

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Kristina Hakenová

VLIV STŘEVNÍ MIKROBIOTY NA ROZVOJ
NEURODEGENERATIVNÍCH CHOROB

INFLUENCE OF INTESTINAL MICROBIOTA ON DEVELOPMENT OF
NEURODEGENERATIVE DISEASES

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Karel Valeš, Ph.D.

Praha 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla veškeré použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 8. 2021

.....
Kristina Hakenová

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu své diplomové práce RNDr. Karlu Valešovi, Ph.D. za cenné rady, odborný dohled a věnovaný čas. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Lence Kletečkové, Ph.D. za konzultace a revizi práce a Davidovi Kačerovi za odbornou pomoc. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu a trpělivost při psaní práce a při celém studiu.

Abstrakt

Během stárnutí dochází přirozeně k biologickým změnám, v jejichž důsledku dochází ke snížení funkční kapacity organismu, což je doprovázeno i zvýšeným rizikem zánětlivých procesů, které se podílejí na rozvoji neurodegenerativních onemocnění. Střevní mikrobiota a její interakce se střevem a centrálním nervovým systémem hraje klíčovou roli v udržení funkcí biologických homeostatických systémů ve vyšším věku. To otevírá možnost ovlivnění, popřípadě modifikace lidské mikrobioty pro terapeutické účely. Na základě analýzy vzorků stolice pomocí HPLC MS/MS studie potvrdila vliv vybraných probiotik na úpravu metabolických drah a správné fungování mikrobioty per se. Největší vliv byl zaznamenán na tyrozinový metabolismus, tryptofanový metabolismus, metabolismus kyseliny arachidonové a metabolismus biosyntézy žlučových kyselin. U vybraných probiotických bakterií byl nalezen pozitivní vliv na paměťové složky kognitivních funkcí. Signifikantní zlepšení bylo pozorováno u verbálního učení a verbální paměti, u jedinců s mírnou kognitivní poruchou došlo ke zpomalení progresu kognitivního deficitu. Signifikantní zlepšení bylo pozorováno i u exekutivních funkcí. Tyto nálezy nebyly následovány subjektivním pocitem zlepšení zdraví, paměti či zažívání.

Klíčová slova: mikrobiota, stárnutí, neurodegenerace, probiotika, kognitivní funkce, metabolomika

Abstract

Aging is associated with natural biological changes, which result in a decrease in the functional capacity of the body, which is also accompanied by an increased incidence of inflammatory processes that contribute to the development of neurodegeneration. The intestinal microbiota and its interaction with the intestine and the central nervous system play a key role in maintaining the function of biological homeostatic systems at an older age. This opens the possibility of influencing or modifying human microbiota for the development of therapeutic strategies. Based on the analysis of stool samples by HPLC MS / MS, the study confirmed the effect of selected probiotics on the modification of metabolic pathways and the proper functioning of the microbiota per se. The greatest effects were observed on tyrosine metabolism, tryptophan metabolism, arachidonic acid metabolism and bile acid biosynthesis metabolism. A positive effect of selected probiotic bacteria was found in the memory component of cognitive functions. Significant improvements were observed in verbal learning and verbal memory. In subjects with mild cognitive impairment, the progression of cognitive deficit has been slowed. Significant improvement was also observed for executive functions. These findings were not followed by a subjective feeling of improved health, memory, or digestion.

Keywords: microbiota, aging, neurodegeneration, probiotics, cognitive function, metabolomics

Seznam zkratek

ABACO	baterie hodnocení kognice
AD	Alzheimerova demence
AGEs	konečné produkty pokročilé glykace
ALBA	rychlý test paměti
ATM	protein kináza (ataxia telangiectasia mutated)
ATR	protein kináza (ataxia telangiectasia and Rad3-related)
BAI	Beckův inventář úzkosti
BDI-II	Beckova sebesuzovací škála depresivity pro dospělé
BDNF	mozkový neurotrofní faktor (brain-derived neurotrophic factor)
CRP	C-reaktivní protein
DDR	odpověď na poškození DNA
DNU	dotazník nežádoucích událostí
ESI	elektrosprejová ionizace
FAQ	subjektivní dotazník funkčního stavu
FNKV	Fakultní nemocnice Královské Vinohrady
GDS	škála ke zhodnocení nálady u starší populace
GIT	gastrointestinální trakt
HPA	osa hypotalamus-hypofýza – nadledviny (hypothalamic-pituitary-adrenal axis)
HPLC-MS/MS	vysokoučinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
hs-CRP	C-reaktivní protein s vysokou citlivostí
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
MDA	malondialdehyd
MDS-UPDRS	hodnotící škála pro Parkinsonovu nemoc
MeOH	methanol
MMSE	krátký test kognitivních funkcí
mtDNA	mitochondriální DNA

NK	přirození zabíječi (natural killer cells)
NUDZ	Národní ústav duševního zdraví
PD	Parkinsonova nemoc
pRB	retinoblastomový protein
PTFE	polytetrafluorethylen
RAVLT	Reyův auditorně-verbální test učení
ROS	reaktivní formy kyslíku
SAPS	fenotyp asociovaný se senescencí
SCFAs	mastné kyseliny s krátkým řetězcem (short-chain fatty acids)
SOD	superoxiddismutáza
TEGEST	test předvedení a následného vybavení gest
TKH	test kreslení hodin
TMT	test cesty
TNF	faktor nádorové nekrózy (tumor necrosis factor)
VAS	vizuální analogové škály

Obsah

1	Úvod	5
1	Stárnutí.....	7
1.1	Biochemické mechanismy stárnutí.....	8
1.1.1	Volné radikály, oxidační stres a mitochondriální dysfunkce.....	8
1.1.2	Hromadění mutací v DNA.....	9
1.1.3	Délka telomer a buněčná senescence	10
1.1.4	Udržování proteostázy.....	10
1.2	Psychické a sociální aspekty stárnutí	11
1.3	Změny kognitivních funkcí	11
1.4	Změny gastrointestinálního traktu.....	12
2	Role mikrobioty v senescenci	13
2.1	Buněčná senescence	13
2.2	Imunosenescence.....	15
2.3	Změny lidské mikrobioty ve stáří.....	15
2.4	Střevní mikrobiom a jeho role v imunosenescenci.....	16
2.5	Mikrobiota a její role v rozvoji neurodegeneračních chorob	18
2.6	Role zánětu ve vztahu k mikrobiotě	18
3	Možnosti ovlivnění stárnoucí mikrobioty.....	19
3.1	Dieta	20
3.2	Fyzická aktivita	21
3.3	Farmaka.....	21
4	Probiotické vlivy.....	22
4.1	Účinky jednotlivých bakteriálních druhů použitých ve studii.....	24
4.1.1	Lactobacillus plantarum	24
4.1.2	Pediococcus pentosaceus.....	24
4.1.3	Streptococcus thermophilus.....	25
4.1.4	Streptococcus salivarius	25
5	Cíle práce.....	26
6	Materiály a metody	27
6.1	Výzkumný soubor	27
6.2	Použitá probiotika/placebo	29
6.3	Kognitivní testy	30
6.4	Dotazníky psychických funkcí	32
6.5	Střevní metabolom	33
6.5.1	Materiály	33
6.5.2	Příprava vzorků a analýza vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní detekcí (HPLC-MS/MS).....	34
6.6	Metodické postupy	35
6.6.1	Statistické vyhodnocení.....	37

7	Výsledky	39
7.1	Kognitivní testy	39
7.2	Dotazníky psychických funkcí	49
7.3	Střevní metabolom	52
8	Diskuse	56
9	Závěr	63
10	Literatura.....	65

1 Úvod

Stárnutí populace je globálním tématem nabývajícím na důležitosti. Postihuje nejen oblast zdravotnictví, ale i oblast společenskou a ekonomickou. Stárnutí je vysoce komplexní děj, během kterého nastávají fyziologické změny na buněčné i celostní úrovni. Proces stárnutí je doprovázen snížením funkční kapacity organismu a vyšší náchylností k onemocněním. Bylo zformulováno mnoho teorií o podstatě stárnutí. Rozdělují se dvou směrů: teorie stochastické popisující stárnutí jako hromadění poškození, především vlivem vnějších jevů, a teorie programové vnímající stárnutí jako děj založený na genetických a vývojových faktorech (Harman 1994, Yin and Chen 2005, Kirkwood and Austad 2000).

Díky vědeckému pokroku bylo popsáno mnoho molekulárních drah a genetických mechanismů souvisejících se stárnutím. Velmi zkoumaným a diskutovaným tématem je fenomén senescence. Senescence neboli biologické stárnutí je postupné zhoršení funkčních charakteristik jedince. Projevuje se na buněčné úrovni, tedy buněčná senescence, i na úrovni celého organismu. Tato práce se zabývá především stárnutím a následnou remodelací imunitního systému, tedy imunosenescencí (Coppé et al. 2008, Serrano et al. 1997, Nikolich-Žugich 2018).

Proces stárnutí a rozvoj se stárnutím spjatých onemocnění je možné ovlivnit mnoha způsoby, jedním z nich je úprava střevní mikrobioty. Střevní mikrobiota je soubor mikroorganismů, který obsahuje zástupce bakterií, *Archea*, virů a *Protozoa* sídlících ve střevě. Zachování zdraví jak fyzického, tak duševního, závisí na funkci biologických homeostatických systémů, nervové, imunitní a endokrinní činnosti. Klíčovou roli v tomto procesu hraje interakce těchto systémů se střevní mikrobiotou. Střevní mikrobiom lze alterovat pomocí probiotik. Probiotika jsou živé organismy, které mají příznivý vliv na zdraví jedince při podání v adekvátním množství, přičemž pro probiotika ovlivňující CNS a psychiku se zavádí termín psychobiotika. Ta jsou rodinou probiotik s pozitivním přínosem pro duševní zdraví jedince (Belizário et al., 2015; Dinan et al., 2013).

Mikroorganismy obsažené v psychobiotikách komunikují s mozkem prostřednictvím oboustranného komunikačního kanálu nazývaného osa mikrobiota-střevo-mozek. Komunikace je zajištěna nervovými, imunitními, endokrinními a metabolickými drahami. Osa mikrobiota-střevo-mozek hraje podle recentních studií významnou roli v rozvoji neurodegenerativních chorob. Změny střevní mikrobioty vyskytující se v pokročilém věku souvisí s alterací střevní sliznice a vyšší permeabilitou střeva. Dochází k poklesu diverzity, která je hlavním adaptačním

mechanismem při výkyvech složení způsobených např. změnou diety nebo léčbou. Dysbióza přispívá k systémovému zánětu a zvyšuje pravděpodobnost jeho vzniku u seniorů (Pilonis, Raboch, and Kream 2018, Cattaneo et al. 2017).

Nové poznatky poukazují na klíčální roli střevní mikrobioty, jakožto faktoru zajišťující zdravé stárnutí. Představují tak vhodný cíl preventivních nebo terapeutických zásahů.

1 Stárnutí

Stárnutí je velkým celospolečenským problémem ovlivňujícím nejen medicínské, ale i sociální a ekonomické odvětví. Jedná se progresivní, ireverzibilní ztrátu vitality způsobenou akumulací změn v buňkách a tkáních doprovázenou vyšší náchylností k různým chorobám. Samo o sobě ale není definováno jako choroba. Stárnutí je přirozený proces, při kterém hrají roli vývojové a genetické vady, vlivy prostředí a choroby. Míra akumulace těchto změn se napříč jednotlivci liší a tím vznikají rozdíly v rozvoji se stárnutím souvisejících chorob a věku úmrtí (Harman, 1994). Existuje mnoho teorií popisujících příčiny stárnutí. Pomyslně je můžeme rozdělit do dvou kategorií. Stochastické teorie, které kladou velký důraz na hromadění poškození, vzestup entropie, například vlivem volných radikálů. Dále programové teorie, které nahlízejí na stárnutí jako na aktivní děj řízený geny (Harman, 1994, 2001; Kirkwood and Austad, 2000; Yin and Chen, 2005). Pravděpodobně je ale stárnutí děj multifaktoriální ovlivněný oběma zmíněnými přístupy.



Obrázek č.1. Charakteristické znaky stárnutí. Převzato a upraveno z (López-Otín et al., 2013). Mezi společné znaky stárnutí patří buněčná senescence, tedy fyziologický proces, při kterém dochází k trvalé zástavě proliferace, blíže popsané v kapitole č.2. Zkracování telomer, mitochondriální dysfunkce, zhroucení proteostázy, nestabilita genomu související s klesající účinností opravných mechanismů, epigenetické změny, deregulace příjmu potravy a změny v rychlosti metabolismu. Dále také vyčerpání kmenových buněk, které v konečném důsledku vede i ke snížené funkčnosti imunitního systému, či změny v mezibuněčné komunikaci, například změnou hladiny určitých hormonů.

1.1 Biochemické mechanismy stárnutí

1.1.1 Volné radikály, oxidační stres a mitochondriální dysfunkce

Teorie stárnutí na základě působení volných radikálů byla navržena roku 1954. Předpokládá, že volné radikály mají významný vliv na endogenní metabolické reakce. Reakce volných radikálů pohánějí proces stárnutí a jsou zodpovědné za postupné zhoršování schopnosti biologického systému opravovat náhodné změny. V roce 1972 byla teorie rozšířena o předpoklad, že většina reakcí produkujících volné radikály probíhá v mitochondriích s rostoucí tendencí jejich produkce ve vyšším věku (Harman, 1992).

Volný radikál je vysoce reaktivní částice, která má ve valenční sféře nepárový elektron. Tyto částice se přirozeně vyskytují v lidském těle a účastní se mnoha signálních drah fyziologických, ale i patologických stavů. Mají kritickou roli v buněčné odpovědi na mitogenní růstové faktory a ve stresových reakcích, jako je tepelný šok nebo infekce (Finkel and Holbrook, 2000). Jejich hlavním producentem je elektrontransportní řetězec v mitochondriích, vznikají zde jako vedlejší produkty metabolismu. Nejčastěji se jedná o kyslíkové radikály a radikály od něj odvozené, jako například radikály hydroxylové. Nejvíce jsou působením radikálů poškozeny právě samotné mitochondrie. Pokud dochází v organismu k jejich nadměrné produkci nebo nedostatečnému odbourávání, jinými slovy snižuje-li se adaptivní homeostáza, dochází k dysfunkci enzymů, buněčných organel a membrán, oxidaci a následné destrukci mnohých makromolekul cytoplazmy. Mezi další biomolekuly, které bývají poškozeny, patří lipidy. Peroxidace polynenasycených mastných kyselin v membránách vede k jejich narušení. Peroxidy lipidů se často shlukují s dalšími biomolekulami a tvoří lipofuscin, pigment, který se ve zvýšené míře vyskytuje především u starších osob v buňkách s malou mitotickou aktivitou. V neposlední řadě dochází k poškození nukleových kyselin. Oxidační poškození může vést ke zlomům v řetězci DNA, tvorbě tzv. cross-links, hydroxylaci bází nebo poškození esterové vazby, což následně vede k mutacím nebo dokonce karcinogennímu bujení. U proteinů dochází k oxidaci thiolů, karbonylaci NH₂ funkčních skupin, hydroxylaci nebo nitrosylaci aromatických aminokyselin. Oxidační poškození proteinů je komorbiditou chorob jako Alzheimerova demence nebo Parkinsonova choroba (Harman, 2001; De Zwart et al., 1999). Antioxidační enzymy např. superoxidodismutázy (SOD), glutathion-S-transferázy, glutathionperoxidázy a další eliminují škodlivé účinky volných radikálů. Další obranou jsou endogenní antioxidanty jako bilirubin, glutathion nebo askorbát, u posledních dvou zmíněných dochází ve staří ke značnému úbytku (Halliwell, 2006). Stejně tak aktivita SOD s vyšším věkem klesá. Tyto látky jsou schopné přednostně reagovat s volnými radikály a zabránit tak potenciálně škodlivým reakcím.

Může tedy dojít k vychýlení z rovnováhy mezi tvorbou a odbouráváním reaktivních forem kyslíku (ROS) a vyššímu oxidačnímu poškození včetně degenerativních změn tkání (De Zwart et al., 1999). Bylo provedeno několik experimentů, které potvrzují vyšší dožití za pomoci antioxidačních enzymů či antioxidantů (Kryscio et al., 2017; Yang and Hekimi, 2010). Existují ale i výzkumy, které radikálovou teorii a významnou roli antioxidačních systémů při procesu stárnutí nepodporují (Huang et al., 2000; Pérez et al., 2009).

Mitochondrie jsou strukturou velmi náchylnou na poškození ve vyšším věku. Je prokázáno, že s věkem dochází k jejich úbytku, klesá funkční kapacita aerobního metabolismu a častěji se vyskytují chyby při replikaci mitochondriální DNA (mtDNA) (Bratich and Larsson, 2013). Díky experimentům na myších s geneticky upravenou mtDNA polymerázou, která cíleně častěji chybovala, bylo zjištěno, že zvýšená chybovost koreluje s rychlejším stárnutím (Finkel and Holbrook, 2000).

1.1.2 Hromadění mutací v DNA

Hromadění mutací v DNA a funkčnost reparačního systému tvoří další z teorií procesu stárnutí, poprvé byla formulována Peterem Medawarem roku 1952 (Medawar, 1952). Výskyt a frekvence mutací je ovlivněna vnějšími zásahy, ale i endogenním poškozením DNA, jako jsou reaktivní karbonyly, spontánní hydrolýza purinových bazí, methylační činidla nebo reaktivní formy kyslíku (ROS). Ve stáří dochází k jejich zvýšené kumulaci (Harman, 2001).

Vliv správného fungování reparačních enzymů na stárnutí dokazují vrozené syndromy předčasného stárnutí, progerie. Weinerův syndrom, progerie dospělých, je způsobem mutací v genu WRN, který ovlivňuje produkty genů zapojených do reparačních procesů (Chen et al., 2003).

Pravděpodobnost vzniku nádorů, která může být zapříčiněna nahromaděním mutací v jaderné DNA, roste s věkem exponenciálně. Poškození DNA má vliv i na regulaci genové exprese včetně exprese genů pro enzymy opravující DNA (Ou and Schumacher, 2018).

Vzácně dochází k dvouřetězcovým zlomům, ty v těle aktivují odpověď na poškození DNA (DDR), při které může výjimečně dojít k eliminaci kmenových buněk. S věkem se hromadí chyby i v epigenetických informacích, je narušena indukce exprese genů a snížena reakce těla na stresové podněty (Ou and Schumacher, 2018).

1.1.3 Délka telomer a buněčná senescence

Telomery jsou koncové oblasti chromozomů, které jsou u člověka tvořeny repetitivními hexanukleotidovými specifickými sekvencemi 5'-TTAGGG-3'. Telomery jsou asociovány s proteiny, které je chrání před působením degradačních a reparačních enzymů. Tyto struktury jsou zcela nezbytné při replikaci, buněčném dělení a rekombinaci. Při buněčném dělení dochází ke zkracování telomer z důvodu neschopnosti DNA-polymerázy připojovat nukleotidy k 5' konci molekuly DNA. Při každém buněčném dělení tak dochází ke ztrátě 50-200 párů bází, až po dosažení minimální délky. Následně dojde k jejich zániku či dysfunkci a v buňce je aktivována dráha p53, která může mimo jiné vést k apoptóze či replikativní senescenci (blíže popsána ve druhé kapitole), tento proces je často podmíněn stárnutím. Kompenzační mechanismus zkracování telomer zajišťuje telomeráza, která je schopna prodlužovat telomerickou DNA před replikací a která je aktivní především v buňkách s vysokou proliferační aktivitou. Omezení buněčné proliferace se nazývá Hayflickův limit. Podle Hayflickových experimentů se několik typů buněk může dělit 40-60x, než dojde k jejich zániku (Hayflick, 1965; Hayflick and Moorhead, 1961). Díky experimentu na buněčné kultuře fibroblastů byl objasněn vztah mezi buněčným stárnutím a celkovým stárnutím organismu. Fibroblasty byly v časovém rozmezí několikrát odebrány mladším dárčům ve věku 17-64, starším ve věku 73-99 a 12-20 týdnů starým embryím. Studie nenalezla významnou korelaci mezi proliferačním potenciálem buněčných linií a věkem dárce. Srovnání buněčných linií od stejných dárců v různých časových intervalech taktéž neodhalilo žádné významné trendy mezi proliferačním potenciálem a přibývajícím věkem. Replikativní životnost fibroblastů v kultuře tedy nesouvisí s věkem dárce. Rozdíl v proliferační aktivitě byl zaznamenán pouze mezi fetálními a postnatálními buňkami (Cristofalo et al., 1998). Sníženou buněčnou proliferaci ale vykazují buňky jedinců postižených syndromy předčasného stárnutí. Studie naznačila, že existuje synergický vztah mezi dysfunkcí telomer a produkcí progerinu, který je produkován u lidí trpících syndromem předčasného stárnutí. V nízkých hladinách je ale detekován i v buňkách a tkáních zdravých jedinců (Cao et al., 2011).

1.1.4 Udržování proteostázy

S přibývajícím věkem dochází k částečnému selhání udržování proteostázy a k nerovnováze syntézy a degradace proteinů. To vede k akumulaci poškozených, neaktivních a agregovaných proteinů uvnitř buňky, což může vést ke smrti buněk (Santra et al., 2019). Zhroucení proteostázy může mít více důvodů, jedním z nich je hromadění volných radikálů v důsledku poškození mitochondrií. Dalším z důvodů může být neschopnost chaperonů

pomáhat ve sbalení nových proteinů, protože jsou vytiženy v důsledku hromadění mnoha nefunkčních proteinů. Poškozeny mohou být i samotné chaperony. K jejich poškození dochází například procesem glykace, která hraje roli i v progerii či diabetu mellitu. Patologická reakce proteinů s glukózou vede ke tvorbě konečných produktů pokročilé glykace (AGEs), které se mimo jiné vyskytují při Alzheimerově demenci (AD). AGEs také podporují zánětlivé reakce vazbou na povrchové receptory makrofágů a následné produkci cytokinů. Tím umocňují chronický zánět a podporuje zánětlivou teorii stárnutí (Ulrich and Cerami, 2001). Snížená je i funkčnost autofágie, jejíž spojitost se stárnutím byla prokázána pomocí genetické inhibice autofágie. Ta indukovala degenerativní změny savčích buněk totožné se změnami, ke kterým dochází s vyšším věkem. V lyzozomech dochází k hromadění reziduálního materiálu, například lipofuscinu, což snižuje jejich účinnost. Pozitivní účinek na funkčnost autofágie u modelových organismů prokazuje kalorická restrikce, aktivace sirtuinu 1, inhibice růstového faktoru insulinu, farmakologická stimulace, či genetické manipulace (Kowald and Kirkwood, 1996; Rubinsztein et al., 2011).

1.2 Psychické a sociální aspekty stárnutí

Mimo biochemické změny doprovází proces stárnutí změny psychické a sociální. Mezi hlavní změny patří zjednodušování struktury osobnosti. K velkým změnám dochází v oblasti kognitivních funkcí, jsou ovlivněny procesy poznávací a nastávají změny ve zrakové a sluchové percepci. Lidé bývají s přibývajícím věkem méně přizpůsobiví a může dojít k projevu složek osobnosti, které jedinec záměrně potlačoval. Dochází ke zvýšené emoční labilitě, která často pramení z pocitu osamění. Nezřídka dochází k upínání se na minulost, snížení potřeby navázání nových vztahů a celkový odklon od vnějšího světa (Pedersen, 1993). Klesá kognitivní plasticita, nejvíce postiženo bývá vnímání, pozornost, paměť, představy a myšlení. Se stářím se pojí i zvýšená úzkostnost a deprese. Tyto stavy bývají často způsobeny neschopností přijmout a smířit se s procesem stárnutí či pocitu osamělosti. K psychické pohodě nepřispívá ani změna sociálního statutu, tedy odchod do důchodu. Je náročnější najít si každodenní aktivity a mohou se objevovat pocity neprospěšnosti až zbytečnosti.

1.3 Změny kognitivních funkcí

I zdravé stárnutí je asociováno s narušením paměti. Pokles paměti související s věkem postihuje především deklarativní složky paměti, ale nikoli nedeklarativní složky dlouhodobé paměti, jako jsou například automatické mentální procesy, které jsou základem mnoha

motorických a kognitivních funkcí jako čtení, nebo informace spojené s emočním podmiňováním (Brickman and Stern, 2009). Deklarativní paměť je dělena na sémantickou a epizodickou, patrnější změny lze pozorovat u paměti epizodické (Rönnlund et al., 2005). Epizodická paměť je složkou paměti uchovávající informace o proběhlých událostech, v experimentálních podmínkách se testuje například pomocí předvedení a následného vybavení gest (TEGEST) (Bartoš, 2018). Mnoho longitudinálních studií naznačuje, že průměrný nástup poklesu epizodické paměti je 60 let (Rönnlund et al., 2005). Starší lidé mívají tendenci zapomínat na kontext každodenních zkušeností, to se projevuje například vyprávěním stejného příběhu několikrát té samé osobě. Sémantická paměť bývá postižena výrazně později, v pokročilém věku rostou potíže s vybavením jednotlivých slov. Bylo navrženo několik teorií vysvětlujících úbytek paměti ve vyšším věku, jednou z nich je zpomalení percepční rychlosti (Salthouse, 1996). Některé teorie opisují změny ve smyslovém vnímání (Baltes and Lindenberger, 1997) či pokles účinnosti inhibičních procesů, které jsou klíčové pro efektivní fungování paměti a pozornosti (Hasher and Zacks, 1988). Další teorie připisuje význam snížené kapacity pracovní paměti a pozornosti (Light et al., 2000).

1.4 Změny gastrointestinálního traktu

Stárání je doprovázeno změnami gastrointestinálního traktu (GIT) na mnoha úrovních. Dochází ke změnám v dutině ústní, žaludku, střevě. Snížená je i imunitní obrana, zvýšený naopak výskyt zánětu, tyto a další faktory vedou k častějšímu výskytu onemocnění GITu. Změnami prochází i enterický nervový systém. Dochází ke snížení počtu neuronů myenterického plexu, který spolu se submukózním plexem tvoří výše zmiňovaný enterický nervový systém, jehož funkcí je ovládání gastrointestinálních pohybů včetně uvolňování svěračů (Soenen et al., 2016).

Změny týkající se dutiny ústní vedou zejména k úpravě diety. U seniorů se vyskytují problémy s kousáním, mimo jiné v důsledku ztráty zubů vlivem senilní osteoporózy a snížené péče o chrup. Tyto změny mohou být kompenzovány zubní náhradou. S nižší schopností kousání se váže vyhýbání se tužším potravinám a nedostatku přijímání především bílkovinné složky potravy. Určitou část stárnoucí populace postihuje xerostomie, tedy sucho v ústech, vlivem dehydratace, přidružené infekce nebo jiné léčby, např. ozáření, dysfunkce slinných žláz, užívání farmak způsobujících xerostomii (Soenen et al., 2016). Vše uvedené může v důsledku vést ke snížení vnímání chuti. Mimo nedostatku vlákniny byl ve vzorcích seniorů s nedostatečnou produkcí slin zaznamenán nedostatek železa, vápníku, zinku, draslíku a vitamínu B6. Výsledky naznačují možnou souvislost xerostomie s geriatrickou podvýživou

(Rhodus and Brown, 1990). Poruchy polykání mohou být způsobeny přidruženými chorobami, jako je AD, Parkinsonova choroba (PD), cévní mozkové příhody, roztroušená skleróza, svalové dystrofie a další (Soenen et al., 2016).

Žaludeční činnost je postižena sníženou produkcí žaludečních kyselin. Ty tvoří důležitou součást neimunologické ochrany proti patogenům, s jejich poklesem se zvyšuje riziko gastritid. Zpomalení gastrického vyprazdňování způsobuje déle trvající pocit sytosti a snížený příjem potravy (O'Connor and O'Moráin, 2014; Soenen et al., 2015).

Ve střevě dochází ke snížení absorpční schopnosti, která je způsobena atrofií sliznice a klků. V kombinaci se změnou v mikrobiálním složení může dojít k deficitu mikronutrientů, jmenovitě železa, vitamínu K, vitamínu B6, folátu a vápníku, což může vést k prohloubení osteoporózy. Klesá i hladina vitamínu D. Snížená citlivost receptorů rekta, snížená motilita a redukce neuronů myenterického plexu vedou k častějšímu výskytu zácpy (Soenen et al., 2016).

Změny v GIT, spolu se sníženým vnímáním chuti a vůně potravin, zvýšeným příjmem léčiv, neurologickými postiženími, depresí, osamělostí, sníženou schopností samostatného nakupování a vaření, zhoršenou úrovní hygieny, vedou k rozvoji proteinové a energetické malnutrice a dehydratace, v některých případech i hypovitaminózy (Soenen et al., 2016; Young and Greenwood, 2001).

2 Role mikrobioty v senescenci

Senescence je definována jako postupné zhoršování funkčních charakteristik živých organismů, případně zvýšení úmrtnosti a snížení plodnosti s věkem. Senescence je fyziologický proces projevující se na dvou úrovních. Na buněčné úrovni, tedy buněčná senescence, a na úrovni celého organismu včetně imunitního systému, tedy imunosenescence (López-Otín et al., 2013).

2.1 Buněčná senescence

Buněčná senescence je definována jako stabilní zástava proliferace pomocí zastavení buněčného cyklu (Lacey and Mistrík, 2020). Tento fyziologický stav bývá způsoben zpravidla stresovým podnětem, kritickým zkrácením telomer, působením reaktivních forem kyslíku (ROS) nebo zánětem. Na rozdíl od buňky v klidovém stavu, proliferace senescentní buňky je zastavena ireverzibilně a projevují se u ní morfologické změny a reorganizace DNA (Serrano et al., 1997). Díky těmto změnám a celkovým změnám chromatinu a exprese genů má buňka

specifický fenotyp, sekreční fenotyp asociovaný se senescencí (SAPS), tím se liší od ostatních neproliferujících buněk (Coppé et al., 2008).

Senescence může být aktivována více drahami, nejlépe popsané jsou dráha proteinů p53-p21 a dráha proteinů p16^{INK4a}-pRB. Většina z těchto faktorů jsou tumorsupresory, senescence tedy s velkou pravděpodobností hraje roli v ochraně proti nádorům (Baker and Petersen, 2018; Brooks and Gu, 2011). Stav způsobující zástavu buněčného cyklu zkrácením telomer na kritickou délku se nazývá replikativní senescence (Harley et al., 1990). Různé stresové faktory mohou vést k senescenci ještě před vyčerpáním Hayflickova limitu. Jedním z těchto faktorů je kritické poškození DNA (Nakamura et al., 2008), dalším je například působení abnormálních mitogenních signálů nebo onkogeny indukovaná senescence (Blagosklonny, 2003). Tato kategorie je nazývána stresem indukovaná předčasná senescence (de Magalhães and Passos, 2018).

Na zkrácení telomer tělo reaguje jako na poškození DNA a dochází k aktivaci DDR. Pomocí signálních kaskád, zahrnujících kinázy ATM a ATR, je inaktivována fosfatáza Cdc25A a vzniká nadbytek fosforylované, tedy inaktivní Cdk2. V tomto stavu nedochází k fosforylaci proteinu Cdc45, jehož funkcí je iniciace replikace (Molinari et al., 2000). Udržení buněk v neaktivní fázi cyklu regulují proteiny p53, tedy transkripční faktory, které aktivují produkci p21, ty zabraňují fosforylaci retinoblastomovému proteinu (pRB) jakožto kruciálního regulátoru buněčného cyklu (Bartek and Lukas, 2001; Lin et al., 2001). Druhá z výše zmíněných cest, tedy přes protein p16^{INK4a}, také způsobuje zástavu buněčného cyklu pomocí fosforylace pRB (Beausejour, 2003). Zástava buněčného cyklu může vést buď k opravě poškození a návratu do cyklu, k apoptóze, nebo právě k senescenci (Acosta et al., 2008).

Buněčná senescence je antiproliferačním mechanismem zabraňující proliferaci poškozených buněk. Samotné senescentní buňky mají vliv i na své okolí (Coppé et al., 2008; Krtolica et al., 2001). Produkují faktory jako například prozánětlivé cytokiny a chemokiny, což vede k prozánětlivé imunitní reakci (Coppé et al., 2008). Senescentní buňky mohou být pomocí této imunitní reakce odstraněny, což je princip suprese a regrese nádorů nebo regenerace pomocí buněčné senescence (Braig et al., 2005; Chen et al., 2005).

Hromadění senescentních buněk naopak ve většině případů vede ke stárnutí a vzniku nádorového bujení (Parrinello et al., 2005). Ve stáří přirozeně přibývá senescentních buněk, pravděpodobně z důvodů vyššího výskytu poškození DNA a nižší funkčnosti imunitního systému, tedy imunosenescence (McHugh and Gil, 2018; Nikolich-Zugich, 2018).

2.2 Imunosenescence

Buněčná senescence má spolu s dalšími faktory dopad na celkovou remodelaci imunitního systému, imunosenescenci. To má dopad na vyšší náchylnost k infekčním a nádorovým onemocněním, sníženou odpověď na vakcinaci a rozvoj chronických onemocnění (Nikolich-Žugich, 2018). Imunosenescence se týká jak vrozené, tak adaptivní složky imunitního systému. Dochází ke stárnutí T-lymfocytů a ostatních složek účastnících se krvetvorby z důvodů stárnutí primárním lymfoidních orgánů. Snížená tvorba naivních T buněk a jejich dysfunkce způsobená involucí thymu vede ke snížené proliferaci a snížené hladině interleukinu 2 (IL-2). Dalším následkem je nižší centrální tolerance. Rovnováha mezi Th17 a Treg je posunuta ve prospěch Th17 a prozánětlivému nastavení organismu. Naopak počet efektorových a paměťových T lymfocytů se zvyšuje (Thomas et al., 2020). B-lymfocyty mohou produkovat dysfunkční protilátky a snížená interakce mezi T a B lymfocyty může vést k nižší protilátkové odpovědi na antigenní podnět. Klesá počet jejich prekurzorů v důsledku změn kostní dřeně. Zvýšená produkce IgM vede k posunu tvorby protilátek k antigenům tělu vlastním. Další změny spojené se stárnutím byly zaznamenány u antigen prezentujících buněk. Snižuje se počet makrofágů i jejich funkčnost včetně exprese toll-like receptorů a schopnosti prezentovat antigen. Rovnováha je posunuta ve prospěch M2 makrofágů. Dendritické buňky mají sníženou schopnost migrace, fagocytózy a produkují vyšší počet prozánětlivých cytokinů. Ubývá nevyzrálých NK buněk oproti vyzrálým. Neutrofilly mají sníženou schopnost chemotaxe a fagocytózy (Nikolich-Žugich, 2018) (Bischof et al., 2019). Epigenetické změny byly zaznamenány i u hematopoetické linie buněk (Agarwal and Busse, 2010).

2.3 Změny lidské mikrobioty ve stáří

Lidský mikrobiální profil je po přibližně třetím roce života velmi stabilní (vyloučíme-li vnější zásahy jako léčbu farmaky, především antibiotiky, výraznou změnu jídelníčku, nebo horečku). Až dvě třetiny všech mikroorganismů ve střevě jsou stabilní od osídlení po celý život jedince. Ve stáří dochází ke snížení rychlosti průchodu potravy zažívacím traktem, omezené schopnosti žvýkat a následné změně diety a zvýšenému příjmu farmak. Kombinací vnějších faktorů a fyziologických změn dochází i ke změnám ve střevním mikrobiotickém profilu (Faith et al., 2013; Odamaki et al., 2016).

V roce 2007 byl spuštěn projekt ELDERMERT, který zkoumal vztah mezi mikrobiotou a zdravotním stavem lidí nad 65 let. Jedním z nejpodstatnějších nálezů této studie bylo, že složení střevní mikrobioty je ve starší populaci vysoce diverzifikované. Mikrobiota odpovídá

především prostředí, ve kterém se senioři nachází. Výrazně se lišilo její složení u seniorů žijících na ambulantních klinikách, v domovech seniorů či ve svých domácnostech. V domovech seniorů a na klinikách přijímali senioři méně vlákniny a jejich mikrobiální složení bylo méně rozmanité. Podle výzkumu senioři žijící ve svých domovech v určitých komunitách měli stravu na vlákniny bohatší, více mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA) a nižší hodnoty zánětlivých markerů. Další vysvětlení markantního rozdílu je, že v domovech seniorů nebo na klinikách jsou senioři často v celkově horším zdravotním stavu, mnohdy doprovázeném přidruženými chorobami. Byla provedena série pokusů zabývajících se vlivem upravené diety v domovech seniorů. Po přijetí nového klienta došlo k velké změně složení a po ročním pobytu se jeho složení střevní mikrobioty velmi podobalo ostatním klientům. Pokus tedy potvrzuje, že ke změnám mikrobioty dochází především díky změně diety (Claesson et al., 2012).

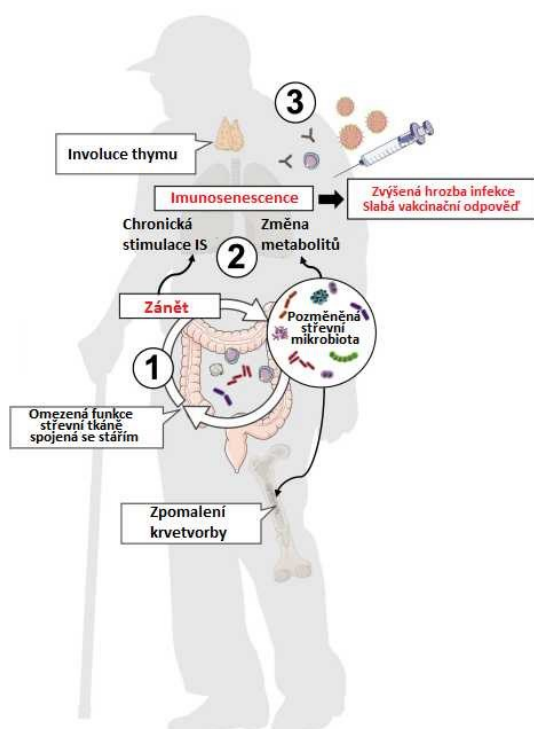
Obdobné studie provedené na dobrovolnících z různých zemí potvrzují výrazné rozdíly složení mikrobioty s přibývajícím věkem. Byly nalezeny značné geografické rozdíly dané rozdílným složením diety (Mueller et al., 2006).

2.4 Střevní mikrobiom a jeho role v imunosenescenci

Lidský mikrobiom se podílí na vývoji jedince a má vliv na funkci a regulaci imunitního systému po celý život. Imunitní systém s mikrobiomem úzce interaguje. Stárnutí mikrobiomu, stejně tak jako stárnutí imunitního systému, koreluje s vyšší náchylností k infekčním onemocněním a sníženou odpovědí na patogeny. Nové studie ukazují, že dysbióza střevního mikrobiomu úzce souvisí s celkovým zdravím, systémovým zánětem a imunosenescencí. Výrazný pokles rozmanitosti střevního mikrobiomu značně ovlivňuje funkčnosti imunitního systému. Udržováním funkčnosti a rozmanitosti střevního mikrobiomu a regenerace střevní tkáně by mohlo dojít ke snížení mikrobiální extravazace a snížení zánětu (Belkaid and Hand, 2014; Hooper and Macpherson, 2010; Nikolich-Žugich, 2018).

Stárnutím způsobená dysbióza je charakteristická sníženým výskytem *Clostridiales* a *Bifidobakterií* a naopak zvýšeným výskytem *Proteobakterií* a patobiontů jako *Enterobacteriaceae* (Jeffery, Lynch, and O'Toole 2016, Xu, Zhu, and Qiu 2019). Na animálních modelech byl prokázán vliv střevního mikrobiomu na stárnutí, celkové zdraví a délku života. Na modelovém organismu *Drosophila melanogaster* bylo prokázáno, že dysbióza střevní mikrobioty je úzce spojena s dysfunkcí střevní bariéry. Změny mikrobioty se dokonce objevují dříve a mohou předpovídat přicházející zhoršení funkce střevní bariéry. Dysfunkce střevní bariéry vedla u *Drosophily melagaster* k nadměrné aktivaci imunitního

systému a následné smrti organismu. Výsledky naznačují možnost předpovídat rychlost poklesu zdraví díky změnám v mikrobiálním profilu (Clark et al., 2015). V jiném experimentu Li a kol. prokázali, že inhibice JAK/Stat signalizace u *Drosophila melanogaster* zabraňuje metaplazii související s věkem, mikrobiální dysbioze a prodlužuje životnost organismu. Výsledky naznačují možnou cestu, jak souvisí chronický zánět ve stáří se změnami střeva a střevní mikrobioty (Li et al., 2016). Další důkazy dopadu střevní mikrobioty na modifikaci procesů stárnutí byly prokázány u modelového organismu *Nothobranchius furzeri*. Kolonizace střeva jedince vyššího věku mikrobiomem mladých dárců vedla k prospěšné systémové změně a prodloužení délky života (Smith et al., 2017). Obdobné výsledky přinesla i studie na myších. Transplantace fekální mikrobioty zdravých myší zlepšila zdraví a dožití u myšího modelu progerie (Bárcena et al., 2019). Při kolonizaci bezmikrobních myší mikrobiomem starší myši došlo k rozvoji zánětu ve střevě a úniku mikrobiálních metabolitů do oběhu, což vedlo k systémovému zánětu a zvýšené aktivaci imunitního systému, zejména T lymfocytů. Studie naznačuje, že střevní mikrobiota starých myší přispívá po přenosu na mladé bezmikrobní myši k celkovému zvýšení zánětu (Fransen et al., 2017). Alterace mikrobioty a fekální transplantace přináší velkou naději v léčbě mnoha chorob. Pro zajištění zdravého stárnutí a vyššího dožití je však nutné lépe charakterizovat zdravý mikrobiom, aby byla léčba bezpečná a účinná.



Obr.č.2. Vliv stárnutí mikrobiomu na imunosenescenci. Převzato a upraveno z (Bosco and Noti, 2021). Na obrázku je graficky znázorněn hypotetický model vlivu střevní mikrobioty na imunosenescenci. Změny na úrovni střevní tkáně podněcují zánětlivou reakci, která zpětně vede k dalším změnám střevní mikrobioty a vytváří pomyslný kruh vzájemných interakcí. Chronická

stimulace imunitního systému vede ke zvýšenému riziku rozvoje zánětlivých procesů, tento stav bývá označován jako nízký stupeň zánětu. Spolu s pozmeněným složením mikrobioty souvisí i změna jejich produktů, tedy střevního metabolomu. Tyto podněty přispívají k imunosenescenci. Ta spolu se sníženou imunitní repopulací z důvodu involuce thymu vede ke zvýšenému riziku infekce (Bosco and Noti, 2021).

2.5 Mikrobiota a její role v rozvoji neurodegenerativních chorob

Mezi střevy a mozkem probíhá bohatá oboustranná komunikace pomocí osy střevní mikrobiota-mozek. Jednou z chorob, ve které pravděpodobně hraje roli i střevní dysbióza, je Alzheimerova choroba (AD). Zvýšená propustnost střevní bariéry způsobuje únik metabolitů včetně lipopolysacharidů a amyloidů do krevního řečiště. Některé z metabolitů modulují signální dráhy a spouštějí produkci prozánětlivých cytokinů, čímž mohou přispět k patogenezi AD. U pacientů s AD bylo identifikováno specifické složení mikrobiálního profilu se zvýšenou hladinou prozánětlivých druhů jako jsou *Bacteroidetes* a *Tenericutes* a naopak sníženou hladinou protizánětlivých druhů *Firmicutes*, *Bifidobacterium*, *Verrucomicrobia* a *Akkermansia* (Jiang et al. 2017, Harach et al. 2017, Dinan and Cryan 2017). Spojení se střevní dysbiózou prostřednictvím produkce chybně sbaleného α -synukleinu bylo nalezeno i u Parkinsonovy choroby. Tuto hypotézu podporuje i fakt, že gastrointestinální potíže, zejména zácpa, často předchází rozvoji motorických dysfunkcí u Parkinsonovy choroby. Mikrobiální profil je opět posunut směrem k prozánětlivému stavu (Scheperjans et al., 2015). Rovněž deprese je doprovázena změnou mikrobiálního profilu s výrazným úbytkem laktobacilů (Dinan and Cryan, 2017).

2.6 Role zánětu ve vztahu k mikrobiotě

S vyšším věkem dochází k narušení rovnováhy mezi pro- a protizánětlivým stavem organismu. To vede z takzvanému chronicky prozánětlivému stavu, takzvaný inflammaging. Prozánětlivý stav může být způsoben vyšším výskytem infekcí, menší fyzickou aktivitou, změnou stravy, psychickou nepohodou, nedostatkem kvalitního spánku, a právě střevní dysbiózou. U starších osob je často zvýšená hladina prozánětlivých faktorů interleukinu 6 (IL-6), faktoru nádorové nekrózy α (TNF α) a C-reaktivního proteinu (CRP) (Chambers and Akbar, 2020). Chronický prozánětlivý stav podporuje vznik metabolického syndromu, kardiovaskulárních onemocnění a neurodegenerativních onemocnění (Goldberg and Dixit, 2015).

Podle dostupných studií souvisí rozmanitější složení střevní mikrobioty s lepším zdravotním stavem a také s nižší zánětlivostí a menším zhoršením kognitivních funkcí

(Franceschi et al., 2006). Prozáňtlivé prostředí, tedy projev imunosenescence, může spustit postupný rozpad mikrobioty. Stárnuocí mikrobiota obsahuje větší počet patobiontů, pokud dojde k zánětu střeva, mohou se tyto organismy rozšířit a dále podporovat prozáňtlivý stav. U laboratorních myší krměných dietou bohatou na nasycené živočišné tuky byl tento nárůst patobiontů experimentálně prokázán (Devkota et al., 2012). Pozitivní vliv stravy bohaté na vlákniny a s nízkým obsahem tuku ukazuje studie Cuervo a kol. Zvýšený příjem vlákniny u seniorů vedl k vyšší produkci SCFA, které omezují zánětlivost (Cuervo et al., 2013). Otázkou stále zůstává, jestli jsou změny mikrobiomu důsledkem fyziologických změn tkání během stárnutí, nebo jestli naopak střevní dysbióza spouští či podporuje stárnutí organismu.

3 Možnosti ovlivnění stárnuocí mikrobioty

Střevní mikrobiom je udržován mnoha mechanismy. Pomocí vnitřních specifických faktorů (miRNAs) a nespecifických faktorů (IgA, mukus, antimikrobiální peptidy), které podporují či inhibují růst konkrétních bakterií. Mezi vnější faktory ovlivňující složení střevní mikrobioty patří životní styl, potravinová intervence, farmaka či terapeuticky využívaná fekální transplantace. Fekální transplantace je přenos stolice od vhodného dárce využívaný například v léčbě na antibiotika resistantní recidivující enterokolitidy způsobené *Clostridium difficile* (Hasan and Yang, 2019).

Střevní mikrobiom je poslední dobou stále slibnějším terapeutickým cílem v léčbě mnoha poruch. Ať už se jedná o onemocnění gastrointestinálního traktu, metabolické poruchy nebo neurologická a psychiatrická onemocnění (Cryan and Dinan 2012, Duboc et al. 2013). Existuje mnoho způsobů, jakými lze ovlivnit složení střevní mikrobioty, a to jak negativně, tak pozitivně. Konkrétní změny mikrobioty lze dokonce přiřadit k jednotlivým patologickým stavům (The integrative HPM, 2014). Účinnou možnost alterace střevní mikrobioty představují probiotika, prebiotika, případně synbiotika a psychobiotika, na které bude zaměřena další kapitola.

Podle studie publikované v časopise mSphere koreluje specifické složení mikrobiálního profilu s takzvaným zdravým stárnutím. Studie byla provedena na 1000 dobrovolnících z Číny ve věkových kategoriích od 3 do více než 100 let, všichni dobrovolníci splňovali kritéria zdravého jedince bez rodinné anamnézy vážných onemocnění. Zdraví senioři měli velmi podobné složení mikrobioty jako mladší dobrovolníci (Bian et al., 2017). Podle výzkumu publikovaného v časopise Nature Metabolism je střevní mikrobiom spojený se zdravým nebo nezdravým stárnutím odlišný. Podle dat sesbíraných na více než 9 000 dobrovolnících je složení mikrobioty zdravých starších jedinců jedinečnější, tedy více se odchyľuje od ostatních.

Klesá množství základních bakteriálních rodů např. *Bacteroides*. Ačkoliv bylo složení značně individuální, metabolické funkce mikrobiomu dobrovolníků se zdravým stárnutím vykazovaly společné rysy. V krevní plazmě těchto dobrovolníků byla nalezena zvýšená hladina indolu odvozeného od tryptofanu, u něhož byl pozorován pozitivní efekt na délku života v myším modelu. Další metabolit, který se vyskytoval ve zvýšeném množství, byl fenylacetylglutamin. Tato zjištění by mohla pomoci předpovědět dožití pacientů nebo napovědět, jakým směrem je vhodné klinicky upravovat střevní mikrobiom. Pokud by se podařilo prokázat přímou souvislost, bylo možné omladit mikrobiom starších jedinců a podpořit tak jejich vitalitu. Stále ale není jasné, co je příčina a co následek. Tedy jestli zdravá mikrobiota předurčuje zdravé stárnutí, nebo naopak (Wilmanski et al., 2021).

3.1 Dieta

Kvalita stravování mnohdy s věkem značně klesá, a to z mnoha důvodů. Dochází ke změnám v dutině ústní a přechodu na lépe kousatelné potraviny. Starší lidé často ztrácejí schopnost vnímat chuť, nebo nejsou schopni si vařit, často přecházejí na takzvanou bílou stravu, která je snadno žvýkatelná, jako je bílé pečivo či brambory. Podle výzkumu mají lidé, jejichž dieta se skládá z potravin bohatých na vlákninu, větší rozmanitost střevních bakterií a obecně lepší zdraví. Právě vláknina je často u starších lidí přijímaná v nedostatečném množství. Nejlepší stravou pro střevní mikrobiom je středomořská strava bohatá na ovoce, zeleninu, celozrnné výrobky, luštěniny a zdravé tuky. Naopak strava západního stylu bohatá na červené maso, smažené potraviny, mléčné výrobky s vysokým obsahem tuku, brambory a slazené nápoje zvyšuje riziko kardiovaskulárních onemocnění, depresí a osteoporózy (Claesson et al., 2012; Kim et al., 2018).

Nastavení diety je spojeno i s vyšším rizikem onemocnění. Nízký příjem vlákniny negativně ovlivňuje růst bakterií produkujících mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), ty představují výživu pro střevní epitelální buňky a indukují vznik regulačních T buněk, které chrání střevo před lokálním zánětem. Regulační T buňky mají zásadní roli v řízení střevního zánětu pomocí exprese transkripčního faktoru Foxp3 (Smith et al., 2013). Podle nedávných studií bylo potvrzeno, že nižší příjem vlákniny koreluje s větším výskytem trávicích a metabolických poruch (Marchesi et al., 2016). Naopak při příjmu potravy s vysokým obsahem vlákniny, nízkým obsahem sacharidů, nasycených mastných kyselin, karagenanů a sulfitů byla zaznamenána zvýšená mikrobiální diverzita a snížená hladina fekálního kalprotektinu, který je hojně využívaným markerem pro akutní a chronické záněty střev (Sabino et al., 2017).

3.2 Fyzická aktivita

Stárnutí doprovází snížená fyzická zdatnost a omezená mobilita, což má negativní vliv na střevní mikrobiotu. Cvičení prokazatelně zvyšuje rozmanitost střevního mikrobiomu několika mechanismy. Jeden z nich je podpora protizánětlivého stavu, druhým mechanismem je aktivace osy hypothalamus-hypofýza-nadledviny (HPA) fyzickým stresem (Codella et al., 2018). Ve studii Clarka a kol. vykazovali elitní sportovci větší rozmanitost mikrobiomu, oproti kontrolní skupině měli signifikantně vyšší hladinu *Faecalibacterium prausnitzii*, která je považována za hlavního producenta butyrátu ve střevě a *Akkermansia muciniphila*, která negativně koreluje s obezitou a metabolickými poruchami. Dále měli sportovci nižší hladinu zánětlivých a vyšší hladinu protizánětlivých cytokinů (Clarke et al., 2014). Obdobné výsledky přinesla studie zaměřená na účinek aerobního cvičení na složení mikrobioty postmenopauzálních žen (Liu et al., 2014). Diskutabilním tématem je intenzita cvičení, dlouhodobé namáhavé cvičení může ovlivnit propustnost střev a vyvolat průjem (Peters et al., 2001). Podle výzkumu provedeného na starších dobrovolnících bylo zjištěno, že jedinci, kteří pravidelně cvičí, mají větší množství prospěšných bakterií produkujících vitamíny a SCFA jako například butyrát, propionát a acetát. Předpokládá se, že změny v mikrobiálním profilu zprostředkované fyzickou aktivitu by mohly ovlivnit vývoj a progresi Alzheimerovy demence alterací osy sval-střevo-mozek (Schlegel et al., 2019).

3.3 Farmaka

Stáří doprovází také zvýšený příjem léčiv, který značně interaguje se složením střevní mikrobioty. Vedle chemoterapeutik a dalších se nejvíce hovoří o antibiotické léčbě. Antibiotika ničí jak patologické, tak symbiotické bakterie. Antibiotická léčba bývá spojována i s rozvojem infekce *Clostridium difficile*. Naopak mají antibiotika pozitivní vliv mají na léčbu syndromu dráždivého tračníku (Menees et al., 2012). Studie prováděné na myších prokázaly negativní vliv antibiotik nejen na druhovou rozmanitost střevní mikrobioty, ale i metabolismus žlučových kyselin a serotoninu v tlustém střevě. Myši léčené antibiotiky měly také zhoršenou střevní motilitu (Ge et al., 2017). Mnoho druhů antibiotik způsobuje negativní změny mikrobiálního profilu trvající několik let. Klindamycin, používaný na léčbu infekcí způsobených grampozitivními a anaerobními bakteriemi, vyvolává změny trvající až 2 roky (Jernberg et al., 2007). V případě léčby infekce způsobené *Helicobakter pylori* antibiotiky klarithromycin a metronidazol trvalo u některých pacientů obnovení mikrobioty čtyři roky (Jakobsson et al.,

2010). Dopad na složení lidské střevní mikrobioty mají i antibiotika používaná v zemědělství při chovu hospodářských zvířat (Blaser, 2016).

4 Probiotické vlivy

Možnost přímé alterace střevní mikrobioty představují probiotika. Jsou to živé mikroorganismy, které mají v adekvátním množství příznivý vliv na zdraví. Prokázané příznivé probiotické účinky mají bakterie mléčného kvašení *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, ale i některé kmeny *Escheirchia coli* a některé druhy kvasinek (Dinleyici et al., 2015; Spinler et al., 2014). Prebiotika jsou látky, které mají příznivý vliv na růst a aktivitu střevní mikrobioty. Mnohdy se používá jejich kombinace, synbiotika. V posledních letech se rozlišuje také pojem psychobiotika, rodina probiotik, která podávaná ve vhodných dávkách má pozitivní účinek na duševní zdraví (Dinan et al., 2013). Fermentací prebiotik vznikají SCFA jako acetát, propionát a butyrát. SCFA podporují růst a integritu střevního epitelu, přes krevní řečiště mají i systémové účinky, např. indukci vzniku regulačních T buněk (Smith et al., 2013). Probiotika mohou vykazovat prospěšný efekt právě ovlivněním imunitního systému, posílením střevní bariéry, modulací metabolické odpovědi nebo působením na neuroendokrinní systém (Shrnuto v (Quigley, 2019)). Počet studií provedených na seniorech je limitovaný a nelze předpokládat, že probiotika budou mít stejný efekt jako na mladší jedince. Senioři tvoří značně specifickou skupinu s rozličnými komorbiditami.

Mnohé studie provedené na animálních modelech potvrdily pozitivní vliv probiotik na kognitivní funkce. Cílem studie E. Akbari a jeho týmu bylo potvrdit tuto tezi na pacientech trpících AD. Randomizovaná, dvojité zaslepená, kontrolovaná studie zkoumala efekt probiotik na kognitivní a metabolické funkce 60 pacientů s AD. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin, 30 pacientů patřících do kontrolní skupiny dostávalo mléčný nápoj, 30 probiotický nápoj. Probiotický nápoj obsahoval bakteriální kmeny *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum* a *Lactobacillus fermentum* po dobu 12 týdnů. Dobrovolníci užívali 200 ml nápoje denně. Jejich kognitivní funkce byly měřeny pomocí krátkého testu kognitivních funkcí (MMSE) před nasazením léčby a po jejím ukončení. Dále byly měřeny vybrané markery v krevních vzorcích. Skupinu dobrovolníků tvořili lidé ve věku 60-95 let s diagnostikovanou AD. Podle vstupních kritérií nesměli trpět metabolickými poruchami, chronickými infekcemi nebo dalšími klinicky relevantními chorobami. Dále nesměli užívat probiotické suplementy ani nápoje či jiné potraviny obsahující vybrané bakteriální kmeny po dobu šesti týdnů před zahájením účasti na studii. U skupiny užívající probiotika došlo po 12 týdnech k signifikantnímu zlepšení kognitivních funkcí (+27.90 % ± 8.07) ve srovnání s kontrolní

skupinou ($-5.03\% \pm 3.00$). Z biochemických markerů byla signifikantně snížená koncentrace malondialdehydu (MDA), C-reaktivního proteinu s vysokou citlivostí (hs-CRP), zvýšená koncentrace triglyceridů, zlepšená funkčnost B-lymfocytů. Studie tedy potvrdila primární tezi, že probiotika zlepšují kognitivní a metabolické funkce u pacientů trpících AD (Akbari et al., 2016). Další ze studií potvrzující příznivý účinek probiotik na kognitivní funkce se zabývala vlivem probiotik složených z bakteriálních kmenů *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* a *Bifidobacterium longum* v kombinaci se selenem. Oproti kontrolním skupinám užívajícím samotný selen nebo placebo dosahovala probiotická skupina lepších výsledků vMMSE ($+1.5 \pm 1.3$ vs. $+0.5 \pm 1.2$ and -0.2 ± 1.1 , $P < 0.001$). Signifikantní byla i redukce hs-CRP, nárůst celkové antioxidační kapacity a snížené hladiny inzulinu v krvi (Tamtaji et al., 2019a).

Další dvě studie se zabývaly jedním konkrétním bakteriálním kmenem, a to *Bifidobacterium breve* A1. Skupina užívající probiotika měla signifikantně lepší výsledky MMSE, změny metabolických funkcí zde nebyly zaznamenány (Kobayashi et al., 2018)(Kobayashi et al., 2019). V jiné studii zaměřené na pokročilý stupeň AD užívali pacienti probiotika po dobu 12 týdnů. Kognitivní testy a biomarkery v séru byly hodnoceny před a po skončení suplementace. Studie nezaznamenala signifikantní změny ani v hladinách biomarkerů v séru, ani v testech kognitivních funkcí (Agahi et al., 2018). Studie zkoumající efekt probiotické suplementace na pohybové a metabolické poruchy u pacientů s Parkinsonovou chorobou (PD) zaznamenala zlepšení na hodnotící škále pro PD (MDS-UPDRS). U skupiny užívající probiotika byla rovněž snížená hladina C-reaktivního proteinu, malondialdehydu, inzulinu a zvýšené hladiny glutathionu ve srovnání s placebo skupinou (Tamtaji et al., 2019b). Výsledky studií ukazují potenciál probiotických doplňků stravy pro zlepšení kognitivních funkcí a metabolického profilu u starších jedinců.

Metaanalýza zaměřená na studie využívající probiotika, prebiotika či synbiotika na stimulaci imunitního systému zjistila, že takto založené terapie mají velice slibné výsledky na snížení chronického zánětu na animálních modelech. V klinické praxi ale neprokázala signifikantní pozitivní efekt (Qu et al., 2019). Studie posuzující účinky *Bacillus subtilis* na stimulaci imunitního systému se zúčastnilo sto dobrovolníků, ti dostávali placebo, nebo probiotikum v periodických cyklech. Konzumace probiotika signifikantně zvýšila hladinu imunoglobulinu A (IgA) ve stolici a slinách, na sníženou frekvenci běžných onemocnění to ale nemělo vliv. Post-hoc analýza prokázala sníženou frekvenci respiračních onemocnění podskupiny jedinců užívajících probiotika (Lefevre et al., 2015). Účinek probiotické suplementace na posílení imunitních funkcí ve stáří prokázal zvýšení fagocytární funkce

polymorfonukleárních buněk a zvýšenou aktivitu NK buněk po krátké suplementaci (3 až 12 týdnů) probiotiky. Hlavním nedostatkem studií je měření pouze krátkodobého účinku a nejasný klinický přínos těchto imunitních změn (Miller et al., 2019).

Jeden z novějších přístupů využívá rekombinantních kmenů bakterií produkujících biologicky aktivní molekuly jako například protizánětlivé cytokiny. Geneticky modifikované bakterie jsou účinným přístupem pro lokální dodávání imunomodulačních proteinů a umožňují dlouhodobou léčbu chronických onemocnění. Studie týmu pod vedením Henriho Bratta se zaměřila na pacienty s Crohnovou chorobou. Pacientům podávali geneticky modifikovaný druh *Lactococcus lactis* (LL-Thy12), ve kterém byl gen pro thymidylát syntázu nahrazen sekvencí kódující lidský interleukin 10 (IL-10). U pacientů nebyly pozorovány vedlejší účinky, tato metoda představuje účinný terapeutický nástroj v boji proti chronickému střevnímu zánětu (Baat et al., 2006).

4.1 Účinky jednotlivých bakteriálních druhů použitých ve studii

4.1.1 *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum je bakterie mléčného kvašení. Obecné mechanismy, kterými zprostředkovává své pozitivní účinky, jsou modulace komenzální mikrobioty, inhibice růstu patogenů, udržování střevní bariéry, modulace imunitního systému a produkce bioaktivních molekul. *L. Plantarum* produkuje bakteriociny, což jsou antimikrobiální peptidy, které brání expanzi patogenů. Díky produkci SCFA snižuje pH tlustého střeva a vytváří nepříznivé prostředí pro růst patogenů. Má významný efekt na snížení hladiny cholesterolu. Pomáhá předcházet zažívacím potížím. Pozitivní efekt byl zaznamenán i v léčbě úzkosti, ekzému, vysokého krevního tlaku, syndromu dráždivého tračníku, zánětlivých onemocnění střev jako je Crohnova choroba a ulcerózní kolitida. Pozitivní vliv má i na zlepšení paměti. *Kmen L. plantarum* PS128 je pro své účinky využíván jako psychobiotikum. U animálních modelů byl prokázán vliv na snížení chování podobné depresi. U myši byly naměřeny snížené hladiny kortikosteronu, což naznačuje, že byla normalizována funkce HPA osy. *L. plantarum* PS128 moduluje expresi IL-6, obnovuje hladinu dopaminu a serotoninu a zvyšuje produkci mozkového neurotrofního faktoru (BDNF) (Garcia-Gonzalez et al., 2021; Liu et al., 2018).

4.1.2 *Pediococcus pentosaceus*

P. pentosaceus prokazatelně posiluje imunitní systém a posiluje protizánětlivou odpověď. Vykazuje antikarcinogenní vlastnosti, slibné výsledky vykazuje v léčbě kolorektálního karcinomu. Jeho potenciální využití naznačují experimenty prováděné na buněčných liniích

i při léčbě rakoviny děložního čípku a rakoviny tlustého střeva. Prostřednictvím vychytávání volných radikálů působí antioxidačně, inhibuje peroxidaci lipidů a snižuje hladinu cholesterolu. Kmeny *P. pentosaceus* působí jako antidota pro vychytávání toxických látek v těle. Ovlivňuje absorpci, vylučování ale i detoxifikační schopnost jater. Napomáhá vstřebávání živin a minerálů z potravin (Jiang et al., 2021). *P. pentosaceus* HLJG0702 zlepšil mozkovou funkci myši mechanismem inhibice acetylcholinesterázy (An et al., 2019).

4.1.3 *Streptococcus thermophilus*

S. thermophilus je jedním z původních bakteriálních kmenů používaných k výrobě jogurtů, a to kvůli odolnosti vůči kyselému prostředí žaludku. Podle studie na bezmikrobních potkanech dosáhl *S. thermophilus* stabilní populace za 30 dní. Hlavní odpovědí kolonizace GIT potkana touto bakterií byla masivní indukce glykolýzy vedoucí k tvorbě laktátu (Rul et al., 2011). Je jedním z nejužívanějších imunomodulačních druhů. Na myším modelu byla dokázána jeho schopnost potlačit prozánětlivou odpověď zprostředkovanou pomocnými T buňkami produkujícími IL-17. Mechanismem je pravděpodobně zvýšení exprese mRNA a následná produkce interferonu gamma (IFN- γ) (Tanabe, 2011). Má schopnost vázat se na buňky střevního epithelu a zabraňovat tak vazbě patogenů. *S. thermophilus* napomáhá trávení u jedinců s intolerancí laktózy, protože má schopnost štěpit laktózu a sloužit jako náhrada laktázy (Rul et al., 2011). *S. thermophilus* má protizánětlivé účinky a schopnost stimulovat makrofágy. Jedna ze studií naznačuje schopnost stimulovat regeneraci epiteliálních buněk (Marcial et al., 2013).

4.1.4 *Streptococcus salivarius*

Některé kmeny *S. salivarius*, jako jsou K12 a M18, patří mezi probiotické kmeny produkující bakteriociny zvané lantibiotika. To jsou malé molekuly s terapeutickým potenciálem při léčbě infekčních chorob. Produkují salivaricin A, salivaricin B, salivaricin 9 a salivaricin G32, které působí proti patogenním bakteriím. Úspěšně inhibuje *Streptococcus pyogenes* a předchází tak streptokokové infekci, může mít také antivirový účinek. Mezi další prospěšné metabolity patří fruktosyltransferáza, která polymerizuje sacharózu na fruktany, které mají strukturu levanu. Levan stimuluje růst a aktivitu vybraných probiotických bakterií a má protinádorové a antidiabetické účinky. Je majoritním druhem v dutině ústní, napomáhá produkci enzymů snižující akumulaci a acidifikaci zubního plaku. (Vesty et al. 2020, Barbour and Philip 2014).

5 Cíle práce

- Stanovit vliv probiotik na kognitivní funkce u starší populace pomocí testovací baterie Prokog
- Zhodnotit, zda došlo k celkovému zlepšení zdravotního stavu na základě subjektivního hodnocení
- Zhodnotit, zda došlo ke zlepšení duševního stavu, konkrétně míry úzkosti, depresivity a celkové nálady pomocí sady dotazníků
- Zmapovat metabolické dráhy a metabolity, ve kterých dochází ke změnám po příjmu probiotik, pomocí hmotnostní spektrometrie

6 Materiály a metody

6.1 Výzkumný soubor

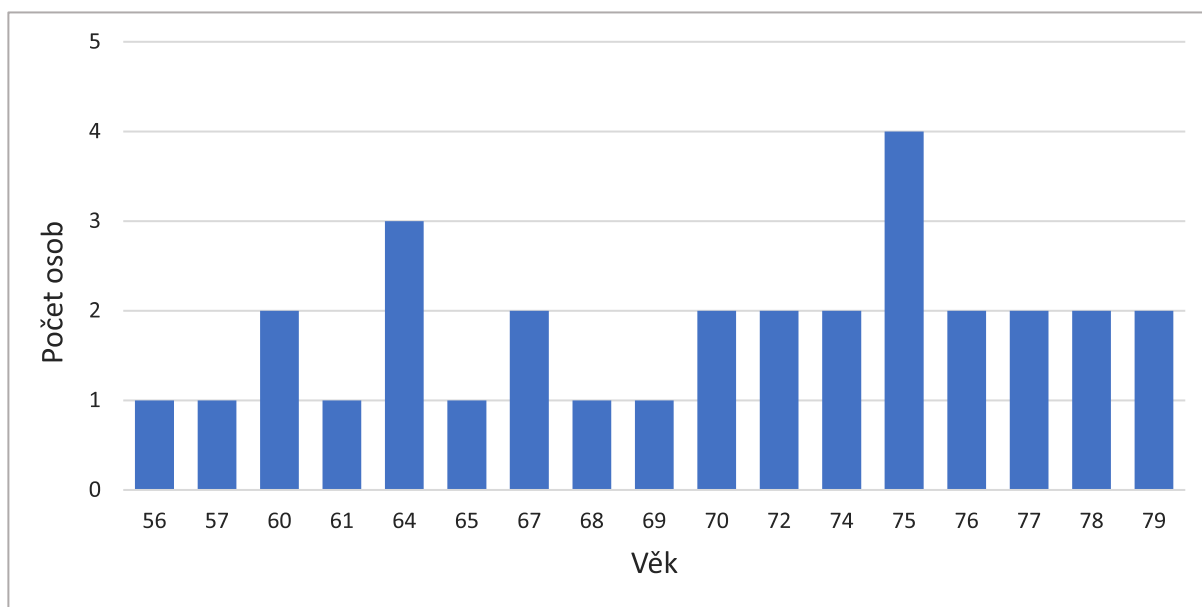
Výzkumný soubor čítal 35 dobrovolníků. Dobrovolníci byli vybíráni na základě vstupních a vylučujících kritérií projektu CleverAge Bioty dostupných na <https://abadeco.cz/kogbionta/>. Hlavními kritérii byl dosažený věk 55-80 let. Mateřský jazyk český. Absence onemocnění GIT, onkologického onemocnění, neurologických obtíží, psychiatrického onemocnění, selhávání vnitřních orgánů, podstoupení radioterapie či chemoterapie v posledních pěti letech, podstoupení operace v celkové narkóze v posledních pěti letech. Důležitou podmínkou bylo neužívání probiotik či antibiotik tři měsíce před vstupem do projektu. Součástí vstupních kritérií byl i krátký inovativní test paměti eALBAV, který trval asi osm minut. Test spočíval v zapamatování a následném vybavení 10 obrázků, věty o 10 slovech a 10 předvedených gest. Paměťové výsledky sloužily i k identifikaci potenciálních kandidátů do studie, jejímž cílem je mimo jiné stanovit zlepšení paměti.

U většiny dobrovolníků nebyla před vstupem do projektu diagnostikována kognitivní či psychická porucha. Podle Beckova inventáře úzkosti (BAI) trpělo úzkostí 11 vyšetřovaných. Na základě Beckovy sebeposuzovací škály depresivity pro dospělé (BDI-II) trpělo depresí 6 dobrovolníků. Při dotazu na výskyt chorob depresi neuvedl žádný z nich, jeden z dobrovolníků byl s depresí léčen v minulosti. Mezi užívanými léky se pouze u jednoho z tázaných vyskytovala antidepresiva. Po vstupní kategorizaci na základě prvního vyšetření byli 3 dobrovolníci zařazeni do kategorie mírných výkyvů a deficitu pozornosti, devět do kategorie mírné kognitivní poruchy a u dvou byl zaznamenán závažný pokles kognitivních funkcí. Nootropika ale mezi užívanými léky uvedl pouze jeden z vyšetřovaných.

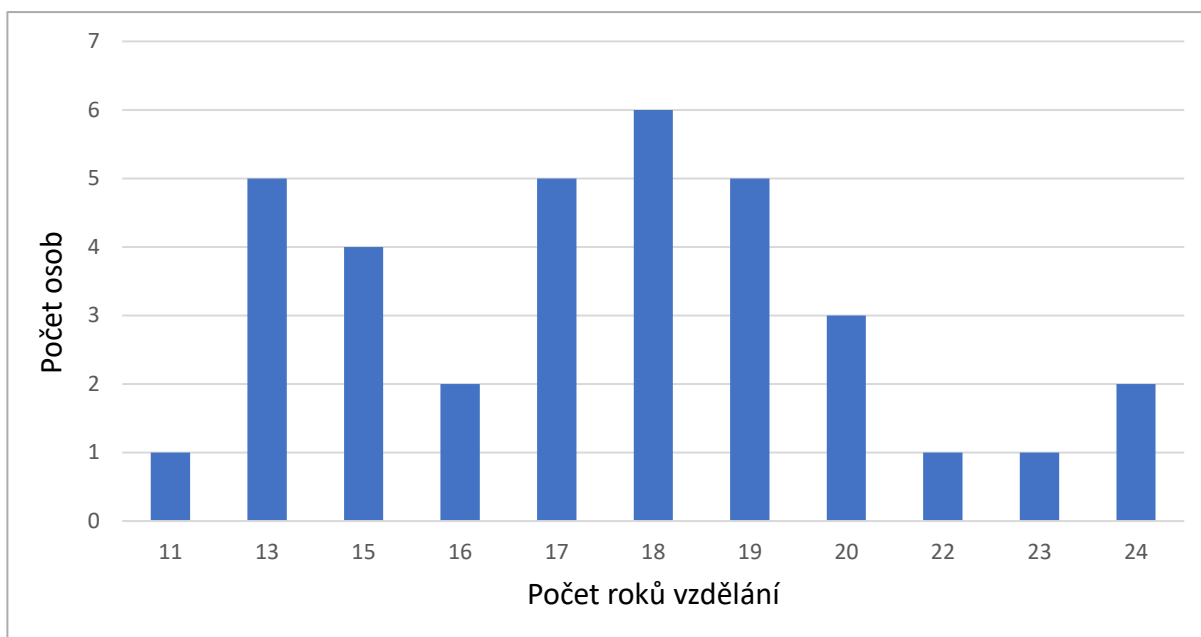
Výzkumu se zúčastnilo 23 žen a 12 mužů. Průměrný věk dobrovolníků byl $70,26 \pm 6,51$ (minimum 56, maximum 79, medián 72). Průměrný počet let vzdělání byl $17,31 \pm 3,28$ (minimum 11, maximum 24, medián 17,5). Převažovali vysokoškolsky vzdělaní lidé. Vše je shrnuto v tabulce č.1.

Pohlaví (muži:ženy)	12:23
Věk (průměr ± sd)	70,26±6,51
Roky vzdělání (průměr ± sd)	17,31±3,28
FAQ (0-100 %, průměr ± sd)	96,15±4,326
GDS (0-15 bodů, průměr ± sd)	2,714±1,964
DNU (0-26 bodů, průměr ± sd)	2,943±2,425
BDI-II (0-63 bodů, průměr ± sd)	7,829±4,712
BAI (0-63 bodů, průměr ± sd)	5,0±3,941

Tabulka č.1. Sociodemografické charakteristiky dobrovolníků. Průměrný dosažený věk je 70,26±6,51 let, v souboru převažují ženy. Průměrné roky vzdělání jsou 17,31±3,28 let, což odpovídá vysokoškolskému vzdělání. V dotazníku funkčního stavu (FAQ-CZ) byla zjištěna plná soběstačnost dobrovolníků. Průměrné dosažené skóre ve škále na zhodnocení nálady u starší populace činí 2,714±1,964, tedy bez přítomnosti deprese. Z výsledků dotazníku nežádoucích událostí (DNU) byla zjištěna nezátíženost výsledků přílišnými negativními vnějšími vlivy. Průměrné skóre Beckovy sebesuzovací škály depresivity pro dospělé (BDI-II) je 7,829±4,712, tedy bez deprese. Průměrná hodnota Beckova inventáře úzkosti (BAI) je 5,0±3,941, bez přítomnosti úzkosti. *Sd.* = směrodatná odchylka.



Graf č.1. Věkové rozložení dobrovolníků. Věkové rozložení je rovnoměrné s mírně vyšším zastoupením jedinců od 70 do 79 let. Nejvyšší zastoupení je ve věku 64 let, konkrétně 3 osoby a 75 let, tohoto věku dosáhly 4 osoby.



Graf č.2. Rozložení let vzdělání dobrovolníků. Mezi dobrovolníky zcela chybí jedinci s maximálním dosaženým vzděláním základním. V menší míře jsou zastoupeni jedinci se středoškolským vzděláním s maturitou a bez maturity. Většina dobrovolníků uvedla počet let odpovídající vysokoškolskému vzdělání. Zastoupeni jsou i probandi s postgraduálním vzděláním.

V dotazníku FAQ dosáhla většina dobrovolníků téměř 100 %, což značí naprostou samostatnost. Minimum bylo 86,67 %, což je stále v normě normálního stárnutí a maximum 100 %, kterého dosáhla většina. V dotazníku GDS byla průměrná hodnota 2,7, což je podle normy bez přítomnosti deprese. V DNU bylo dosaženo průměrně necelých 3 bodů, medián ale činil pouze 2 body. Maximum bylo 8 dosažených bodů. Pouze 6 z 35 testovaných neuvědlo žádnou negativní událost. V BDI-II bylo dosaženo průměrného skóre 7,8 což podle českých norem značí nepřítomnost deprese. Dosažené maximum bylo 18 bodů, tedy mírná deprese. V BAI bylo dosaženo průměrného skóre 5 bodů, což je podle norem bez přítomnosti úzkosti. Maximum bylo 15 bodů, tedy mírná úzkost. Celkem 20 z 35 testovaných vyjádřilo subjektivní nespokojenost se svou pamětí. U žádné z osob nedošlo během testování ke změně medikace, nebo zdravotního stavu který by mohl výzkum ovlivnit.

6.2 Použitá probiotika/placebo

Použitá originální probiotika jsou humánního původu z databanky od společnosti NAXARS s imunomodulačním účinkem, dokázaným prostřednictvím snížení CD4-IFN γ ve slezině testovaných myší. Obsahují bakteriální kmeny *Streptococcus thermophilus* GH, *Streptococcus salivarius* GH NEXARS, *Lactobacillus plantarum* GH a *Pediococcus*

pentosaceus GH, jejichž účinky jsou popsány v teoretické části práce. NEXARS u všech vybraných probiotických kmenů provedl celogenomové sekvenování k vyloučení přenosu bakteriální rezistence, což je z pohledu bezpečnosti nezbytné.

V České sbírce mikroorganismů je zanesen *Streptococcus salivarius* GH NEXARS pod kódem CCM 8797. *Streptococcus salivarius* GH NEXARS č.j. PATB 11/18 je originální biotechnologický produkční kmen mezinárodně chráněný podle patentového řízení podle Budapešťské smlouvy. Osekvenovaný genom je k dispozici v databázi GenBank na <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/670337>. Druhá sada tablet obsahovala mikronizovanou jablečnou vlákninu.

Placebo k probiotikům bylo složeno z polohrubé pšeničné mouky, škrobu, maltodextrinu a stearanu hořečnatého. Placebo k vláknině bylo složeno z celulózy, maltodextrinu a stearanu hořečnatého. Placebo tablety byly vizuálně i chuťově identické se zkoumanými tabletami.

6.3 Kognitivní testy

Dobrovolníci byli testováni pomocí testovací baterie PROKOG. Baterie obsahuje standardní i inovativní psychodiagnostické testy paměťových a exekutivních funkcí. Dále dobrovolníci vyplňovali sadu dotazníků na různé oblasti života. Mnohé z dotazníků a testů jsou volně k dispozici na <https://www.nudz.cz/adcentrum/index.html>.

Test kreslení hodin (TKH)

TKH je jednou z nejčastějších neuropsychologických zkoušek. Jedná se o screeningovou zkoušku na zjištění postižení exekutivních funkcí a zrakově-prostorových schopností. Maximum bodů je pět, tohoto skóre by měla dosáhnout kognitivně zdravá osoba. Obecné hraniční skóre pro časnou AD je méně nebo rovno čtyřem bodům.

Rychlý test paměti, Amnesia Light and Brief Assessment (ALBA)

Test ALBA se skládá z testu vštípení a vybavení věty a testu epizodické paměti na gesta (TEGEST). Smyslem TEGESTu je prověření krátkodobé epizodické paměti a nepřímou kvalitou porozumění, ze které je možné zjistit senzoricke afázii. Maximum bodů je šest, normální je vybavení 4-6 gest v libovolném pořadí. Maximum bodů ALBA testu je 12, 4-5 bodů značí mírnou poruchu, 0-3 poruchu závažnou.

Kategoriální slovní produkce na skupinu „zvířata“

Tento test je zaměřen na kvalitu vybavnosti z dlouhodobé sémantické paměti. Test je ohraničen časovým limitem jedné minuty. Existuje mnoho orientačních norem, norma stanovená na vzorku 1500 osob v AD Centru Praha byla stanovena na 22 ± 6 , u osob s podprůměrnou funkcí dlouhodobé sémantické paměti klesá počet pod 15 zvířat za minutu.

Paměťový test učení, Rey Auditory Verbal Learning Test (RAVLT)

RAVLT je vhodný pro diagnostiku paměťových poruch a deficitů. Test ověřuje bezprostřední a krátkodobou verbálně-sluchovou paměť, kapacitu krátkodobé paměti, kvalitu verbálního učení a míru udržitelnosti nebo zapomínání nově získaných verbálních informací. Test je rozdělen na několik fází. Fázi učení (sada A) s distrakcí (sada B) a s okamžitým spontánním vybavením a oddáleným vybavením po 25-30 minutách. Kapacita krátkodobé paměti je 7 ± 2 slova, pokles zapamatování na 4 slova a méně poukazuje na sníženou kapacitu krátkodobé paměti. Více než 9 slov značí naopak kapacitu nadprůměrnou. Krátkodobá paměť se testuje prvním pokusem ve fázi učení sady A a učení sady B. Dále test prověřuje celkovou schopnost učení, výsledek se porovnává s věkově odpovídajícím normativním vzorkem. Díky porovnání výkonu v bezprostředním vybavení a oddáleném vybavení je možné rozeznat AD a fronto-temporální lobární degeneraci. Pacienti s AD obvykle dosahují minimálního počtu bodů v oddáleném vybavení.

Test cesty, Trail Making Test (TMT A, TMT B)

Tento test původně sloužil ke screeningové diagnostice mozkových dysfunkcí u zraněných vojáků. Prověřuje schopnost integrace mnoha funkcí, zrakového vyhledávání, zaměřené a rozdělené pozornosti, mentální flexibility, vizuomotorických dovedností a psychomotorického tempa. TMT-B je zaměřen především na exekutivní funkce, schopnost přepínat mezi dvěma paralelními činnostmi a mentální flexibilitu.

Subtest „kódování symbolů“ z Wechslerovy inteligenční škály pro dospělé (SYMBOLY)

Subtest je zaměřen na rychlost psychomotorického tempa, pozornost a částečně krátkodobou paměť. Zkouška trvá 2 minuty a úkolem je přepisovat čísla do znaků.

Baterie hodnocení kognice, Assessment Battery of Cogniton (ABACO)

Baterie ABACO se skládá z několika zkoušek. Čtení šifrovaných vět, tedy test ověřující vizuální pozornost. Test spočívá v rozluštění tří zašifrovaných vět. Další část, test vštípení a vybavení věty, prověřuje epizodickou složku paměti. Vštípení věty je přerušeno krátkou distrakcí v podobě testu produkce slov. Po provedení dalších dvou testů následuje oddálené vybavení této věty. Další částí baterie je písemné pojmenování obrázků a jejich vybavení (POBAV) zaměřený na dlouhodobou sémantickou a krátkodobou vizuální paměť. Rovněž prověřuje schopnost psaného jazyka. Zkouška má dvě fáze, pojmenování a vybavení. Fáze vybavení následuje neprodleně po fázi pojmenování a je časově ohraničená dvěma minutami. Posledním testem v baterii je test čárové obrazové produkce (ČAPR), úkolem vyšetřovaného je nakreslit co nejvíce obrazců z určitého počtu rovných čar. Test je časově omezen.

6.4 Dotazníky psychických funkcí

Škála ke zhodnocení nálady u starší populace (GDS)

Geriatrická škála deprese je nejpoužívanějším dotazníkem zjišťujícím přítomnost depresivních symptomů u seniorské populace. GDS je screeningový nástroj pro měření deprese u seniorské populace, vhodný i pro jedince s mírnou kognitivní poruchou či mírným stupněm demence. Není vhodná pro pacienty s pokročilejší fází demence. Podle české standardizace Bahbouha a Tošnerové získá 0-7 bodů značí, že pacient netrpí depresí, 8-12 bodů znamená výskyt mírné deprese a 13 bodů a více značí těžkou depresi.

Beckova sebeposuzovací škála depresivity pro dospělé (BDI-II)

BDI-II je dotazník pro zjištění závažnosti deprese u již diagnostikovaných pacientů s depresí, ale může sloužit i k detekci depresivních syndromů a deprese u zdravé populace. Obsahuje 21 tvrzení, která představují charakteristické symptomy deprese, např. pocity smutku, pesimistické výhledy do budoucnosti apod. BDI-II byl adaptován na českou populaci a počítá s cut-off skóre 0-13 bodů bez deprese, 14-19 bodů značí mírnou depresi, 20-28 bodů střední depresi a 29-63 bodů těžkou depresi (Gottfried, 2015). Kvalitativně pak lze hodnotit, které symptomy dominují.

Beckův inventář úzkosti (BAI)

BAI je rychlý screeningový nástroj pro zhodnocení míry celkové úzkosti u pacientů s úzkostnými poruchami nebo depresí. Zkoumá symptomy jak v oblasti psychické, tak fyzické.

Lze podle něj určit dominující symptomy deprese a sledovat změny v intenzitě a závažnosti úzkosti. BAI nemá standardizaci na českou populaci, normy pro hodnocení jsou přejaty ze zahraničí. 0-7 bodů značí absenci úzkosti, 8-15 bodů mírná úzkost, 16-25 bodů střední úzkost, 26-63 bodů těžká úzkost.

Vizuální analogové škály (VAS)

VAS jsou psychometrickým nástrojem, který se nejčastěji používá pro měření bolesti a pro psychologickou diagnostiku pacientů s chronickou bolestí. Lze použít i pro subjektivní zhodnocení jakéhokoliv duševního stavu. Pro naše účely byla využita numerická VAS, kde posuzovaná osoba vyjadřuje intenzitu posuzovaného stavu na stupnici od 0-10. Nula značí nejnižší hodnotu, např. nevyskytuje se žádná bolest. Desítka představuje maximální hodnotu, tedy, vyskytuje se maximální bolest.

Subjektivní dotazník funkčního stavu (FAQ-CZ)

FAQ-CZ slouží ke zhodnocení soběstačnosti osoby. Slouží k detekci časných poruch v instrumentálních aktivitách ve stáří a ve stadiu mírné kognitivní poruchy. Maximální možné skóre činí 30 bodů, to odpovídá nejvyššímu postižení v instrumentálních denních aktivitách a výrazně omezenou soběstačnost. Nulová hodnota naopak značí plnou soběstačnost.

Dotazník nežádoucích událostí (DNU)

DNU je sebesposuzovací nástroj ke zjištění počtu a charakteru významných negativních životních událostí v období jednoho roku. Autorem metody je doc. Marek Preiss. Test vychází z teorie psychosomatiky, která uvádí, že pokud se u jedince vyskytnou tři a více významné negativní události, může dojít k dekompenzaci s psychickými, fyzickými a následně i zdravotními dopady. Maximální skóre činí 26 bodů, čím vyšší je dosažené skóre, tím více negativních událostí osobu zasáhlo.

6.5 Střevní metabolom

6.5.1 Materiály

Pro přípravu vzorků stolice a následnou analýzu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní detekcí (HPLC-MS/MS) byly použity následující chemikálie a materiály:

- Vzorky stolice jednotlivých participantů

- miliQ, metanol pro HPLC, kyselina mravenčí, standardy vybraných látek (L-alanin, L- glycine, L-serin, L-treonin, L-tryptofan, L-leucin, L-izoleucin, L-valine, L-proline, L-metionine, L-citruline, L-aspartová kyselina, L-asparagin, L-glutamová kyselina, L-glutamin, L-fenylalanin, L-cystein, L-histidin, L-tyrosin, L-kynurenine, L-kynureninová kyselina, L- hydroxyindoloctová kyselina, pikolinová kyselina, chinolinová kyselina, homovanilová kyselina, tryptamin, adenine, guanin, cytosine, ornitin, 5-hydroxy-L-tryptofan, oleová kyselina, stearová kyselina, palmitová kyselina, arachidonová kyselina). Všechny použité chemikálie jsou od výrobce Sigma-Aldrich.

6.5.2 Příprava vzorků a analýza vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní detekcí (HPLC-MS/MS)

Od každého dobrovolníka bylo v rámci jedné návštěvy získáno několik vzorků – pacientovi byla odebrána krev, která byla následně okamžitě zpracována a získané sérum a plazma byly rozděleny na alikvoty a hluboce zamraženy (-84 °C). Dále si sebou pacient přinesl vzorek stolice, který odebral v intervalu 3 dní od vizity a následně uschoval ve svém mrazáku do doby odevzdání vzorku. Vzorek moči pacient odebral nalačno v den vizity a také přinesl spolu se vzorkem stolice v polystyrenovém boxu s mrazicí vložkou tak, aby bylo dosaženo co největší homogenity transportu vzorků. Vzorek stolice i moči byl okamžitě po přinesení bez další manipulace se vzorkem uložen a hluboce zamražen při -84°C.

V den zpracování vzorků byly vzorky nejprve vybrány z hlubokomrazícího boxu (-84 °C) a umístěny na cca hodinu do ledové tříště, kde byly uchovány v originálním transportním obalu při cca -5°C. Z každé transportní zkumavky bylo odebráno cca 200–500 mg vzorku stolice do označené, předvážené, 2ml eppendorfky. Následně byl vzorek zvážen a bylo přidáno extrakční činidlo (metanol (MeOH): voda s 0,1 objemovým procentem kyseliny mravenčí v poměru 1:1) v poměru 1:4 (hmotnost: objem extrakčního činidla). Každý vzorek byl následně 2 minuty vortexován, následně umístěn na 10 minut do ultrazvukové lázně při 10 °C a následně inkubován 2 h při teplotě 5°C. Po ukončení inkubace byly vzorky centrifugovány při 5 °C po dobu 20 minut a 13.000 g. Odebraný supernatant byl přefiltrován přes polytetrafluorethylenový (PTFE) filtr (0,22 µm) a následně podroben analýze pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS).

Analýza na kapalinovém chromatografu (Thermo Ultimate 3000) s hmotnostním detektorem s vysokým rozlišením (AB Sciex TripleTOF 5600) proběhla v elektrosprejové ionizaci (ESI) plus módu, v každém ve dvou detekčních oknech (50-500 Da, 500-1200 Da). Získaná data byla následně zpracována nejprve pomocí softwarové aplikace Markerview (AB Sciex), aby následně byla porovnána s daty vloženými do volně přístupné metabolické databáze Metaboanalyst (www.metaboanalyst.ca).

Pro separaci byla zvolena chromatografická kolona od společnosti Phenomenex, konkrétně Kinetex C18 2,6 μm 50x3 mm. Byla zvolena 20minutová gradientová metoda s mobilní fází A (mili Q + 0,1% kyseliny octové) a mobilní fází B (MeOH + 0,1% kyseliny mravenčí) s následujícím gradientem:

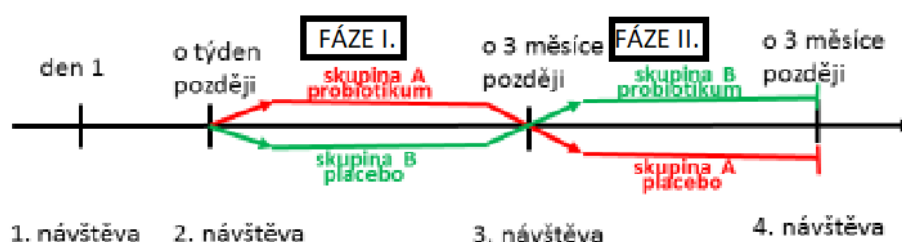
čas (min)	průtok (ml/min)	%A	%B
0	0.5	95	5
0.3	0.5	95	5
0.5	0.5	90	10
1	0.5	85	15
12	0.5	0	100
16	0.5	0	100
17.5	0.5	85	15
18	0.5	95	5
20.5	0.5	95	5

Tabulka č. 2. Profil gradientu mobilních fází pro zvolenou HPLC metodu. Průtok stanovený v mililitrech za minutu a poměr mobilní fáze A a B v procentech.

6.6 Metodické postupy

Testování probíhalo v prostorách Národního ústavu duševního zdraví (NUDZ) a neurologické kliniky Fakultní nemocnice Královské Vinohrady (FNKV). Každý z dobrovolníků, který prošel vyřazovacími a vstupními kritérii, byl zařazen do skupiny A nebo B. Skupina A užívala probiotika a vlákninu, skupina B placebo. Dobrovolníci brali každý den jednu tobolku probiotika/placeba a tři tobolky vlákniny/placeba po dobu tří měsíců. Vždy v kombinaci probiotika + vláknina nebo placebo + placebo. Probiotika jsou potravinový doplněk stravy, nikoli léčivý přípravek. Studie CleverAge Biota byla schválena etickou komisí NUDZ a FNKV. Studie je randomizovaná dvojité zaslepená cross studie. Dobrovolník ani

vyšetřující neví, jakou látku podává/užívá. Každý byl seznámen s průběhem a podmínkami výzkumu a podepsal informovaný souhlas o testování a odběru vzorků moči, stolice a krve.



Obr.č.3. Design projektu CleverAgeBiota. Celý projekt je rozdělen do dvou fází. V práci je uvedena fáze I. Celý projekt trvá 6 měsíců a obnáší čtyři návštěvy pracoviště.

Z důvodu odsunutí projektu během pandemie COVID-19 se tato práce zabývá pouze fází I. celého projektu. Finální studie bude doplněna o data z fáze II., analýzu vybraných parametrů ze vzorků krve a moči, zjištění dlouhodobých stravovacích zvyklostí a nutriční vyšetření, posouzení fyzické kondice pomocí sady testů a dat z aktigrafů.

Každý z dobrovolníků byl testován dvakrát baterií PROKOG. U prvního vyšetřování byly použity první verze testů. Při opakovaném vyšetřování byly u vybraných testů použity tzv. paralelní verze, pokud existují. Tím by mělo být zabráněno, aby došlo k tzv. efektu nácviku, kdy se při dalším testování výkon zlepšuje tím, že dotyčná osoba již zná test z minulosti. Druhé vyšetření proběhlo pro třech měsících užívání probiotik/placeba. Testování probíhalo vždy v samostatné místnosti za přítomnosti testovaného, testujícího případně supervizora, aby nedocházelo z rušivých vlivům, které by testování mohli ovlivnit.

Interval mezi jednotlivými návštěvami byl stanoven na základě dostupné literatury, hlavně na základě vhodné doby užívání probiotik. Studie s nejkratším intervalem měření byly na čtyři týdny. Nejdelší trvala 20 týdnů, nejvíce užívaný a osvědčený model ale byl právě 12 týdnů. Menší časový odstup by mohl mít za následek neprojevení efektu probiotik. Delší interval by mohl znamenat i menší ochotu a možnost dobrovolníků vzhledem k pokročilému věku se dostavit k druhému testování (Akbari et al. 2016, Santocchi et al. 2016, Tillisch et al. 2013, R. Huang, Wang, and Hu 2016).

Osobní vyšetření se skládalo z dotazníků a testů uvedených výše, které jsou zaměřeny na hlavní cíl projektu – ovlivnění paměti a nálady. Celé vyšetřování trvalo vždy přibližně 60 minut. Testy byly administrovány v následujícím pořadí:

- A. Kontrola vstupních kritérií do výzkumu

-dotazník se vstupními a vylučujícími kritérii do výzkumu KogBionta

-podepsání informovaného souhlasu a vyplnění anamnestického dotazníku první část

B. Testy

- a. Test kreslení hodin (TKH)
- b. Amnesia Light and Brief Assessment (ALBA)
- c. Kategoriální slovní produkce na skupinu „Zvířata“
- d. Reyův paměťový test učení s oddáleným vybavením a znovupoznáním (RAVLT) (do okamžitého vybavení A6)
- e. Test cesty s verzí A a B (TMT A a TMT B)
- f. Subtest „Kódování symbolů“ z WAIS III

C. Dotazníky

- a. Anamnestický dotazník druhá část
- b. Vlastní zhodnocení nálady podle dotazníku Škála ke zhodnocení nálady u starší populace (GDS)
- c. Beckova sebesuzovací škála depresivity pro dospělé (BDI-II)
- d. Beckův inventář úzkosti (BAI)
- e. několik vizuálních škál na zhodnocení paměti, duševní pohody, celkového pocitu zdraví, úzkosti, spánku, fyzické únavy a bolestí (VAS)
- f. Vlastní zhodnocení soběstačnosti podle dotazníku funkčního stavu (FAQ)
- g. Dotazník nežádoucích událostí (DNU)

D. Testy

- a. Reyův paměťový test učení s oddáleným vybavením a znovupoznáním (RAVLT) (oddálené vybavení slov po cca 25-30 minutách)
- b. Assessment Battery of Cogniton ABACO
- c. Dotazník s průvodními projevy užívání probiotik
- d. Stravovací dotazník

6.6.1 Statistické vyhodnocení

Výsledky jednotlivých testů a dotazníků byly vyhodnoceny podle norem a zapsány do souhrnné elektronické tabulky MS Excel. Převody hodnot na percentily byly stanoveny za pomoci psychologů.

Data byla zpracována pomocí programu GraphPad Prism 8.0.1. Z metod deskriptivní statistiky byl vždy spočítán průměr, směrodatné odchylky, minimum, maximum a medián.

U všech testů a dotazníků byla nejprve ověřena normalita dat pomocí souboru testů pro normální distribuci, Anderson-Darling test, D'Agostino & Pearson test, Shapiro-Wilk test a Kolmogorov-Smirnov test. Podle splnění či nesplnění testů normality byl použit párový t-test, případně neparametrický párový Wilcoxonův test. Tyto testy porovnávaly průměry mezi prvním a druhým měřením a jejich odchylky od stanovené hodnoty. Tedy, jestli se testování během užívání placebo/probiotik zlepšilo, případně zhoršilo a jestli je tato změna statisticky významná. Kalkulace statistické síly byla provedena pomocí programu G*Power 3.1.9.7.

Pro vlastní identifikaci jednotlivých analytů ze vzorků stolice byla využita knihovna spekter vybraných analytů, která vznikala v průběhu posledních let v analytickém týmu Národního ústavu duševního zdraví. Porovnáním hmotnostních spekter s výsledky bylo zatím identifikováno několik desítek biologicky významných metabolitů. Všechna vyhodnocení, verifikace jednotlivých analytů pomocí knihoven atd. byla provedena v softwaru SCIEX OS – verze 1.5, dodávaném spolu s hmotnostními spektrometry společnosti AB Sciex.

7 Výsledky

7.1 Kognitivní testy

Následující tabulky a grafy shrnují výsledky dosažené v testech kognitivních funkcí. Data jsou vyhodnocována horizontální analýzou, jsou porovnány výsledky stejných osob ve dvou testovacích časech. Data jsou vyhodnocena pomocí programu GraphPad Prism 8. Na analýzu bylo využito párového t-testu, případně neparametrického párového Wilcoxonova testu. Tabulka č.2. shrnuje výsledky skupiny A, tedy skupiny užívající probiotika. V tabulce č.3. jsou shrnuty výsledky skupiny B, skupiny užívající placebo. Každý výsledek obsahuje průměrný počet dosažených bodů, směrodatnou odchylku a maximální a minimální dosažený počet bodů. Všechna data jsou uvedena jak z prvního testování, tak z druhého. Dosažená hladina signifikance je v jednotlivých grafech označena následovně: *= $P \leq 0.05$, **= $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.001$. Tabulka č.4. obsahuje vyhodnocení jednotlivých subtestů baterie ALBA skupiny A. Tabulky č.5. a č.6. obsahují výsledky vyhodnocení jednotlivých subtestů baterie ABACO. Signifikantní výsledky jsou znázorněny graficky a podrobně rozebrány na následujících stranách. Porovnávány jsou výsledky prvního testování (čas 1) a druhého testování (čas 2).

Test	Skupina A			
	První testování	Min/max	Druhé testování	Min/max
TKH (0-5)	4,824±0,39	4/5	4,765±0,56	3/5
ABACO (0-35)	27,29±3,33	20/32	25,82±4,08	16/31
RAVLT 1 (0-100 %) **	40,29±26,60	10/90	53,82±24,40	10/90
RAVLT 2 (0-100 %)	39,41±23,31	10/100	49,12±27,85	5/100
TMT A (0-100 %)	48,82±32,43	0/95	55,00±26,16	15/90
TMT B (0-100 %) **	57,65±21,51	15/90	70,88±19,06	35/95
Symbols (0-100 %)	56,41±24,25	16/100	54,62±23,37	25/100
ALBA (0-12) **	9,35±1,37	6/12	7,94±2,22	4/11
Zvířata	23,47±4,85	16/33	23,42±5,49	12/34

Tabulka č.2. Výsledky kognitivních testů skupiny A, v tabulce je uveden průměr ± směrodatná odchylka, v dalším sloupci je uvedeno minimum a maximum dosažené dobrovolníky v jednotlivých testech. ** = $P \leq 0.01$

Test	Skupina B			
	První testování	Min/max	Druhé testování	Min/max
TKH (0-5)	4,5±0,7	3/5	4,389±0,77	3/5
ABACO (0-35)	25,50±6,93	4/33	25,06±7,36	4/33
RAVLT 1 (0-100 %)	50,33±29,66	10/90	52,33±29,66	5/85
RAVLT 2 (0-100 %)	37,83±25,57	0/90	48,06±32,09	0/95
TMT A (0-100 %) *	38,67±49,17	10/90	49,17±26,53	10/90
TMT B (0-100 %)	51,39±19,61	10/80	53,33±21,9	5/80
Symboly (0-100 %)	53,44±27,53	16/95	57,2±23,22	25/99
ALBA (0-12)	8,78±2,67	2/11	7,89±2,63	1/12
Zvířata	23,89±6,49	13/39	24,17±5,61	14/33

Tabulka č.3. Výsledky kognitivních testů skupiny B, v tabulce je uveden průměr ± směrodatná odchylka, v dalším sloupci je uvedeno minimum a maximum dosažené dobrovolníky v jednotlivých testech. *= $P \leq 0.05$

Ze souhrnných dat v tabulce č.1. a v tabulce č.2. lze vyčíst signifikantní výsledek u většiny paměťových testů skupiny A. Konkrétně se jedná o paměťový test učení RAVLT 1 do okamžitého vybavení, $P=0,0088$ ($n=17$, velikost efektu 0,95). Rychlý test paměti ALBA A, $P=0,0027$ ($n=17$, velikost efektu 0,95). Test cesty B (TMT B) $t(16)=3,665$, $P=0021$ ($n=17$, velikost efektu 0,84). Všechny signifikantní výsledky jsou graficky znázorněny a rozepsány níže.

ALBA	Skupina A			
	První testování	Min/max	Druhé testování	Min/max
Věttest vštípení (0-6)	5,82±0,39	5/6	5,77±0,44	5/6
Věttest vybavení (0-6) ***	5,06±1,03	2/6	3,24±1,86	0/6
Tegest předvedení (0-6)	6±0	6/6	6±0	6/6
Tegest vybavení (0-6)	4,29±0,77	3/6	4,71±0,99	3/6

Tabulka č.4. Výsledky jednotlivých subtestů baterie ALBA skupiny A, v tabulce je uveden průměr ± směrodatná odchylka, v dalším sloupci je uvedeno minimum a maximum dosažené dobrovolníky v jednotlivých testech. *** $P \leq 0.001$

Pro větší názornost a pochopení, který z testů, tedy která paměťová složka byla nejvíce ovlivněna, byly na základě signifikance celkového dosaženého skóre v baterii ALBA vyhodnoceny a uvedeny v tabulce č.4. výsledky z jednotlivých subtestů. Signifikantního výsledku bylo dosaženo pouze v subtestu Věttest vybavení, který je graficky znázorněn a popsán níže.

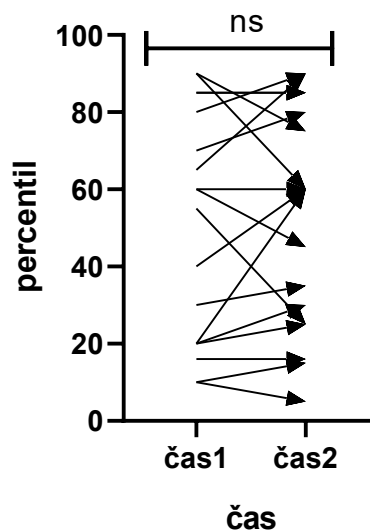
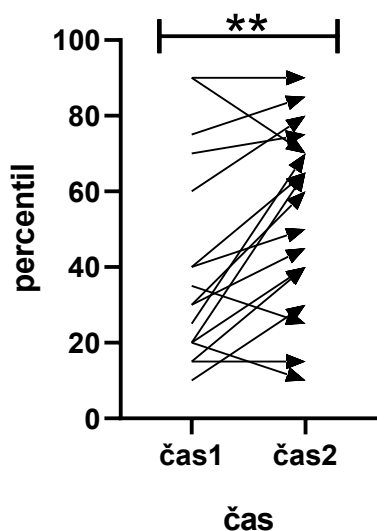
ABACO	Skupina A			
	První testování	Min/max	Druhé testování	Min/max
Okamžité vybavení věty	8,18±1,88	4/10	8,06±1,3	5/10
Oddálené vybavení věty	6,47±1,77	2/9	5,82±1,51	4/9
POBAV	8,82±2,1	2/10	8,24±2,39	2/10

Tabulka č.5. Výsledky jednotlivých subtestů baterie ABACO skupiny A, v tabulce je uveden průměr ± směrodatná odchylka, v dalším sloupci je uvedeno minimum a maximum dosažené dobrovolníky v jednotlivých testech.

ABACO	Skupina B			
	První testování	Min/max	Druhé testování	Min/max
Okamžité vybavení věty	8,44±1,54	5/10	7,33±2,89	0/10
Oddálené vybavení věty	6,39±2,64	0/10	5,72±2,89	0/10
POBAV	8,28±3,01	1/10	8,33±2,98	1/10

Tabulka č.6. Výsledky jednotlivých subtestů baterie ABACO skupiny B, v tabulce je uveden průměr ± směrodatná odchylka, v dalším sloupci je uvedeno minimum a maximum dosažené dobrovolníky v jednotlivých testech.

Baterie PROKOG obsahuje několik paměťových testů, u většiny z nich byly zaznamenány signifikantní změny, z tohoto důvodu jsou zde podrobněji vyhodnoceny subtesty baterie ABACO v tabulce č.5. a tabulce č.6. zaměřené na paměť. U žádného z nich nebyl zaznamenán signifikantní výsledek.

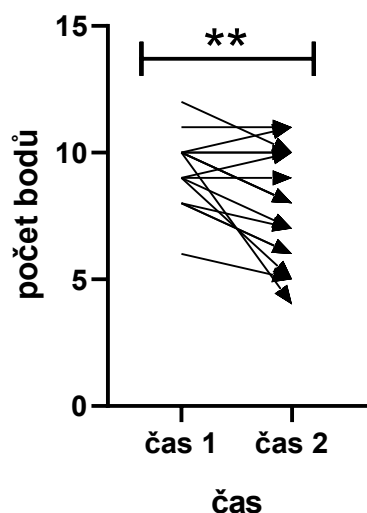


Graf č.1. Percentilové rozložení testu RAVLT 1 skupiny A. Vyhodnoceno Wilcoxonovým párovým testem, $P=0,0088$, $n=17$. Velikost efektu=0,95.

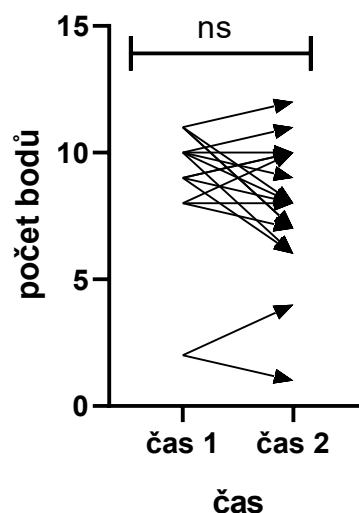
Graf.č.2. Percentilové rozložení testu RAVLT 1 skupiny B. Vyhodnoceno Wilcoxonovým párovým testem, $P=0,6436$, $n=18$. Velikost efektu=0,72.

Signifikantních výsledků bylo dosaženo v testu RAVLT 1 u skupiny A, $P=0,0088$. Velikost efektu pro skupinu čítající 17 dobrovolníků je 0,95, tato hodnota značí nejmenší Cohenovo D, které je při zvoleném nastavení testu možné detekovat jako signifikantní. Podle Cohenovy stupnice byl detekován velký efekt ($\geq 0,8$). Z grafu č.1. je zřejmé výrazné zlepšení většiny dobrovolníků kromě tří, u kterých propad nebyl výrazný. U jednoho z dobrovolníků skupiny A nebyla zaznamenána žádná změna. Test RAVLT 1 obsahuje souhrnný výsledek 1. – 5. pokusu učení první sady patnácti slov, sady A. Percentilové hodnota odpovídá celkové schopnosti verbálního učení a verbální paměti. Percentilové normy jsou pro tento test poměrně široké, norma je mezi 16. – 84. percentilem. Nad percentil 84 je považován podle norem za nadstandardní. Pokud výsledky klesnou pod 16. percentil, dá se verbální paměť testovaného označit jako značně oslabená. Ve skupině A, tedy skupině užívající probiotika, byli identifikováni tři testovaní s podprůměrným výsledkem během prvního testování. Po tříměsíčním užívání probiotik a vlákniny se u dvou z nich výkony v testu RAVLT 1 zlepšily nakolik, že se posunuli do normy. Konkrétně z 15. percentilu na 40., v druhém případě z 15. percentilu na 30., což představuje velký pokrok. Třetí z dobrovolníků se nezlepšil ani nezhoršil a v obou testování dosáhl percentilu 15. Z grafu je názorné, že u třech dobrovolníků došlo ke

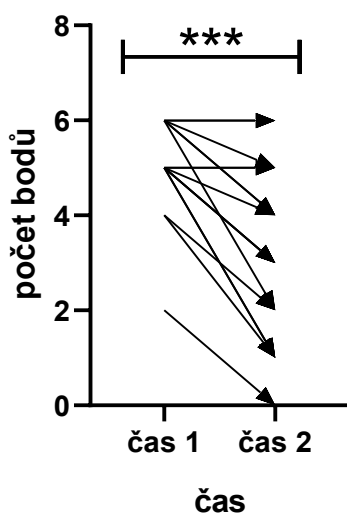
zhoršení, konkrétně se jednalo o pokles z percentilu 90, což je značně nadprůměrný výsledek na percentil 70, který je stále v horní části normy. U dalšího z dobrovolníků byl zaznamenán pokles z percentilu 20 na percentil 10, což odpovídá nedostatečnému výsledku pro splnění norem. U třetího z dobrovolníků došlo k propadu z percentilu 35 a percentil 25, obě hodnoty jsou v normách. V souboru 17 testovaných byly zaznamenány tři výsledky překračující horní normu, tedy nadprůměrně výtečné výsledky, konkrétně se jednalo o percentil 90 při prvním i druhém testování. Druhý z nadprůměrných výsledků byl percentil 75, který se při druhém testování zlepšil na percentil 85 a již zmiňovaný pokles z percentilu 90 na percentil 70. U skupiny B, skupiny užívající probiotika, bylo zaznamenáno pět zhoršených výsledků vzhledem k výkonu při prvním testování. Dva testování nedosahovali normy ani při prvním, ani při druhém testování. Percentil pod normou bývá typickým pro mírnou kognitivní poruchu, která se později může rozvinout do AD. Ze skupiny B dosahovali čtyři dobrovolníci nadprůměrných hodnot, jejich výsledek byl ale podobný jak při prvním testování, tak při druhém. Celkově tedy zaznamenáváme potenciální vliv probiotické suplementace na funkčnost verbální složky paměti. RAVLT 1 umožňuje kvantitativně zhodnotit křivku učení, u kognitivně zdravých osob je křivka učení lineární. Konstrukce křivky učení byla provedena u dobrovolníků s celkovým skórem pod normou. U dvou z nich se objevila nelineární, plochá křivka učení při prvním i druhém testování, což naznačuje kognitivní postižení. Kontrola křivky učení byla provedena z důvodu vyloučení ovlivnění výsledku momentální náladou nebo nepozorností, v těchto případech bývá křivka učení kolísavá. Poruchu funkčnosti mozku naznačují i zvýšené opakování stejných slov, tento ukazatel může být rovněž ve velké míře ovlivněn nepozorností, únavou či jinými emočními vlivy. Nadměrné opakování slov se vyskytovalo u jednoho z dobrovolníků, který dosahoval vysokého percentilu v obou měřeních, pravděpodobně šlo o vnější vliv.



Graf.č.3. Bodové rozložení testu ALBA skupiny A. Vyhodnoceno Wilcoxonovým testem, $P=0,0027$, $n=17$. Velikost efektu=0,95.



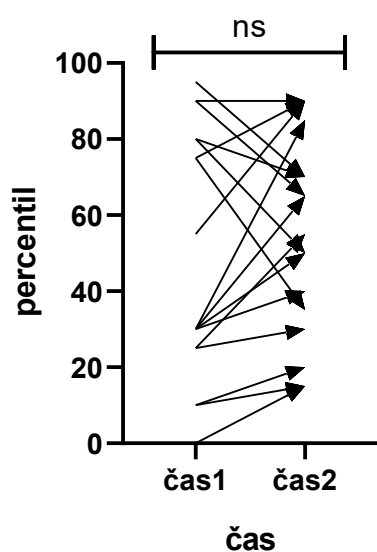
Graf.č.4. Bodové rozložení testu ALBA skupiny B. Vyhodnoceno Wilcoxonovým testem, $P=0,1175$, $n=18$. Velikost efektu=0,72.



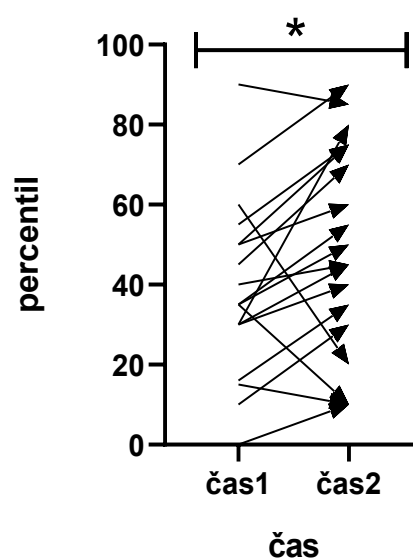
Graf.č.5. Bodové rozložení testu ALBA skupiny A, subtest oddálené vybavení věty. Vyhodnoceno Wilcoxonovým testem, $P=0,0002$, $n=17$. Velikost efektu=1,24.

Signifikantních změn bylo dosaženo v rychlém testu paměti ALBA. U skupiny A došlo k signifikantnímu zhoršení; $P=0,0027$. Velikost efektu pro skupinu čítající 17 dobrovolníků je 0,95. Následně byly vyhodnoceny jednotlivé subtesty pro získání podrobnějších informací.

Signifikantní změna nastala u testu věty, konkrétně následnému vybavení. Věta se skládá z šesti slov, první částí testu je její vštípení (Větest vštípení), tedy přečtení administrátorem a následné okamžité zopakování testovaným. Každé slovo musí být zcela shodné, jiný pád či tvar je hodnocen jako chyba. Následným testem je test epizodické paměti (Tegest), který se opět skládá ze dvou fází, fáze předvedení a fáze vybavení. Zkouška testuje krátkodobou epizodickou paměť a kvalitu porozumění zadanému úkolu. Zkouška má za úkol simulovat běžné životní situace, obsahuje tři skrytých principů. Prvním z nich je druh gest, všechna se týkají lidských smyslů, druhým principem je uspořádání do pomyslné kružnice, chuť, hmat, sluch, zrak, čich. Počet gest odpovídá kapacitě krátkodobé paměti, tedy 6 gest. Norma pro vybavení gest je 4 až 6, což bylo splněno u všech dobrovolníků kromě pěti napříč oběma skupinami. Tegest slouží rovněž jako distraktor. Po něm následuje nejdůležitější a nejtěžší zkouška z tohoto souboru, vybavení věty administrované na začátku testu. Normální je vybavení 3 až 6 správných slov. Ačkoliv došlo v této zkoušce k signifikantnímu zhoršení, stále dosažený průměr splňuje normy zdravého seniora. Celkové skóre baterie ALBA by měl dosahovat 6 až 12 bodů, pokud jedinec nemá žádné kognitivní postižení, čehož bylo v průměru dosaženo jak při prvním, tak při druhém testování.

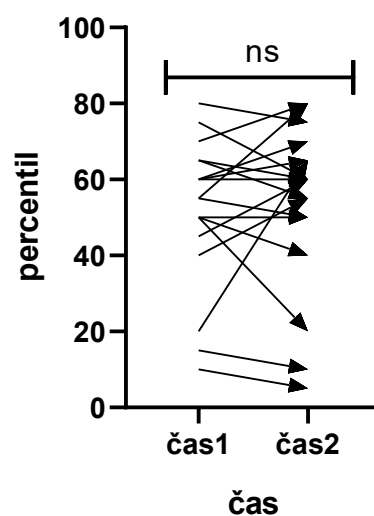
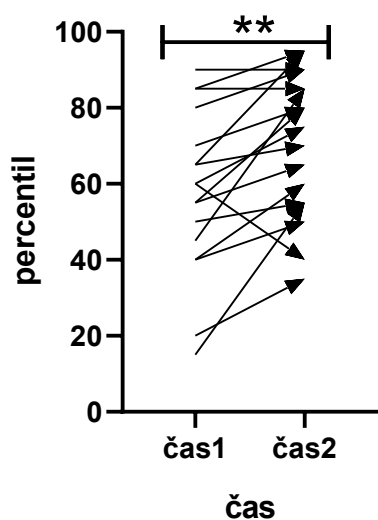


Graf.č.6. Percentilové rozložení testu cesty A skupina A. Vyhodnoceno Wilcoxonovým testem, $P=0,3543$, $n=17$. Velikost efektu=0,74.



Graf.č.7. Percentilové rozložení testu cesty A skupina B. Vyhodnoceno párovým t -testem, $t(17)=2,231$, $P=0,0394$, $n=18$. Velikost efektu=0,72.

Graf.č.6. a Graf č.7. obsahují grafické znázornění dosaženého percentilového skóre v testu cesty varianta A. U skupiny B, tedy skupiny užívající placebo došlo k mírnému zlepšení $t(17)=2,231$, $P=0,0394$. Test cesty je screeningovou zkouškou založenou na citlivé detekci poškození mozku. Testuje komplexní zapojení více psychických funkcí. Zrakové vyhledávání, schopnost zaměření pozornosti a rychlost. Další důležitou složkou, kterou test cesty testuje, je psychomotorické tempo. Pro provedení zkoušky je nutná znalost čísel. V testu cesty A je úkolem probanda spojit čísla od jedné do 25 v co nejrychlejším možném čase. České normy TMT A leží mezi 16. – 84. percentilem. Tyto normy v průměrném výsledku splnila jak skupina A tak skupina B, výjimky jsou uvedeny v diskusi.



Graf.č.8 Bodové rozložení testu cesty B skupina A. Vyhodnoceno párovým t-testem, $t(16)=3,665$, $P=0,0021$, $n=17$. Velikost efektu=0,84.

Graf.č.9. Bodové rozložení testu cesty B skupina B. Vyhodnoceno Wilcoxonovým testem, $p=0,7450$, $n=18$. Velikost efektu=0,72.

Test cesty B zaznamenal signifikantní výsledek u skupiny A, $t(16)=3,665$, $P=0,0021$. Test cesty varianta B je zaměřen na exekutivní funkce, jedná se o výrazně těžší zkoušku oproti variantě A. Testuje schopnost flexibilně střídat paralelní činnosti. Oproti testu cesty A je více zaměřena na mentální flexibilitu a schopnost rozložit pozornost. Velmi dobře je schopen odhalit deterioraci kognitivních funkcí. Pro provedení zkoušky je nutná znalost čísel a abecedy. V testu cesty B je úkolem probanda spojit čísla od jedné do 25 a písmena od A do L. Numerická řada se střídá s alfabetickou, proband tedy spojuje číslo 1 s písmenem A, takto až do čísla 13. v co

nejrychlejším možném čase. České normy TMT A leží mezi 16. – 84. percentilem. Tyto normy v průměrném výsledku splnila jak skupina A tak skupina B, výjimky jsou uvedeny v diskusi.

7.2 Dotazníky psychických funkcí

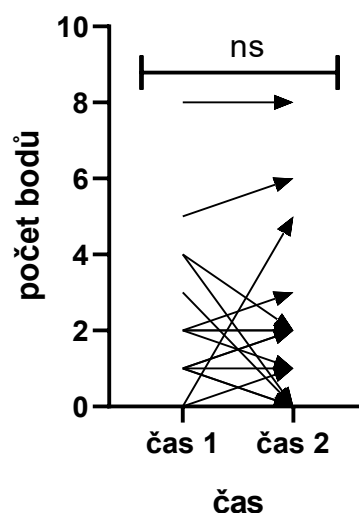
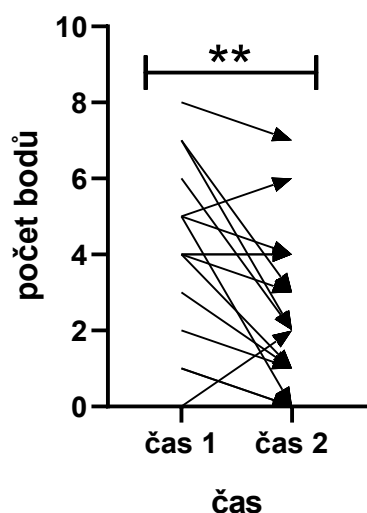
Tabulka č. 7. a č.8. shrnují výsledky dotazníků psychických funkcí skupina A a následně skupiny B. Dotazníky ověřují vliv probiotik na náladu. Všechny dotazníky jsou subjektivním hodnocením stavu testované osoby. Pro zhodnocení soběstačnosti byl použit dotazník funkčního stavu (FAQ-CZ). Nálada byla hodnocena na základě dotazníku Škála ke zhodnocení nálady u starší populace (GDS). Významné negativní události, které by mohli ovlivnit náladu dotyčné osoby, byly posuzovány pomocí dotazníků nežádoucích událostí (DNU). Následně byl zhodnocen duševní stav dobrovolníků pomocí vizuálních škál na zhodnocení paměti (VAS1), zažívání (VAS2), celkového pocitu zdraví (VAS3), kvality spánku (VAS4), pocitu úzkosti (VAS5), fyzické únavy (VAS6) a celkové bolesti (VAS7).

Dotazník	Skupina A			
	První testování	Min/max	Druhé testování	Min/max
GDS (0-15)	3,06±2,30	0/9	2,41±2,03	0/7
BDI-II (0-64)	8,18±4,72	0/16	6,94±6,05	0/20
BAI (0-63)	5,06±4,45	0/15	5,24±4,56	0/16
FAQ (0-100 %)	96,08±4,89	86,67/100	96,47±5,94	80/100
DNU **	3,88±2,45	0/8	2,35±2,12	0/7
VAS1	4,59±2,48	1/9	4,77±1,95	2/8
VAS2	7,53±2,21	3/10	7,65±1,73	4/10
VAS3	6,41±1,91	3/10	6,59±1,66	4/10
VAS4	6,71±2,34	2/10	6,59±2,55	2/9
VAS5	1,18±1,43	0/6	1,0±1,17	0/5
VAS6	3,18±1,78	0/6	3,71±1,8	0/6
VAS7	3,0±2,69	0/8	3,41±2,9	0/9

Tabulka č.7. Výsledky dotazníků skupiny A, v tabulce je uveden průměr ± směrodatná odchylka, v dalším sloupci je uvedeno minimum a maximum dosažené dobrovolníky v jednotlivých dotaznících. ** = $P \leq 0.01$.

Dotazník	Skupina B			
	První testování	Min/max	Druhé testování	Min/max
GDS (0-15)	2,39±1,56	0/5	2,06±1,77	0/6
BDI-II (0-64)	7,50±4,82	0/18	6,89±5,28	0/20
BAI (0-63)	4,94±3,52	0/12	5,44±4,11	0/15
FAQ (0-100 %)	96,85±3,7	86,67/100	96,11±6,59	73,33/100
DNU	2,06±2,1	0/8	1,94±2,29	0/8
VAS1	4,61±2,06	1/10	4,89±1,49	2/9
VAS2	7,5±2,07	3/10	6,5±2,75	1/10
VAS3	7,5±1,95	2/10	7,44±1,65	5/10
VAS4	6,11±2,52	1/10	6,06±2,16	3/10
VAS5	1,67±1,72	0/5	1,67±2,0	0/8
VAS6	2,67±1,82	0/6	2,94±1,83	0/5
VAS7	1,39±1,88	0/6	2,28±2,35	0/7

Tabulka č.8. Výsledky dotazníků skupiny B, v tabulce je uveden průměr ± směrodatná odchylka, v dalším sloupci je uvedeno minimum a maximum dosažené dobrovolníky v jednotlivých dotaznících



Graf.č.10. Bodové rozložení dotazníku nežádoucích událostí (DNU) skupina A. Vyhodnoceno párovým *t*-testem, $t(16)=3,099$, $P=0,0069$, $n=17$. Velikost efektu=0,84.

Graf.č.11. Bodové rozložení dotazníku nežádoucích událostí (DNU) skupina B. Vyhodnoceno Wilcoxonovým testem, $p=0,7759$, $n=18$. Velikost efektu=0,72.

Signifikantního výsledku bylo dosaženo v dotazníku nežádoucích událostí u skupiny A, $t(16)=3,099$, $P=0,0069$. Došlo ke zlepšení, tedy méně nepříjemných událostí v životě dobrovolníků ze skupiny A. Dotazník obsahuje 22 otázek na různé oblasti života. Tři a více nežádoucích událostí mohou významně ovlivnit psychické a následně i zdravotní ukazatele. Ve skupině A zaznamenalo více než tři negativní události v posledním roce 12 testovaných při prvním testování, 7 při druhém. Ve skupině B 5 při prvním testování a 4 při druhém.

7.3 Střevní metabolom

Byla provedena necílená metabolomická analýza 35x2 vzorků stolice. Tedy 35 vzorků odebraných při zahájení studie a 35 vzorků od stejných probandů po 3měsíční probiotické/placebo intervenci. Bylo nalezeno 15 000 potenciálních metabolitů, z toho 3 500 s hodnotou *P* menší než 0,05. Z této skupiny bylo vybráno na základě důkladné literární rešerše 10 metabolitů, na které byla zaměřena pozornost.

Metabolit	m/z	RT	T-value	P-value	průměr skupiny B	průměr skupiny A
DL-Tyrosin	182.0813	0.74	8.59239904	9.15E-11	4380.353	1186.268
kyselina cholová	409.294	12.5	5.94185466	9.77E-07	466.241	203.551
kynurenin	209.0928	1.39	4.08784314	0.00017	66.614	20.6625
kyselina palmitová	257.2483	12.2	3.6947303	0.00054	50.778	86.505
kyselina glutamová	148.0597	0.6	3.70226085	0.0007	192.542	36.095
prostaglandin A2	335.2211	9.63	3.19447239	0.00254	488.925	228.837
leukotrien B4	337.2377	9.92	3.12023998	0.00282	1055.924	569.203
kyselina dihydroxyeicosatrienová (DHETE)	339.2526	10.4	2.8257309	0.00666	624.650	339.178
prostaglandin K2	351.2158	9.16	2.51572038	0.01438	339.343545	207.914159
tryptofan	205.0978	2.02	2.48662103	0.01556	3668.46439	2422.77838

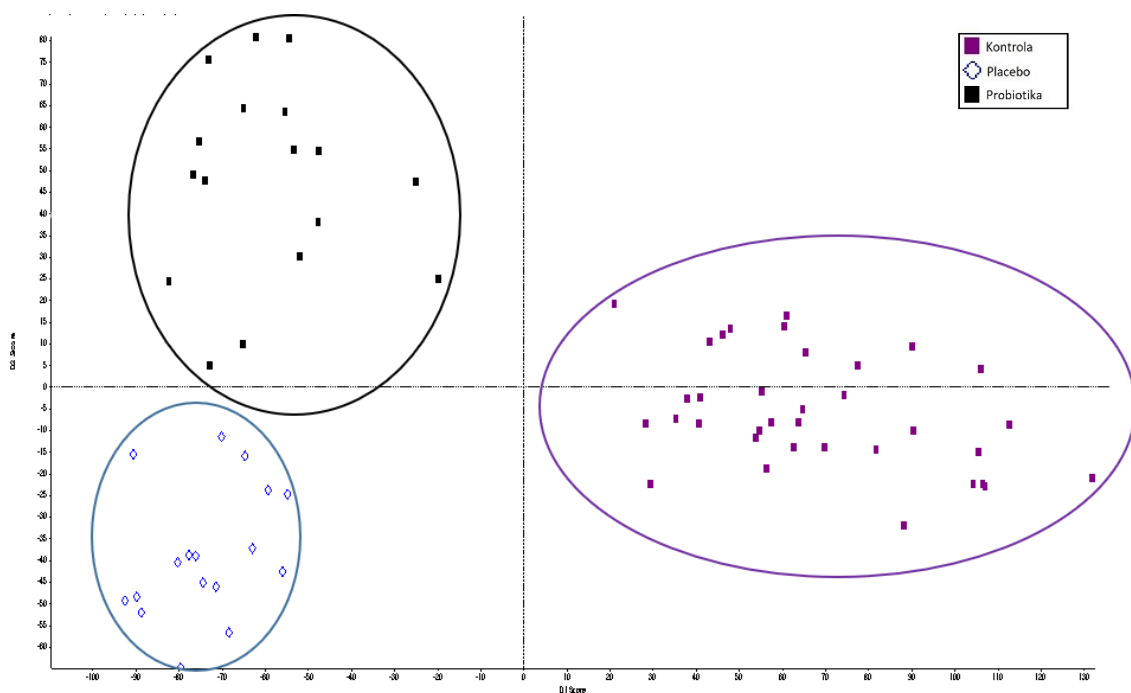
Tabulka č.9. Vybrané fekální metabolity. V tabulce je uvedena intenzita signálu a přesná hmota (poměr m/z), retenční čas v minutách (RT), T-value, P-value a průměrná plocha pod píky. U prostaglandinů, leukotrienů a DHETE se s malou pravděpodobností může jednat o izomery se stejnou hodnotou m/z.

Z hodnoty ploch píků je zřetelný rozdíl v intenzitě metabolitů. Vyšší intenzita je u skupiny B (skupiny užívající placebo) zaznamenána u všech vybraných metabolitů s výjimkou kyseliny palmitové. Čtyřnásobný rozdíl byl zaznamenán u tyrosinu, jehož deriváty jsou biologicky významné látky katecholaminy nebo hormony štítné žlázy. Rovněž je u tyrosinu tento rozdíl nejvíce signifikantní. Kyselina cholová, základní žlučová kyselina, měla ve skupině B (placebo skupině) naměřenou více než dvojnásobnou plochu a rovněž je výsledek vysoce signifikantní. Výrazný rozdíl byl zaznamenán u kynureninu a tryptofanu, oba metabolity patří do metabolismu tryptofanu. Leukotrieny a prostaglandiny, u nichž je rovněž pozorována zvýšená intenzita u skupiny B, se účastní metabolismu kyseliny arachidonové. Zvýšená intenzita byla zaznamenána i u glutamové kyseliny a DHETE.

Metabolická dráha	Celkem	Hity	P-value
Tyrozínový metabolismus	86	46	1.0771E-4
Tryptofanový metabolismus	64	29	0,041
Metabolismus biopterinu	9	6	0,049
Metabolismus mastných kyselin	14	8	0,067
Metabolismus k.arachidonové-prostaglandinová cesta	43	18	0,188
Metabolismus vitamínu B6	7	5	0,051

Tabulka č.10. Výsledky analýzy metabolických cest. Celkový počet označuje počet intermediátů metabolické dráhy. Hity označují narušení metabolické dráhy. P-hodnota je vypočítána na základě enrichment analýzy.

Jak napovídají data z předchozí tabulky, největší změny metabolické dráhy byly přítomny u tyrozínového metabolismu a tryptofanového metabolismu. V případě tyrozínového metabolismu bylo zaznamenáno 46 hitů. V případě tryptofanového metabolismu 26 hitů. Další ze signifikantně změněných drah byl metabolismus biopterinu. S menší signifikancí byla zaznamenána změna v metabolismu mastných kyselin, metabolismu kyseliny arachidonové, konkrétně cyklooxygenázová cesty směrem k prostaglandinům a metabolismu vitamínu B6.



Obr.č.3 Analýza hlavních komponent (PCA) interpolovaných dat tří skupin, probiotické (černě), placebo (modře) a kontrol (fialově). Kontroly jsou výsledky z prvního měření před začátkem užívání probiotik/placeba.

PCA analýza potvrdila rozdíly mezi skupinami a vytvořila tři zřetelně oddělené klastry, přičemž je zcela zřejmé, že určitý efekt měla jak podaná probiotika, tak placebo.

8 Diskuse

Cílem diplomové práce bylo stanovit vliv probiotik složených z bakteriálních kmenů *Streptococcus thermophilus* GH, *Streptococcus salivarius* GH NEXARS, *Lactobacillus plantarum* GH a *Pediococcus pentosaceus* GH na kognitivní funkce, zlepšení zdravotního stavu a zlepšení duševního zdraví u starší populace. Dalším cílem bylo pomocí metabolické analýzy stanovit a identifikovat metabolické dráhy a metabolity vhodné z dalšímu zkoumání. K posouzení kognitivních funkcí bylo použito devět testů, dva z nich obsahovaly více dílčích úloh testující různé kognitivní složky. K posouzení zlepšení duševního zdraví byla použita sada šesti dotazníků. Změny v metabolomu byly měřeny pomocí hmotnostní spektrometrie.

Bylo posuzováno celkem 35 osob, 17 ve skupině A, 18 ve skupině B. Skupina A užívala probiotika a vlákninu, skupina B placebo. Dobrovolníci byli ve věku 55-80 let. Převažovaly starší osoby, průměrný věk byl 70 let. Mezi dobrovolníky převažovali vysokoškolsky vzdělaní lidé, lze tedy předpokládat větší kognitivní trénovanost. Ve skupině zcela chybí jedinci pouze se základním vzděláním, středoškolsky vzdělaní tvoří menšinu. Ve skupině převažovaly ženy. Žádný z dobrovolníků neměl před vstupem do projektu diagnostikovanou poruchu kognitivních funkcí, jeden z dobrovolníků byl v minulosti léčen s depresí. Na základě výsledků z prvního testování byla zaznamenána mírná kognitivní porucha u devíti probandů. U dvou byl zaznamenán závažný pokles kognitivních funkcí.

RAVLT je celosvětově užívaný test, který bývá téměř bez výjimky součástí neuropsychologických vyšetření seniorů (Nikolai et al., 2016). Je zaměřen na epizodickou paměť, která je výrazně narušena u mnoha neurodegenerativních onemocnění včetně Alzheimerovy demence (Gainotti and Marra, 1994). Principem RAVLT je zapamatování delšího seznamu slov, zahrnuje pět opakování jedné sady slov, distrakci pomocí odlišné sady slov. Poté okamžité vybavení první sady slov a velmi důležité oddálené vybavení a rekognici první sady slov. Umožňuje zformulovat křivku učení a pomáhá detekovat paměťové poruchy (Griffin et al., 2017). V České republice existují dvě používané verze, zde byla použita verze první, tedy první Paměťový test učení metodicky upraven doktorem Preissem (Preiss, 1999). RAVLT je nejčastěji užívaným testem verbální paměti (Rabin et al., 2005). Významný vliv věku na výkon v testu je experimentálně potvrzen. Vliv pohlaví nebyl potvrzen, studie věnující se vlivu vzdělání nejsou konzistentní (Bezdicek et al., 2014; Cavaco et al., 2015; Van der Elst et al., 2005; Messinis et al., 2007, 2016; Speer et al., 2014; Vakil et al., 2010). Pro Českou republiku jsou normativní data v roce 1999, získaná na skupině 61 osob ve věku 65-85 let (Preiss, 1999). Normativní data na větším vzorku populace (363 osob) byla vypracována v roce 2018 (Frydrychová et al., 2018). Naše výsledky horizontální analýzy pomocí párového t-testu

případně párového Wilcoxonova testu (porovnání výsledků od stejných osob s probiotikem oproti placebové skupině) ukazují signifikantní zlepšení při výkonu v testu RAVLT 1 ($p=0,0088$) ve skupině A užívající probiotika a vlákninu. RAVLT 1 je souhrnným výsledkem 1. až 5. pokusu učení seznamu slov. Tato data ukazují na potenciální vliv námi vybraných bakteriálních kmenů na zlepšení paměti, v tomto testu konkrétně verbálního učení a verbální paměti. Zajímavým ukazatelem je, že v testu RAVLT 2, tedy následném vybavení seznamu týchž slov po 30 minutách, nedošlo k signifikantní změně u žádné ze skupin (pro skupinu A, $P=0,200$, pro skupinu B, $P=0,057$). To by mohlo značit vyšší efekt retrogradní interference, kdy nově načerpané informace v časové mezeře mezi RAVLT 1 a RAVLT 2 negativně ovlivňují výsledek RAVLT 2. RAVLT 2 je senzitivní k rozpoznání zdravých osob v porovnání s pacienty trpící AD, případně fronto-temporální lobární degenerací. U zdravých jedinců by se výsledek RAVLT 2 neměl výrazně lišit od výkonu v 5. pokusu učení v RAVLT 1. Pokles o více než 3 slova je závažnější a naznačuje oslabení mnestických schopností a rychlejší zapomínání nových informací. K tomuto poklesu došlo u tří dobrovolníků z probiotické skupiny A a u sedmi dobrovolníků z placebo skupiny B. Vzhledem k tomu, že se jedná o horizontální analýzu, lze vyloučit efekt rozdělení skupin. Vstupní kategorizace po prvním vyšetření odpovídala 10 dobrovolníkům bez kognitivního deficitu, u dvou výsledky naznačovaly nulový kognitivní deficit s občasnými výkyvy či deficitem pozornosti, pět spadalo do kategorie mírné kognitivní poruchy (MKP) ve skupině A. Ve skupině B bylo 11 účastníků bez kognitivního deficitu, jeden s občasnými výkyvy pozornosti, 4 u kterých se dá předpokládat MKP a dva dobrovolníci se závažným poklesem kognitivních funkcí. Rozložení je srovnatelné. U dvou dobrovolníků se závažným deficitem i u dobrovolníků s MKP je možné předpokládat rychlejší úpadek kognitivních funkcí. I u tří dobrovolníků ze skupiny A vykazujících zhoršení v testu RAVLT 1 bylo zhoršení pozvolnější než u skupiny B, což naznačuje zpomalení progresu kognitivního deficitu díky probiotické suplementaci i u jedinců s MKP.

Další signifikantní výsledek byl zaznamenán u baterie Amnesia Light and Brief Assessment (ALBA). Pro větší informativní hodnotu a přesnější identifikaci výsledku byly následně vyhodnoceny jednotlivé subtesty baterie ALBA. Signifikance byla zaznamenána u testu vybavení věty (Věttest vybavení), který testuje vědomou a záměrnou slovní paměť. ALBA je původní českou zkouškou používanou pro detekci poruch paměti v klinické praxi. Ke stejnému účelu je používán velmi známý test-Mini-Mental State Examination (MMSE). Tento test námi nebyl zvolen pro jeho limitace, např. neexistenci přesných českých norem. Další limitací je sedmičkový test, který nahrazuje Tegest v baterii ALBA. Sedmičkový test je

test, při kterém administrovaná osoba odečítá číslo sedm pětkrát za sebou. Znevýhodněny jsou tedy osoby, které od mládí mají problémy s počítáním. Proto byl zvolen inovativní test ALBA. Normální skóre z celé baterie je 6 až 12 bodů, zisk 4 až 5 bodů značí mírnou poruchu paměti, méně pak naznačuje závažnou poruchu paměti. Optimální počet bodů pro Větest vybavení je tři až šest správných slov. Hodnoceno je každé správné slovo, tedy ve správném pádu, na pořadí vybavených slov nezáleží. Ve studii prof. Bartoše z roku 2019 získaly zdravé kontrolní starší osoby v tomto testu $4,5 \pm 1,5$ bodů. Pacienti s diagnostikovanou mírnou kognitivní poruchou získali $1,4 \pm 1,7$ bodů (Bartoš, Diondet 2020). V naší studii dosáhli dobrovolníci v prvním testování $5,06 \pm 1,03$ bodů, byli tedy vysoce nad normou (3 až 6 bodů). Při druhém testování se sice průměrné skóre snížilo na $3,24 \pm 1,86$. I toto skóre je ale zcela v normě. Výsledků nesplňujících normu dosáhl v probiotické skupině A v prvním testování jeden testovaný, při druhém testování nesplňovalo normu šest dobrovolníků. Ve skupině B, tedy skupině užívající placebo, při prvním testování nedosahovaly norem dvě osoby, při druhém testování také šest osob. Dá se tedy předpokládat, že příčinou nižšího skóre při druhém testování je přirozený úpadek paměťových schopností osob ve vyšším věku.

Další ze signifikantních výsledků byly zaznamenány u testu cesty (TMT A a TMT B). Test cesty je psychodiagnostický test používaný původně pro armádu k diagnostice mozkových funkcí. Test má více alternativ, některé z nich nahrazují písmena barvami, především aby nedošlo k ovlivnění u pacientů s jinou používanou abecedou, než je latinská. Všichni probandi naší studie byli české národnosti, takže mohl být zvolen test cesty A i B. Pro Českou republiku existují normy vzniklé na základě metaanalýzy z roku 2006 (Preiss and Preiss, 2006). Na základě mnoha studií byl prokázán značný efekt vzdělání, proto obsahují normy i korekční tabulku na základě dosaženého vzdělání. Studie z roku 2009 (Sánchez-Cubillo et al., 2009) pozorovala korelace mezi TMT A a TMT B, naše výsledky toto pozorování nepotvrzují. Podle předchozích studií je test cesty citlivý na psychický stav jedince, momentální náladu a léčiva, je tedy velmi pravděpodobné, že rozdíly zaznamenané u TMT A ve skupině B byl efekt náhodných proměnných, s největší pravděpodobností se ale jedná o statistickou chybu. U TMT byl zaznamenán vliv nácviku na výkon v testu, proto byla získána data korelována s daty z předchozích studií. Po třech týdnech byl vlivem nácviku zlepšen čas o několik sekund (Stuss et al., 2001), po 14-24 týdnech bylo zaznamenáno zlepšení vlivem re-testu o 3 sekundy pouze u TMT B (Bornstein, 1989). Průměrné časové zlepšení skupiny A naší studie je 12,06 s, vliv nácviku lze tedy zamítnout a je možné předpokládat, že probiotika mají pozitivní vliv na exekutivní funkce. Norma pro zdravé osoby je mezi 16.-84. percentilem. Ve skupině A, testu TMT A v prvním kole testování nesplňovaly tři osoby, u jedné z nich došlo v druhém kole

k signifikantnímu zlepšení z percentilu 10 na percentil 20. V testu TMT B byla pod normou jedna osoba, u které rovněž došlo ke zlepšení a zařazení do normy. Ve skupině B, testu TMT A tři osoby nespĺňovaly normou, nedošlo zde ani ke zlepšení, ani ke zhoršení, stejně tak u testu TMT B, kde normu nespĺňovaly dvě osoby při prvním i druhém testování. Druhou zkouškou zaměřenou na exekutivní složku paměti je test symboly, výsledky by tedy měly korelovat, u toho však nedošlo k žádné změně, proto se nedá efekt probiotik na exekutivní složku paměti touto studií zcela prokázat. Do budoucna je třeba věnovat této složce paměti větší pozornost na větším vzorku dobrovolníků.

Z dotazníků psychických funkcí vyšla signifikantní změna u dotazníku nežádoucích událostí (DNU). DNU posuzuje počet a charakter významných negativních událostí za období jednoho roku. Tři a více negativních událostí mohou významně ovlivnit psychický, ale i zdravotní stav. U skupiny došlo k poklesu negativních událostí $t(16)=3,099$, $P=0,0069$. Výsledek ale nekoreluje ani se zlepšením v Beckově inventáři úzkosti (BAI), Beckově sebeposuzovací škále depresivity pro dospělé (BDI-II) a škále ke zhodnocení nálady u starší populace (GDS). Dá se tedy usuzovat, že snížení negativních událostí nemělo vliv na zlepšení nálady jedinců. Zároveň byly odpovědi pravděpodobně silně ovlivněny pandemií COVID-19, což značí velmi vysoké bodové skóre DNU u mnohých dobrovolníků. Limit tří negativních událostí překonalo ze skupiny A 12 osob při prvním testování a 7 osob při druhém testování. Ve skupině B 5 osob při prvním testování a 4 osoby při druhém testování. Pozitivní vliv probiotické suplementace na zlepšení nálady nebyl potvrzen. Otázkou ale zůstává, jak velký vliv v získaných výsledcích hraje pandemie COVID-19, která podle mnoha studií celkově zvýšila úzkostnost a depresivitu obyvatel (Deng et al., 2021).

Na základě necílené analýzy fekálních metabolitů pomocí HLPC-MS/MS se podařilo najít 15 000 metabolitů, z toho 3 500 signifikantně rozdílných. Prostřednictvím literární rešerše bylo vybráno několik zásadních metabolitů účastnících se klíčových metabolických drah. Jednou z fokusovaných drah byl metabolismus kyseliny arachidonové z důvodu úzké souvislosti s pro- a protizánětlivým působením. Narušení metabolické dráhy bylo zaznamenáno především v cyklooxygenázové dráze směrem k prostaglandinům, které působí převážně protizánětlivě. Rozdíl v intenzitě metabolismu leukotrienu B4 byl zaznamenán dvojnásobný u skupiny užívající placebo. Leukotrieny vznikají lipoxygenázovou dráhou metabolismu kyseliny arachidonové a mají převážně prozánětlivý účinek, zvyšují tvorbu cytokinů a přispívají tak k systémovému zánětu. Mírně zvýšená je i intenzita metabolismu cyklooxygenázovou cestou směrem k prostaglandinům, které působí převážně protizánětlivě. Z dat lze předpokládat, že zvýšení intenzity metabolismu prostaglandinů je kompenzačním

mechanismem ke zvýšení intenzity metabolismu leukotrienů. Při vývoji probiotik byla jedním z terapeutických cílů metabolická dráha biosyntézy žlučových kyselin. Úprava metabolické dráhy kyseliny cholové jakožto základní žlučové kyseliny, která má protizánětlivé působení, byla tedy očekávaným výsledkem. Podíl volných žlučových kyselin je závislý na aktivitě hydrolázy žlučových kyselin, která je zprostředkovávána střevním mikrobiomem. Hydrolýza a uvolnění glycinu a taurinu předchází transformaci kyseliny cholové, působením vybraných probiotických kmenů, na sekundární a terciální žlučové kyseliny. Žlučové kyseliny pomáhají trávení a vstřebávání lipidů ve střevě. Jejich dalším účinkem je regulace homeostázy cholesterolu (Heřmánková et al., 2018). Tato data naznačují, že probiotika použitá v této studii mají pozitivní vliv na úpravu mnoha metabolických drah včetně metabolismu kyseliny arachidonové, biosyntézy žlučových kyselin, tryptofanového metabolismu a tyrozinového metabolismu a pomáhají udržet metabolismus směrem k protizánětlivému stavu. PCA analýza rovněž prokázala změny v metabolomu jednotlivých skupin a poukázala nejen na efekt probiotik použitých pro studii, ale i na efekt placebo. Efekt placebo může být vlivem přirozeného zhoršení stavu v pokročilém věku dobrovolníků, mezi prvním, tedy kontrolním odběrem a druhým odběrem byly tři měsíce, během kterých mohlo dojít z přirozeným změnám metabolismu. Dalším možným vlivem je sezónní zhoršení funkčnosti metabolismu, studie byla prováděna od ledna do dubna, kdy dochází u seniorů často k omezení pohybu, snížení rozmanitosti stravy a úbytku příjmu vlákniny vlivem ročního období. Na potvrzení tohoto zjištění by bylo třeba podrobnější cílené analýzy na větším vzorku dobrovolníků. Tato data lze považovat za explorativní s velice slibnými výsledky pro další zkoumání.

Navzdory hromadícím se důkazům o vlivu mikrobioty na kognitivní funkce, úzkost a depresivitu na animálních modelech, studie na lidech jsou poměrně omezené. Studie Akbari a kol., kteří pro svůj výzkum používali probiotický nápoj obsahující *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum* a *Lactobacillus fermentum* po dobu 12 týdnů, také potvrdili vliv vybraných probiotických kmenů na kognitivní funkce. Na rozdíl od naší studie byl ve studii Akbari a kol. použit test k měření kognitivních funkcí MMSE. MMSE je nejčastěji používaným testem pro zhodnocení kognitivních funkcí. Není ale tak citlivý k odhalení mírného kognitivního deficitu a zcela chybí test orientující se na exekutivní funkce, proto byla pro naši studii použita rozsáhlejší testovací baterie. U probiotické skupiny došlo v testu MMSE o zlepšení kognitivních funkcí o $27,90 \pm 8,07$ v porovnání s kontrolami, kteří měli skóre $-5,03 \pm 3,0$, rozdíl mezi skupinami byl statisticky významný ($P < 0,001$). Ze studie bohužel nelze přesněji určit která ze složek, kterou MMSE testuje, byla konkrétně zlepšena. Na základě biochemické analýzy krve byly zaznamenány příznivé účinky na hladinu MDA,

hs-CRP, aktivitu inzulínového metabolismu a hladinu triglyceridů. Změny biomarkerů oxidačního stresu a zánětu, například FPG a dalších lipidových profilů, nebyly prokazatelně signifikantní. Nutno podotknout, že studie byla prováděna na pacientech s již diagnostikovanou AD (Akbari et al., 2016). Studie zkoumající vliv *Bifidobacterium longum* NCC3001 na depresivitu a úzkostnost, obdobně jako naše studie nepotvrdila vliv vybraného bakteriálního kmenu na úzkostnost. Depresivita byla snížena se signifikancí $P=0,04$. Nebyla nalezena výrazná změna ve složení fekální mikrobioty. Analýza pomocí funkční nukleární magnetické resonance prokázala snížení reakce na negativní emocionální podněty v různých oblastech mozku včetně amygdaly a fronto-limbických oblastí (Pinto-Sanchez et al., 2017). Další dvě humánní studie nenalezly žádný efekt probiotik na úzkost a depresi (Benton et al., 2007; Messaoudi et al., 2011). Pět studií, včetně zmiňované studie Akbari a kol., našlo vliv probiotik na kognitivní funkce (pomocí MMSE, nebo „otestuj svoji paměť“ testu (TYM)), redukci malondialdehydu a hs-CRP, pravděpodobně na základě mechanismu snížení úrovně zánětlivých a oxidačních biomarkerů (Agahi et al., 2018; Akbari et al., 2016; Hwang et al., 2019; Kobayashi et al., 2019; Tamtaji et al., 2019a). Studie zkoumající vliv *Lactobacillus acidophilus* LA-5 a *Bifidobacterium lactis* BB na stáří, provedená na myším modelu, pozorovala rozdíly v hladinách dimethylglycinu, sarkosinu, nikotinátu a N-methylnikotinamid v moči. Vzorky stolice vykazovaly změněné hladiny o4-hydroxyfenylacetátu, xylózy a valerátu. Probiotika modulovala metabolismus homocysteinu a NAD, které jsou zapojeny do mnoha buněčných procesů, které se s vyšším věkem mění (Brasili et al., 2013). Studie, stejně jako naše, potvrzují, že probiotická suplementace je podle dosavadních výsledků vhodná pro prevenci a redukci s věkem související metabolické dysfunkce, zlepšení kognitivních funkcí, případně zpomalení progresu kognitivních funkcí. Vliv na úzkost a depresivitu je nejasný.

Jednou z limitací studie je nenáhodný výběr, participantů se do studie hlásili na základě zájmu. Hlavním limitem této práce je nedostatečný počet dobrovolníků, který umožňuje odhalit pouze velký efekt signifikance. U malých či středních efektů není v této studii statistická síla efekt detekovat. U velkého efektu, který je zde detekovatelný, je zvýšená pravděpodobnost falešně pozitivních výsledků. Z důvodů ročního odkladu studie kvůli pandemii COVID-19 nebylo možné zpracovat větší vzorek. V následujících měsících bude přibývat dobrovolníků s ukončenou jak fází I. tak fází II. projektu a bude možné zařadit do analýzy zbývající počet dobrovolníků, který umožní podrobněji rozklíčovat problematiku. Je tedy třeba uvažovat o výsledcích pouze explorativně. Dalším k diskusi vhodným faktem je, že většina testů zaměřených na paměť bylo signifikantních ve prospěch skupiny A, a to kromě testu ALBA (taktéž zaměřeného na paměťovou složku kognitivních funkcí) a paměťových subtestů baterie

ABACO. Tyto testy by při předpokladu náhodného výběru a absenci statistických a jiných chyb měly vyjít konzistentně, aby bylo možné výsledek považovat za naprosto konkluzivní. Další limitací způsobenou pandemií COVID-19 je absence dat z fáze II., ve které dochází k výměně administrovaných tablet u jednotlivých skupin. Po skončení odběrů všech dobrovolníků bude možné provést i longitudinální analýzu o přetrvávání efektu použitých probiotik, což se dá považovat za jednu z nejzajímavějších a potenciálně nejvíce terapeuticky využitelnou informaci. Zároveň bude možné data z kognitivních testů a psychologických dotazníků korelovat s nálezy progresí pohybové aktivity, s nastavením diety, metabolickým a krevním obrazem.

9 Závěr

Zachování fyzického a duševního zdraví závisí na funkčnosti homeostatických systémů těla, nervové, endokrinní a imunitní činnosti. Všechny tyto procesy jsou podle recentních výzkumů spjaté se střevní mikrobiotou a jejími metabolity. Během stárnutí dochází přirozeně k fyziologickým, případně patologickým změnám vedoucím ke snížení funkční kapacity organismu. Největším rizikovým faktorem vzniku chorob spojených se stářím je posun organismu do stavu nízkého stupně zánětu, tedy celkový posun k prozánětlivému stavu. Změny nastávající v imunitním systému, tedy imunosenescence, mohou vést k narušení celkové homeostázy, oxidačnímu stresu a střevní dysbióze. Střevní dysbióza je podle studií z posledních let spojena s rozvojem neurodegenerativních onemocnění včetně snížení kognitivních funkcí. Cílem studie bylo zhodnotit, zda probiotika použitá v této studii mají pozitivní vliv na celkový zdravotní stav, kognitivní funkce a duševní zdraví u 35 dobrovolníků. Dalším z cílů bylo pomocí hmotnostní spektrometrie vytvořit panel biomarkerů doprovázejících změny ve složení fekálního metabolomu po konzumaci probiotik. Ze získaných výsledků se dá usuzovat, že zvolené probiotické kmeny pozitivně ovlivňují paměť, především její epizodickou složku. Subjektivní pocit zlepšení paměti ale u dobrovolníků nebyl zaznamenán. Dále byl zaznamenán pozitivní vliv na exekutivní funkce. Vliv vybraných probiotik na duševní zdraví, snížení úzkosti či depresivity nebyl ve studii potvrzen. Analýza střevních metabolitů naznačila vliv použitých probiotik na nápravu poruch mnoha metabolických cest a správné fungování mikrobioty per se. Největší změna mezi jednotlivými skupinami byla pozorována u tyrosinového metabolismu, tryptofanového metabolismu, metabolismu kyseliny arachidonové a metabolismu biosyntézy žlučových kyselin. Tato pozorování ale nebyla doprovázena subjektivním pocitem zlepšením zažívání, pocitu zdraví, zlepšení spánku ani fyzické únavy.

Studie přináší nejen zajímavé výsledky na poli vědy, má však pozitivní přínos pro jednotlivé dobrovolníky, a to nejen v podobě probiotické suplementace, ale především kompletního vyšetření kognitivních funkcí a zdravotního stavu. Pro větší informační hodnotu bude třeba ve studii pokračovat s větším počtem dobrovolníků s dostatečným množstvím osob jednotlivých seniorských věkových kategorií, různým počtem let vzdělání a s různým počátečním stavem kognitivních a zdravotních funkcí. Nicméně jedná se o jednu z prvních studií zkoumající zcela komplexně dopad vybraných probiotik na fyzické a duševní zdraví.

Především metabolická analýza přináší velmi slibné výsledky, kterým je v budoucí práci třeba věnovat větší pozornosti.

10 Literatura

- Acosta, J.C., O’Loghlen, A., Banito, A., Guijarro, M. V., Augert, A., Raguz, S., Fumagalli, M., Da Costa, M., Brown, C., Popov, N., et al. (2008). Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell* 133, 1006–1018.
- Agahi, A., Hamidi, G.A., Daneshvar, R., Hamdieh, M., Soheili, M., Alinaghypour, A., Taba, S.M.E., and Salami, M. (2018). Does severity of Alzheimer’s disease contribute to its responsiveness to modifying gut microbiota? A double blind clinical trial. *Front. Neurol.* 9.
- Agarwal, S., and Busse, P.J. (2010). Innate and adaptive immunosenescence. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 104, 183–190.
- Akbari, E., Asemi, Z., Daneshvar Kakhaki, R., Bahmani, F., Kouchaki, E., Tamtaji, O.R., Hamidi, G.A., and Salami, M. (2016). Effect of Probiotic Supplementation on Cognitive Function and Metabolic Status in Alzheimer’s Disease: A Randomized, Double-Blind and Controlled Trial. *Front. Aging Neurosci.* 8.
- An, K.S., Choi, Y.O., Lee, S.M., Ryu, H.Y., Kang, S.J., Yeon, Y., Kim, Y.R., Lee, J.G., Kim, C.J., Lee, Y.J., et al. (2019). Ginsenosides Rg5 and Rk1 Enriched Cultured Wild Ginseng Root Extract Bioconversion of *Pediococcus pentosaceus* HLJG0702: Effect on Scopolamine-Induced Memory Dysfunction in Mice. *Nutrients* 11, 1120.
- Baker, D.J., and Petersen, R.C. (2018). Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: Evidence and perspectives. *J. Clin. Invest.* 128, 1208–1216.
- Baltes, P.B., and Lindenberger, U. (1997). Emergence of a powerful connection between sensory and cognitive functions across the adult life span: A new window to the study of cognitive aging? *Psychol. Aging* 12, 12–21.
- Barbour, A., and Philip, K. (2014). Variable Characteristics of Bacteriocin-Producing *Streptococcus salivarius* Strains Isolated from Malaysian Subjects. *PLoS One* 9, e100541.
- Bárcena, C., Valdés-Mas, R., Mayoral, P., Garabaya, C., Durand, S., Rodríguez, F., Fernández-García, M.T., Salazar, N., Nogacka, A.M., Garatachea, N., et al. (2019). Healthspan and lifespan extension by fecal microbiota transplantation into progeroid mice. *Nat. Med.* 25, 1234–1242.
- Bartek, J., and Lukas, J. (2001). Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 738–747.

- Bartoš, A. (2018). Test of gestures (TEGEST) for a brief examination of episodic memory in mild cognitive impairment. *Česká a Slov. Neurol. a Neurochir.* 81/114, 37–44.
- Bartoš, A., and Diondet, S. (2020). Amnesia Light and Brief Assessment (ALBA) test – the second version and repeated examinations. *Česká a Slov. Neurol. a Neurochir.* 83/116, 535–543.
- Beausejour, C.M. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* 22, 4212–4222.
- Belizário, J.E., Napolitano, M., and Mcauliffe, O. (2015). Human microbiomes and their roles in dysbiosis , common diseases , and novel therapeutic approaches. *Front. Microbiol.* 6, 1–16.
- Belkaid, Y., and Hand, T.W. (2014). Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell* 157, 121–141.
- Benton, D., Williams, C., and Brown, A. (2007). Impact of consuming a milk drink containing a probiotic on mood and cognition. *Eur. J. Clin. Nutr.* 61, 355–361.
- Bezdicek, O., Stepankova, H., Moták, L., Axelrod, B.N., Woodard, J.L., Preiss, M., Nikolai, T., Růžička, E., and Poreh, A. (2014). Czech version of Rey Auditory Verbal Learning test: Normative data. *Aging, Neuropsychol. Cogn.* 21, 693–721.
- Bian, G., Gloor, G.B., Gong, A., Jia, C., Zhang, W., Hu, J., Zhang, H., Zhang, Y., Zhou, Z., Zhang, J., et al. (2017). The Gut Microbiota of Healthy Aged Chinese Is Similar to That of the Healthy Young. *MSphere* 2, 1–12.
- Bischof, J., Gärtner, F., Zeiser, K., Kunz, R., Schreiner, C., Hoffer, E., Burster, T., Knippschild, U., and Zimecki, M. (2019). Immune Cells and Immunosenescence. *Folia Biol. (Praha).* 65, 53–63.
- Blagosklonny, M. V. (2003). Cell senescence and hypermitogenic arrest. *EMBO Rep.* 4, 358–362.
- Blaser, M.J. (2016). Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. *Science* (80-.). 352, 544–545.
- Bornstein, R.F. (1989). Exposure and Affect: Overview and Meta-Analysis of Research, 1968-1987. *Psychol. Bull.* 106, 265–289.
- Bosco, N., and Noti, M. (2021). The aging gut microbiome and its impact on host immunity. *Genes Immun.*

- Braat, H., Rottiers, P., Hommes, D.W., Huyghebaert, N., Remaut, E., Remon, J., van Deventer, S.J.H., Neiryck, S., Peppelenbosch, M.P., and Steidler, L. (2006). A Phase I Trial With Transgenic Bacteria Expressing Interleukin-10 in Crohn's Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *4*, 754–759.
- Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A.H.F.M., Schlegelberger, B., Stein, H., Dörken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C.A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* *436*, 660–665.
- Brasili, E., Mengheri, E., Tomassini, A., Capuani, G., Roselli, M., Finamore, A., Sciubba, F., Marini, F., and Miccheli, A. (2013). Lactobacillus acidophilus La5 and bifidobacterium lactis BB12 induce different age-related metabolic profiles revealed by 1H-NMR spectroscopy in urine and feces of mice 1-3. *J. Nutr.* *143*, 1549–1557.
- Bratic, A., and Larsson, N.-G. (2013). The role of mitochondria in aging. *J. Clin. Invest.* *123*, 951–957.
- Brickman, A.M., and Stern, Y. (2009). Aging and Memory in Humans. In *Encyclopedia of Neuroscience*, (Elsevier), pp. 175–180.
- Brooks, C.L., and Gu, W. (2011). The impact of acetylation and deacetylation on the p53 pathway. *Protein Cell* *2*, 456–462.
- Cao, K., Blair, C.D., Faddah, D.A., Kieckhafer, J.E., Olive, M., Erdos, M.R., Nabel, E.G., and Collins, F.S. (2011). Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts. *J. Clin. Invest.* *121*, 2833–2844.
- Cattaneo, A., Cattane, N., Galluzzi, S., Provasi, S., Lopizzo, N., Festari, C., Ferrari, C., Paolo, U., Paghera, B., Muscio, C., et al. (2017). Neurobiology of Aging Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiol. Aging* *49*, 60–68.
- Cavaco, S., Gonçalves, A., Pinto, C., Almeida, E., Gomes, F., Moreira, I., Fernandes, J., and Teixeira-Pinto, A. (2015). Auditory Verbal Learning Test in a Large Nonclinical Portuguese Population. *Appl. Neuropsychol. Adult* *22*, 321–331.
- Chambers, E.S., and Akbar, A.N. (2020). Can blocking inflammation enhance immunity during aging? *J. Allergy Clin. Immunol.* *145*, 1323–1331.
- Chen, L., Huang, S., Lee, L., Davalos, A., Schiestl, R.H., Campisi, J., and Oshima, J. (2003). WRN, the protein deficient in Werner syndrome, plays a critical structural role in optimizing

DNA repair. *Aging Cell* 2, 191–199.

Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.-K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., et al. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436, 725–730.

Claesson, M.J., Jeffery, I.B., Conde, S., Power, S.E., O'Connor, E.M., Cusack, S., Harris, H.M.B., Coakley, M., Lakshminarayanan, B., O'Sullivan, O., et al. (2012). Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 488, 178–184.

Clark, R.I., Salazar, A., Yamada, R., Fitz-Gibbon, S., Morselli, M., Alcaraz, J., Rana, A., Rera, M., Pellegrini, M., Ja, W.W., et al. (2015). Distinct Shifts in Microbiota Composition during *Drosophila* Aging Impair Intestinal Function and Drive Mortality. *Cell Rep.* 12, 1656–1667.

Clarke, S.F., Murphy, E.F., O'Sullivan, O., Lucey, A.J., Humphreys, M., Hogan, A., Hayes, P., O'Reilly, M., Jeffery, I.B., Wood-Martin, R., et al. (2014). Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut* 63, 1913–1920.

Codella, R., Luzi, L., and Terruzzi, I. (2018). Exercise has the guts: How physical activity may positively modulate gut microbiota in chronic and immune-based diseases. *Dig. Liver Dis.* 50, 331–341.

Coppé, J.-P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2008). Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biol.* 6, e301.

Cristofalo, V.J., Allen, R.G., Pignolo, R.J., Martin, B.G., and Beck, J.C. (1998). Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: A reevaluation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 10614–10619.

Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 701–712.

Cuervo, A., Salazar, N., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., and González, S. (2013). Fiber from a regular diet is directly associated with fecal short-chain fatty acid concentrations in the elderly. *Nutr. Res.* 33, 811–816.

Deng, J., Zhou, F., Hou, W., Silver, Z., Wong, C.Y., Chang, O., Huang, E., and Zuo, Q.K. (2021). The prevalence of depression, anxiety, and sleep disturbances in COVID-19 patients: a meta-analysis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1486, 90–111.

- Devkota, S., Wang, Y., Musch, M.W., Leone, V., Fehlner-Peach, H., Nadimpalli, A., Antonopoulos, D.A., Jabri, B., and Chang, E.B. (2012). Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in *Il10^{-/-}* mice. *Nature* 487, 104–108.
- Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2017). Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *J. Physiol.* 595, 489–503.
- Dinan, T.G., Stanton, C., and Cryan, J.F. (2013). Psychobiotics: A novel class of psychotropic. *Biol. Psychiatry* 74, 720–726.
- Dinleyici, E.C., Kara, A., Dalgic, N., Kurugol, Z., Arica, V., Metin, O., Temur, E., Turel, O., Guven, S., Yasa, O., et al. (2015). *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 reduces the duration of diarrhoea, length of emergency care and hospital stay in children with acute diarrhoea. *Benef. Microbes* 6, 415–421.
- Duboc, H., Rajca, S., Rainteau, D., Benarous, D., Maubert, M.A., Quervain, E., Thomas, G., Barbu, V., Humbert, L., Despras, G., et al. (2013). Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and Gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut* 62, 531–539.
- Van der Elst, W., van Boxtel, M.P.J., van Breukelen, G.J.P., and Jolles, J. (2005). Rey's verbal learning test: normative data for 1855 healthy participants aged 24–81 years and the influence of age, sex, education, and mode of presentation. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 11, 290–302.
- Faith, J.J., Guruge, J.L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A.L., Clemente, J.C., Knight, R., Heath, A.C., Leibel, R.L., et al. (2013). The Long-Term Stability of the Human Gut Microbiota. *Science* (80-.). 341, 1237439.
- Finkel, T., and Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247.
- Franceschi, C., Bonafé, M., Valesin, S., OLIVIERI, F., DE LUCA, M., OTTAVIANI, E., and DE BENEDICTIS, G. (2006). Inflamm-aging: An Evolutionary Perspective on Immunosenescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 908, 244–254.
- Fransen, F., van Beek, A.A., Borghuis, T., Aidy, S. El, Hugenholtz, F., van der Gaast – de Jongh, C., Savelkoul, H.F.J., De Jonge, M.I., Boekschoten, M. V., Smidt, H., et al. (2017). Aged Gut Microbiota Contributes to Systemical Inflammaging after Transfer to Germ-Free Mice. *Front. Immunol.* 8, 1–12.
- Frydrychová, Z., Kopeček, M., Bezdicek, O., and Stepankova Georgi, H. (2018). České normy pro revidovaný reyův auditorně-verbální test učení (RAVLT) pro populaci starších osob. *Cesk.*

Psychol. 62, 330–349.

Gainotti, G., and Marra, C. (1994). Some aspects of memory disorders clearly distinguish dementia of the Alzheimer's type from depressive pseudo-dementia. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 16, 65–78.

Garcia-Gonzalez, N., Battista, N., Prete, R., and Corsetti, A. (2021). Health-Promoting Role of *Lactiplantibacillus plantarum* Isolated from Fermented Foods. *Microorganisms* 9, 349.

Ge, X., Ding, C., Zhao, W., Xu, L., Tian, H., Gong, J., Zhu, M., Li, J., and Li, N. (2017). Antibiotics-induced depletion of mice microbiota induces changes in host serotonin biosynthesis and intestinal motility. *J. Transl. Med.* 15, 13.

Goldberg, E.L., and Dixit, V.D. (2015). Drivers of age-related inflammation and strategies for healthspan extension. *Immunol. Rev.* 265, 63–74.

Gottfried, J. (2015). Beckova sebezpozovaci škála depresivity pro dospělé: Recenze metody. *TESTFÓRUM* 4, 20–25.

Griffin, J.W., John, S.E., Adams, J.W., Bussell, C.A., Saurman, J.L., and Gavett, B.E. (2017). The effects of age on the learning and forgetting of primacy, middle, and recency components of a multi-trial word list. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 39, 900–912.

Halliwell, B. (2006). Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol.* 141, 312–322.

Harach, T., Marungruang, N., Duthilleul, N., Cheatham, V., Mc Coy, K.D., Frisoni, G., Neher, J.J., Fåk, F., Jucker, M., Lasser, T., et al. (2017). Reduction of Abeta amyloid pathology in APPPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiota. *Sci. Rep.* 7, 41802.

Harley, C.B., Futcher, A.B., and Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458–460.

Harman, D. (1992). Free radical theory of aging: History. In *Free Radicals and Aging*, (Basel: Birkhäuser Basel), pp. 1–10.

Harman, D. (1994). Aging: Prospects for further increases in the functional life span. *Age* (Omaha). 17, 119–146.

Harman, D. (2001). Aging: Overview. In *Annals of the New York Academy of Sciences*, pp. 1–21.

Hasan, N., and Yang, H. (2019). Factors affecting the composition of the gut microbiota, and

its modulation. *PeerJ* 7, e7502.

Hasher, L., and Zacks, R.T. (1988). Working Memory, Comprehension, and Aging: A Review and a New View. In *Biochemistry*, pp. 193–225.

Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37, 614–636.

Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585–621.

Heřmánková, E., Žák, A., Poláková, L., Hobzová, R., Hromádka, R., and Širc, J. (2018). Polymeric bile acid sequestrants: Review of design, in vitro binding activities, and hypocholesterolemic effects. *Eur. J. Med. Chem.* 144, 300–317.

Hooper, L. V., and Macpherson, A.J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 159–169.

Huang, R., Wang, K., and Hu, J. (2016). Effect of Probiotics on Depression: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutrients* 8, 483.

Huang, T.T., Carlson, E.J., Gillespie, A.M., Shi, Y., and Epstein, C.J. (2000). Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span in mice. *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 55, B5–B9.

Hwang, Y.H., Park, S., Paik, J.W., Chae, S.W., Kim, D.H., Jeong, D.G., Ha, E., Kim, M., Hong, G., Park, S.H., et al. (2019). Efficacy and safety of *Lactobacillus plantarum* C29-fermented soybean (DW2009) in individuals with mild cognitive impairment: A 12-week, multi-center, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Nutrients* 11.

Jakobsson, H.E., Jernberg, C., Andersson, A.F., Sjölund-Karlsson, M., Jansson, J.K., and Engstrand, L. (2010). Short-Term Antibiotic Treatment Has Differing Long-Term Impacts on the Human Throat and Gut Microbiome. *PLoS One* 5, e9836.

Jeffery, I.B., Lynch, D.B., and O’Toole, P.W. (2016). Composition and temporal stability of the gut microbiota in older persons. *ISME J.* 10, 170–182.

Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C., and Jansson, J.K. (2007). Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J.* 1, 56–66.

Jiang, C., Li, G., Huang, P., Liu, Z., and Zhao, B. (2017). The Gut Microbiota and Alzheimer’s Disease. *J. Alzheimer’s Dis.* 58, 1–15.

- Jiang, S., Cai, L., Lv, L., and Li, L. (2021). *Pediococcus pentosaceus*, a future additive or probiotic candidate. *Microb. Cell Fact.* *20*, 45.
- Kim, H.S., Sohn, C., Kwon, M., Na, W., Shivappa, N., Hébert, J.R., and Kim, M.K. (2018). Positive Association between Dietary Inflammatory Index and the Risk of Osteoporosis: Results from the KoGES_Health Examinee (HEXA) Cohort Study. *Nutrients* *10*, 1999.
- Kirkwood, T.B.L., and Austad, S.N. (2000). Why do we age? *Nature* *408*, 233–238.
- Kobayashi, Y., Kinoshita, T., Matsumoto, A., Yoshino, K., Saito, I., and Xiao, J.-Z. (2018). Bifidobacterium Breve A1 Supplementation Improved Cognitive Decline in Older Adults with Mild Cognitive Impairment: An Open- Label, Single-Arm Study. *J. Prev. Alzheimer's Dis.* *1*, 1–6.
- Kobayashi, Y., Kuhara, T., Oki, M., and Xiao, J.-Z. (2019). Effects of Bifidobacterium breve A1 on the cognitive function of older adults with memory complaints: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Benef. Microbes* *10*, 511–520.
- Kowald, A., and Kirkwood, T.B.L. (1996). A network theory of ageing: The interactions of defective mitochondria, aberrant proteins, free radicals and scavengers in the ageing process. *Mutat. Res. - DNAging Genet. Instab. Aging* *316*, 209–236.
- Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 12072–12077.
- Kryscio, R.J., Abner, E.L., Caban-Holt, A., Lovell, M., Goodman, P., Darke, A.K., Yee, M., Crowley, J., and Schmitt, F.A. (2017). Association of Antioxidant Supplement Use and Dementia in the Prevention of Alzheimer's Disease by Vitamin E and Selenium Trial (PREADVISE). *JAMA Neurol.* *74*, 567.
- Lacey, M., and Mistrík, M. (2020). The molecular genetics of cellular senescence in the context of organismal aging. *Cas. Lek. Cesk.* *159*, 88–92.
- Lefevre, M., Racedo, S.M., Ripert, G., Housez, B., Cazaubiel, M., Maudet, C., Jüsten, P., Marteau, P., and Urdaci, M.C. (2015). Probiotic strain *Bacillus subtilis* CU1 stimulates immune system of elderly during common infectious disease period: a randomized, double-blind placebo-controlled study. *Immun. Ageing* *12*, 24.
- Li, H., Qi, Y., and Jasper, H. (2016). Preventing Age-Related Decline of Gut Compartmentalization Limits Microbiota Dysbiosis and Extends Lifespan. *Cell Host Microbe*

19, 240–253.

Light, L.L., Prull, M.W., and Kennison, R.F. (2000). Divided attention, aging, and priming in exemplar generation and category verification. *Mem. Cognit.* 28, 856–872.

Lin, W.C., Lin, F.T., and Nevins, J.R. (2001). Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev.* 15, 1833–1844.

Liu, W.Y., Lu, D.J., Du, X.M., Sun, J.Q., Ge, J., Wang, R.W., Wang, R., Zou, J., Xu, C., Ren, J., et al. (2014). Effect of aerobic exercise and low carbohydrate diet on pre-diabetic non-alcoholic fatty liver disease in postmenopausal women and middle aged men - The role of gut microbiota composition: Study protocol for the AELC randomized controlled trial. *BMC Public Health* 14, 1–11.

Liu, Y.-W., Liong, M.-T., and Tsai, Y.-C. (2018). New perspectives of *Lactobacillus plantarum* as a probiotic: The gut-heart-brain axis. *J. Microbiol.* 56, 601–613.

López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell* 153, 1194–1217.

de Magalhães, J.P., and Passos, J.F. (2018). Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mech. Ageing Dev.* 170, 2–9.

Marchesi, J.R., Adams, D.H., Fava, F., Hermes, G.D.A., Hirschfield, G.M., Hold, G., Quraishi, M.N., Kinross, J., Smidt, H., Tuohy, K.M., et al. (2016). The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut* 65, 330–339.

Marcial, G., Messing, J., Menchicchi, B., Goycoolea, F.M., Faller, G., Graciela, F. de V., and Hensel, A. (2013). Effects of polysaccharide isolated from *Streptococcus thermophilus* CRL1190 on human gastric epithelial cells. *Int. J. Biol. Macromol.* 62, 217–224.

McHugh, D., and Gil, J. (2018). Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J. Cell Biol.* 217, 65–77.

Medawar, P.B. (1952). *An unsolved problem of biology* (College).

Menees, S.B., Maneerattannaporn, M., Kim, H.M., and Chey, W.D. (2012). The Efficacy and Safety of Rifaximin for the Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 107, 28–35.

Messaoudi, M., Violle, N., Bisson, J.-F., Desor, D., Javelot, H., and Rougeot, C. (2011). Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in healthy human volunteers. *Gut Microbes* 2, 256–261.

- Messinis, L., Tsakona, I., Malefaki, S., and Papathanasopoulos, P. (2007). Normative data and discriminant validity of Rey's Verbal Learning Test for the Greek adult population. *Arch. Clin. Neuropsychol. Off. J. Natl. Acad. Neuropsychol.* 22, 739–752.
- Messinis, L., Nasios, G., Mougias, A., Politis, A., Zampakis, P., Tsiamaki, E., Malefaki, S., Gourzis, P., and Papathanasopoulos, P. (2016). Age and education adjusted normative data and discriminative validity for Rey's Auditory Verbal Learning Test in the elderly Greek population. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 38, 23–39.
- Miller, L.E., Lehtoranta, L., and Lehtinen, M.J. (2019). Short-term probiotic supplementation enhances cellular immune function in healthy elderly: systematic review and meta-analysis of controlled studies. *Nutr. Res.* 64, 1–8.
- Molinari, M., Mercurio, C., Dominguez, J., Goubin, F., and Draetta, G.F. (2000). Human Cdc25 A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis. *EMBO Rep.* 1, 71–79.
- Mueller, S., Saunier, K., Hanisch, C., Norin, E., Alm, L., Midtvedt, T., Cresci, A., Silvi, S., Orpianesi, C., Verdenelli, M.C., et al. (2006). Differences in Fecal Microbiota in Different European Study Populations in Relation to Age, Gender, and Country: a Cross-Sectional Study. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1027–1033.
- Nakamura, A.J., Chiang, Y.J., Hathcock, K.S., Horikawa, I., Sedelnikova, O.A., Hodes, R.J., and Bonner, W.M. (2008). Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence. *Epigenetics Chromatin* 1, 6.
- Nikolai, T., Štěpánková, H., Vyhnálek, M., and Kopeček, M. (2016). Neuropsychologická diagnostika kognitivního deficitu ve stáří. *Cesk. Psychol.* 60, 525–541.
- Nikolich-Zugich, J. (2018). The twilight of immunity: emerging concepts in aging of the immune system. *Nat. Immunol.* 19, 10–19.
- O'Connor, A., and O'Moráin, C. (2014). Digestive Function of the Stomach. *Dig. Dis.* 32, 186–191.
- Odamaki, T., Kato, K., Sugahara, H., Hashikura, N., Takahashi, S., Xiao, J., Abe, F., and Osawa, R. (2016). Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol.* 16, 90.
- Ou, H., and Schumacher, B. (2018). DNA damage responses and p53 in the aging process. *Blood* 131, 488–495.

- Parrinello, S., Coppe, J.-P., Krtolica, A., and Campisi, J. (2005). Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J. Cell Sci.* *118*, 485–496.
- Pedersen, J.B. (1993). The psychological process of ageing. What does it mean to get old? *Nord. J. Psychiatry* *47*, 49–51.
- Pérez, V.I., Van Remmen, H., Bokov, A., Epstein, C.J., Vijg, J., and Richardson, A. (2009). The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice. *Aging Cell* *8*, 73–75.
- Peters, H.P., De Vries, W.R., Vanberge-Henegouwen, G.P., and Akkermans, L.M. (2001). Potential benefits and hazards of physical activity and exercise on the gastrointestinal tract. *Gut* *48*, 435–439.
- Pilonis, G.B.S.N., Raboch, R.P.J., and Kream, M.V.R.M. (2018). Gut , Microbiome , and Brain Regulatory Axis : Relevance to Neurodegenerative and Psychiatric Disorders. *Cell. Mol. Neurobiol.* *38*, 1197–1206.
- Pinto-Sanchez, M.I., Hall, G.B., Ghajar, K., Nardelli, A., Bolino, C., Lau, J.T., Martin, F.-P., Cominetti, O., Welsh, C., Rieder, A., et al. (2017). Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 Reduces Depression Scores and Alters Brain Activity: A Pilot Study in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* *153*, 448-459.e8.
- Preiss, M. (1999). Paměťový test učení: manuál pro dospělé a děti. Brno Psychodiagnostika.
- Preiss, M., and Preiss, J. (2006). Test cesty. Trail Making Test. Manual in Czech. Bratislava: Psychodiagnostika.
- Qu, H., Zhang, Y., Chai, H., Gao, Z., and Shi, D. (2019). Effects of microbiota-driven therapy on inflammatory responses in elderly individuals: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* *14*, e0211233.
- Quigley, E.M.M. (2019). Prebiotics and Probiotics in Digestive Health. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *17*, 333–344.
- Rabin, L.A., Barr, W.B., and Burton, L.A. (2005). Assessment practices of clinical neuropsychologists in the United States and Canada: a survey of INS, NAN, and APA Division 40 members. *Arch. Clin. Neuropsychol.* *20*, 33–65.
- Rhodus, N.L., and Brown, J. (1990). The association of xerostomia and inadequate intake in older adults. *J. Am. Diet. Assoc.* *90*, 1688–1692.

- Rönnlund, M., Nyberg, L., Bäckman, L., and Nilsson, L.-G. (2005). Stability, growth, and decline in adult life span development of declarative memory: cross-sectional and longitudinal data from a population-based study. *Psychol. Aging* *20*, 3–18.
- Rubinsztein, D.C., Mariño, G., and Kroemer, G. (2011). Autophagy and aging. *Cell* *146*, 682–695.
- Rul, F., Ben-Yahia, L., Chegdani, F., Wrzosek, L., Thomas, S., Noordine, M.-L., Gitton, C., Cherbuy, C., Langella, P., and Thomas, M. (2011). Impact of the Metabolic Activity of *Streptococcus thermophilus* on the Colon Epithelium of Gnotobiotic Rats. *J. Biol. Chem.* *286*, 10288–10296.
- Sabino, J., Vieira-Silva, S., Machiels, K., Joossens, M., Falony, G., Ferrante, M., Van Assche, G.A., Van Der Merwe, S., Matthys, C., Raes, J., et al. (2017). Therapeutic Manipulation of the Gut Microbiota Through Diet to Reduce Intestinal Inflammation: Results from the FIT Trial. *Gastroenterology* *152*, S1.
- Salthouse, T.A. (1996). The processing-speed theory of adult age differences in cognition. *Psychol. Rev.* *103*, 403–428.
- Santocchi, E., Guiducci, L., Fulceri, F., Billeci, L., Buzzigoli, E., Apicella, F., Calderoni, S., Grossi, E., Morales, M.A., and Muratori, F. (2016). Gut to brain interaction in Autism Spectrum Disorders: a randomized controlled trial on the role of probiotics on clinical, biochemical and neurophysiological parameters. *BMC Psychiatry* *16*, 183.
- Santra, M., Dill, K.A., and de Graff, A.M.R. (2019). Proteostasis collapse is a driver of cell aging and death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *116*, 22173–22178.
- Scheperjans, F., Aho, V., Pereira, P.A.B., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E., Haapaniemi, E., Kaakkola, S., Eerola-Rautio, J., Pohja, M., et al. (2015). Gut microbiota are related to Parkinson’s disease and clinical phenotype. *Mov. Disord.* *30*, 350–358.
- Schlegel, P., Novotny, M., Klimova, B., and Valis, M. (2019). “Muscle-Gut-Brain Axis”: Can Physical Activity Help Patients with Alzheimer’s Disease Due to Microbiome Modulation? *J. Alzheimer’s Dis.* *71*, 861–878.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* *88*, 593–602.
- Smith, P., Willemsen, D., Popkes, M., Metge, F., Gandiwa, E., Reichard, M., and Valenzano,

- D.R. (2017). Regulation of life span by the gut microbiota in the short-lived African turquoise killifish. *Elife* 6, 1–26.
- Smith, P.M., Howitt, M.R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C.A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J.N., and Garrett, W.S. (2013). The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis. *Science* (80-.). 341, 569–573.
- Soenen, S., Rayner, C.K., Horowitz, M., and Jones, K.L. (2015). Gastric Emptying in the Elderly. *Clin. Geriatr. Med.* 31, 339–353.
- Soenen, S., Rayner, C.K., Jones, K.L., and Horowitz, M. (2016). The ageing gastrointestinal tract. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 19, 12–18.
- Speer, P., Wersching, H., Bruchmann, S., Bracht, D., Stehling, C., Thielsch, M., Knecht, S., and Lohmann, H. (2014). Age- and gender-adjusted normative data for the German version of Rey’s Auditory Verbal Learning Test from healthy subjects aged between 50 and 70 years. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 36, 32–42.
- Spinler, J.K., Sontakke, A., Hollister, E.B., Venable, S.F., Oh, P.L., Balderas, M.A., Saulnier, D.M.A., Mistretta, T.-A., Devaraj, S., Walter, J., et al. (2014). From Prediction to Function Using Evolutionary Genomics: Human-Specific Ecotypes of *Lactobacillus reuteri* Have Diverse Probiotic Functions. *Genome Biol. Evol.* 6, 1772–1789.
- Stuss, D.T., Bisschop, S.M., Alexander, M.P., Levine, B., Katz, D., and Izukawa, D. (2001). The trail making test: A study in focal lesion patients. *Psychol. Assess.* 13, 230–239.
- Tamtaji, O.R., Heidari-soureshjani, R., Mirhosseini, N., Kouchaki, E., Bahmani, F., Aghadavod, E., Tajabadi-Ebrahimi, M., and Asemi, Z. (2019a). Probiotic and selenium co-supplementation, and the effects on clinical, metabolic and genetic status in Alzheimer’s disease: A randomized, double-blind, controlled trial. *Clin. Nutr.* 38, 2569–2575.
- Tamtaji, O.R., Taghizadeh, M., Daneshvar Kakhaki, R., Kouchaki, E., Bahmani, F., Borzabadi, S., Oryan, S., Mafi, A., and Asemi, Z. (2019b). Clinical and metabolic response to probiotic administration in people with Parkinson’s disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin. Nutr.* 38, 1031–1035.
- Tanabe, S. (2011). Suppression of Th17 response by *Streptococcus thermophilus* ST28 through induction of IFN- γ . *Int. J. Mol. Med.* 28, 817–822.
- The integrative HPM (2014). The Integrative Human Microbiome Project: Dynamic Analysis of Microbiome-Host Omics Profiles during Periods of Human Health and Disease. *Cell Host*

Microbe 16, 276–289.

Thomas, R., Wang, W., and Su, D.-M. (2020). Contributions of Age-Related Thymic Involution to Immunosenescence and Inflammaging. *Immun. Ageing* 17, 2.

Tillisch, K., Labus, J., Kilpatrick, L., Jiang, Z., Stains, J., Ebrat, B., Guyonnet, D., Legrain–Raspaud, S., Trotin, B., Naliboff, B., et al. (2013). Consumption of Fermented Milk Product With Probiotic Modulates Brain Activity. *Gastroenterology* 144, 1394–1401.e4.

Ulrich, P., and Cerami, A. (2001). Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog. Horm. Res.* 56, 1–21.

Vakil, E., Greenstein, Y., and Blachstein, H. (2010). Normative Data for Composite Scores for Children and Adults Derived from the Rey Auditory Verbal Learning Test. *Clin. Neuropsychol.* 24, 662–677.

Vesty, A., Gear, K., Boutell, S., Taylor, M.W., Douglas, R.G., and Biswas, K. (2020). Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of oral probiotic *Streptococcus salivarius* M18 on head and neck cancer patients post-radiotherapy: a pilot study. *Sci. Rep.* 10, 13201.

Wilmanski, T., Diener, C., Rappaport, N., Patwardhan, S., Wiedrick, J., Lapidus, J., Earls, J.C., Zimmer, A., Glusman, G., Robinson, M., et al. (2021). Gut microbiome pattern reflects healthy ageing and predicts survival in humans. *Nat. Metab.* 3, 274–286.

Xu, C., Zhu, H., and Qiu, P. (2019). Aging progression of human gut microbiota. *BMC Microbiol.* 19, 1–10.

Yang, W., and Hekimi, S. (2010). A Mitochondrial Superoxide Signal Triggers Increased Longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol.* 8, e1000556.

Yin, D., and Chen, K. (2005). The essential mechanisms of aging: Irreparable damage accumulation of biochemical side-reactions. *Exp. Gerontol.* 40, 455–465.

Young, K.W.H., and Greenwood, C.E. (2001). Shift in Diurnal Feeding Patterns in Nursing Home Residents With Alzheimer’s Disease. *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 56, M700–M706.

De Zwart, L.L., Meerman, J.H.N., Commandeur, J.N.M., and Vermeulen, N.P.E. (1999). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 202–226.