (Lei i sur. 2008).

1.3.3. Štakorski model Alzheimerove bolesti

Zbog navedenih utjecaja Al i D-gal, kao dobar model za proučavanje AB se počelo koristiti oba spoja budući da svaki od njih na svoj način doprinosi oponašanju stanja do kojeg dolazi prilikom AB. Iako Al i D-gal djeluju na različite načine, krajnji rezultat su patološke promjene u mozgu koje imitiraju stanje AB. Pokazano je kako u miša kombinacija Al i D-gal uzrokuje poremećaje učenja i pamćenja i visoke razine A β P1-42 u korteksu i hipokampusu. Utjecaj je bio veći nego u miševa koji su obrađeni samo Al i samo D-gal. Također, kombinacija Al i D-gal je uzrokovala značajnije promjene u ekspresiji gena koji su povezani s metabolizmom A β P, nego Al ili D-gal zasebno (Luo i sur. 2009;). Histološki prerezi korteksa i hipokampusa su pokazani na Slici 5.



Slika 5. Imunoreaktivnost na amiloidni prekursorski protein u mozgovima štakora koji su konzumirali količine aluminijske relevantne za ljude. (A) kortikalni neuroni kontrolnog štakora; (B) kortikalni neuroni kognitivno nesposobnih štakora; (C) neuroni hipokampusa kontrolnog štakora; (D) neuroni hipokampusa kognitivno nesposobnih štakora. Skale: (A,B) = 10 μ m; (C,D) = 5 μ m. Preuzeto i prilagođeno iz rada Walton i Wang, 2009.

2 . MATERIJALI I METODE

2.1. MATERIJALI

2.1.1. Pokusne životinje

U istraživanju su korišteni mužjaci štakora Y59 stari 3 mjeseca, uzgojeni na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Istraživanje je provedeno na ukupno 20 štakora Y59 podijeljenih na 2 skupine sa po 10 životinja obzirom na obradu (Tablica 1.) koji su bili hranjeni standardnom hranom za laboratorijske životinje (Standard Diet GLP, 4RF21, Mucedola, Settimo Milanese MI, Italija), uz stalnu dostupnost vode. Uvjeti su bili standardni (dnevni ritam od 12 sati dana i 12 sati mraka, temperatura 24 °C uz kontroliranu vlažnost zraka).

Istraživanje je provedeno prema etičkim načelima važećima u Republici Hrvatskoj (Zakon o zaštiti laboratorijskih životinja, NN 19, 1999.) i prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, DHHS (NIH) Publ # 86-23).

2.1.2. Kemikalije

- aluminijev klorid 6-hidrat (AlCl_3), Mr = 241,45 (proizvođač: Gram-mol d.o.o., Hrvatska)
- fiziološka otopina; 0,9 % NaCl (Natrijev klorid 0,9 % otopina za infuziju, proizvođač B. Braun Adria d. o. o., Hrvatska)
- natrijev tioglikolat, Mr = 114,10 (proizvođač: Sigma Aldrich, SAD)
- natrij-hidrogenfosfat-dodekahidrat, Mr = 358,14 (proizvođač: Kemika, Hrvatska)
- natrij-dihidrogenfosfat-dihidrat, Mr = 177,99 (proizvođač: Applichem, Njemačka)
- *p*-nitrofenil- β -D-glukuronid, Mr = 315,23 (proizvođač: Sigma Aldrich, SAD)
- *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranozid, Mr = 301,25 (proizvođač: Sigma Aldrich, SAD)
- *o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid, Mr = 301,25 (proizvođač: Sigma Aldrich, SAD)
- natrijev karbonat, Mr = 150,99 (proizvođač: Applichem, Njemačka)
- Microbiology Granucult™ MRS agar (proizvođač: Merck, Njemačka)
- TOS-Propionate Agar (Base) (proizvođač: Merck, Njemačka)

- Tryptic soy agar (proizvođač: Merck, Njemačka)
- MUP selective supplement (proizvođač: Merck, Njemačka)
- Maxwell DNA Tissue kit (proizvođač: Promega, SAD)
- API 50 CHL pločice (proizvođač: BioMérieux, Francuska)
- API 50 CHL kit za identifikaciju bakterija (proizvođač: BioMérieux, Francuska)

2.1.3. Instrumenti

Centrifuga: Centrifuge 5702 (proizvođač: Eppendorf); Mikro 200R (proizvođač: Hettich, Njemačka)

Spektrofotometar: Libra S22 (proizvođač: Biochrom, UK)

Vaga: ABS 220 – 4 (proizvođač: Kern & Sohn, Njemačka)

Vortex: Vortex Genius 3 (proizvođač: IKA, SAD)

Izolator DNA: Maxwell® 16 (proizvođač: Promega, SAD)

Homogenizator: Sonopuls mini (proizvođač: Bandelin, Njemačka)

Digestor: Mikrobiološki zaštitni cabinet, KTB-NS (proizvođač: Klimaoprema, Hrvatska)

Inkubator: Inkubator I-CO2-235 (proizvođač: Kambič, Slovenija)

2.2. METODE

2.2.1. Praćenje promjena tjelesne mase

Prije početka izvođenja pokusa, kao i tijekom izvođenja pokusa, životinje su pojedinačno označene i izvagane, te su na temelju toga razvrstane u skupine s približno sličnom tjelesnom masom (± 10 g). Na temelju mase životinja za pojedinu skupinu određena je količina pojedinačnih pripravka koje su davane tijekom pokusa, te je praćena promjena mase tijekom istih. Mjerenja tjelesnih masa su izvršena digitalnom vagom.

2.2.2. Obrada životinja

Patofiziološke promjene su izazvane intraperitonealnim injiciranjem AlCl_3 u dozi od 10 mg/kg štakora i D-galaktoze u dozi 60 mg/kg štakora tijekom 28 dana (Tablica 1.). Nakon 24 sata po završetku obrade životinje su anestetizirane i analgezirane intraperitonealnim injiciranjem kombinacije Narketana® (Vetoquinol S.A. BP 189 Lure Cedex, Francuska) i Xylapana® (Vetoquinol Biowet Sp., Gorzow, R. Poljska) žrtvovane kako bi se izolirao sadržaj kolona za daljnju analizu.

Tablica 1. Pokusne skupine i način obrade

Oznaka skupine	Sastav pokusne otopine	Doziranje	Način primjene	Period obrade (dani)
0. Kontrola	0,9 % NaCl	0,5 mL svaki dan	intraperitonealno	28
1. AlCl_3 10 mg/kg + D-galaktoza 60 mg/kg	10 mg/kg AlCl_3 60 mg/kg D- galaktoza 0,5 mL 0,9 % NaCl	0,5 mL svaki dan	intraperitonealno	28

2.2.3. Prikupljanje uzoraka

Nakon 24 sata po završetku obrade životinje su anestetizirane i žrtvovane. Unutar 30 min od anestezije izoliran je kolon. Poštujući pravila asepse iz kolona uzorkovan je sadržaj kolona (100 mg) za izolaciju DNA i sekvenciranje, te u sterilnim Eppendorf tubicama pohranjen na $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Za izolaciju probiotičkih kultura na hranjivom agaru i za mjerenje aktivnosti mikrobnih enzima, koji imaju važnu ulogu u biotransformaciji, uzorkovani sadržaj kolona resuspendiran je u tioglikolatu u omjeru 1:10 (w/v).

2.2.4. Mjerenje aktivnosti enzima crijevnog mikrobioma

Aktivnost bakterijskih enzima iz sadržaja kolona mjerena je otpuštanjem *p*- i *o*-nitrofenola iz njihovih nitrofenilglukozida prema metodi Juśkiewicz i sur. (2009). Za enzime su u koncentraciji od 5 mM korišteni slijedeći supstrati: za β -glukuronidazu supstrat *p*-nitrofenil- β -D-glukuronid, za β -glukozidazu supstrat *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranozid i za β -galaktozidazu supstrat *o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid, a pripremljeni su otapanjem u 100 mL svježe pripremljenog 100 mM fosfatnom puferu (pH 7,0). Reakcijska smjesa sadržavala

je 0,3 mL otopine supstrata i 0,2 mL 1:10 (v/v) nadtaloga sadržaja kolona, koji je dodatno razrijeđen u 100 mM fosfatnom puferu. Slijedila je inkubacija u trajanju od 60 min pri 37 °C. Nakon inkubacije dodano je 2,5 mL hladnog natrijevog karbonata (0,25 M) kako bi se zaustavila reakcija, te je na spektrofotometru izmjerena apsorbancija *p*-nitrofenola pri $\lambda = 400$ nm, a *o*-nitrofenola pri $\lambda = 420$ nm. Kako bi aktivnost enzima bila izražena kao mmol stvorenog produkta po minuti i po gramu fešeca korištena je formula:

$$\text{aktivnost enzima} \left[\frac{U}{\text{min g}(feces)} \right] \\ = \frac{A}{\varepsilon \left[\frac{1}{\text{mmol cm}} \right] \times l[\text{cm}]} \times d \times 0,005 \left[\frac{\text{mmol}}{\text{mL}(supstrat)} \right] \times 10 \left[\frac{1}{\text{g}(feces)} \right]$$

pri čemu je *A* apsorbancija, ε ekstincijski koeficijent supstrata i *d* razrjeđenje.

2.2.5. Priprema podloga za probiotičke kulture

Za izolaciju probiotičkih bakterija korištene su i pripremljene krute selektivne podloge s inhibitornim djelovanjem na ostale mikroorganizme kako bi se izolirali gore navedeni specifični mikroorganizmi. Postupak pripreme hranjivih podloga iz dehidriranih podloga izveden je prema uputi proizvođača dostupan na pakiranju proizvoda i u elektroničkom obliku. Prilikom pripreme dehidriranih podloga pažljivo je odvagana količina praha, propisana od proizvođača, na digitalnoj vagi. Odvagana dehidrirana podloga prenijeta je u odgovarajuću posudu u kojoj otopljena podloga zauzima maksimalno 2/3 ukupnog volumena posude. Prah je postupno otopljen grijanjem na plameniku u odgovarajućem volumenu deionizirane vode prema odvagi dehidrirane podloge (propisano od proizvođača), te dobro promiješan okretanjem posude kako bi se podloga u potpunosti otopila. Tako pripremljene podloge se pripremaju za sterilizaciju autoklaviranjem na način da se boce zatvore vatenim čepovima učvršćenim folijom. Pripremljene podloge za autoklaviranje poslagane su u autoklav tako da vodena para može slobodno strujati između spremnika. Autoklaviranje se izvodi pri temperaturi i vremenu koje proizvođač podloga propiše. Nakon autoklaviranja podloge su ohlađene u vodenoj kupelji na 47 °C do 50 °C te razlivena kraj plamenika u laminar-kabinetu. U sterilnim Petrijevim pločama razlivena su krute hranjive podloge debljine 3 mm (za Petrijevu ploču \varnothing 90 do 94 mm razliveno je 20 mL agara) te su ploče ostavljene na ravnoj površini kako bi se agar skrutio i ohladio. Tako pripremljene podloge čuvane su od isušivanja i zaštićene od svjetla u hladnjaku pri temperaturi od 5 °C.

2.2.6. Priprema agara za bakterije roda *Lactobacillus*

Kao selektivna podloga za izolaciju bakterija roda *Lactobacillus* korišten je MRS agar (proizvođač: Merck, Njemačka). MRS agar je agar koji je osmišljen i pripremljen od strane De Man, Rogosa i Sharpe (1960). Sadrži polisorbitat, acetat, magnezij i mangan koji su posebni faktori rasta za bakterije roda *Lactobacillus*. Za pripremu MRS agara odvagano je i otopljeno 68,2 g MRS agara u 1 L destilirane vode prema uputama proizvođača (Merck, Njemačka). Agar je otopljen u Erlenmayerovoj tikvici zagrijavanjem na plameniku uz miješanje. Otopljen agar autoklaviran je 15 min pri 121 °C, te je nakon autoklaviranja razliven u Petrijeve ploče.

2.2.7. Priprema agara za bakterije roda *Bifidobacter*

Kao selektivna podloga za izolaciju bakterija roda *Bifidobacter* korišten je TOS-propionat agar (proizvođač: Merck, Njemačka) koji uz dodatak selektivnog dodatka (supplement) litij – mupirocina (proizvođač: Merck, Njemačka) omogućuje analizu živih bakterija roda *Bifidobacter*. Galaktooligosaharid TOS je šećer kojeg mogu metabolizirati samo bakterije roda *Bifidobacter*. Dodatak litij-mupirocin sprečava rast laktobacila, laktokoka, streptokoka i leukonostoka. Za pripremu TOS-propionat agara odvagano je i otopljeno 62,5 g TOS-propionat agara u 1 L destilirane vode prema uputama proizvođača (Merck, Njemačka). Suplement je pripremljen otapanjem 25 mg litij-mupirocina u 25 mL sterilne vode prema uputama proizvođača (Merck, Njemačka). Agar je otopljen u Erlenmayerovoj tikvici zagrijavanjem na plameniku uz miješanje. Nakon otapanja, u agar je dodana otopina selektivnog dodatka. Tako pripremljen agar je autoklaviran 15 min pri 115 °C, te je nakon autoklaviranja razliven u Petrijeve ploče.

2.2.8. Priprema hranjivog agara

Hranjivi „Tryptic soy agar“ (proizvođač: Merck, Njemačka) je agar hranjivog sastava koji se koristi za održavanje mikrobioloških kultura i izolaciju bakterija, a hranjivim ga čini sastav od kazeina i peptona iz soje koji osiguravaju izvor organskog dušika i aminokiselina. Pripremljen otapanjem 40 g u 1 L destilirane vode uz zagrijavanje na plameniku. Agar je izliven u staklene epruvete uz plamenik, zatvoren čepom i autoklaviran pri 121 °C 15 min. Potom je ostavljen da se stvrdne u epruvetama u kosom položaju.

2.2.9. Nasađivanje

Prije nasađivanja iz primarnog razrjeđenja su korištenjem sterilne fiziološke otopine pripremljena serijska razrjeđenja otopljenih uzoraka sadržaja kolona do 10^{-7} , a na podloge su nasađivana razrjeđenja uzoraka 10^{-2} , 10^{-6} i 10^{-7} CFU/g. Bakterije su nasađivane na podloge u digestoru uz plamenik tako da je 0,1 mL uzorka razrjeđenja sadržaja kolona pomoću automatske pipete prenesen na podlogu i pomoću sterilnog, u vatri opaljenog drigalskog štapića, kružnim pokretima raspoređen po podlozi koja je odmah poklopljena. Nakon što su svi uzorci nanesti na podloge, one koje omogućuju rast roda *Lactobacillus* su pohranjene u mikroaerofilnim uvjetima, a one koje omogućuju rast roda *Bifidobacter* su pohranjene u anaerobnim uvjetima u kutijama za inkubaciju i inkubirane na 37 °C kroz 3 dana. Nakon 3 dana su prebrojane kolonije koje su nastale na podlogama i po jedna kolonija iz svake podloge je sterilnom ezom presađena na kosi „Tryptic soy agar“. Inkubacija je bila pri anaerobnim uvjetima i 37 °C kroz tri dana.

2.2.10. Identifikacija bakterija

Za brzu analizu bakterija koje su narasle na kosom „Tryptic soy agaru“ korišteni su API (engl. *analytical profile index*) CHL testovi (proizvođač BioMérieux, Francuska). Za provođenje API testova, pokupi se sve što je naraslo na kosom agaru i otopi u 10 mL API 50 CHL Medium (bioMérieux, Francuska). Gustoća inokuluma koja se mjeri u denzitometru, standardizirana je prema 2 McFarland standardu. Pripremljena suspenzija je nakapana u cjevčice API 50 CHL pločice, koja sadrži 49 različitih ugljikohidrata, pazeći da se ne formiraju mjehurići. Nakon toga je u sve cjevčice nakapano mineralno ulje kako bi se osigurali anaerobni uvjeti. Inkubacija je trajala 48 h pri 37 °C nakon čega je provedeno očitavanje rezultata i analiza.

2.2.11. Izolacija DNA za sekvenciranje

Ekstrakcija DNA iz uzoraka sadržaja kolona je provedena u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Za ekstrakciju ukupne mješovite DNA iz uzoraka korišten je uređaj Maxwell® 16 i kit za izolaciju „Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit“. Uzorci sadržaja kolona koji su bili pohranjeni na -20 °C su odmrznuti neporedno prije početka pripreme za ekstrakciju. Nakon odmrzavanja,

100 g uzorka sadržaja kolona je resuspendirano u 1 mL fiziološke otopine i vorteksirano. Slijedilo je centrifugiranje 1 min pri 2 000 rpm da se netopivi ostaci sadržaja kolona, stelje i dlaka štakora spuste na dno epruvete, nakon čega je supernatant prebačen u novu epruvetu i centrifugiran 10 min pri 13 000 rpm. Nakon toga je supernatant odstranjen, a pelet stanica resuspendiran u 400 μ L TE (Tris-EDTA) pufera i 100 μ L lizozima ($\gamma=25$ mg/mL). Uzorci su inkubirani 1,5 h na tresilici nakon čega su sonicirani u 3 ciklusa po 30 s sonikacije s 15 s pauze pomoću ultrazvučnog homogenizatora Sonopuls mini (Bandelin). Iz tako pripremljenog uzorka se provodi ekstrakcija DNA pomoću kita Maxwell DNA Tissue kit u uređaju Maxwell® 16 Series (Promega).

Neposredno prije pokretanja uređaja Maxwell® 16 potrebno je njegovu unutrašnjost prebrisati etanolom i zatvoriti vrata. Slijedi uključivanje uređaja pritiskom na Run/Stop, te se odabire program ovisno o korištenom kitu za izolaciju DNA. Slijede se upute na ekranu. Kada postolje za kasete s uzorcima izađe van, oni se namjeste u utore tako da etiketa gleda prema unutra, a žlijeb na sredini kasete prema nama. Odljepi se pokrov sa kasete i uzorci se stavljaju u prvu jažicu, a klipovi u zadnju. Tubice za eluciju se poslože na predviđeno mjesto te se u svaku doda 300 μ L pufera za eluciju. Zatvore se vrata uređaja čime se ujedno automatski pokrene sam postupak izolacije, koji traje oko 45 minuta. Po završetku ekstrakcije, 100 μ L DNA je prebačeno u male epruvete, omotano parafilmom i poslano na sekvenciranje.

Priredeni uzorci DNA poslani su na daljnju analizu u MR DNA (Molecular Research, Shallowater, TX, SAD), koji su akreditirani laboratorij za Illumina MiSeq sekvenciranje. Samom sekvenciranju prethodi umnažanje V3 – V5 varijabilne regije 16S rRNA gena pomoću specifičnih početnica uz primjenu HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, SAD). Pročišćeni PCR produkti koriste se za pripremu DNA knjižnice Illumina TruSeq, a sekvenciranje se provodi u uređaju MiSeq. Rezultati se prikazuju u 2 dokumenta u formatu FASTQ: jedan sadrži očitane sljedove u smjeru 5'-3' (R1), a drugi sadrži očitane sljedove u smjeru 3'-5' (R2).

2.2.12. Statistička obrada podataka

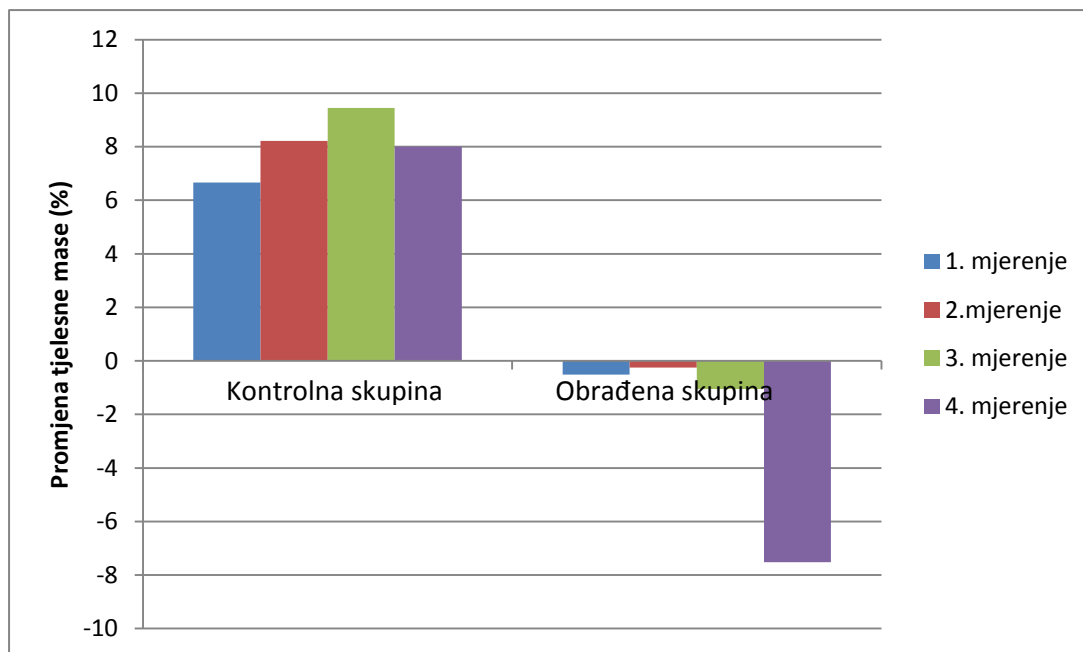
Podaci dobiveni brojanjem kolonija naraslih na selektivnim podlogama i mjerenjem aktivnosti enzima crijevnog mikrobioma su analizirani Studentovim *t*-testom pri čemu je korištena razina značajnosti *P*-vrijednost = 0,05. Podaci dobiveni sekvenciranjem DNA iz laboratorija MR DNA su analizirani Studentovim *t*-testom kako bi se utvrdilo koje vrste bakterija su se značajno promijenile između kontrolne i obrađene skupine štakora. Za podatke

je izračunat i Shannonov index raznovrsnosti. Bakterije koje su pokazale značajnu razliku na Studentovom t -testu su analizirane hijerarhijskim klasteriranjem. To je metoda strojnog učenja kojom se gradi hijerarhija klastera iz određenog seta podataka. Prvo se svaki podatak (u ovom slučaju, bakterijska vrsta i podaci o postotku njenog udjela u mikrobiomu životinje) odredi kao pojedini klaster, a zatim se klasteri spajaju ovisno o njihovoj međusobnoj udaljenosti tj. ovisno o tome koliko su slični. Što je manja razlika među klasterima, oni su sličniji. Spajanjem klastera se dobije stablo u kojem su podaci koji su najbliži međusobno i najbliži i nalaze se u istom klasteru. Koliko su klasteri slični određuje visina na kojoj se nalaze na stablu. Podaci o udjelu bakterijskih vrsta u mikrobiomu životinje su također analizirani metodom analize glavnih komponenti (engl. *principal component analysis*, PCA). To je analiza kojom se utvrđuje koje varijable (u ovom slučaju bakterijske vrste) najviše utječu na varijabilnost opažanja (u ovom slučaju životinja) (Hardy i sur., 2015).

3. REZULTATI

3.1. Praćenje tjelesne mase

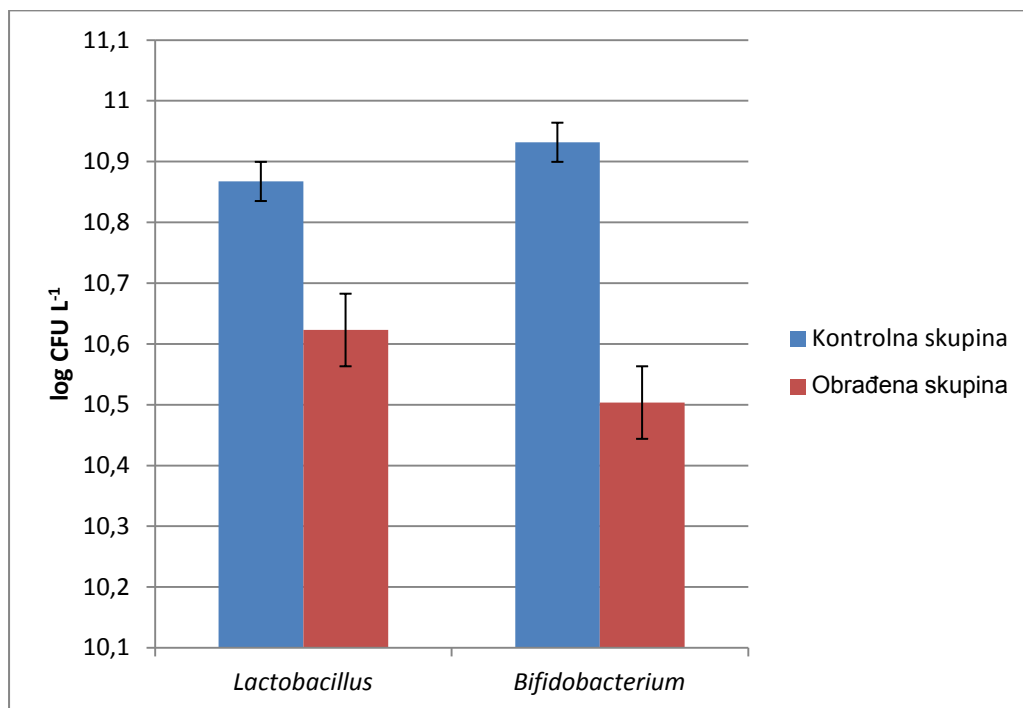
Prema Slici 6. vidljivo je kako u kontrolnoj skupini dolazi do pada tjelesne mase tek u četvrtom tjednu obrađivanja, dok skupini koja je obrađivana AlCl_3 i D-galaktozom od prvog tjedna pada masa.



Slika 6. Razlike mase između mjerenja mase koja su bila provedena jednom tjedno tijekom četiri tjedna eksperimenta. Kontrolnoj skupini je intraperitonealno injicirana fiziološka otopina (0,9% NaCl), a obrađenoj skupini je intraperitonealno injiciran aluminijev klorid u dozi od 10 mg/kg i D-galaktoza u dozi od 60 mg/kg. Životinje su obrađivane svakodnevno tijekom 28 dana.

3.2. Rast kolonija *Lactobacillus* i *Bifidobacter* na selektivnim podlogama

Rezultati dobiveni metodom brojanja kolonija naraslih na selektivnim podlogama za bakterijske rodove *Lactobacillus* i *Bifidobacter* su prikazani na Slici 7. Ova metoda je pokazala značajne razlike u broju kolonija koje su stvorile bakterije rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacter* u obrađenoj skupini za razliku od kontrolne skupine. Studentovim *t*-testom (razina značajnosti P -vrijednost=0,05) su dobivene značajne P -vrijednosti, za rod *Lactobacillus* $P=0,00502$, a za *Bifidobacterium* $P=0,03295$.



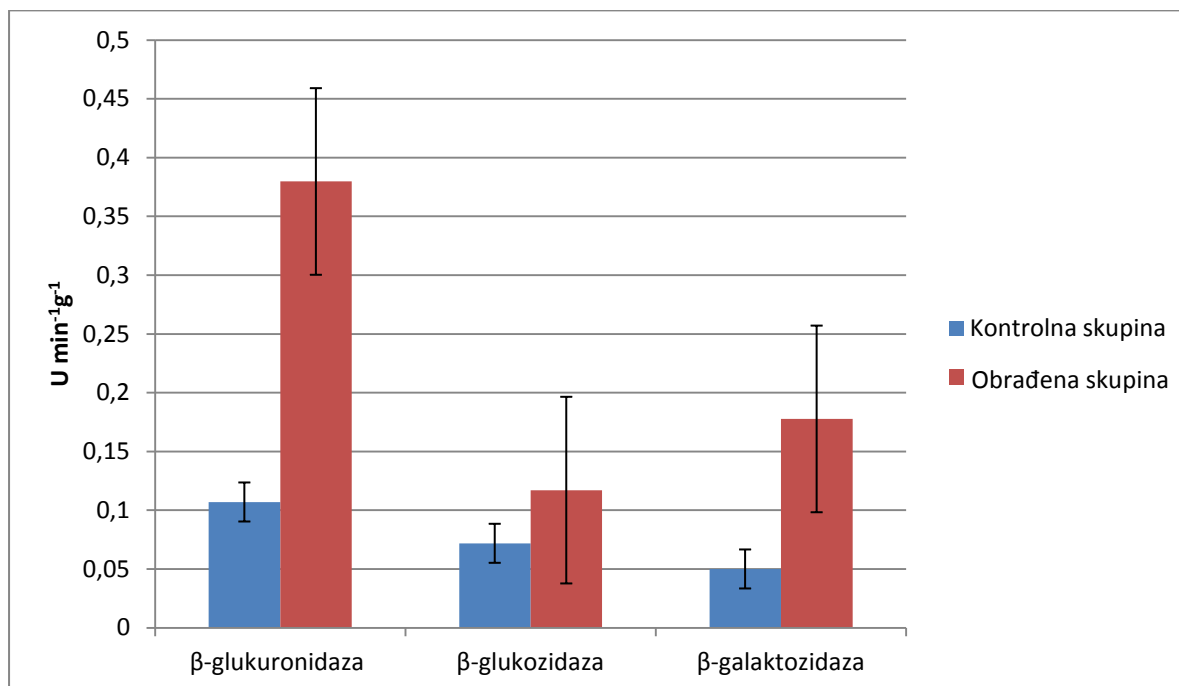
Slika 7. Rezultati brojanja kolonija nastalih na selektivnim podlogama za *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Štakori (n=10) su obrađeni intraperitonealnim injiciranjem AlCl₃ u dozi od 10 mg/kg štakora i D-galaktoze u dozi od 60 mg/kg štakora tijekom 28 dana. Nakon žrtvovanja su uzorci sadržaja kolona razrijeđeni u fiziološkoj otopini nanjeni na selektivne podloge prema opisu u odjeljku “Materijali i metode”. Statistički značajna razlika: Kontrola vs model AB za rod *Lactobacillus* ($P=0,00502$); za rod *Bifidobacterium* ($P=0,03295$).

3.3. Identifikacija bakterija roda *Lactobacillus*

Provođenjem API testova za selektivne podloge za bakterije roda *Lactobacillus* je dobiveno kako je dominantna vrsta *Lactobacillus pentosus* (92% - 99%). Uz nju su detektirane još i vrste *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* i *Lactobacillus brevis*.

3.4. Aktivnosti enzima crijevnog mikrobioma

Provedeni Studentov *t*-test (razina značajnosti $P=0,05$) je pokazao kako se aktivnosti enzima β -glukuronidaze ($P=0,01008$), β -glukozidaze ($P=0,00023$) i β -galaktozidaze ($P=0,00226$) značajno razlikuju između kontrolne i obrađene skupine (modela AB), a rezultati su prikazani na Slici 8.



Slika 8. Rezultati mjerenja aktivnosti enzima crijevnog mikrobioma. Štakori (n=10) su obrađeni intraperitonealnim injiciranjem AlCl₃ u dozi od 10 mg/kg štakora i D-galaktoze u dozi od 60 mg/kg štakora tijekom 28 dana. Aktivnost bakterijskih enzima iz sadržaja kolona mjerena je otpuštanjem *p*- i *o*-nitrofenola iz njihovih nitrofenilglukozida prema metodi Juškiewicz i sur. (2009). Statistički značajna razlika: Kontrola vs model AB za enzima β-glukuronidaze ($P=0,01008$); β-glukozidaze ($P=0,00023$) i β-galaktozidaze ($P=0,00226$).

3.5. Rezultati udjela bakterija u mikrobiomu dobivenih sekvenciranjem DNA iz sadržaja kolona štakora

3.5.1. Shannonov indeks

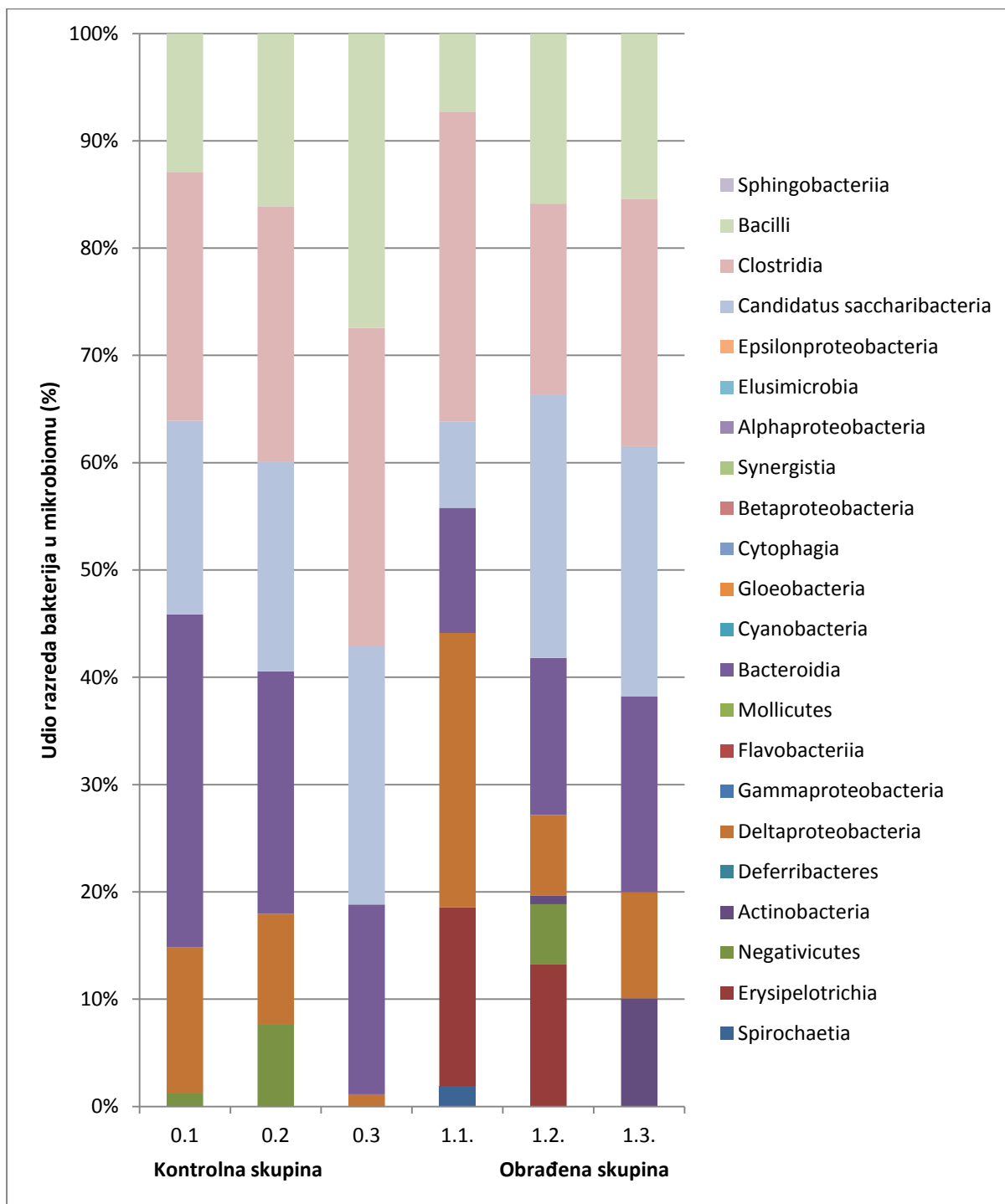
Podaci o udjelima bakterijskih vrsta u mikrobiomima životinja kontrolne i obrađene skupine su dobiveni iz laboratorija MR DNA. Izračunavanjem Shannonovog indeksa iz tih podataka je dobivena raznolikost bakterijskih vrsta u probavilu štakora prema skupini kako prikazuje Tablica 2. Podaci pokazuju kako su mikrobiomi životinja podjednako raznovrsni.

Tablica 2. Shannonov index za mikrobiome životinja kontrolne i obrađene skupine. Štakori (n=6) su obrađeni intraperitonealnim injiciranjem AlCl₃ u dozi od 10 mg/kg štakora i D-galaktoze u dozi od 60 mg/kg štakora tijekom 28 dana. Iz uzoraka sadržaja kolona je izolirana DNA koja je sekvencirana i analizirana kako bi se dobila prisutnost različitih vrsta bakterija u sadržaju kolona. Iz udjela pojedinih vrsta bakterija u životinjama je izračunat Shannonov indeks raznolikosti. Prikazana je srednja vrijednost indeksa unutar skupine i standardnu devijaciju.

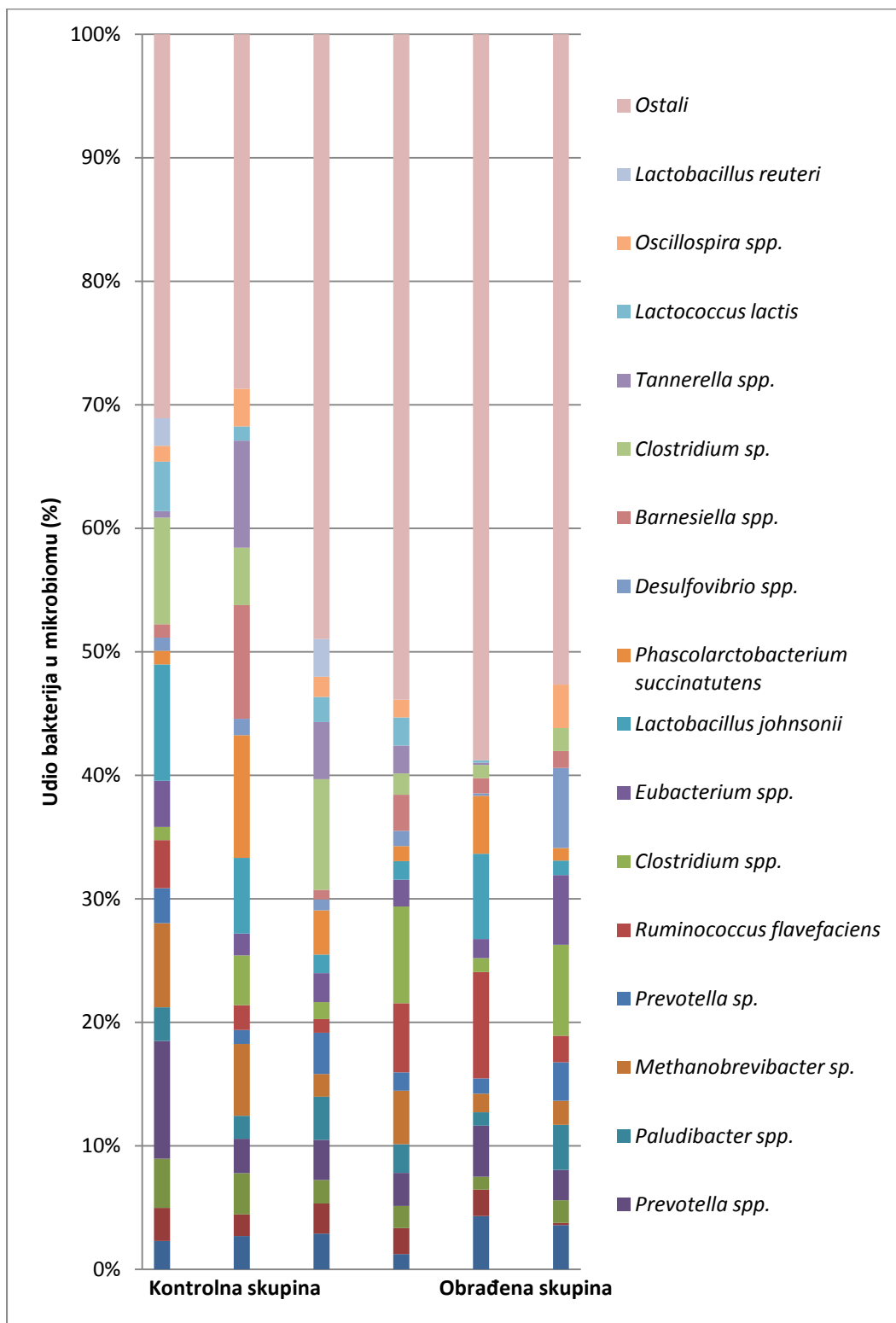
KONTROLNA SKUPINA	OBRAĐENA SKUPINA
3,390633 ± 0,03657895	3,387541 ± 0,05119652

3.5.2. Udjeli bakterijskih razreda i vrsta u mikrobiomima pojedinih životinja

Iz Slike 9. udjela razreda bakterija u mikrobiomu pojedine životinje se može uočiti kako sve životinje dominantno sadrže razrede Bacilli, Clostridia, Candidatus saccharibacteria, Bacteroidia, Deltaproterobacteria i Actinobacteria. Bez obzira na pojedine individualne razlike životinja, ne uočava se osobita različitost između kontrolne i obrađene skupine na osnovi prisutnih bakterijskih razreda. Iz Slike 10., koja prikazuje udjele bakterijskih vrsta koje čine više od 1% mikrobioma, je interesantno vidjeti kako veliki udio u crijevnom mikrobiomu imaju upravo bakterijske vrste kojih ima manje od 1%.



Slika 9. Udio razreda bakterija u mikrobiomima životinja. Štakori (n=6) su obrađeni intraperitonealnim injiciranjem AlCl_3 u dozi od 10 mg/kg štakora i D-galaktoze u dozi od 60 mg/kg štakora tijekom 28 dana. Iz uzoraka sadržaja kolona je izolirana DNA koja je sekvencirana i analizirana kako bi se dobila prisutnost različitih vrsta bakterija u sadržaju kolona. Vrste su pridružene pripadajućim razredima.



Slika 10. Raznovrsnost bakterija koje čine više od 1% analiziranog mikrobioma u analiziranim životinjama. Štakori (n=6) su obrađeni intraperitonealnim injiciranjem AlCl_3 u dozi od 10 mg/kg štakora i D-galaktoze u dozi od 60 mg/kg štakora tijekom 28 dana. Iz uzoraka sadržaja kolona je izolirana DNA koja je sekvencirana i analizirana kako bi se dobila prisutnost različitih vrsta bakterija u sadržaju kolona.

3.5.3. Određivanje bakterija značajno promijenjenih između kontrolne i obrađene skupine

Proveden je Studentov *t*-test koji je sa značajnošću $P < 0,05$ pokazao kako se zastupljenost određenih vrsta bakterija značajno promijenila između kontrolne i obrađene skupine. Od 396 otkrivenih bakterijskih vrsta, 46 ih je pokazalo značajnu razliku. Međutim, valja zamijetiti kako se gotovo sve od tih bakterijskih vrsta čine vrlo mali udio mikrobioma. Odnosno, bakterije koje su se značajno promijenile, a barem u jednoj od skupina se nalaze u udjelu većem od 1% su samo *Lachnoclostridium clostridium lavalense* i *Prevotella copri*. *P*-vrijednosti i udjeli bakterijskih vrsta koje su se značajno promijenile se mogu vidjeti u Tablici 3.

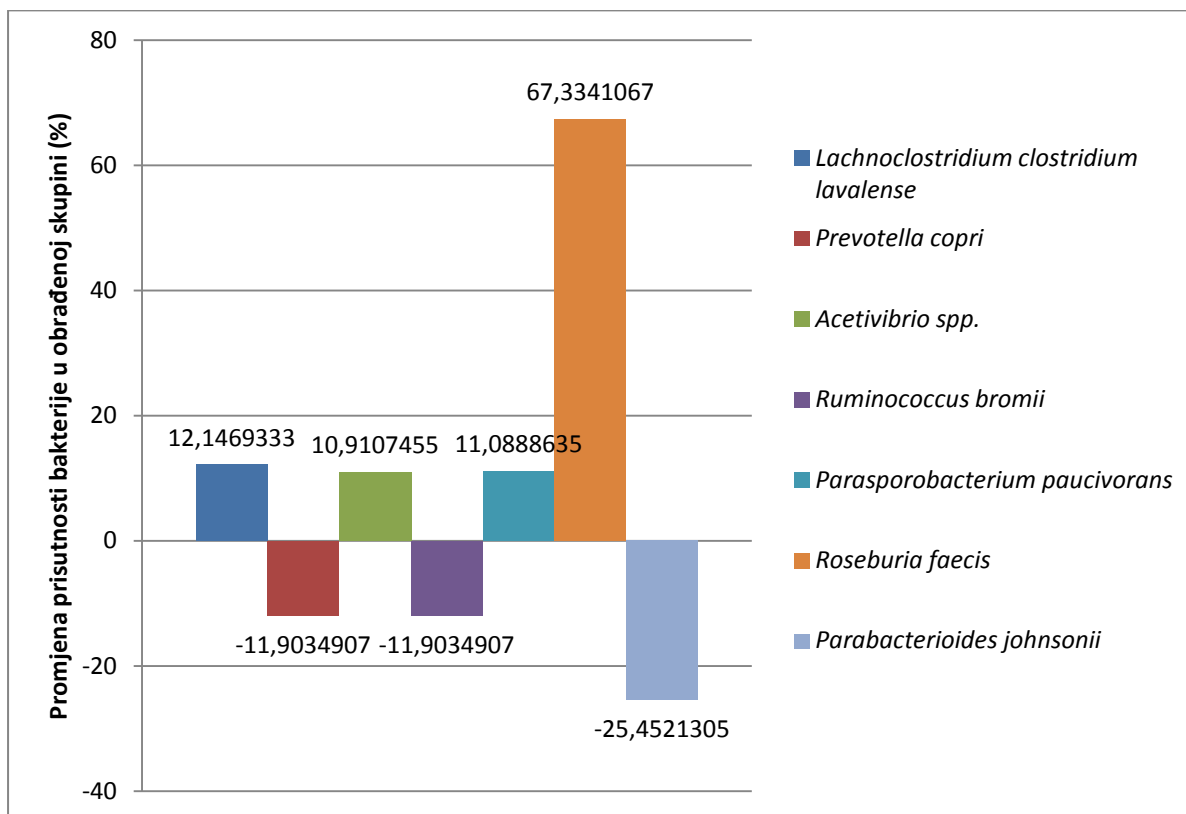
Tablica 3. Bakterijske vrste koje su se značajno promijenile između kontrolne i obrađene skupine

Vrsta bakterije ^a	Prosječni udio bakterije u mikrobiomu štakora unutar kontrolne skupine (%)	Prosječni udio bakterije u mikrobiomu štakora unutar obrađene skupine (%)	<i>P</i> -vrijednost
<i>Alistipes putredinis</i>	0,03019	0,05583	0,03827
<i>Bacillus spp.</i>	0,04071	0,03978	0,00437
<i>Acidaminococcus intestini</i>	0,00063	0,00030	0,01251
<i>Lachnoclostridium [Clostridium] lavalense</i>	1,04481	1,16628	0,01201
<i>Prevotella copri</i>	3,07665	1,09402	0,00542
<i>Christensenella minuta</i>	0,01631	0,01152	0,00445
<i>Sporanaerobacter acetigenes</i>	0,00282	0,00345	0,03822
<i>Roseburia inulinivorans</i>	0,00649	0,00219	0,02315
<i>Acetivibrio spp.</i>	0,13799	0,24709	0,00121
<i>Rhizobium sp.</i>	0,00755	0,00033	0,01624
<i>Ruminococcus bromii</i>	0,45434	0,33531	0,02284
<i>Clostridium aminobutyricum</i>	0,00311	0,00816	0,04032
<i>Brachyspira muridarum</i>	0,00094	0,00159	0,01301
<i>Bacteroides coprocola</i>	0,00062	0,00030	0,01868
<i>Pseudoflavonifractor bacteroides capillosus</i>	0,00970	0,01298	0,03111
<i>Lachnoclostridium [Clostridium] amygdalinum</i>	0,01867	0,03137	0,00883
<i>Syntrophococcus sp.</i>	0,01787	0,03548	0,03308
<i>Roseburia faecis</i>	0,45465	1,12799	0,01667

<i>Coprococcus eutactus</i>	0,00031	0,00214	0,04311
<i>Peptococcus sp.</i>	0,01417	0,01131	0,03227
<i>Eubacterium xylanophilum</i>	0,01708	0,01903	0,00090
<i>Brachyspira sp.</i>	0,00373	0,01785	0,02971
<i>Bacteroides gallinarum</i>	0,00095	0,00033	0,03549
<i>Cellulosilyticum spp.</i>	0,00031	0,00128	0,00827
<i>Parabacteroides goldsteinii</i>	0,00158	0,00193	0,02219
<i>Alkalibacter spp.</i>	0,02729	0,01640	0,00311
<i>Caloramator fervidus</i>	0,00220	0,00257	0,00065
<i>Erysipelatoclostridium clostridium ramosum</i>	0,01534	0,01738	0,03735
<i>Butyricimonas virosa</i>	0,00570	0,00575	0,03096
<i>Parabacteroides gordonii</i>	0,00531	0,00450	0,00031
<i>Sporobacter termitidis</i>	0,00341	0,00292	0,00348
<i>Clostridium boliviensis</i>	0,01309	0,00959	0,03212
<i>Lutispora spp.</i>	0,00126	0,00093	0,02038
<i>Pseudobutyrvibrio spp.</i>	0,00500	0,01575	0,00210
<i>Ruminococcus callidus</i>	0,09089	0,14573	0,00205
<i>Parabacteroides johnsonii</i>	0,61250	0,35798	0,04027
<i>Marvinbryantia bryantella formatexigens</i>	0,02830	0,03917	0,03791
<i>Enterorhabdus caecimuris</i>	0,05248	0,04095	0,01617
<i>Subdoligranulum spp.</i>	0,06924	0,05974	0,03394
<i>Bacteroides uniformis</i>	0,08176	0,08615	0,01175
<i>Escherichia coli</i>	0,01684	0,00794	0,02502
<i>Anaerovorax spp.</i>	0,08300	0,06846	0,03655
<i>Desulfosporosinus meridiei</i>	0,00374	0,00413	0,01724
<i>Ruminiclostridium clostridium stercorarium</i>	0,00035	0,00095	0,01140
<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	0,24338	0,28996	0,00020
<i>Tyzzzeria clostridium neopropionicum</i>	0,00221	0,00033	0,01074

^aZa svaku bakterijsku vrstu je navedeno koji postotak mikrobioma u prosjeku čini u štakorima kontrolne, odnosno obrađene skupine i pripadajuća *P*-vrijednost. Štakori (*n*=6) su obrađeni intraperitonealnim injiciranjem AlCl₃ u dozi od 10 mg/kg štakora i D-galaktoze u dozi od 60 mg/kg štakora tijekom 28 dana. Iz uzoraka sadržaja kolona je izolirana DNA koja je sekvencirana i analizirana kako bi se dobila prisutnost različitih vrsta bakterija u sadržaju kolona. Prisutnost bakterijskih vrsta je statistički obrađena Studentovim *t*-testom.

Od bakterijskih vrsta navedenih u Tablici 3. se ističu one koje su se promijenile za više od 10% između kontrolne i obrađene skupine te su prikazane na Slici 11.



Slika 11. Bakterijske vrste koje su se značajno promijenile više od 10% između kontrolne i obrađene skupine. Štakori (n=6) su obrađeni intraperitonealnim injiciranjem $AlCl_3$ u dozi od 10 mg/kg štakora i D-galaktoze u dozi od 60 mg/kg štakora tijekom 28 dana. Iz uzoraka sadržaja kolona je izolirana DNA koja je sekvencirana i analizirana kako bi se dobila prisutnost različitih vrsta bakterija u sadržaju kolona. Prisutnost bakterijskih vrsta je statistički obrađena Studentovim *t*-testom.

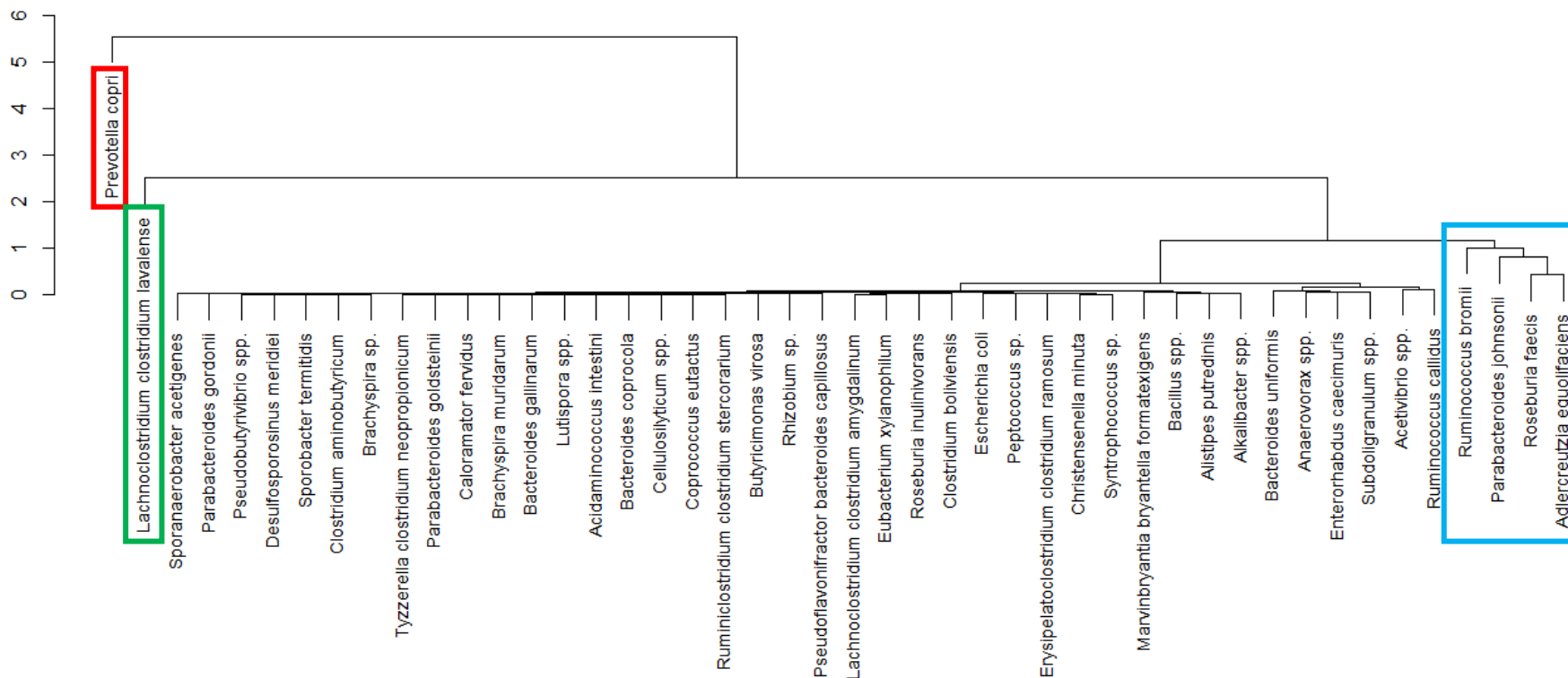
3.5.4. Hijerarhijsko klasteriranje

Nad bakterijskim vrstama koje su na Studentovom *t*-testu pokazale značajnu razliku ($P < 0,05$) napravljeno je hijerarhijsko klasteriranje. To je metoda strojnog učenja kojom se podaci raspoređuju u zasebne klustere ovisno o tome koliko se međusobno razlikuju (podaci koji se najmanje razlikuju idu u zajednički klaster) i hijerarhijski slažu. Za računanje klastera (odnosno pripadnosti podatka određenom klasteru) u ovom slučaju je korištena metoda potpune veze (engl. *complete linkage*).

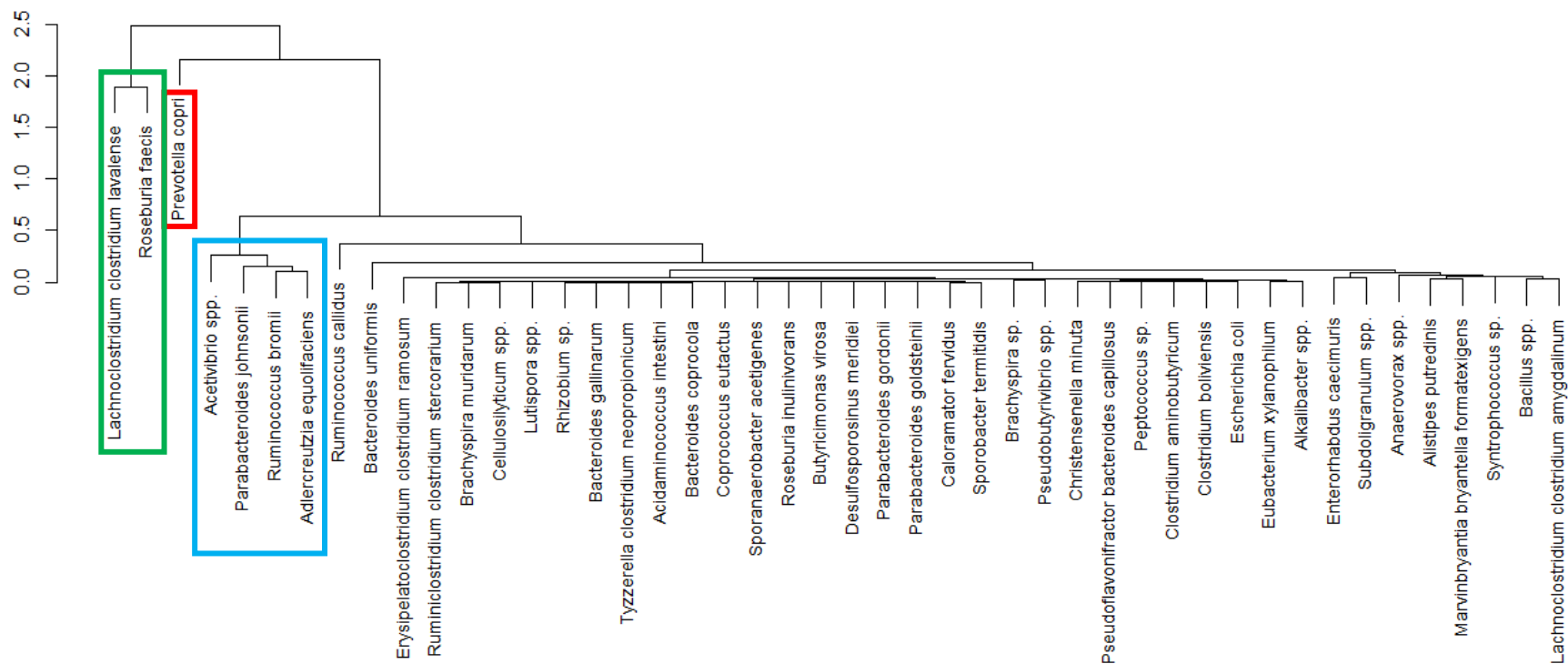
Rezultati hijerarhijskog klasteriranja za kontrolnu skupinu su prikazani na Slici 12. Hijerarhijsko klasteriranje prisutnosti bakterija kontrolne skupine je istaknulo tri klastera koji se značajno razlikuju od velikog klastera od 40 bakterija čija je prisutnost vrlo slična u

mikrobiomu. To su *Prevotella copri* (crveni okvir), *Lachnoclostridium* [*Clostridium*] *lavalense* (zeleni okvir) i klaster u plavom okviru koji sadrži *Ruminococcus bromii*, *Parabacteroides johnsonii*, *Roseburia faecis* i *Adlercreutzia equolifaciens*.

Rezultati hijerarhijskog klasteriranja za obrađenu skupinu su prikazani na Slici 13. Hijerarhijsko klasteriranje prisutnosti bakterija obrađene skupine je također istaknulo tri klastera koji se značajno razlikuju od velikog klastera od 39 bakterija čija je prisutnost vrlo slična u mikrobiomu. To su *Prevotella copri* (crveni okvir), *Lachnoclostridium* [*Clostridium*] *lavalense* i *Roseburia faecis* (zeleni okvir) i klaster u plavom okviru koji sadrži *Ruminococcus bromii*, *Parabacteroides johnsonii*, *Adlercreutzia equolifaciens* i *Acetivibrio* spp. Iako se klasteri obrađene skupine (Slika 13.) nisu mnogo promijenili u odnosu na kontrolnu skupinu, značajno je kako se visina hijerarhijskog stabla promijenila. Naime, visina stabla kontrolne skupine je do 5,5, a obrađene skupine 2,5. To znači da se tri odvojena klastera kod obrađene skupine puno manje razlikuju nego kod obrađene skupine.



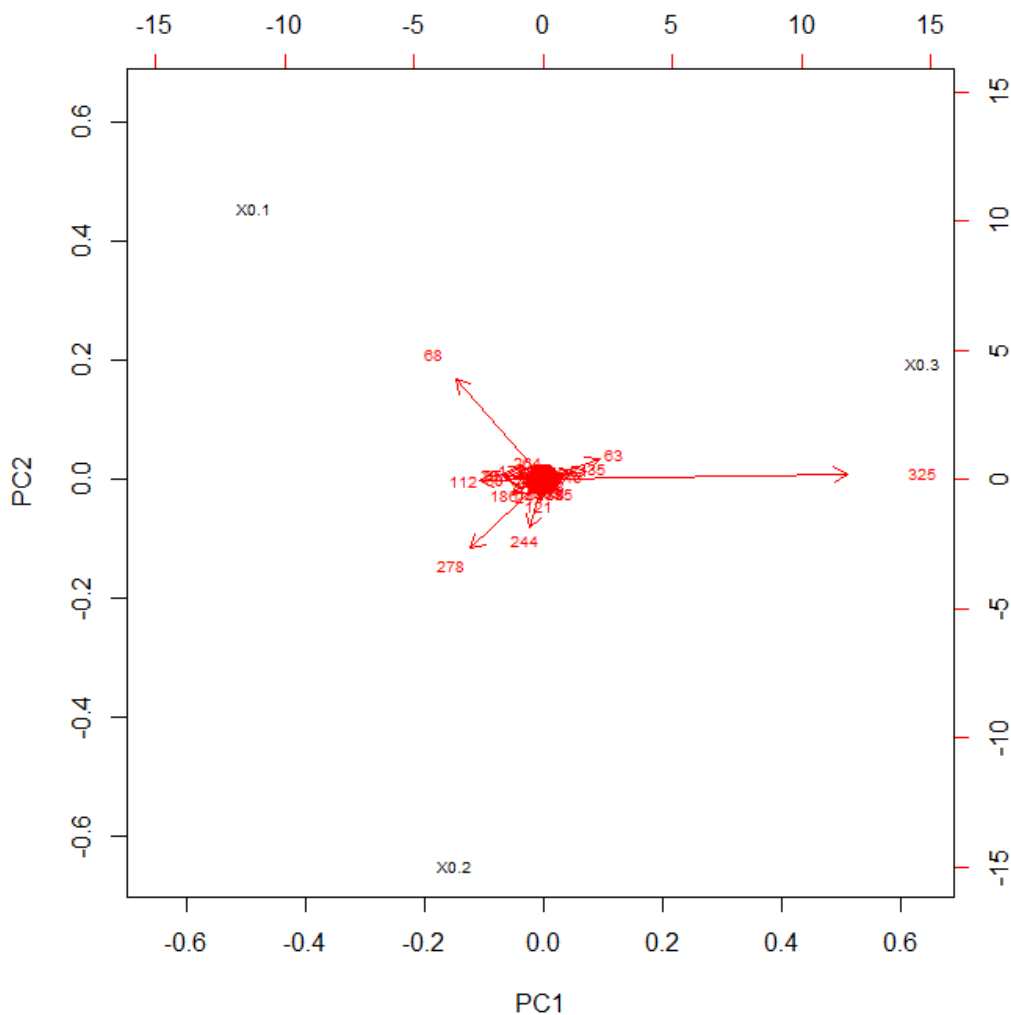
Slika 12. Hijerarhijsko klasteriranje prisutnosti bakterijskih vrsta u životinjama kontrolne skupine. Štakori (n=6) su obrađeni intraperitonealnim injiciranjem AlCl_3 u dozi od 10 mg/kg štakora i D-galaktoze u dozi od 60 mg/kg štakora tijekom 28 dana. Iz uzoraka sadržaja kolona je izolirana DNA koja je sekvencirana i analizirana kako bi se dobila prisutnost različitih vrsta bakterija u sadržaju kolona. Prisutnost bakterijskih vrsta je statistički obrađena i Studentovim *t*-testom su dobivene vrste koje su se značajno promijenile između kontrolne i obrađene skupine. Nad tim vrstama je provedeno hijerarhijsko klasteriranje. Prikazani su klasteri kontrolne skupine.



Slika 13. Hijerarhijsko klasteriranje prisutnosti bakterijskih vrsta u životinjama obrađene skupine. Štakori (n=6) su obrađeni intraperitonealnim injiciranjem AlCl_3 u dozi od 10 mg/kg štakora i D-galaktoze u dozi od 60 mg/kg štakora tijekom 28 dana. Iz uzoraka sadržaja kolona je izolirana DNA koja je sekvencirana i analizirana kako bi se dobila prisutnost različitih vrsta bakterija u sadržaju kolona. Prisutnost bakterijskih vrsta je statistički obrađena i Studentovim t -testom su dobivene vrste koje su se značajno promijenile između kontrolne i obrađene skupine. Nad tim vrstama je provedeno hijerarhijsko klasteriranje. Prikazani su klasteri obrađene skupine.

3.5.5. Metoda analize glavnih komponenti

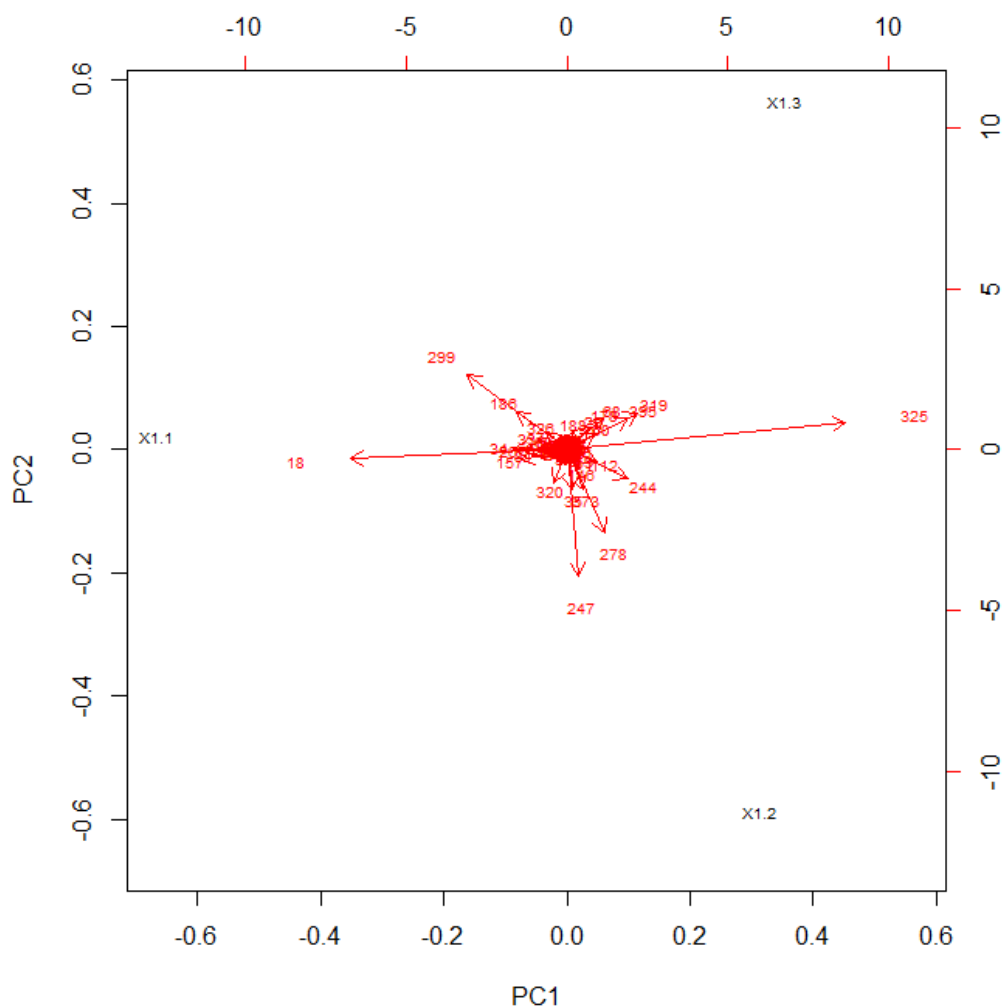
Metoda analize glavnih komponenti je pokazala kako se kontrolna i obrađena skupina razlikuju po bakterijama koje utječu na njihovu varijabilnost. Na varijabilnost u kontrolnoj skupini najviše utječu *Prevotella spp.*, *Eubacterium spp.*, *Barnesiella spp* i *Lactococcus lactis*. Također, sa Slike 14. se jasno uočava kako je na se u mikrobiomu životinje X0.3 ističe bakterija *Lactococcus lactis* i to znatno više nego u druge dvije životinje. Osim toga, na mikrobiom životinje X0.1 jako utječe *Prevotella spp.*, a životinje X0.2 *Barnesiella spp*.



Slika 14. Graf prve dvije glavne komponente za kontrolnu skupinu. Štakori (n=3) su obrađeni intraperitonealnim injiciranjem $AlCl_3$ u dozi od 10 mg/kg štakora i D-galaktoze u dozi od 60 mg/kg štakora tijekom 28 dana. Iz uzoraka sadržaja kolona je izolirana DNA koja je sekvencirana i analizirana kako bi se dobila prisutnost različitih vrsta bakterija u sadržaju kolona. Prisutnost bakterijskih vrsta je statistički obrađena i Studentovim *t*-testom su dobivene vrste koje su se značajno promijenile između kontrolne i obrađene skupine. Nad tim vrstama je provedena analiza glavnih komponenti. Prva glavna komponenta objašnjava 86% varijabilnosti bakterija, a druga 13%.

Oznake: X0.1, X0.2, X0.3 – životinje kontrolne skupine; 68 – *Prevotella spp.*, 244 – *Eubacterium spp.*, 278 – *Barnesiella spp.*, 325 – *Lactococcus lactis*

S druge strane, sa Slike 15. koja prikazuje prvu i drugu glavnu komponentu za podatke o obrađenoj skupini, uočava se znatan utjecaj *Lactococcus lactis* na mikrobiome životinja X1.2 i X1.3. Na mikrobiom životinje X1.2 još znatno utječu *Eubacterium spp.* i *Lactobacillus johnsonii*, dok se za mikrobiom životinje X1.1. ističu *Candidatus saccharimonas aalborgensis* i *Clostridium spp.* Kod obje skupine se na prikazima uočava kako se oznake životinja nalaze na različitim stranama grafa što govori kako se znatno razlikuju s obzirom na to koje bakterije utječu na varijabilnost njihovih mikrobioma.



Slika 15. Graf prve dvije glavne komponente za obrađenu skupinu. Štakori (n=3) su obrađeni intraperitonealnim injiciranjem AlCl_3 u dozi od 10 mg/kg štakora i D-galaktoze u dozi od 60 mg/kg štakora tijekom 28 dana. Iz uzoraka sadržaja kolona je izolirana DNA koja je sekvencirana i analizirana kako bi se dobila prisutnost različitih vrsta bakterija u sadržaju kolona. Prisutnost bakterijskih vrsta je statistički obrađena i Studentovim *t*-testom su dobivene vrste koje su se značajno promijenile između kontrolne i obrađene skupine. Nad tim vrstama je provedena analiza glavnih komponenti. Prva glavna komponenta objašnjava 79% varijabilnosti bakterija, a druga 20%.

Oznake: X1.1, X1.2, X1.3 – životinje obrađene skupine; 18 – *Candidatus saccharimonas aalborgensis*, 186 – *Ruminococcus flavefaciens*, 244 – *Eubacterium spp.*, 247 – *Lactobacillus johnsonii*, 278 – *Barnesiella spp.*, 299 – *Clostridium spp.*, 320 – *Turicibacter spp.*, 325 – *Lactococcus lactis*

4. RASPRAVA

Istraživanja na *germ free* životinjama pokazala su kako je bakterijska kolonizacija probavila ključna za razvijanje središnjeg i enteričkog živčanog sustava. Nedostatak bakterija je povezan s promjenama u količini neurotransmitera, reakcijama na stres, poremećajima u pamćenju (Carabotti i sur., 2015). Rezultati mnogih istraživanja upućuju kako uzimanje probiotika kao što su *Lactobacillus* i *Bifidobacter* poboljšava pamćenje, raspoloženje i kognitivne sposobnosti, a smanjuje depresivno ponašanje (Wang i Kasper, 2013; Liu i sur., 2015; Yu i sur., 2017; Jiang i sur., 2017).

U ovom istraživanju metoda brojanja kolonija naraslih na selektivnim podlogama je pokazala kako je prisutnost probiotičkih bakterija značajno pala u obrađene skupine (Slika 7.). To je pokazatelj kako su $AlCl_3$ i D-galaktoza štetno utjecali na probiotičke bakterije mikrobioma. Do sada nije istraženo zašto $AlCl_3$ i D-galaktoza štetno utječu na probiotičke bakterije, ali smatrano je da na te promjene zasigurno utječe dvosmjerna komunikacija između crijeva i mozga te njihovi učinci u mozgu koji izazivaju značajan stres, doprinose razvijanju upalnog procesa, stvaraju ROS i AGE (Mayer i sur. 2015). Budući da je poznato kako probiotičke bakterije preko osi mikrobiom-crijeva-mozak mogu utjecati na neurofiziologiju (Saulnier i sur. 2013, Mayer i sur. 2015), vrlo je značajno znati da su promjene u neurofiziologiji mozga kod štakora značajno utjecale na promjenu sastava mikrobioma. Naime, komunikacija po osi mikrobiom-crijeva-mozak je dvosmjerna i izvjesno je da molekule kao što su ROS, AGE i proupalni citokini mogu utjecati na bakterije mikrobioma, a tako i na probiotičke bakterije. Upravo podatak da su $AlCl_3$ i D-galaktoza utjecali na prisutnost probiotičkih bakterija u cijevnom mikrobiomu potvrđuju važnost osi crijeva-mozak.

Mjerenje aktivnosti enzima crijevnog mikrobioma (Slika 8.) je pokazalo značajan porast aktivnosti svih enzima. β -galaktozidaza poboljšava razgradnju laktoze i škroba te sudjeluje u stvaranju kratkolančanih masnih kiselina. β -glukozidaza ima hidrolitičku aktivnost koja dovodi do stvaranja toksina i bakterijskih glukozidnih derivata koji su povezani sa zaštitom od kemijski induciranog raka. β -glukuronidaza također sudjeluje u stvaranju toksina i karcinogenih metabolita, a veliku količinu tog enzima stvaraju bakterije koje se nalaze u crijevu kao što su *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Bacterioides fragilis*, *Ruminococcus gnavus* i rod *Eubacterium*. Velike količine β -glukuronidaze su

otkivene u cerebrospinalnoj tekućini ljudi koji imaju rak na mozgu, a korištenje antibiotika dovodi do smanjenja količine enzima u kolonu, što sugerira kako cijevne bakterije imaju važnu ulogu u regulaciji razine tog enzima u kolonu (Wronkowska i sur. 2011; Mroczyńska i sur. 2013) Smatram kako povećanje aktivnosti ovih enzima odgovara manjoj prisutnosti probiotičkih bakterija u crijevu štakora. Ovi enzimi su pokazatelj prisutnosti nepoželjnih bakterija koje narušavaju crijevnu epitelnu barijeru, stvaraju genotoksične, karcionogene ili mutagene molekule, vode upali i stvaranju ROS povećavajući crijevnu propusnost te omogućuju izlazak toksina u krvotok i njihov toksični učinak na sva tkiva i organe (Uccello i sur. 2012).

Koliko se zapravo mikrobiom promijenio između kontrolne i obrađene skupine govori Shannonov indeks (Tablica 2.), koji je gotovo jednak za obje skupine, međutim treba imati na umu da nije važna samo razlika između pojedinih vrsta nego njihova biomasa. Jako je važno što su podaci pokazali kako se sastavi crijevnih mikrobioma svih 6 životinja, iz čijih sadržaja kolona su izolirane i sekvencirane DNA kako bi se proučio sastav mikrobioma, razlikuju. To je za očekivati budući da je svaka životinja individualna i iako su sve iz istog okota, odrastale su u istim uvjetima i bile jednako obrađivane, postoje određene razlike u načinu na koji jedu, količini sna, količini kretanja, načinu na koji doživljavaju stres, a takvi čimbnici mogu značajno utjecati na njihovu fiziologiju. Promjena tjelesne mase tijekom perioda od 28 dana i stalni stres tijekom obrade životinja jasno potvrđuju navedene činjenice (Slika 6). Ono što utječe na fiziologiju štakora, također će utjecati i na njihov mikrobiom. Naime, vrlo lako dođe do promjena u sastavu mikrobioma budući da se stalno događa kompeticija između patobionta i poželjnih bakterija.

Rezultati analize glavnih komponenti su pokazali kako se tri analizirane životinje unutar kontrolne skupine međusobno razlikuju i kako se tri analizirane životinje unutar obrađene skupine međusobno razlikuju. Sve one imaju iste vrste bakterija u svojim probavilima, međutim, njihovi udjeli su različiti (Slike 14. i 15.). Kad se uzme u obzir koliko različitih čimbenika utječe na mikrobiom životinja, logično je kako će osjetljiva metoda kao što je sekvenciranje druge generacije to iznijeti na vidjelo i upravo zato bi bilo poželjno koristiti više životinja po skupini u istraživanju.

Statističkom analizom je dobiveno kako od 396 bakterija dobivenih sekvenciranjem, 46 bakterija (tj. 11,61%) pokazuju značajne promjene u udjelu (Tablica 3.) između kontrolne i obrađene skupine. Međutim, bakterije koje su se značajno promijenile nisu one kojih je u

sastavu mikrobioma najviše ili one koje, prema analizi glavnih komponenti, najviše utječu na varijabilnost mikrobioma. Kada bi se značajno promijenila neka od tih vrsta bakterija (navedene su kod rezultata analize glavnih komponenti) mogli bismo očekivati kako će to značajno utjecati na promjene u mikrobiomu, količini patobionta i posljedično u utjecaju na neurofiziologiju preko osi mikrobiom-crijeva-mozak.

Važno je istaknuti kako su podaci o udjelima bakterija u mikrobiomima životinja vrlo precizni, ali zbog broja životinja po skupini (n=3) rezultati se ne mogu generalizirati. Ne može se zaključiti kako bi kod svih štakorskih skupina dobili slične podatke. Velike su razlike u rezultatima sekvenciranja nove generacije zbog specifičnosti početnica koje se koriste, osjetljivosti uređaja na postojanje signala vezanja nukleotida na DNA, uređaja kojim se sekvencira, a do razlika dolazi i u obradi podataka. Naime, od 46 bakterija koje su pokazale značajnu razliku između kontrolne i obrađene skupine, samo 2 čine više od 1% mikrobioma (Tablica 3). To su *Lachnoclostridium [Clostridium] lavalense* i *Prevotella copri*. Također, od tih 46 vrsta koje su se značajno promijenile u prosjeku čine svega 6,725% mikrobioma u kontrolnoj skupini, a 5,405% u obrađenoj skupini.

Kang i suradnici (2011) su otkrili kako je prisutnost vrsta roda *Prevotella* u autistične djece značajno manja. Rod *Prevotella* je značajan zato što te bakterije mogu metabolizirati veliki spektar biljnih polisaharida. Smatra se kako ona sudjeluje u kompeticiji s patobiontima kao što su neke bakterije rodova *Escherichia* i *Shigella* (Kang i sur. 2013). Rezultati mojeg istraživanja pokazuju smanjenje prisutnosti vrste *E.coli* i može se zaključiti kako se radi o ne-štetnim sojevima *E.coli* budući da bi se patogeni sojevima u mikrobiomima štakora obrađene skupine, koji imaju manje rodova *Lactobacillus*, *Bifidobacter* i *Prevotella*, povećala prisutnost, a ne smanjila.

Metoda hijerarhijskog klasteriranja koja je provedena nad bakterijskim vrstama koje su se značajno promijenile je pokazala kako je sastav bakterija koje se nalaze u kontrolnoj i u obrađenoj skupini ostao sličan budući da su se klasteri vrlo malo izmijenili (Slike 12. i 13.). Međutim, značajno je kako se promijenila visina stabla koja govori o razlici između dva klastera. Budući da je kod kontrole najveća razlika u visini 5,5, a kod obrađene skupine 2,5, to govori kako su AlCl₃ i D-galaktoza loše utjecali na prisutnost bakterija koje se nalaze u višim klasterima (a to su *Prevotella copri*, *Lachnoclostridium [Clostridium] lavalense*, *Roseburia faecis*, *Ruminococcus bromii*, *Parabacteroides johnsonii*, *Adlercreutzia equolifaciens* i *Acetivibrio spp.*).

Smatra se kako je upala glavni razlog zbog čega u ljudi oboljelih od Alzheimerove bolesti dolazi do pada kognitivnih sposobnosti (Caracciolo i sur. 2013). Pokazano je kako se s godinama mijenja omjer Firmicutes i Bacteroidetes u crijevnom mikrobiomu i smanjuje se raznolikost bakterija u crijevnom mikrobiomu. Također, starenje je povezano sa slabom, ali stalnom aktivacijom urođenog i specifičnog imunološkog sustava, zbog čega dolazi do stalnog stanja blage upale. Međutim, na raznovrsnost crijevnog mikrobioma i na proces upale se može utjecati načinom života i prehranom (Jiang i sur. 2017). Pokazano je kako polifenoli, koji su prisutni u voću, povrću, hrani i piću od voća i povrća, čaju, začinima i maslinovom ulju, a također i nezasićene masne kiseline utječu na poboljšanje stanja demencije, kognitivnih sposobnosti i govor. Smatra se kako do toga dolazi zbog njihovih antioksidativnih i protuupalnih učinaka (Caracciolo i sur. 2013). Budući da Alzheimerovu bolest karakteriziraju brojni patofiziološki procesi i promjene mikrobioma slične promjenama koje pokazuje inducirani model AB u štakora, važno je istaknuti da prehrana bogata vlaknima te unos probiotika mogu imati sinergistički učinak za postizanje homeostaze crijevnog mikrobioma i smanjenje posljedica u bolesnika s AB. Također bilo bi važno da bolesnici prehranom unose probiotike i prebiotike kako bi te bakterije pozitivno utjecale na mozak stvaranjem protuupalnih citokina, utjecanjem na smanjenje pristunosti patogenih bakterija, obnovom cjelovitosti crijevne epitelne barijere i proizvodnjom GABA-e koja je važan inhibitorski neurotransmiter u CNS-u, (Bhattacharjee i Lukiw, 2013; Wang i Kasper, 2014). Budući da s godinama starosti osobe krvno-moždana barijera postaje sve više propusna, uloga probiotika u održavanju cjelovitosti crijevne epitelne barijere je vrlo važna (Hill i sur., 2014). Uspostavljanje crijevne homeostaze je ključno u održavanju važnih homeostatskih procesa u središnjem živčanom sustava (CNS).

U daljnjim istraživanjima je potrebno detaljnije proučiti bakterijske vrste crijevnog mikrobioma. Naime, smatra se kako ih ima barem 1000 (Jiang i sur. 2017), a u ovom istraživanju ih je otkriveno 496. Također, bilo bi poželjno prilagoditi doze kojima se štakori obrađuju kako bi se produljilo vrijeme istraživanja i kako bi bilo moguće proučiti kako pojačavanje upale koju izazivaju $AlCl_3$ i D-galaktoza utječe na crijevni mikrobiom. Iako je otkriveno nekoliko bakterijskih vrsta koje su se značajno promijenile, kada se u obzir uzme koliki je njihov udio u crijevnom mikrobiomu i koliko utječu na varijabilnost mikrobioma pojedine životinje, dolazi se do zaključka kako bi bilo potrebno koristiti više životinja u istraživanju jer bi se tako utjecaj varijabilnosti crijevnog mikrobioma svake pojedine životinje smanjio. Također, budući da je pokazano kako $AlCl_3$ i D-galaktoza negativno utječu

na probiotičke bakterije crijevnog mikrobioma, bilo bi važno proučiti može li se preventivnim unosom probiotičkih bakterija spriječiti ili ublažiti upalni proces izazvan $AlCl_3$ i D-galaktozom. Osim toga, bilo bi važno istražiti metabolite koje stvara crijevni mikrobiom uključujući GABA, kratkolančane masne kiseline, serotonin, histamin, čimbenik zaštite moždanih stanica (engl. *brain-derived growth factor*), razinu upalnih citokina, važne vitamine (skupina B i vitamin K) u krvi, ali i u mozgu.

5. ZAKLJUČAK

Temeljem dobivenih rezultata zaključujem:

- Aluminijevim kloridom i D-galaktozom je uspješno izazvan štakorski model Alzheimerove bolesti.
- Obrada štakora aluminijevim kloridom i D-galaktozom je smanjila broj probiotičkih bakterija u crijevnom mikrobiomu.
- Obrada štakora aluminijevim kloridom i D-galaktozom je povećala aktivnosti bakterijskih enzima β -galaktozidaze, β -glukozidaze i β -glukuronidaze povezanih s prisutnošću nepoželjnih bakterija crijevnog mikrobioma.
- Pokazane su promjene u sastavu crijevnog mikrobioma, međutim za jasniju sliku potreban je veći broj analiziranih životinja.
- Crijevni mikrobiomi pojedinih životinja su različiti s obzirom na udjele pojedinih bakterija.
- Između kontrolne skupine i skupine štakora obrađene aluminijevim kloridom i D-galaktozom je došlo do značajnih promjena u 46 bakterijskih vrsta, međutim, te vrste čine mali udio crijevnog mikrobioma.
- Skupina obrađena aluminijevim kloridom i D-galaktozom ima smanjenu biomasu crijevnog mikrobioma.
- *Prevotella copri* i *Lachnoclostridium [Clostridium] lavalense* su se najviše promijenile u udjelu crijevnog mikrobioma između kontrolne skupine i skupine obrađene aluminijevim kloridom i D-galaktozom.
- Smanjeni udio *Lactobacillus* i *Bifidobacter*, povećana enzimska aktivnost β -galaktozidaze, β -glukozidaze i β -glukuronidaze i smanjenje biomase crijevnog mikrobioma povezani su s upalnim procesom izazvanim u štakorskom modelu AB.
- Prehrana bogata vlaknima i prebiotici zasigurno bi mogli pozitivno djelovati na crijevni mikrobiom smanjujući upalu te pozitivno djelovati na bolesnike s Alzheimerovom bolesti i/ili drugim neuralnim bolestima povezanim s upalom i oksidacijskim stresom.

6. LITERATURA

Ali AA, Ahmed HI, Abu-Elfotuh K (2016). Modeling Stages Mimic Alzheimer's Disease Induced by Different Doses of Aluminum in Rats: Focus on Progression of the Disease in Response to Time. *J Alzheimers Dis Parkinsonism* **11**: 2:12

Balltore C, Lee VM-Y, Trojanowski JQ (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* **8**: 663-672.

Bhattacharjee S, Lukiw WJ (2013). Alzheimer's disease and microbiome. *Front Cell Neurosci* **7**: 153-157.

Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, Severi C (2015). The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann Gastroenterol* **28(2)**: 203-209.

Caracciolo B, Xu W, Collins S, Fratiglioni (2014). Cognitive decline, dietary factors and gut-brain interactions. *Mech Ageing Dev* **136**: 59-69.

Citron M (2010). Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat Rev Drug Discov* **9**: 387-398.

Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Cummings JL, DeKosky ST, Barberger-Gateau P, Gauthier S (2010). Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol* **9**: 1118-1127.

Foster JA, McVey Neufeld K-A (2013). Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci* **36(5)**: 305-312.

Gareth J, Witten D, Hastie TJ, Tibshirani RJ. *An Introduction to Statistical Learning: With Applications in R*. New York: Springer, 2015.

Hardy J (2009). The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *J Neurochem* **110**: 1129-1134.

Hill JM, Clement C, Pogue AI, Bhattacharjee S, Zhao Y, Lukiw WJ (2014). Pathogenic microbes, the microbiome and Alzheimer's Disease (AD). *Front Aging Neurosci* **6**: 127

Ittner LM, Götz J (2011). Amyloid- β and tau - a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* **12(2)**: 65-72.

Jiang C, Li G, Huang P, Liu Z, Zhao B (2017). The gut microbiota and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **58**: 1-15.

Juśkiewicz J, Wróblewska M, Jarosławska J, Baliński P, Matusevičius P, Zduńczyk P, Zduńczyk Z i sur. (2009). Effects of inulin supplemented to cellulose-free or cellulose-rich

diets on caecal environment and biochemical blood parameters in rats. *J Anim Feed Sci* **18(18)**: 709-722.

Kang DW, Park JG, Ilhan ZE, Wallstrom G, LaBaer J, Adams JB, Krajmalnik-Brown R (2013). Reduced incidence of *Prevotella* and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. *PloS one* **8(7)**: e68322

Kawahara M, Kato-Negishi M (2011). Link between aluminium and the pathogenesis of Alzheimer's disease: the integration of the aluminium and amyloid cascade hypothesis. *Int J Alzheimers Dis* doi:10.4061/2011/276393

Kumar A, Singh A (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol Rep* **67(2)**: 195-203.

Lei M, Hua X, Xiao M, Ding J, Han Q, Hu G (2008). Impairments of astrocytes are involved in the D-galactose-induced brain aging. *Biochem Biophys Res Commun* **369(4)**: 1082-1087.

Liu X, Cao S, Zhang X (2015). Modulation of gut microbiota-brain axis by probiotics, prebiotics, and diet. *J Agric Food Chem* **63(36)**: 7885-7895.

Lu J, Wu DM, Zheng YL, Hu B, Zhang ZF, Ye Q, Wang YJ i sur. (2010). Ursolic acid attenuates D-galactose-induced inflammatory response in mouse prefrontal cortex through inhibiting AGEs/RAGE/NF- κ B pathway activation. *Cereb Cortex* **20(11)**: 2540-2548.

Luo Y, Fengnan N, Sun Zongzheng, C Wangsen, Zhang X, Guan D, Lv Z, Zhang B, Xu Y (2009). Altered expression of A β metabolism-associated molecules from D-galactose/AlCl₃ induced mouse brain. *Mech Ageing Dev* **130**: 248-252.

Mayer E A, Tillisch K, Gupta A (2015). Gut/brain axis and the microbiota. *J Clin Invest* **125(3)**: 926-938.

Mroczyńska M, Galecka M, Szachta P, Kamoda D, Libudzisz Z, Roszak D (2013). Beta-glucuronidase and Beta-glucosidase activity in stool specimens of children with inflammatory bowel disease. *Pol J Microbiol* **62**: 319-325.

Sampson TR, Mazmanian SK (2015). Control of brain development, function, and behavior by the microbiome. *Cell Host Microbe* **17(5)**: 565-576.

Saulnier DM, Ringel Y, Heyman MB, Foster JA, Bercik P, Shulman RJ, Guarner F i sur. (2013) The intestinal microbiome, probiotics and prebiotics in neurogastroenterology. *Gut microbes* **4(1)**: 17-27.

Thies W, Bleiler L i sur. (2011). 2011 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* **7**: 208-244.

Uccello M, Malaguarnera G, Basile F, D'agata V, Malaguarnera M, Bertino G, Biondi, A i sur. (2012). Potential role of probiotics on colorectal cancer prevention. *BMC surg.* **12(1)**: S35.

Walton JR, Wang M-X (2009). APP expression, distribution and accumulation are altered by aluminum in a rodent model for Alzheimer's disease. *J Inorg Biochem* **103(11)**: 1548-1554.

Wang Y, Kasper LH (2014). The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain Behav Immun* **38**: 1-12 .

Wronkowska M, Juśkiewicz J, Zduńczyk Z, Soral-Śmietana M, Krupa-Kozak U (2011). Influence of chemically-modified potato starch (RS type 4) on the nutritional and physiological indices of rats. *Pol J Food Nutr Sci* **61(2)**: 143-151.

Xiao F, Li XG, Zhang XZ, Hou JD, Lin LF, Gao Q, Luo HM (2011). Combined administration of D-galactose and aluminium induces Alzheimerlike lesions in brain. *Neurosci bull* **27(3)**: 143-155.

Yang HD, Kim DH, Lee SB, Young LD (2016). History of Alzheimer's Disease. *Dement Neurocognitive Disord* **15(4)**:115-121.

Yu L, Zhai Q, Tian F, Liu X, Wang G, Zhao J, Zhang H, Narbad A, Chen W (2017). *Lactobacillus plantarum* CCFM639 can prevent aluminium-induced neural injuries and abnormal behaviour in mice. *J Funct Foods* **30**: 142-150.

7. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Adresa: Volavje 128, 10450 Jastrebarsko
Datum i mjesto rođenja: 23.3.1994., Zagreb
Broj mobitela: 0989812247
E-mail: majafabijanic@hotmail.com

STRUČNA SPREMA

Stručna sprema: sveučilišna prvostupnica molekularne biologije

OBRAZOVANJE

Trenutni studij: 2. godina diplomskog studija molekularne biologije
2012.-2015.: preddiplomski studij molekularne biologije, PMF Zagreb
2008.-2012.: V. gimnazija, Zagreb
2005.-2011.: Glazbena škola „Jastrebarsko“, violina

- nagrađena stipendijom Zagrebačke županije za izvrsnost 2013., 2014., 2015., 2016. godine

LABORATORIJSKE STRUČNE PRAKSE

ožujak 2017 – sada: suradnja na projektu Laboratorija za evolucijsku genetiku, grupa dr.rer.nat. Tomislava Domazet-Loše

srpanj 2015. – siječanj 2016.: laboratorijska stručna praksa u grupi prof. Maje Matulić na Zavodu za molekularnu biologiju PMF-a Zagreb

- rad u staničnoj kulturi, svjetlosna i fluorescentna mikroskopija, izolacija DNA i RNA, lančana reakcija polimerazom (PCR), kvantitativni PCR, gel elektroforeza, *Western blot* analiza

ožujak – lipanj 2015.: laboratorijska stručna praksa u grupi prof. Vlatke Zoldoš na Zavodu za molekularnu biologiju PMF-a Zagreb

- lančana reakcija polimerazom, gel elektroforeza, priprema uzoraka za pirosekvenciranje

JEZICI

Engleski jezik razina B2

RAČUNALNE VJEŠTINE

Microsoft Office

R studio

KONFERENCIJE

“DCW: Dissent, Conscience and the Wall” projekt by EucA and NEA – sudjelovala s prezentacijom na temu: “Science development on both sides of the Iron curtain” (2014.)

VOLONTERSKO ISKUSTVO

Noć biologije 2013., 2014. i 2016. u organizaciji biološkog odsjeka PMF-a u Zagrebu – sudionik (radionice, predavanja)

rujan - listopad 2015. i 2016.: volonterski projekt „72 sata bez kompromisa“, organizacijski tim

lipanj 2015. – siječanj 2017: koordinator sadržaja web stranica udruge SKAC Palma, web i social media marketing

prosinao 2015. : koordinator akcije „100 sretnih Božića“, promocija

kolovoz 2015.: volonterski kamp u prognaničkom naselju u Maloj Gorici, aktivnosti s djecom

studeni 2015.: volonter Jesuit Refugee Service, rad s izbjeglicama u izbjegličkom kampu u Slavanskom Brodu

INTERESI I AKTIVNOSTI

- društveni aktivizam, volonterski angažman za pomoć potrebitim ljudima, posebno djeci i mladima

- glazba, fotografija, psihologija, povijest