



**Università
degli Studi
di Ferrara**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
" Scienze biomediche e biotecnologiche "**

CICLO XXXVI

COORDINATRICE/COORDINATORE Prof. Pinton Paolo

**L' Irrigazione Trans-Anale nei pazienti con
Malattia di Parkinson: efficacia e sicurezza nel
trattamento della stipsi correlata alla malattia,
impatto sul microbiota intestinale e sui disordini del
movimento**

Settore Scientifico Disciplinare Med/18

Dottoranda/o

Dott. Chimisso Laura

(firma)

Tutore

Prof. Carcoforo Paolo

(firma)

Anni 2020/2024

Indice:

1. Introduzione	pag.1
2. Obiettivi	pag.5
3. Materiali e metodi	pag.5
4. Risultati	pag. 10
5. Discussione	pag. 21
6. Conclusioni	pag. 24
7. Bibliografia	pag. 25

L' Irrigazione Trans-Anale nei pazienti con Malattia di Parkinson: efficacia e sicurezza nel trattamento della stipsi correlata alla malattia, impatto sul microbiota intestinale e sui disordini del movimento.

Introduzione:

La Malattia di Parkinson (MP) è una patologia neurodegenerativa del sistema nervoso centrale descritta da James Parkinson nel 1817 in "Eassay on the Shaking Palsy" (1). Lo stesso James Parkinson la descrive come una patologia complessa, progressiva e disabilitante, indicandone una possibile terapia di guarigione con il progredire della scienza. Ad oggi, più di 200 anni dopo, non c'è un trattamento specifico per bloccare la progressione della neuro-degenerazione ed inoltre l'incidenza e prevalenza della malattia sono in continuo incremento.

L'incidenza varia da 5 a 35 su 100.000 abitanti anno, aumenta progressivamente con l'avanzare dell'età, circa di 5-10 volte dalla 6° alla 9° decade di vita (2). Infatti, parallelamente all'aumento dell'aspettativa di vita globale si registra un notevole incremento dei casi di MP. In aggiunta, le nuove metodiche diagnostiche, la maggior attenzione verso i sintomi della malattia e probabilmente anche il maggior inquinamento ambientale favoriscono un aumento della diagnosi (3).

L'eziologia è multifattoriale ed è il risultato della combinazione tra fattori ambientali e genetici. L'esposizione ad agenti chimici tossici e i traumi cranici ripetuti incrementano il rischio di sviluppare malattia. Anche la genetica ha un ruolo favorente: mutazioni mendeliane portano a parkinsonismi monogenici (5-10%); un'alta percentuale di mutazioni genetiche associate alla MP (polimorfismi) presenta una penetranza incompleta, sottolineando come altri fattori ambientali e genetici contribuiscano all'evoluzione clinica (4). Nei gemelli omozigoti e dizigoti il rischio di sviluppare MP è maggiore solo del 30% e aumenta se il gemello affetto presenta i sintomi prima dei

40 anni; questo suggerisce come il rischio di sviluppare MP sia prevalentemente correlato a fattori comportamentali ed ambientali (5).

Sul piano patogenetico, la MP è caratterizzata da accumulo di alfa-sinucleina a livello neuronale con la successiva formazione dei corpi di Lewy. La diagnosi viene posta dopo l'esordio delle manifestazioni motorie della malattia che occorrono quando vi è la perdita di una buona percentuale di neuroni dopaminergici a carico della pars compatta della sostanza nera (SN) mesencefalica. Segni cardini per la diagnosi sono la presenza di bradicinesia (lentezza nell'esecuzione del movimento associato a decremento di velocità e ampiezza nei movimenti ripetitivi), rigidità plastica (incremento del tono muscolare a carico dei muscoli flessori durante la mobilizzazione passiva), tremore a riposo asimmetrico e instabilità posturale.

Tuttavia, secondo la teoria di Braak, la perdita neuronale inizia molti anni prima delle manifestazioni motorie, manifestandosi come danno a carico dei neuroni del plesso enterico, del bulbo olfattorio, ipotalamici e della formazione reticolare, determinando lo stadio 1 e 2 di Braak. Sul piano clinico, infatti, i pazienti affetti da MP manifestano anche diversi anni prima sintomi non motori, quali ipo-anosmia, deflessione del tono dell'umore, disordini autonomici, disturbo del sonno REM, nicturia e stipsi (6). Quest'ultima persiste e peggiora con il decorso della malattia ma si manifesta anche 20 anni prima delle manifestazioni motorie, sottolineando l'interessamento del sistema nervoso enterico e del nucleo motore dorsale del vago in questa alfa-sinucleinopatia (7).

La stipsi è il principale e più disabilitante sintomo non motorio nella MP. La sua prevalenza varia dal 24,6% a 63% a seconda dei differenti criteri diagnostici utilizzati (8).

Nel Parkinson la stipsi è maggiormente correlata ad un rallentamento del transito colico o ad una dissinergia pubo-rettale. Il concomitante utilizzo di farmaci antiparkinsoniani, antidepressivi e antidolorifici può peggiorarne il quadro.

Un adeguato trattamento della stipsi è necessario per prevenire complicanze come l'occlusione intestinale e assicurare un'ottimale risposta alla terapia antiparkinsoniana oltre che migliorare la qualità della vita del paziente.

Tra le opzioni terapeutiche, analogamente ad altre condizioni di intestino neurologico, l'irrigazione transanale (TAI) risulta particolarmente indicata nel caso di scarsa risposta ai convenzionali trattamenti conservativi, risultando vincente in termini di efficacia e di costi riguardanti la gestione dei sintomi da parte del paziente (9).

Altro aspetto interessante nella MP è rappresentato dalla composizione del microbiota intestinale. È noto come la composizione del microbiota intestinale (MI) influenzi il transito e come la stipsi possa essere causata da alterazioni del microbiota stesso (10). Recenti studi hanno evidenziato come una modifica nella composizione del MI potrebbe avere un ruolo determinante nella patogenesi della MP facilitando la caratteristica progressione della neurodegenerazione ascendente, ovvero l'accumulo degli aggregati di alfa-sinucleina dal plesso mioenterico al sistema nervoso centrale (7). Si ipotizza, inoltre, che la composizione batterica del MI sia correlata al fenotipo clinico della MP in quanto l'abbondanza di enterobatteri sembra correlata con la severità dell'instabilità posturale e delle difficoltà deambulatorie (11).

La modifica del MI negli anni di malattia, influenzata da modifiche alimentari (riduzione di apporto proteico) e assunzione di farmaci, così come gli stessi farmaci, incrementano la severità del quadro stitico (8).

Nella MP il rallentamento del transito colico induce stipsi e rallenta l'assorbimento di levodopa. Con il progredire della malattia, l'incremento della stipsi e la maggior perdita di neuroni dopaminergici, richiedono un continuo incremento dei dosaggi di dopaminoagonisti, aumentando il rischio di eventi avversi.

Il trattamento della stipsi potrebbe quindi comportare una riduzione della terapia con levodopa (che è alla base di diverse complicanze motorie (discinesie) e non motorie (allucinazioni)), così come potrebbe comportare un miglioramento del sintomo stesso e della qualità di vita del paziente, nonché influenzare l'evoluzione e la progressione della malattia modificando la composizione del MI.

Attualmente il trattamento della stipsi nella MP è farmacologico, con utilizzo di procinetici appartenenti a diverse classi. Non vi è una preferenza statistica tra le opzioni terapeutiche (12).

Tra le terapie, oltre le variazioni dietetiche e l'utilizzo di farmaci lassativi, l'irrigazione colica transanale (TAI) rappresenta una valida opzione per il controllo dei sintomi ed il mantenimento di un regolare transito intestinale.

La TAI è progettata per aiutare l'evacuazione e lo svuotamento colico introducendo acqua attraverso l'ano. L'acqua viene introdotta utilizzando un catetere flessibile che, una volta rimosso, consente di eseguire l'evacuazione stimolando l'espulsione del contenuto rettale e sigmoideo fino al colon discendente. Svuotando regolarmente l'intestino, la TAI ha lo scopo di aiutare a ristabilire il controllo sulla funzione intestinale consentendo al paziente di scegliere il tempo e il luogo dell'evacuazione. La TAI rappresenta un pratica sicura ed efficace nel trattamento dei sintomi dell'intestino neurologico, con ottimi risultati ottenuti negli ultimi anni anche in termini di miglioramento della qualità di vita (9).

Nei pazienti affetti da MP in cui la stipsi è quasi sempre presente, l'evacuazione regolare della regione retto- sigmoidea può promuovere il transito intestinale prevenendo fenomeni occlusivi o fecalomi (13).

Basandoci su queste premesse, risulta necessario incrementare le metodiche di trattamento della stipsi nei pazienti affetti da MP, sia per un miglioramento della qualità di vita sia per ottimizzare la

normale flora microbica intestinale, che sembra avere un ruolo primitivo nell'inizio e progressione della malattia (7, 10-11).

Inoltre, il miglioramento dello svuotamento intestinale, potrebbe incrementare la cinesi gastroenterica, favorendo l'assorbimento della terapia dopaminergica, utilizzando quindi una minor quantità di farmaco e riducendo i possibili effetti avversi della stessa.

Obiettivi:

- Primario: Valutare l'efficacia clinica dell'Irrigazione Trans-Anale (TAI) nel trattamento della stipsi e dei sintomi motori nei pazienti con Malattia di Parkinson, sia in fase iniziale - intermedia che avanzata;
- Secondario:
 - a) valutare la correlazione tra la composizione del microbiota nei pazienti affetti da PD rispetto alla composizione basale di un individuo italiano sano e valutare le variazioni del microbiota prima e dopo l'utilizzo della TAI;
 - b) valutare una eventuale variazione dei sintomi e necessità di riduzione di terapia dopaminergica prima e dopo TAI.

Materiali e metodi:

Questo è uno studio prospettico, osservazionale, di coorte condotto presso l'Università degli Studi di Ferrara (U.O.C. Neurologia e U.O.C. Chirurgia Generale) con la collaborazione del Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie dell'Università di Bologna.

Sono stati valutati tutti pazienti affetti da MP afferiti presso l'Ambulatorio Neurologico dell'Arcispedale Sant'Anna di Cona (Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara) tra Luglio 2022 e Luglio 2023. I pazienti con stipsi da moderata a grave (Wexner score ≥ 6) sono stati inviati presso

l'Ambulatorio Proctologico della U.O.C. di Chirurgia Generale per valutazione coloproctologica. A tutti i pazienti è stata proposta l'Irrigazione Colica Trans Anale, spiegando loro le finalità dello studio ed ottenendo il consenso informato. La TAI è quindi stata eseguita nei pazienti che hanno accettato la procedura, i restanti pazienti sono stati trattati con terapia sintomatica (lassativi, osmotici) e sono stati somministrati i questionari specifici e di qualità di vita. È stato inoltre chiesto ai pazienti di fornire un campione fecale alla prima visita e in quelli che hanno accettato di sottoporsi alla TAI, a 6 mesi dall' utilizzo.

Criteri di inclusione:

- diagnosi di Malattia di Parkinson secondo i criteri MSD (14) ;
- presenza di complicanze motorie come freezing, fluttuazioni motorie on-off, discinesie
- età >18 anni
- diagnosi di Malattia di Parkinson early/intermedia (<8anni) o avanzata (≥9anni)

Criteri di esclusione:

- rifiuto alla partecipazione allo studio o inabilità ad esprimere il consenso informato;
- MP severa tale da impedire la cooperazione del paziente o del caregiver;
- altre patologie neurologiche, malattie infiammatorie intestinali (IBD);
- diverticoliti;
- sanguinamento intestinale negli ultimi 3 mesi;
- neoplasia nei precedenti 12 mesi;
- chirurgia coloretale negli ultimi 6 mesi;
- terapia antibiotica negli ultimi 4 mesi.

Outcome primario: valutare l' efficacia della TAI nella sintomatologia legata alla MP.

Sono stati utilizzati i seguenti questionari per indagare i disordini di movimento:

- Montreal Cognitive Assessment (MOCA) (15): una breve batteria di valutazione di primo livello per valutare le alterazioni cognitive;
- Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale Part III (MDS-UPDRS III): scala validata per valutare i sintomi motori nella MP (16);
- Movement Disorder Society Non-Motor-Rating Scale (MDS-NMS) (17): scala validata per valutare i sintomi non-motori nella MP;
- Hoehn and Yahr scale (H&Y) (18) : scala comunemente utilizzata per valutare lo stato di malattia;
- The Parkinson's Disease Questionnaire (PDQ-39) (19): questionario validato per valutare lo stato di salute e di benessere nei pazienti con MP.

Diversi questionari sono stati utilizzati per indagare vari aspetti della funzionalità intestinale prima e dopo l' utilizzo della TAI:

- Patient Assessment of Constipation QoL questionnaire (PAC-QoL) (20), un questionario autosomministrato diviso in due sezioni: da B1-B6 le domande valutano l' impatto dell' alterazione della funzionalità intestinale nella vita quotidiana mentre B7 misura la soddisfazione dei pazienti nella gestione intestinale;
- Neurogenic Bowel Dysfunction Score (NBD) (21): questionario di 10 domande con un punteggio totale tra 0 e 47, corrispondente alla gravità dei disturbi intestinali presenti;
- Agachan-Wexner (A-W) Constipation score (22): score con punteggio da 0 a 30, valuta diversi aspetti della defecazione (frequenza delle defecazioni, difficoltà, incompletezza, durata delle defecazioni, tentativi infruttuosi, sintomi addominali e durata del problema, indipendentemente dall'assunzione di lassativi);
- Fecal Incontinence Cleveland Clinic Index (FI-CCI) (23) per misurare il livello di incontinenza fecale;

- Visual Analogue Scale (VAS) (24), scala da 0 a 10 che misura la soddisfazione dei pazienti per quel che riguarda il trattamento e la gestione intestinale.

L' Irrigazione Colica Trans Anale è stata eseguita con l' uso dei presidi Peristeen (Coloplast A/S, Humblaebek, Denmark) o Qufora click (IrriSedo, Allerød, Denmark), entrambi composti da una sonda rettale collegata ad una sacca contenente acqua. L' acqua è introdotta nel retto da un sistema di propulsione manuale; la quantità d' acqua irrigata varia a seconda delle necessità del paziente e ogni paziente è stato sottoposto ad un addestramento specifico da parte di personale dedicato.

I pazienti sono stati quindi sottoposti a più valutazioni durante il periodo di studio.

Durante la prima valutazione (Neurologica e Proctologica) sono stati somministrati i questionari relativi ai disordini inerenti la MP e la funzionalità intestinale ed è stato raccolto un campione fecale per l' analisi del microbiota.

I pazienti sono stati rivalutati a 6 mesi. Sono stati somministrati nuovamente i questionari ed è stato raccolto un nuovo campione fecale nei pazienti sottoposti a TAI.

La rivalutazione clinica e la sottomissione dei questionari è stata inoltre ripetuta a distanza di 1 anno.

	T0 - baseline	T1 (3 mesi)	T2 (6 mesi)	T3 (12 mesi)
Visita Neurologica	X		x	X
Visita Proctologica	X		x	X
UPDRS III	X		x	X
H&Y	X		X	X
NMS	X		X	X
PDQ 39	X		X	X
MOCA	X			X

AGACHAN-WEXNER score	X	X	X	X
PAC-QoL	X	X	X	X
NBD score	X	X	X	X
FI-CCI score	X	X	X	X
VAS Satisfaction (bowel habits)	X	X	X	X
GM	X		x	

Analisi del Microbiota Intestinale (MI)

Il DNA microbico è stato estratto dal materiale fecale con il un Sistema di estrazione automatizzato (25). Le regioni ipervariabili V3-V4 del gene 16S rRNA sono state amplificate e indicizzate seguendo le istruzioni del produttore (Illumina, San Diego, CA, USA). I campioni ottenuti sono stati raggruppati a una concentrazione equimolare, denaturati e diluiti del sequenziamento su una piattaforma Illumina MiSeq.

Le sequenze sono state elaborate con QIIME 2 (26). Dopo il filtraggio per lunghezza e qualità, le letture sono state suddivise in varianti di sequenza degli ampliconi (ASV) (27). L'assegnazione tassonomica è stata effettuata utilizzando l'algoritmo VSEARCH (28) rispetto al database Greengenes. La diversità alfa è stata valutata utilizzando diverse metriche. Le distanze Bray-Curtis e UniFrac ponderate e non ponderate sono state utilizzate per costruire grafici di analisi delle coordinate principali (PCoA).

Analisi statistica

I dati vengono presentati come numeri o percentuali per variabili categoriali, in termini di media + deviazione standard (DS) o mediana e range interquartile (IQR) per variabili continue, a seconda della distribuzione.

Il confronto tra variabili binarie è stato effettuato tramite il test Chi Quadrato, coefficiente di Pearson o il test di Fisher, il confronto tra variabili continue mediante il t test se distribuite in modo normale o mediante il test di Mann-Whitney.

Il confronto tra gruppi è stato effettuato mediante regressione logistica binaria per il calcolo dell'Odds Ratio e relativi Intervalli di Confidenza al 95%, correggendo per sesso, età. Per le variabili continue l'associazione tra outcome e fattore di esposizione (prognostico) è stata utilizzata l'analisi di varianza con covariate (ANCOVA).

Risultati:

I pazienti partecipanti allo studio sono stati reclutati da Luglio 2022 a Luglio 2023 per un totale di 26 pazienti. Di questi, 14 non hanno accettato di sottoporsi a TAI, 12 hanno iniziato l'irrigazione colica transanale. Di 26 pazienti solo 1 appartenente al gruppo TAI ha abbandonato la procedura dopo 6 mesi per problemi legati alla gestione domiciliare del presidio e all'evoluzione della malattia, ma ha comunque completato la compilazione dei questionari. Non si sono verificate complicanze legate al dispositivo per l'irrigazione transanale, né problematiche acute intercorrenti che hanno necessitato di ricovero o che hanno potuto determinare peggioramento del quadro clinico. Sono state analizzate le caratteristiche di base riguardanti i due gruppi costituiti : gr.1 no TAI, gr.2 TAI (Tabella 1). Come mostrato in Tabella n. 1 i due gruppi risultano omogenei per caratteristiche come sesso, BMI e tipologia di malattia (advanced vs intermedia/anni di malattia). Solo due pazienti del gr. 2 riferivano incontinenza fecale oltre la stipsi. I due gruppi risultano

omogenei anche per quanto riguarda il punteggio di partenza dei questionari che indagano le problematiche neurologiche (disabilità, sintomi motori/non motori, benessere generale), mentre i pazienti che hanno accettato di sottoporsi ad irrigazione colica transanale mostrano complessivamente punteggi peggiori e statisticamente significativi per quello che riguarda il Wexner Score (p: 0.001), NBD score (p<0.001) ed il PacQoL sia negli items da 1 a 6 (p: 0.002) che nel B7 (p: 0.049), a fronte di una gestione intestinale misurata attraverso il VAS score complessivamente bassa e statisticamente omogenea in entrambi i gruppi (p: 0.6) (Tabella 2).

Il controllo a 6 e 12 mesi ha mostrato come nei pazienti sottoposti a TAI i punteggi riguardanti le disabilità motorie e non motorie siano rimasti immutati mentre sono migliorati in modo statisticamente significativo i punteggi riguardanti la stipsi e la qualità di vita. Tra i questionari somministrati per indagare la sintomatologia legata alla MP, l'unico ad ottenere miglioramento statisticamente significativo a 12 mesi è stato il PDQ-39 (p<0.001) che valuta complessivamente attività motorie, capacità di svolgere attività quotidiane, emozioni e benessere mentale, domande sulla percezione di se', sulla rete di supporto sociale e sulle relazioni interpersonali (Figure 1,2,3,4,5,6,7,8,9). La VAS è statisticamente migliorata (p<0.001) già a 3 mesi dall'utilizzo della TAI, mantenendosi elevata nei punteggi fino alla fine del Follow up . Nessun paziente ha ridotto la terapia dopaminergica dopo TAI.

	non TAI n= 14	TAI n=12	P-value
SEX (%)	7 (47%)	6 (55%)	0.7
BMI median [IQR]	25.71 [24.35, 26.37]	24.80 [23.95, 26.01]	0.5
Parkinson advanced (%)	6 (43%)	7 (58%)	0.2
Parkinson intermedio (%)	8 (57%)	5 (42%)	0.2
anni malattia median [IQR]	8.0 (6.0, 9.0)	12.0 (6.0, 13.0)	0.5

Tabella 1 : TAI /non TAI (caratteristiche demografiche)

	non TAI n= 14	TAI n=12	P-value
VAS SCORE median [IQR]	5.00 (4.00, 5.50)	5.00 (4.00, 5.00)	0.6
wexner	13.0 (9.0, 16.0)	19.0 (17.5, 20.0)	0.001
PACQOL items 1-6	25 (18, 38)	46 (43, 68)	0.002
PACQOL Item7	5.00 (4.00, 8.00)	4.00 (3.00, 5.50)	0.049
NBD	6.0 (3.0, 6.0)	18.0 (14.5, 20.5)	<0.001
MOCA	26.00 (23.00, 27.50)	22.00 (21.00, 24.00)	0.056
MDS-UPDRS III	27 (20, 34)	34 (30, 38)	0.10
MDS-NMS	35 (24, 65)	55 (46, 72)	0.065
H&Y			
PDQ39	33 (15, 48)	43 (31, 72)	0.13

Tabella 2: TAI e NO TAI (sintomi) baseline

Figura 1: variazioni PacQoL Items 1-6 a 6-12 mesi

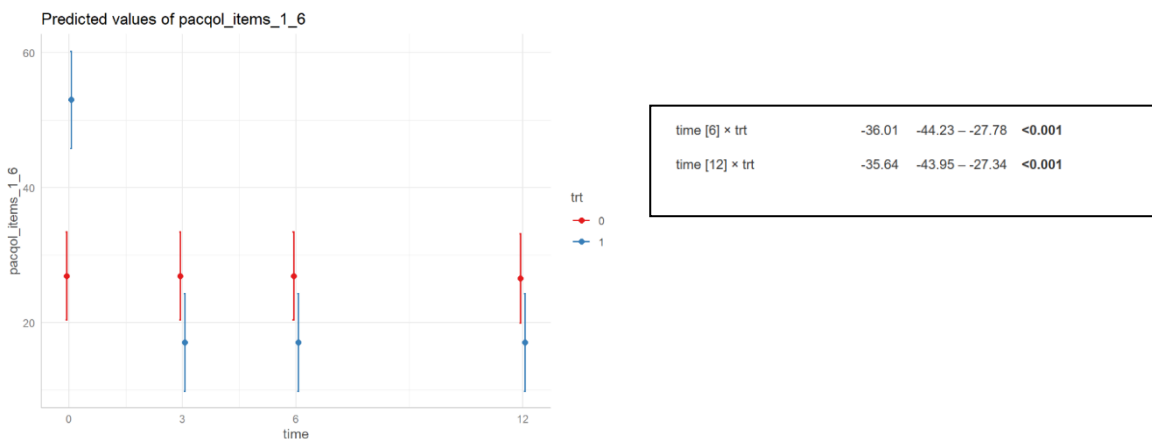
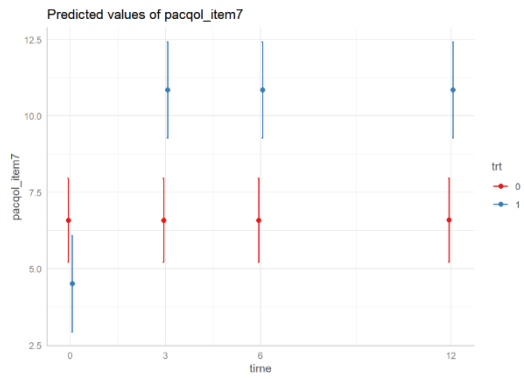
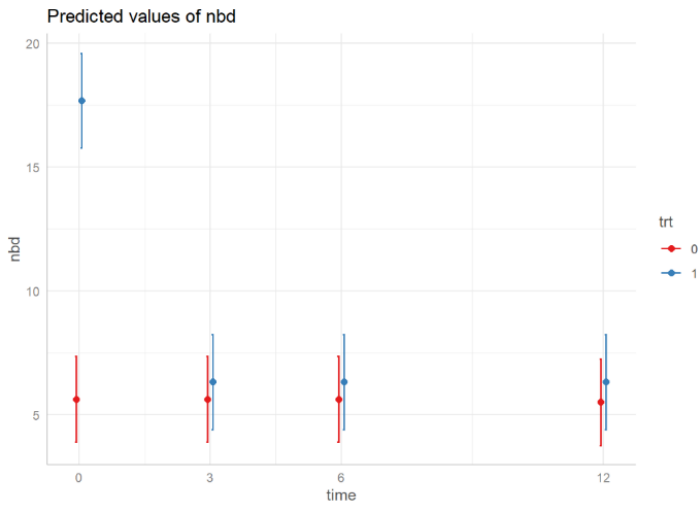


Figura 2: variazioni PacQoL Item 7 a 6-12 mesi



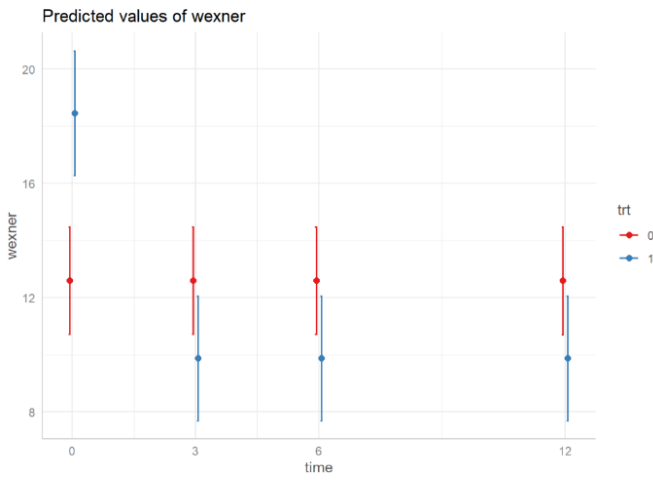
time [6] × trt	6.35	5.40 – 7.30	<0.001
time [12] × trt	6.34	5.38 – 7.30	<0.001

Figura 3: variazioni NBD SCORE 6-12 mesi



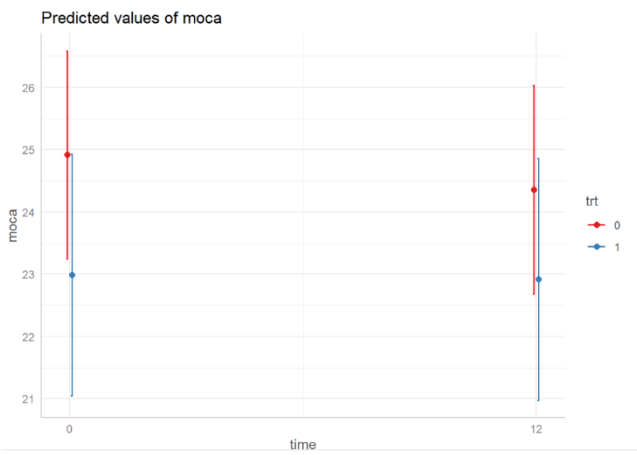
time [6] × trt	-11.36	-13.39 – -9.32	<0.001
time [12] × trt	-11.24	-13.29 – -9.19	<0.001

Figura 4: variazioni WEXNER SCORE 6-12 mesi



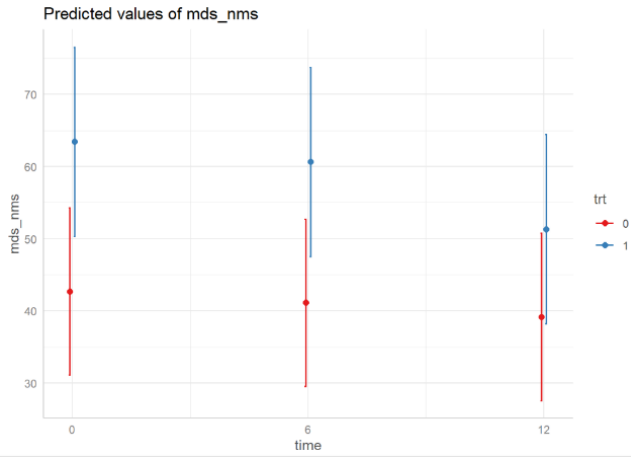
time [6] × trt	-8.60	-9.46	-7.73	<0.001
time [12] × trt	-8.59	-9.46	-7.72	<0.001

Figura 5: variazioni MOCA 12 mesi



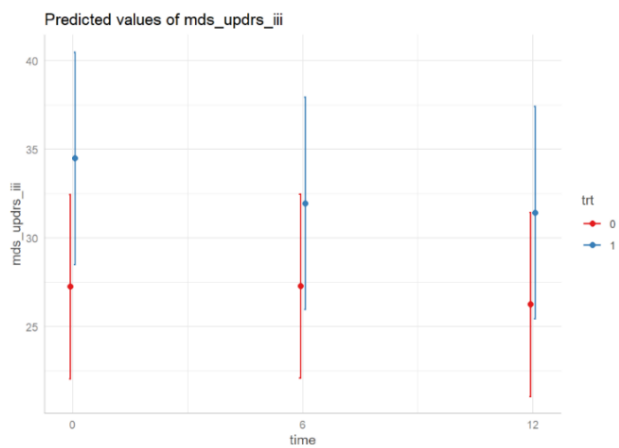
time [12] × trt	0.49	-0.21	1.18	0.164
-----------------	------	-------	------	-------

Figura 6: variazioni MDS 6- 12 mesi



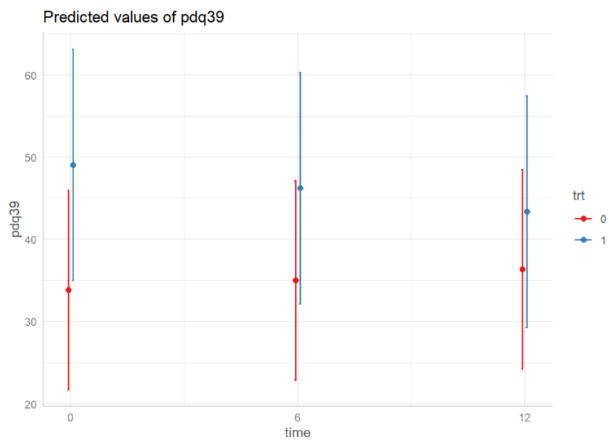
time [6] × trt	-1.23	-12.06 – 9.61	0.822
time [12] × trt	-8.56	-19.40 – 2.27	0.120

Figura 7: variazioni UPDRS III 6- 12 mesi



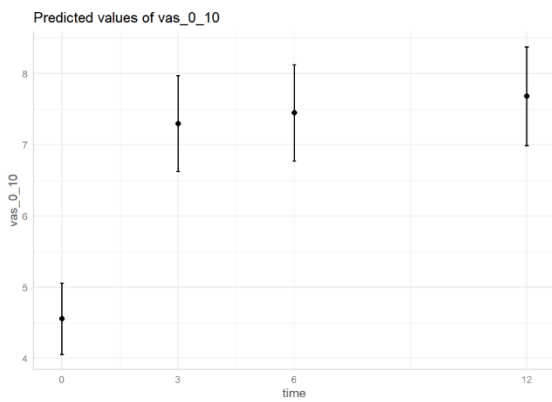
time [6] × trt	-2.58	-5.71 – 0.55	0.104
time [12] × trt	-2.07	-5.20 – 1.06	0.191

Figura 8: variazioni PDQ 39 6- 12 mesi



time [6] × trt	-4.01	-8.00	-0.02	0.049
time [12] × trt	-8.18	-12.17	-4.19	<0.001

Figura 9: variazioni VAS in pazienti gr.2 TAI



time [3]	2.74	1.99	3.49	<0.001
time [6]	2.89	2.14	3.64	<0.001
time [12]	3.13	2.36	3.90	<0.001

Dei 26 pazienti partecipanti allo studio, 8 pazienti del gr. 1 (no TAI) e 11 del gr.2 (TAI) hanno consegnato i campioni fecali per l'analisi del microbiota.

L'analisi del microbiota intestinale è stata eseguita al tempo T0 in tutti i pazienti e nei pazienti sottoposti a TAI è stato raccolto un ulteriore campione dopo 6 mesi di trattamento con l'irrigazione colica transanale.

L'analisi del microbiota ha mostrato come tra i due gruppi non siano state riscontrate differenze significative riguardo la diversità alfa e la diversità beta (metrica weighted UniFrac) (p value = 0.389) (figura 10-11a), mentre per quanto riguarda la diversità beta (metrica unweighted UniFrac) (figura 11b), seppure con valori non statisticamente significativi, si osserva una tendenza alla separazione del gruppo sottoposto a TAI al T1 rispetto agli altri gruppi ($p=0.214$). Si osserva infatti una tendenza alla variazione del microbiota intestinale nei pazienti dopo trattamento con irrigazione colica. A livello di phylum si osserva infatti una tendenza alla diminuzione dell'abbondanza relativa del phylum Bacteroidota dopo la TAI (Figura 12-13).

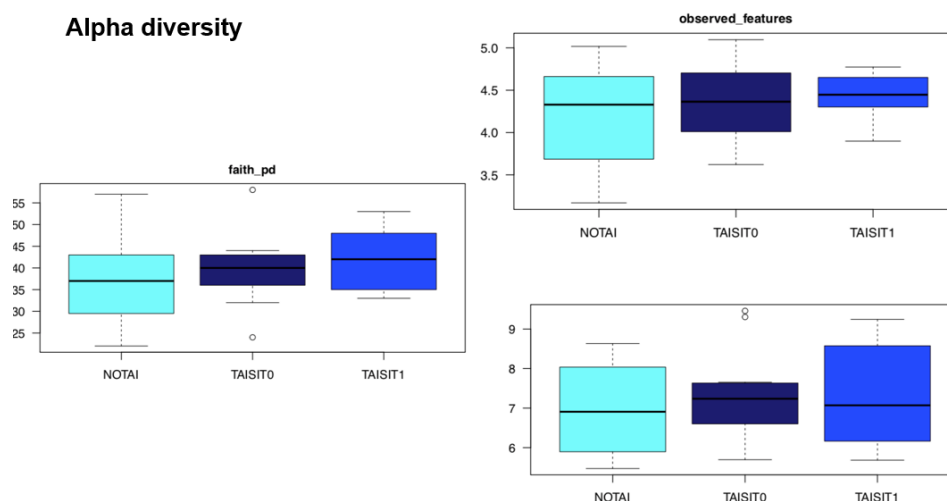


Figura 10: alfa diversity

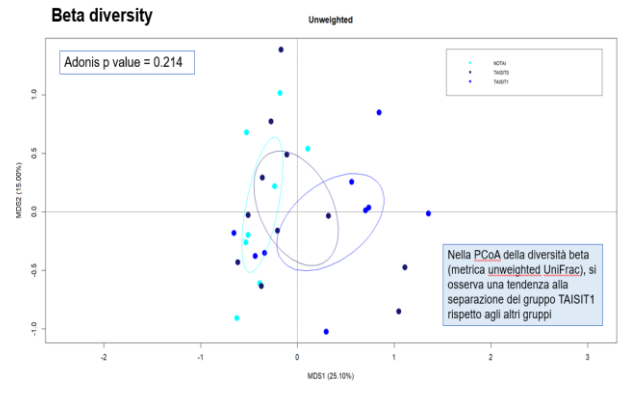
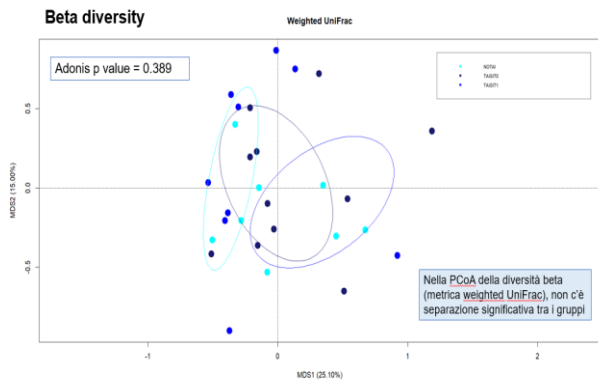


Figura 11 (a-b): beta diversity

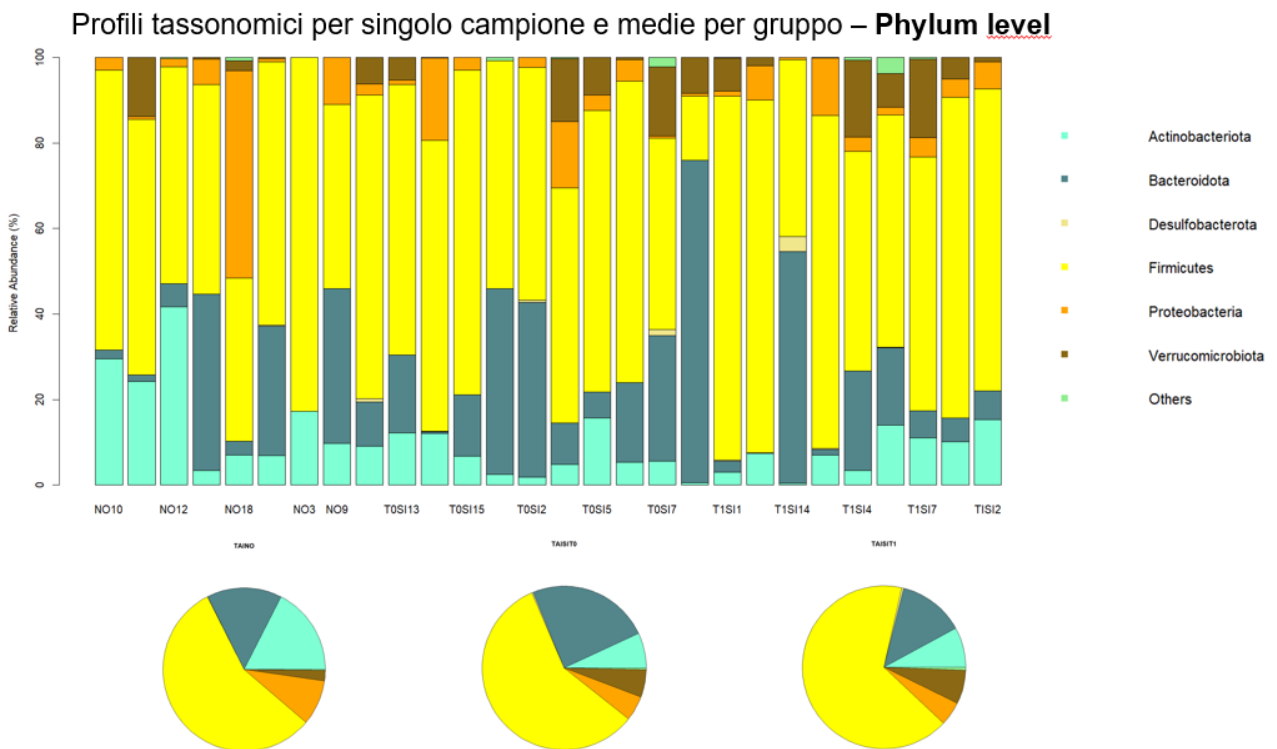


Figura 12: profili tassonomici, Phylum level

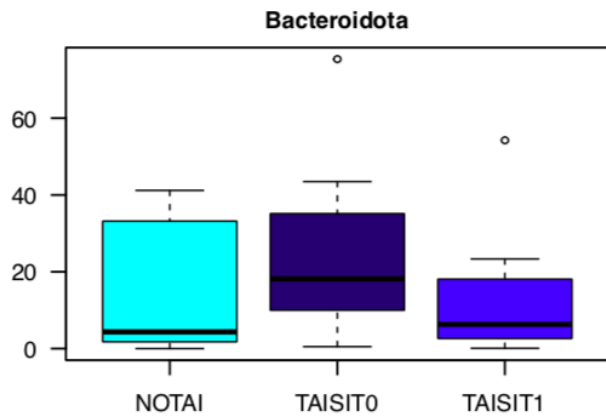


Figura 13: composizione Phylum

Per quanto riguarda il livello Famiglia, si osserva un aumento relativo dei microrganismi Clostridia UCG 014 (famiglia associata al metabolismo del triptofano con produzione di metaboliti come indole-3-acetic acid, importanti per l'omeostasi intestinale e quindi associate ad una condizione di benessere intestinale) e della famiglia Erysipelotrichaceae (in modo statisticamente significativo; $p=0.006$), generalmente considerati pro-infiammatori ma alcuni generi hanno attività anti-tumorale e sono stati associati alla salute metabolica, verosimilmente attraverso produzione di SCFA e 3-hydroxyoctadecaenoic (Figura 14-15-16).

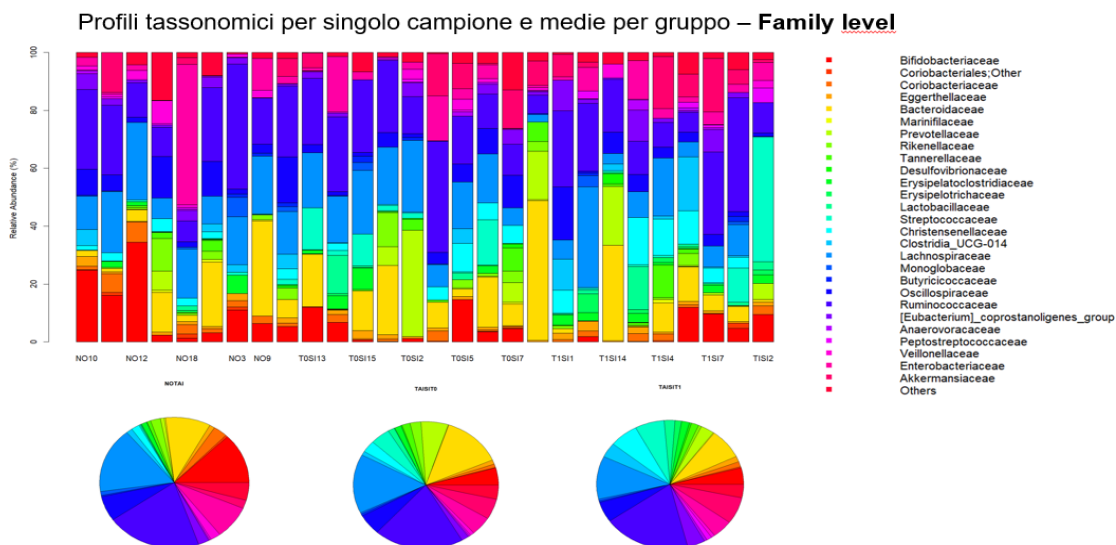


Figura 14: profili tassonomici, Family level

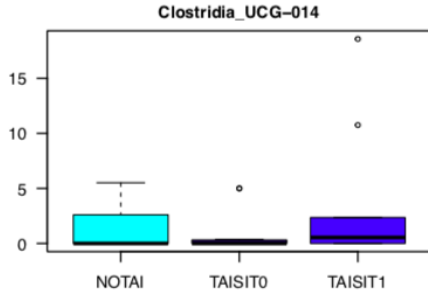


Figura 15

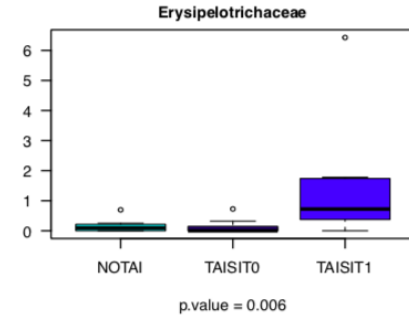


Figura 16

Per quel che riguarda il Genere invece si è osservata una tendenza alla diminuzione del *Faecalibacterium* (associato al benessere intestinale, produttore di SCFA) e dei microrganismi del genere *Eubacterium eligens*, microrganismi associati al benessere intestinale con un impatto positivo sull'infiammazione (Figura 17-18-19).

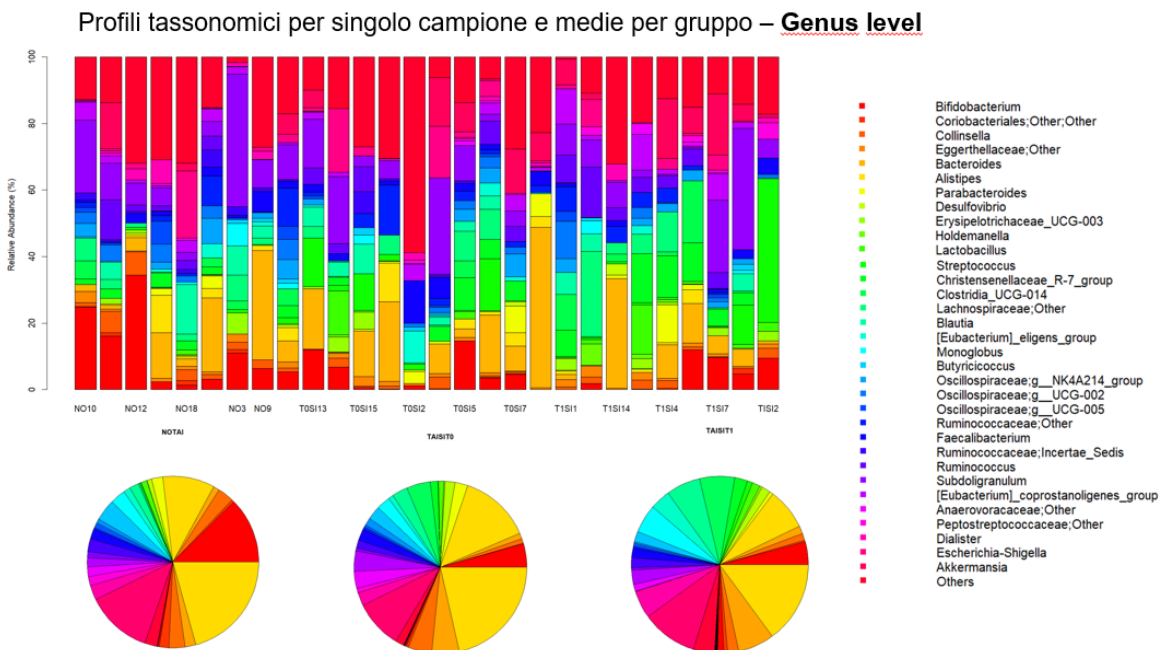


Figura 17: profili tassonomici, Genus level

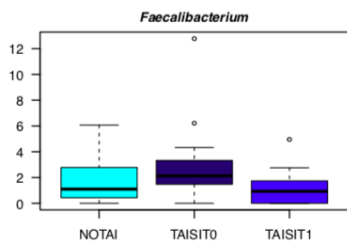


Figura 18

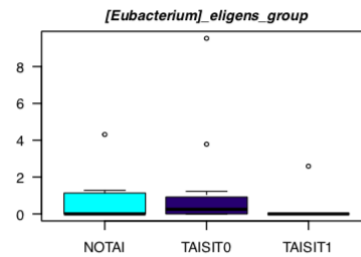


Figura 19

Discussione:

La MP è una malattia degenerativa con una notevole prevalenza nella popolazione generale, fino a raggiungere il 4% nella popolazione adulta (29). E' caratterizzata da varie alterazioni motorie come bradicinesia, rigidità, freezing, tremore a riposo ed alterazioni posturali ma anche da disfunzioni neuropsicologiche come depressione, affaticamento, declino cognitivo ed alterazioni del sonno, che influiscono negativamente sulla qualità di vita dei pazienti (30). Alcuni studi hanno dimostrato come la qualità di vita dei pazienti con MP sia nettamente più bassa rispetto ai controlli sani in più dimensioni, specialmente quelle che concernono le attività motorie e le funzioni cognitive (30, 31). Risulta quindi fondamentale valutare le possibili strategie per migliorare questo aspetto nella vita dei pazienti con MP. La stipsi e la gestione intestinale risultano essere dei punti cardine nella qualità di vita di questi pazienti. Nella baseline delle valutazioni proctologiche e neurologiche emerge infatti come i pazienti partano da un livello di disabilità (motoria e non, legata alla malattia) simile, ma solo alcuni scelgono di sottoporsi ad irrigazione colica transanale. Questi pazienti presentano punteggi dei questionari legati al problema oggettivo della soddisfazione intestinale decisamente peggiori, nonostante tutti i pazienti di entrambi i gruppi non siano comunque soddisfatti della loro gestione intestinale, come dimostrato dal VAS score al T0. Diversi approcci sono stati tentati per il trattamento della stipsi (dieta, lassativi, riabilitazione, tossina botulinica) (31) ma nonostante i trattamenti sintomatici, la costipazione e le alterazioni del transito e dello svuotamento intestinale

rimangono un grave problema per i pazienti. L' Irrigazione Colica Transanale si è dimostrata un valido alleato per il miglioramento dei sintomi legati alle disfunzioni intestinali nell' intestino neurologico o in altre patologie funzionali (33,34) ma pochi studi dimostrano la sua efficacia nella MP. Nel nostro studio la TAI si è dimostrata efficace e sicura nel migliorare la gestione intestinale dei pazienti, con notevole e significativa riduzione dei punteggi dei questionari specifici e miglioramento della qualità di vita. Nonostante non ci sia stato un miglioramento complessivo dei sintomi neurologici, la percezione del paziente nei confronti della propria disabilità sembra migliorata, come testimoniato dal miglioramento dei punteggi a 12 mesi del questionario PDQ-39. Per quanto riguarda le variazioni del microbiota intestinale dopo utilizzo di TAI i dati preliminari mostrano dei risultati incoraggianti. E' noto come i pazienti affetti da MP abbiano un profilo di base differente dai corrispettivi sani e come il profilo del microbiota intestinale nei pazienti con MP cambi in base alla durata della malattia (35- 36). Diversi studi hanno dimostrato come alcune popolazioni microbiche siano predominanti nei pazienti affetti da MP, come *Akkermansia*, *Verrucomicrobiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Bifidoacterium* e *Proteobacteria*. Queste popolazioni batteriche sono associate a varie funzioni e alla produzione di vari metaboliti che possono potenzialmente contribuire alla patogenesi della MP (37) . Ad esempio, la capacità delle *Akkermansia* (membri del phylum *Verrucomicrobiota*) di degradare il muco della barriera intestinale può risultare in un aumento di permeabilità e consentire il passaggio sistemico di LPS (lipopolisaccaride) che con il suo ruolo nella regolazione del sistema immunitario e dell' infiammazione può promuovere i processi neurodegenerativi. La famiglia delle *Lachnospiraceae* invece è coinvolta nella produzione degli acidi grassi a catena corta (SCFAs) come il butirrato, la cui disregolazione può avere un impatto sull' asse gut-brain e contribuire alla neuroinfiammazione e alla progressione della MP (37).

Quindi la disbiosi sembra avere un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella progressione della MP. La disregolazione intestinale si manifesta anche con sintomi legati alla stipsi, che in molti di

questi pazienti risulta essere particolarmente ingravescente. L' utilizzo della TAI ha dato risultati incoraggianti in termini di miglioramento dei sintomi e della qualità di vita nei pazienti affetti da disordini neurologici, ma pochissimi studi hanno valutato l' impatto che questa ha sulla variazione del microbiota intestinale. Uno studio condotto dal nostro gruppo di lavoro sulla variazione del microbiota intestinale prima e dopo la TAI in pazienti affette da Sclerosi Multipla ha mostrato come la composizione del microbiota sia profondamente diversa in queste pazienti rispetto ai controlli sani e come l'adozione della TAI non abbia avuto un impatto significativo sulla struttura generale del microbiota intestinale ma abbia portato comunque ad un aumento della diversità microbica (segno distintivo di un intestino sano) e ad un certo numero di cambiamenti di composizione, alcuni dei quali possono essere favorevoli nel contesto della SM (33).

Nel nostro studio condotto sull' analisi del microbiota intestinale nei pazienti affetti da MP prima e dopo 6 mesi dall' utilizzo della TAI, i risultati sono stati molto incoraggianti, nonostante le differenze riscontrate non siano risultate statisticamente significative.

I due gruppi non mostravano diversità alfa ma per quanto riguarda la beta- diversità sono state riscontrate delle tendenze interessanti. La prima variazione osservata a livello di Phylum è stata un tendenza alla riduzione in abbondanza relativa del phylum *Bacteroidota* dopo la TAI. I *Bacteroidetes* sono il più grande phylum di batteri Gram Negativi che abitano il nostro sistema gastrointestinale. Ad alcuni generi di *Bacteroidetes* sono stati attribuiti ruoli specifici nello sviluppo della disregolazione immunitaria, di malattie sistemiche come la sindrome metabolica e anche di disturbi neurologici. La secrezione di glicoproteine, lo squilibrio degli acidi grassi a catena corta, la produzione di tossine e il mimetismo molecolare sono solo una parte delle funzioni esercitate da questi commensali che interagiscono con l'ospite (38). Altre tendenze interessanti sono state riscontrate a livello di Famiglia, con aumento dopo la TAI di *Clostridia UCG 014* e *Erysipelotrichaceae* (p: 0.006) associate al mantenimento dell' omeostasi intestinale, e a livello di Classe con tendenze non del tutto favorevoli alla luce delle riduzioni relative di *Fecalibacterium* e

Eubacterium Eliges, anch' essi associati al mantenimento dell' omeostasi intestinale, confermando come sia cruciale il ruolo del microbiota intestinale nella regolazione del normale transito intestinale. Sicuramente per avere risultati più definiti sulla composizione del microbiota dopo utilizzo di TAI e sul potenziale ruolo che questa svolge a livello della sintomatologia legata alla MP (nel nostro studio non sono stati riscontrati miglioramenti sui disordini motori ne' sui dosaggi terapeutici), sarà necessario eseguire l' analisi su un campione più ampio.

I limiti di questo studio infatti riguardano principalmente l' esiguità del campione e la necessità di ulteriori analisi sul microbiota da correlare al fenotipo di MP e quindi all' eventuale correlazione tra le variazioni microbiche e la gravità di malattia.

Conclusioni:

La MP è una malattia degenerativa gravata da notevole decadimento della qualità della vita.

La gestione intestinale rappresenta uno dei problemi maggiormente percepiti dai pazienti, il cui trattamento rimane ancora oggi oggetto di discussione. La TAI rappresenta un' opzione sicura e di facile utilizzo da parte dei pazienti o dei caregiver, con ottimi risultati in termini di miglioramento di qualità di vita e gestione intestinale. Inoltre, migliorando il transito, potrebbe migliorare la composizione del microbiota intestinale migliorando la disbiosi e favorendo l' omeostasi, con future e promettenti implicazioni terapeutiche.

Bibliografia:

1. Parkinson J *An Essay on the Shaking Palsy*. London: Sherwood, Neely, and Jones; 1817.
2. Twelves D, Perkins KS, Counsell C. Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2003. January;18(1):19–31
3. Prevalence of Parkinson's disease across North America. *Marras C, Beck JC, Bower JH, Roberts E, Ritz B, Ross GW, Abbott RD, Savica R, Van Den Eeden SK, Willis AW, Tanner CM, Parkinson's Foundation P4 Group. NPJ Parkinsons Dis*. 2018; 4():21.
4. Simon DK, Tanner CM, Brundin P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clin Geriatr Med*. 2020 Feb;36(1):1-12. doi: 10.1016/j.cger.2019.08.002.
5. Goldman SM, Marek K, Ottman R, et al. Concordance for Parkinson's disease in twins: A 20-year update. *Ann Neurol*. 2019. April;85(4):600–5.
6. Sung VW, Nicholas AP. Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: expanding the view of Parkinson's disease beyond a pure motor, pure dopaminergic problem. *Neurologic clinics*. 2013. August;31(3 Suppl):S1–16
7. Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, Challis C, Schretter CE, Rocha S, Gradinaru V, Chesselet MF, Keshavarzian A, Shannon KM, Krajmalnik-Brown R, Wittung-Stafshede P, Knight R, Mazmanian SK. Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell*. 2016 Dec 1;167(6):1469-1480.e12. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.018.
8. Stocchi F, Torti M. Constipation in Parkinson's Disease. *Int Rev Neurobiol*. 2017;134:811-826. doi: 10.1016/bs.irn.2017.06.003.
9. Christensen P, Bazzocchi G, Coggrave M, Abel R, Hultling C, Krogh K, Media S, Laurberg S. A randomized, controlled trial of transanal irrigation versus conservative bowel management in spinal cord-injured patients. *Gastroenterology*. 2006 Sep;131(3):738-47. doi: 10.1053/j.gastro.2006.06.004.

10. Ohkusa T, Koido S, Nishikawa Y, Sato N. Gut Microbiota and Chronic Constipation: A Review and Update. *Front Med (Lausanne)*. 2019 Feb 12;6:19. doi: 10.3389/fmed.2019.00019.
11. Scheperjans F, Aho V, Pereira PA, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, Haapaniemi E, Kaakkola S, Eerola-Rautio J, Pohja M, Kinnunen E, Murros K, Auvinen P. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord*. 2015 Mar;30(3):350-8. doi: 10.1002/mds.26069.
12. Seppi K, Ray Chaudhuri K, Coelho M, Fox SH, Katzenschlager R, Perez Lloret S, Weintraub D, Sampaio C; the collaborators of the Parkinson's Disease Update on Non-Motor Symptoms Study Group on behalf of the Movement Disorders Society Evidence-Based Medicine Committee. Update on treatments for nonmotor symptoms of Parkinson's disease-an evidence-based medicine review. *Mov Disord*. 2019 Feb;34(2):180-198. doi: 10.1002/mds.27602.
13. Seppi K, Ray Chaudhuri K, Coelho M, Fox SH, Katzenschlager R, Perez Lloret S, Weintraub D, Sampaio C; the collaborators of the Parkinson's Disease Update on Non-Motor Symptoms Study Group on behalf of the Movement Disorders Society Evidence-Based Medicine Committee. Update on treatments for nonmotor symptoms of Parkinson's disease-an evidence-based medicine review. *Mov Disord*. 2019 Feb;34(2):180-198. doi: 10.1002/mds.27602.
14. Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, Obeso J, Marek K, Litvan I, Lang AE, Halliday G, Goetz CG, Gasser T, Dubois B, Chan P, Bloem BR, Adler CH, Deuschl G. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2015 Oct;30(12):1591-601. doi: 10.1002/mds.26424. PMID: 26474316.
15. Nasreddine ZS, Phillips NA, Bédirian V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, Cummings JL, Chertkow H. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc*. 2005 Apr;53(4):695-9. doi: 10.1111/j.1532-5415.2005.53221.x. Erratum in: *J Am Geriatr Soc*. 2019 Sep;67(9):1991. PMID: 15817019.
16. Goetz CG, Tilley BC, Shaftman SR, Stebbins GT, Fahn S, Martinez-Martin P, Poewe W, Sampaio C, Stern MB, Dodel R, Dubois B, Holloway R, Jankovic J, Kulisevsky J, Lang AE, Lees A, Leurgans S, LeWitt PA, Nyenhuis D, Olanow CW, Rascol O, Schrag A, Teresi JA, van Hilten JJ, LaPelle N; Movement Disorder Society UPDRS Revision Task Force. Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results. *Mov Disord*. 2008 Nov 15;23(15):2129-70. doi: 10.1002/mds.22340. PMID: 19025984.

17. Martinez-Martin P, Schrag A, Weintraub D, Rizos A, Rodriguez-Blazquez C, Chaudhuri KR; IPMDS Non Motor PD Study Group. Pilot Study of the International Parkinson and Movement Disorder Society-sponsored Non-motor Rating Scale (MDS-NMS). *Mov Disord Clin Pract*. 2019 Feb 5;6(3):227-234. doi: 10.1002/mdc3.12728. PMID: 30949554; PMCID: PMC6417755.
18. Goetz CG, Poewe W, Rascol O, Sampaio C, Stebbins GT, Counsell C, Giladi N, Holloway RG, Moore CG, Wenning GK, Yahr MD, Seidl L; Movement Disorder Society Task Force on Rating Scales for Parkinson's Disease. Movement Disorder Society Task Force report on the Hoehn and Yahr staging scale: status and recommendations. *Mov Disord*. 2004 Sep;19(9):1020-8. doi: 10.1002/mds.20213. PMID: 15372591.
19. Jenkinson C, Fitzpatrick R, Peto V, Greenhall R, Hyman N. The Parkinson's Disease Questionnaire (PDQ-39): development and validation of a Parkinson's disease summary index score. *Age Ageing*. 1997 Sep;26(5):353-7. doi: 10.1093/ageing/26.5.353. PMID: 9351479.
20. Marquis P, De La Loge C, Dubois D, McDermott A, Chassany O. Development and validation of the Patient Assessment of Constipation Quality of Life questionnaire. *Scand J Gastroenterol*. 2005 May;40(5):540-51. doi: 10.1080/00365520510012208. PMID: 16036506.
21. Krogh K, Christensen P, Sabroe S, Laurberg S. Neurogenic bowel dysfunction score. *Spinal Cord*. 2006 Oct;44(10):625-31. doi: 10.1038/sj.sc.3101887. Epub 2005 Dec 13. PMID: 16344850.
22. Agachan F, Chen T, Pfeifer J, Reissman P, Wexner SD. A constipation scoring system to simplify evaluation and management of constipated patients. *Dis Colon Rectum*. 1996 Jun;39(6):681-5. doi: 10.1007/BF02056950. PMID: 8646957.)
23. Jorge JM, Wexner SD. Etiology and management of fecal incontinence. *Dis Colon Rectum*. 1993 Jan;36(1):77-97. doi: 10.1007/BF02050307. PMID: 8416784
24. Voutilainen A, Pitkäaho T, Kvist T, Vehviläinen-Julkunen K. How to ask about patient satisfaction? The visual analogue scale is less vulnerable to confounding factors and ceiling effect than a symmetric Likert scale. *J Adv Nurs*. 2016 Apr;72(4):946-57. doi: 10.1111/jan.12875. Epub 2015 Dec 22. PMID: 26689434.
25. Yu Z., Morrison M. (2004). Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques* 36(5) 808. 10.2144/04365ST04

26. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, Bai Y, Bisanz JE, Bittinger K, Brejnrod A, Brislawn CJ, Brown CT, Callahan BJ, Caraballo-Rodríguez AM, Chase J, Cope EK, Da Silva R, Diener C, Dorrestein PC, Douglas GM, Durall DM, Duvall C, Edwardson CF, Ernst M, Estaki M, Fouquier J, Gauglitz JM, Gibbons SM, Gibson DL, Gonzalez A, Gorlick K, Guo J, Hillmann B, Holmes S, Holste H, Huttenhower C, Huttley GA, Janssen S, Jarmusch AK, Jiang L, Kaehler BD, Kang KB, Keefe CR, Keim P, Kelley ST, Knights D, Koester I, Kosciolk T, Kreps J, Langille MGI, Lee J, Ley R, Liu YX, Loftfield E, Lozupone C, Maher M, Marotz C, Martin BD, McDonald D, McIver LJ, Melnik AV, Metcalf JL, Morgan SC, Morton JT, Naimey AT, Navas-Molina JA, Nothias LF, Orchanian SB, Pearson T, Peoples SL, Petras D, Preuss ML, Pruesse E, Rasmussen LB, Rivers A, Robeson MS 2nd, Rosenthal P, Segata N, Shaffer M, Shiffer A, Sinha R, Song SJ, Spear JR, Swafford AD, Thompson LR, Torres PJ, Trinh P, Tripathi A, Turnbaugh PJ, Ul-Hasan S, van der Hooft JJJ, Vargas F, Vázquez-Baeza Y, Vogtmann E, von Hippel M, Walters W, Wan Y, Wang M, Warren J, Weber KC, Williamson CHD, Willis AD, Xu ZZ, Zaneveld JR, Zhang Y, Zhu Q, Knight R, Caporaso JG. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol.* 2019 Aug;37(8):852-857. doi: 10.1038/s41587-019-0209-9. Erratum in: *Nat Biotechnol.* 2019 Sep;37(9):1091. PMID: 31341288; PMCID: PMC7015180.
27. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* 2016 Jul;13(7):581-3. doi: 10.1038/nmeth.3869. Epub 2016 May 23. PMID: 27214047; PMCID: PMC4927377.
28. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ.* 2016 Oct 18;4:e2584. doi: 10.7717/peerj.2584. PMID: 27781170; PMCID: PMC5075697.
29. Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna).* 2017;124(8):901–905.
30. Zhao N, Yang Y, Zhang L, Zhang Q, Balbuena L, Ungvari GS, Zang YF, Xiang YT. Quality of life in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis of comparative studies. *CNS Neurosci Ther.* 2021 Mar;27(3):270-279. doi: 10.1111/cns.13549. Epub 2020 Dec 28. PMID: 33372386; PMCID: PMC7871788.
31. Balestrino R, Martinez-Martin P. Neuropsychiatric symptoms, behavioural disorders, and quality of life in Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 2017 Feb 15;373:173-178. doi: 10.1016/j.jns.2016.12.060. Epub 2016 Dec 28. PMID: 28131182.

32. Pedrosa Carrasco AJ, Timmermann L, Pedrosa DJ. Management of constipation in patients with Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis.* 2018 Mar 16;4:6. doi: 10.1038/s41531-018-0042-8. PMID: 29560414; PMCID: PMC5856748.
33. Ascanelli S, Bombardini C, Chimisso L, Carcoforo P, Turrone S, D'Amico F, Caniati ML, Baldi E, Tugnoli V, Morotti C, Valpiani G, Bazzocchi G. Trans-anal irrigation in patients with multiple sclerosis: Efficacy in treating disease-related bowel dysfunctions and impact on the gut microbiota: A monocentric prospective study. *Mult Scler J Exp Transl Clin.* 2022 Jul 6;8(3):20552173221109771. doi: 10.1177/20552173221109771. PMID: 35832690; PMCID: PMC9272186.
34. Musco S, Bazzocchi G, Martellucci J, Amato MP, Manassero A, Putignano D, Lopatriello S, Cafiero D, Paoloni F, Del Popolo G. Treatments in neurogenic bowel dysfunctions: evidence reviews and clinical recommendations in adults. *Eur J Phys Rehabil Med.* 2020 Dec;56(6):741-755. doi: 10.23736/S1973-9087.20.06412-6. Epub 2020 Sep 16. PMID: 32935955.
35. Varesi A, Campagnoli LIM, Fahmideh F, Pierella E, Romeo M, Ricevuti G, Nicoletta M, Chirumbolo S, Pascale A. The Interplay between Gut Microbiota and Parkinson's Disease: Implications on Diagnosis and Treatment. *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 14;23(20):12289. doi: 10.3390/ijms232012289. PMID: 36293176; PMCID: PMC9603886.
36. Boertien JM, Pereira PAB, Aho VTE, Scheperjans F. Increasing Comparability and Utility of Gut Microbiome Studies in Parkinson's Disease: A Systematic Review. *J Parkinsons Dis.* 2019;9(s2):S297-S312. doi: 10.3233/JPD-191711. PMID: 31498131; PMCID: PMC6839453.
37. Heravi FS, Naseri K, Hu H. Gut Microbiota Composition in Patients with Neurodegenerative Disorders (Parkinson's and Alzheimer's) and Healthy Controls: A Systematic Review. *Nutrients.* 2023 Oct 13;15(20):4365. doi: 10.3390/nu15204365. PMID: 37892440; PMCID: PMC10609969.
38. Gibiino G, Lopetuso LR, Scaldaferrri F, Rizzatti G, Binda C, Gasbarrini A. Exploring Bacteroidetes: Metabolic key points and immunological tricks of our gut commensals. *Dig Liver Dis.* 2018 Jul;50(7):635-639. doi: 10.1016/j.dld.2018.03.016. Epub 2018 Mar 20. PMID: 29650468.