



POLSKA AKADEMIA NAUK
INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII
DOŚWIADCZALNEJ IM. L. HIRSZFELDA
ZAKŁAD IMMUNOLOGII CHOROÓB ZAKAŻNYCH
LABORATORIUM WIRUSOLOGII

Rozprawa doktorska

Analiza współzależności stanu zapalnego przyzębia i choroby
Alzheimera – rola czynników zakaźnych oraz aktywacji
i odpowiedzi obwodowych komórek odpornościowych

Analysis of the correlation between periodontal inflammation
and Alzheimer's disease – the role of infectious agents and the
activation and response of peripheral immune cells

mgr inż. Michał Jerzy Ochnik

PROMOTOR: dr hab. Egbert Piasecki, prof. PAN
PROMOTOR POMOCNICZY: dr hab. Marta Sochocka

WROCŁAW, 2024

Pragnę wyrazić wdzięczność wszystkim, którzy w jakikolwiek sposób przyczynili się do powstania tej pracy na każdym etapie jej realizacji.

Szczególnie chciałbym podziękować **Uczestnikom** badania, zwłaszcza **Osobom żyjącym z demencją oraz ich rodzinom i opiekunom**, bez których praca ta nie mogłaby powstać. Mam nadzieję, że te badania, jak i przyszłe prace w tej dziedzinie, pozwolą lepiej zrozumieć chorobę Alzheimera i przyczynią się do opracowania w przyszłości skutecznych i ogólnodostępnych terapii.

Serdeczne podziękowania pragnę złożyć mojemu Promotorowi, **dr. hab. Egbertowi Piaseckiemu** za wsparcie merytoryczne, zaufanie i umożliwienie realizacji pracy doktorskiej w Laboratorium Wirusologii oraz Promotorce pomocniczej **dr. hab. Marcie Sochockiej**, której opieka merytoryczna, nieustanna motywacja do działania, cierpliwość oraz otwartość były bezcenne i zaowocowały powstaniem niniejszej Rozprawy w jej obecnym kształcie.

Dziękuję również

Prof. dr. hab. n. med. Jerzemu Leszkowi z Katedry Psychiatrii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, którego pomoc i zaangażowanie w proces rekrutacji pacjentów z chorobą Alzheimera były kluczowe w realizacji niniejszych badań.

Dr n. med. Aleksandrze Sender-Janeczek oraz **dr. n. med. Jackowi Zborowskiemu** za przeprowadzenie badań periodontologicznych, zaangażowanie oraz wsparcie merytoryczne.

Dr Marcie Świtalskiej za wykonanie analiz hematologicznych próbek krwi uczestników badania.

Dr Paulinie Żebrowskiej-Różańskiej za wprowadzenie w techniki sekwencjonowania DNA oraz pomoc w przeprowadzeniu badań mikrobiomu jamy ustnej oraz analizie bioinformatycznej otrzymanych wyników.

Dr Idze Andrasiak oraz **dr. Maciejowi Sobczyńskiemu** za rady oraz wsparcie w trakcie analizy statystycznej.

Szczególne wyrazy wdzięczności pragnę złożyć mojej **Rodzinie, Przyjaciółom oraz Znajomym** za cierpliwość, zrozumienie oraz wiarę w moje umiejętności. Dziękuję wszystkim **Pracownikom i Doktorantom** Zakładu Immunologii Chorób Zakaźnych za miłą i inspirującą atmosferę.

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	7
SUMMARY	10
WYKAZ SKRÓTÓW	13
1. WSTĘP	15
1.1. Choroba Alzheimer	15
1.1.1. Czynniki ryzyka rozwoju choroby Alzheimer	18
1.1.2. Patofizjologia choroby Alzheimer	19
1.2. Rola układu odpornościowego w przebiegu choroby Alzheimer	22
1.2.1. Stan zapalny w mózgu (neuroinflammation)	23
1.2.2. Obwodowy układ odpornościowy	26
1.3. Hipoteza infekcyjna rozwoju choroby Alzheimer	30
1.3.1. Patogeny uznawane za czynniki ryzyka rozwoju choroby Alzheimer	31
1.3.2. Mikrobiom jamy ustnej, paradontoza a choroba Alzheimer	35
2. CEL PRACY	41
3. MATERIAŁY I METODY	44
3.1. Materiały	44
3.1.1. Odczynniki chemiczne i płyny hodowlane	44
3.1.2. Gotowe zestawy	45
3.1.3. Sprzęt i aparatura badawcza	45
3.1.4. Oprogramowanie komputerowe	46
3.1.5. Materiały zużywalne	46
3.1.6. Linia komórkowa i wirus indykatorowy	47
3.1.7. Lipopolisacharyd z <i>Porphyromonas gingivalis</i>	47
3.1.8. Oligonukleotydy do reakcji real-time PCR	47
3.1.9. Sondy TaqMan	48
3.2. Metody	49
3.2.1. Kwestie etyczne	49
3.2.2. Grupa badana	49
3.2.3. Pobranie próbek krwi i śliny	51
3.2.4. Morfologia krwi	51
3.2.5. Prowadzenie hodowli komórkowych	51
3.2.6. Namnażanie VSV	52
3.2.7. Oznaczanie miana VSV metodą TCID ₅₀	52
3.2.8. Izolacja leukocytów z krwi obwodowej	52

3.2.9.	<i>Stymulacja PBLs LPS-PG</i>	53
3.2.10.	<i>Oznaczanie poziomu nieswoistej odpowiedzi immunologicznej – test oporności leukocytów na zakażenie VSV</i>	54
3.2.11.	<i>Ilościowe oznaczenie stężenia cytokin</i>	54
3.2.12.	<i>Izolacja RNA i synteza komplementarnego DNA</i>	55
3.2.13.	<i>Analiza ekspresji genów</i>	57
3.2.14.	<i>Izolacja genomowego DNA</i>	58
3.2.15.	<i>Genotypowanie polimorfizmów pojedynczego nukleotydu</i>	58
3.2.16.	<i>Izolacja bakteryjnego DNA</i>	60
3.2.17.	<i>Przygotowanie bibliotek i sekwencjonowanie 16S rDNA</i>	60
3.2.18.	<i>Analiza statystyczna</i>	63
4.	WYNIKI	69
4.1.	Charakterystyka grupy badanej.....	69
4.2.	Ocena zmian w profilach komórek immunologicznych krwi obwodowej.....	72
4.3.	Ocena związku między stanem zaawansowania choroby Alzheimera oraz stanem zapalnym przyzębia (paradontoza).....	73
4.4.	Analiza poziomu wytwarzanych cytokin: IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 i IL-15 przez PBLs w odpowiedzi na LPS-PG	78
4.5.	Wpływ współwystępowania AD i PeD na odpowiedź odpornościową PBLs na LPS-PG	80
4.6.	Analiza poziomu ekspresji genów związanych z aktywacją i regulacją stanu zapalnego: <i>COX1, COX2, SOCS1, SOCS3, STAT1, STAT3, IRF1, IRF3, AP-1 (JUN), PI3KR1, NFkB</i> w odpowiedzi na LPS-PG.....	84
4.7.	Analiza związku pomiędzy poziomem nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, mierzonej testem oporności PBLs na zakażenie wirusem indykatorowym VSV, a współwystępowaniem AD i PeD	86
4.8.	Analiza poziomu wytwarzanych cytokin pro- i przeciwzapalnych przez PBLs w odpowiedzi na zakażenie VSV	88
4.9.	Wpływ współwystępowania AD i PeD na odpowiedź odpornościową obwodowych komórek immunologicznych na VSV.....	91
4.10.	Analiza częstości występowania polimorfizmów genów związanych z odpowiedzią immunologiczną u pacjentów z AD i PeD	93
4.11.	Analiza związku występowania określonych alleli układu HLA oraz poziomu wytwarzanych mediatorów stanu zapalnego przez PBLs w odpowiedzi na LPS-PG	100
4.12.	Ocena różnorodności mikrobiomu jamy ustnej u pacjentów z AD i PeD	105
4.13.	Analiza związku między składem mikrobiomu jamy ustnej a odpowiedzią cytokinową PBLs na LPS-PG.....	115
5.	DYSKUSJA	117

6. WNIOSKI KOŃCOWE	143
7. PRZYSZŁE KIERUNKI BADAŃ	144
8. BIBLIOGRAFIA.....	145
SPIS RYSUNKÓW.....	163
SPIS TABEL.....	165
DODATEK.....	166

STRESZCZENIE

Choroba Alzheimera (AD) jest najczęstszą postacią demencji na świecie, która stanowi od 60 do 80% wszystkich jej przypadków. Niestety, wraz z wydłużaniem się średniej długości życia rośnie również liczba przypadków demencji, dla której wiek jest najważniejszym czynnikiem ryzyka. Obecnie AD jest uważana za jedno z najpoważniejszych wyzwań społecznych i ekonomicznych wymagającym pilnej interwencji. Przez wiele dekad w dziedzinie badań nad AD dominowała hipoteza kaskady amyloidu, która wskazywała na główny udział złogów peptydu amyloidu- β (A β) obecnych w mózgu w patofizjologii AD, jednak wyniki ostatnich lat w znaczący sposób zmieniły ten pogląd. Obecnie AD uważana jest nie tylko za chorobę neurodegeneracyjną mózgu, ale również za chorobę układową, ponieważ dotyka zarówno ośrodkowego układu nerwowego jak i procesów ogólnoustrojowych, a zmiany w odpowiedzi zapalnej w mózgu, jak również w adaptacyjnej i wrodzonej odpowiedzi immunologicznej wydają się kluczowe dla pełnego zrozumienia jej przyczyn.

Dodatkowym źródłem cząsteczek zapalnych w mózgu mogą być infekcje, w tym te obejmujące jamę ustną, takie jak zapalenie przyzębia (paradontoza, PeD). W rezultacie PeD i zmiany w składzie mikrobioty jamy ustnej mogą odgrywać kluczową rolę w patogenezie AD. Ze względu na bliskie położenie anatomiczne jamy ustnej i mózgu istnieje możliwość infiltracji mózgu przez periopatogeny jak również ich metabolity. Przyczynia się to do powstawania stanu zapalnego w mózgu, a w konsekwencji aktywacji rezydujących komórek odpornościowych, akumulację patologicznych białek, w tym A β , śmierci neuronów oraz neurodegeneracji. Wstępne badania potwierdzają, że stan zapalny wywołany przez periopatogeny może być jednym z czynników przyspieszających rozwój AD, ale nadal związek tych dwóch zaburzeń nie został w pełni wyjaśniony, co uzasadnia potrzebę dalszych badań w tym obszarze. AD jest przyczyną najwyższej śmiertelności wśród ludzi na całym świecie, dlatego poszerzenie wiedzy na temat roli mikrobiomu jamy ustnej i odpowiedzi immunologicznej w patogenezie AD ma kluczowe znaczenie.

Głównym celem tego badania była kompleksowa analiza współzależności między AD i PeD na poziomie klinicznym, funkcjonowania obwodowych komórek odpornościowych, molekularnym oraz mikrobiologicznym. Zrozumienie tych

mechanizmów jest istotne w celu opracowania nowych, skutecznych terapii zatrzymujących lub opóźniających rozwój choroby. Określenie związku między PeD, aktywacją zapalną i parametrami klinicznymi w AD przeprowadzono z wykorzystaniem modelu izolowanych leukocytów krwi obwodowej (PBLs) *ex vivo*, które poddawano ocenie aktywacji i odpowiedzi odpornościowej na antygeny bakteryjny i wirusowy. W badaniach wykorzystano LPS-u pochodzący z periopatogenu - *Porphyromonas gingivalis* (LPS-PG) oraz wirus indykatorowy VSV (*vesicular stomatitis virus*), za pomocą którego określono poziom wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Następnie przeprowadzono analizę cząsteczek pro- i przeciwzapalnych, a także poziomu ekspresji genów związanych z aktywacją i regulacją odpowiedzi zapalnej. Zbadano również związek między parametrami klinicznymi w AD i polimorfizmami genów związanych z odpowiedzią immunologiczną (fenotyp hiper zapalny) w AD oraz skład gatunkowy mikrobioty jamy ustnej.

Na podstawie analizy parametrów klinicznych stwierdzono, że istnieje ścisły związek między występowaniem AD i paradontozy, a obciążenie stanem zapalnym przyzębia u pacjentów demencyjnych co może istotnie wpływać na pogarszanie się funkcji poznawczych i progresję AD. Przeprowadzone badania pozwoliły ustalić, że w przebiegu AD dochodzi do istotnych zmian w składzie obwodowych komórek odpornościowych, co może być związane z osłabieniem odporności wrodzonej pacjentów. W wyniku zakażenia komórek wirusem indykatorowym VSV pacjenci z AD charakteryzowali się istotnie niższymi stężeniami wydzielonych cytokin prozapalnych w związku z tym można przypuszczać, że cechują się oni ogólnie niższą odpornością wrodzoną niż osoby zdrowe. Nie stwierdzono natomiast, aby obciążenie stanem zapalnym przyzębia było związane z poziomem wrodzonej odporności u osób zdrowych poznawczo. Na poziomie molekularnym obwodowe komórki odpornościowe pacjentów obciążonych AD charakteryzowały się zmniejszonym wytwarzaniem mediatorów zapalnych przy jednocześnie gwałtownej odpowiedzi odpornościowej w odpowiedzi na antygen bakteryjny (LPS-PG). Zaobserwowano znacznie większy wyrzut mediatorów stanu zapalnego u osób z AD niż u osób kognitywnie zdrowych, co może wskazywać, że komórki pacjentów z AD ulegają hiperaktywacji. Dodatkowo, zwiększona ekspresja genu *AP-1* wśród pacjentów AD może wiązać się z nasileniem stanu zapalnego przyzębia czym można tłumaczyć większą ekspresję cytokin w odpowiedzi na LPS-PG.

Zaobserwowano także różnice w składzie mikrobioty jamy ustnej między osobami zdrowymi poznawczo a chorymi z AD. Pacjenci z AD charakteryzowali się wyższym udziałem bakterii *Bacteroidetes* i niższym *Proteobacteria* niż osoby zdrowe poznawczo.

Przeprowadzone badania potwierdzają, że paradontoza (PeD) jako choroba infekcyjna i zapalna, jest dodatkowym, znacznym, obciążeniem dla układu odpornościowego pacjentów cierpiących na AD, co wpływa na ogólną kondycję i status obwodowych komórek odpornościowych oraz powoduje utrzymywanie się przewlekłego ogólnoustrojowego stanu zapalnego o niskim nasileniu. Dlatego priorytetem w dziedzinie zdrowia psychicznego powinno być wdrożenie diagnostyki stanu zapalnego przyzębia (paradontozy) wśród osób z zaburzeniami funkcji poznawczych oraz demencją, zwłaszcza typu alzheimerowskiego (AD). Należy także rozważyć włączenie leczenia paradontozy na stałe do protokołu leczenia/postępowania z pacjentami demencyjnymi, ale także z osobami wykazującymi łagodne zaburzenia poznawcze a personel medyczny tj. pielęgniarki, lekarze psychiatry oraz stomatolodzy powinni być szkoleni oraz na bieżąco informować pacjentów o koniecznej profilaktyce paradontozy, aby uniknąć przyszłych konsekwencji dla zdrowia psychicznego.

SUMMARY

Alzheimer's disease (AD) is the most common dementia type worldwide, accounting for 60 to 80% of all cases. Unfortunately, as average life expectancy increases, the number of dementia cases is also increasing, for which age is the most significant risk factor. Currently, AD is considered one of the most serious social and economic challenges requiring urgent intervention. For many decades the amyloid cascade hypothesis dominated AD research, indicating that deposits of amyloid-beta peptide (A β) in the brain play a major role in the pathophysiology of AD. However, recent findings have significantly altered this view. Nowadays, AD is considered not only as neurodegenerative disease of the brain but rather as systemic disease, as it affects both the central nervous system and systemic processes. Changes in the inflammatory response in the brain, as well as in the adaptive and innate immune responses, seem crucial for fully understanding its causes.

An additional source of inflammatory molecules in the brain may be infections, including those involving the oral cavity, such as periodontal disease (PeD). As a result, PeD and changes in the composition of the oral microbiota may play a key role in the pathogenesis of AD. Due to the close anatomical location of the oral cavity and the brain, there is a possibility of infiltration of the brain by periopathogens and their metabolites. This contributes to the development of inflammation in the brain, leading to the activation of resident immune cells, accumulation of pathological proteins including A β , neuronal death, and neurodegeneration. Preliminary studies confirm that inflammation caused by periopathogens may be one of the factors accelerating the development of AD, but the relationship between these two disorders has not yet been fully explained, justifying the need for further research in this area. AD is a leading cause of mortality worldwide; therefore, expanding knowledge about the role of the oral microbiome and immune response in the pathogenesis of AD is crucial.

The main objective of this study was a comprehensive analysis of the interdependencies between AD and PeD at the clinical level, the functioning of peripheral immune cells, and at molecular and microbiological levels. Understanding these mechanisms is important for developing new, effective therapies that stop or delay disease progression. The relationship between PeD, inflammatory activation, and

clinical parameters in AD was determined using an *ex vivo* model of isolated peripheral blood leukocytes (PBLs), which were assessed for activation and immune response to bacterial and viral antigens. The study utilized lipopolysaccharide from the periopathogen *Porphyromonas gingivalis* (LPS-PG) and the indicator virus VSV (*vesicular stomatitis virus*) to determine the level of innate immune response. Subsequently, an analysis of pro- and anti-inflammatory molecules was conducted, as well as the expression levels of genes associated with activation and regulation of the inflammatory response. The relationship between clinical parameters in AD, gene polymorphisms associated with the immune response (hyper-inflammatory phenotype), and the species composition of the oral microbiota was also examined.

Based on the analysis of clinical parameters, it was found that there is a close relationship between the occurrence of AD and PeD, and that the burden of periodontal inflammation in patients with dementia may significantly affect the deterioration of cognitive functions and progression of AD. The conducted studies established that significant changes occur in the composition of peripheral immune cells during the course of AD, which may be associated with the weakening of patients' innate immunity. Following infection of cells with the indicator virus VSV, patients with AD exhibited significantly lower concentrations of secreted pro-inflammatory cytokines, suggesting that they generally have lower innate immunity than healthy individuals. However, it was not found that the burden of periodontal inflammation was associated with the level of innate immunity in cognitively healthy individuals. At the molecular level, peripheral immune cells of patients with AD were characterized by decreased production of inflammatory mediators while exhibiting a rapid immune response to a bacterial antigen (LPS-PG). A significantly greater release of inflammatory mediators was observed in individuals with AD than in cognitively healthy individuals, which may indicate that the cells of patients with AD undergo hyperactivation. Additionally, increased expression of the *AP-1* gene among AD patients may be associated with the increased periodontal inflammation, which could explain the higher expression of cytokines in response to LPS-PG. Differences were also observed in the composition of the oral microbiota between cognitively healthy individuals and those with AD. Patients with AD were characterized by a higher proportion of *Bacteroidetes* bacteria and lower *Proteobacteria* than cognitively healthy individuals.

The conducted studies confirm that PeD, as an infectious and inflammatory disease, is an additional significant burden on the immune system of patients suffering from AD. This affects the overall condition and status of peripheral immune cells and leads to the persistence of chronic low-grade systemic inflammation. Therefore, a priority in the field of mental health should be the implementation of diagnostics for periodontal inflammation (PeD) among individuals with cognitive impairments and dementia, especially of the Alzheimer's type (AD). It should be also considered to permanently include periodontal treatment in the protocol for managing patients with dementia and those exhibiting mild cognitive impairments. Medical personnel, such as nurses, psychiatrists, and dentists, should be trained and continually inform patients about the necessary of prevention of PeD to avoid future mental health consequences.

WYKAZ SKRÓTÓW

Aβ	peptyd amyloidu beta;
Aβ40	amyloid beta o długości 40 aminokwasów;
Aβ42	amyloid beta o długości 42 aminokwasów;
AD	choroba Alzheimera, też grupa badana;
API	wskaźnik ilości płytki nazębnej w przestrzeniach międzyzębowych;
APOE	gen kodujący apolipoproteiny E;
ApoE	apolipoproteiny E;
APP (AβPP)	białko prekursora amyloidu beta;
AMP	białko przeciwdrobnoustrojowe;
ANOVA	analiza wariancji;
ATP	adenozyno-5'-trifosforan;
BBB	bariera krew-mózg;
BDNF	neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego;
BOP	wskaźnik powierzchni krwawiących dziąseł;
BOPxT	wskaźnik powierzchnia krwawiących dziąseł podzielony przez liczbę zębów;
CAL	wskaźnik utraty przyczepu łącznotkankowego;
CD14	koreceptor i marker powierzchniowy CD14;
CD18	koreceptor i marker powierzchniowy CD18;
cDNA	komplementarny DNA;
CPE	efekt cytopatyczny;
DAMPs	alarminy, struktury molekularne związane z uszkodzeniami;
DMFT	indeks zepsutych-brakujących-wypełnionych zębów stałych;
DSM-5	5. edycja klasyfikacji zaburzeń psychicznych;
EDTA	kwas wersenowy;
EFP	Europejska Federacja Periodontologii;
EOAD	choroba Alzheimera o wczesnym początku;
FAD	rodzinna forma choroby Alzheimera;
FAM	barwnik fluorescencyjny (fluorofor);
FBS	płodowa surowica bydlęca;
gDNA	genomowe DNA;
GDS	geriatryczna skala oceny depresji;
H1N1	wirus grypy szczep H1N1;
H3N2	wirus grypy szczep H3N2;
HDL	lipoproteina o wysokiej gęstości;
HHV-1	wirus opryszczki pospolitej typu 1;
HHV-2	wirus opryszczki pospolitej typu 2
HHV-3 (VZV)	wirus ospy wietrznej i półpaśca;
HHV-4 (EBV)	wirus Epsteina-Barr;
HHV-5 (CMV)	cytomegalowirus;
HHV-6	ludzki herpeswirus typu 6;
HSE	opryszczkowe zapalenie mózgu;
LDL	lipoproteina o niskiej gęstości;
LDLR	receptor dla LDL;
LOAD	choroba Alzheimera o późnym początku;

LPS	lipopolisacharyd;
LPS-EC	lipopolisacharyd z <i>Escherichia coli</i> ;
LPS-PG	lipopolisacharyd z <i>Porphyromonas gingivalis</i> ;
M	średnia;
MAD	odchylenie medianowe;
MCI	łagodne zaburzenia poznawcze;
Mdm	mediana;
MMSE	test Mini-Mental State Examination;
MoCA	test Montreal Cognitive Assessment;
NFTs	sploty neurofibrylarne;
NGS	sekwencjonowanie nowej generacji;
NHST	testowanie istotności hipotez zerowych;
NMDA	kwas N-metylo-D-asparaginowy;
NMDAR	receptor N-metylo-D-asparaginowy;
OUN	ośrodkowy układ nerwowy;
PAMPs	wzorce molekularne związane z patogenami;
PBLs	obwodowe komórki odpornościowe ;
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy;
PD	wskaźnik głębokości sondowania kieszonek dziąsłowych;
PeD	zapalenie przyzębia (paradontoza), też grupa osób z paradontozą;
PERMANOVA	permutacyjna wielowymiarowa analiza wariancji;
PET	pozytonowa tomografia emisyjna;
PMR	płyn mózgowo rdzeniowy;
PRR	receptory rozpoznające wzorce;
PSEN1	gen kodujący presenilinę-1;
PSEN2	gen kodujący presenilinę-2;
R ²	współczynnik determinacji;
rDNA	rybosomalne DNA;
RPMI	płyn hodowlany Roswell Park Memorial Institute;
ROS	reaktywne formy tlenu;
SAD	sporadyczna forma choroby Alzheimera;
SASP	fenotyp wydzielniczy SASP;
SD	odchylenie standardowe z próby;
SNP	polimorfizm pojedynczego nukleotydu;
SS	suma kwadratów;
TCID ₅₀	miano infekcyjne zakażające komórki w 50%;
TLR	receptory Toll-podobne;
UMW	Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu;
VIC	barwnik fluorescencyjny (fluorofor);
VLDL	lipoproteina o bardzo niskiej gęstości;
VSV	wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej;
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia;
ZDR	grupa osób zdrowych poznawczo (kontrola);

1. WSTĘP

Choroby neurodegeneracyjne to nieuleczalne schorzenia, które charakteryzują się postępującą dysfunkcją układu nerwowego na skutek degradacji neuronów, co prowadzi do demencji, zaburzeń motorycznych i innych zaburzeń funkcjonalnych (1). Demencja dotyczy przede wszystkim osoby starsze, niestety zmiany neurodegeneracyjne mogą rozpocząć się w każdym wieku, nawet 15-20 lat przed wystąpieniem klinicznych objawów choroby. Najczęstszą postacią demencji jest **choroba Alzheimera** (ang. *Alzheimer's disease* – AD) (1). Obecnie przy braku skutecznego leku i niewielu zatwierdzonych terapiach, AD szybko staje się jedną z najdroższych i najbardziej wyniszczających chorób tego stulecia. Wynika to z niewystarczającego zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw choroby, a być może również z tego, że zbyt wiele podstawowych luk w wiedzy, alternatywnych interpretacji danych i zawitości metodologicznych nie otrzymało należytej uwagi. Dlatego istnieje pilna potrzeba poszukiwania pierwotnych przyczyn procesów neurodegeneracyjnych obserwowanych w AD oraz przyspieszenia rozwoju terapii ukierunkowanych.

1.1. Choroba Alzheimera

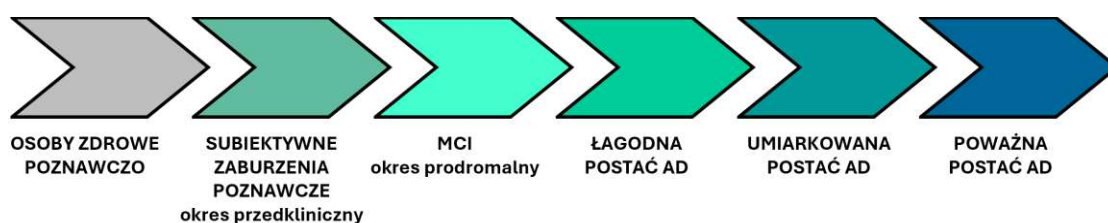
AD należy do grupy chorób otępiennych (demencji), które cechują się nabytym, postępującym i nieodwracalnym uszkodzeniem ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Po raz pierwszy kliniczną i neuropatologiczną charakterystykę choroby przedstawił Alois Alzheimer w 1906 roku na podstawie badań pacjentki, która trafiła do szpitala we Frankfurcie w 1901 roku z objawami utraty pamięci, halucynacjami, urojeniami oraz deficytami poznawczymi (2). Po śmierci chorej, jej mózg został poddany analizie, która ujawniła charakterystyczne zmiany zwyrodnieniowe wraz ze złogami znanymi dziś jako blaszki starcze (ang. *senile plaques*) i splątkami neurofibrylarnymi (ang. *neurofibrillary tangles* – NFTs) (2).

Szacuje się, że AD stanowi od 50 do 80% wszystkich przypadków demencji na świecie (3,4). Według Amerykańskiego Towarzystwa Alzheimerowskiego (ang. *Alzheimer's Association*) demencja dotyczy już 55 milionów ludzi na całym świecie, a ogólnoświatowe szacunki podają, że do połowy XXI wieku liczba chorych z demencją

może przekroczyć nawet 152 miliony ludzi (3,4). Według Europejskiego Raportu przygotowanego w ramach programu Unii Europejskiej w dziedzinie zdrowia na lata 2014-2020 problem demencji dotyczy obecnie prawie 8 mln Europejczyków. Uważa się, że liczba ta zwiększy się niemal dwukrotnie przed 2050 rokiem osiągając nawet 14 mln chorych (5). Również w Polsce osób z demencją przybywa. W 2019 roku zarejestrowano ponad 500 tys. przypadków, a według prognoz, do połowy wieku liczba Polaków z demencją przekroczy milion osób (5). Wzrost liczby chorych stanowi poważny problem społeczny i ekonomiczny, zwłaszcza dla krajów rozwiniętych, w których średnia długość życia zwiększa się. Według raportu WHO z sierpnia 2024 roku, gdzie prezentowane są dane szacunkowe za 2021 rok AD wskazywana jest jako siódma najczęstsza przyczyna śmierci wśród wszystkich chorób na świecie (6,7). Stanowi więc poważny problem, który wraz ze starzejącym się społeczeństwem będzie znaczącym wyzwaniem medycznym w nadchodzących latach.

AD jest chorobą degeneracyjną prowadzącą do atrofii niektórych obszarów mózgu w obrębie kory mózgowej, a w szczególności hipokampu, środkowego zakrętu skroniowego, kory śródwęchowej (kora entoryalna) i tylnego zakrętu obręczy (8). Zmiany neurodegeneracyjne powodowane są głównie przez śmierć neuronów cholinergicznym odpowiedzialnych za uwagę, proces uczenia się, pamięć oraz czucie (9), a także neuronów glutaminergicznym głównie dotyczących receptora *N*-metylo-D-asparaginowego (NMDAR) (10), zaangażowanych w proces uczenia się, pamięć oraz neuroplastyczność mózgu (11). W przebiegu AD obserwuje się przede wszystkim zaburzenia zdolności poznawczych i funkcjonalnych. W pierwszych etapach dochodzi do łagodnych zaburzeń pamięci, uwagi oraz planowania. Początkowo zaburzenia wpływają na wykonywanie tylko skomplikowanych czynności, przez co często mylone są z naturalnym procesem starzenia się lub stresem i nie wzbudzają większych podejrzeń. W bardziej zaawansowanych stadiach choroby dochodzi do coraz poważniejszych zaburzeń zdolności uczenia się i zapamiętywania. AD dotyczy przede wszystkim osób starszych, powyżej 65. roku życia. Uważa się jednak, że przedkliniczny etap AD może trwać od 2 do 20 lat ustępując następnie trwającemu około 7 lat okresowi prodromalnemu. Po tym czasie pojawiają się już typowe dla AD objawy kliniczne (12) (rysunek 1). Wyróżnia się dwie formy AD: rodzinną (ang. *familial Alzheimer's disease* – FAD), która stanowi do 5% przypadków i charakteryzuje się wczesnym początkiem –

przed 65 rokiem życia (ang. *early-onset Alzheimer's disease* – EOAD) – oraz sporadyczną (ang. *sporadic Alzheimer's disease* – SAD) o późnym początku – rozpoznawana zwykle po 65 roku życia (ang. *late-onset Alzheimer's disease* – LOAD) – która stanowi nawet 95% wszystkich przypadków AD (13). FAD związany jest przede wszystkim z mutacjami genetycznymi dziedziczonymi autosomalnie dominująco. Wśród nich zidentyfikowano mutacje w genach kodujących białko prekursora amyloidu (ang. *amyloid precursor protein* – APP) (21q21.3) oraz preseniliny 1 (*PSEN1*, 14q24.2) i 2 (*PSEN2*, 1q42.13) (13,14). Z kolei SAD uważany jest za idiopatyczny (15), a jego wystąpienie warunkują różnorodne czynniki ryzyka.



Rys. 1. *Etapy w przebiegu choroby Alzheimera*

MCI – łagodne zaburzenia poznawcze, AD – choroba Alzheimera.

Pomimo ponad 100 lat badań, wciąż nie istnieje skuteczny lek zatrzymujący postęp choroby lub odwracający skutki zmian neurodegeneracyjnych. Dwa nowe leki, które dopuszczono niedawno do leczenia na wczesnych etapach AD – aducanumab i lecanemab – tylko częściowo hamują rozwój choroby a jednocześnie wzbudzają wiele obaw i kontrowersji ze względu na odnotowane poważne skutki uboczne, z których najważniejsze obejmują kurczenie się oraz obrzęk mózgu (16–18). Wydaje się, że brak skutecznego leczenia i profilaktyki AD wynika głównie z tego, iż pierwotne przyczyny rozwoju choroby nie zostały jednoznacznie poznane. Ponadto, diagnostyka AD, z powodu braku specyficznego i czułego biomarkera choroby, jest utrudniona i pozwala na postawienie diagnozy dopiero w momencie ujawnienia się znaczących deficytów poznawczych. Obecnie najważniejszym wyzwaniem przed jakim stoją lekarze i naukowcy jest opracowanie metod wykrywania rozwijającej się choroby w okresie przedklinicznym oraz pełne zrozumienie jej etiologii.

1.1.1. Czynniki ryzyka rozwoju choroby Alzheimera

Podeszły wiek, obecność przypadków AD w historii rodziny, płeć (kobiety stanowią dwie trzecie przypadków) oraz uwarunkowania genetyczne są najważniejszymi niemodyfikowalnymi czynnikami ryzyka wystąpienia choroby (3) (rysunek 2). Po 65 roku życia ryzyko AD podwaja się co pięć lat, natomiast po 85 roku życia ryzyko dotyczy prawie jednej trzeciej populacji. Dekadę temu naukowcy znali tylko 10 genów powiązanych z AD. Obecnie zidentyfikowano już ponad 70 regionów genetycznych związanych z tą chorobą. Jednym z najlepiej poznanych genów wpływających na ryzyko AD jest gen apolipoproteiny E (*APOE*). Białko apolipoproteina E (apoE) uczestniczy w transporcie cholesterolu (niezbędnym w procesie tworzenia mieliny) i innych rodzajów tłuszczów we krwi (19). ApoE jest wytwarzana głównie w hepatocytach wątroby. Mózg jest drugi po wątrobie pod względem ilości wytwarzania apoE, głównie przez astrocyty i w mniejszym stopniu przez mikroglej, oligodendrocyty, komórki ścienne naczyń i neurony (20). ApoE pełni funkcję transportera cholesterolu i innych lipidów pomiędzy komórkami w mózgu i jest modulatorem odpowiedzi zapalnej w zdrowych mózgach. Gen *APOE* występuje w kilku postaciach, będących allelami ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$). Obecność *APOE* $\epsilon 4$ (19q13.32) zwiększa ryzyko rozwoju choroby i wiąże się z jej wcześniejszym wystąpieniem w niektórych populacjach. Białka apoE4 są słabo lipidowane, a poprzez toksyczne działanie prowadzą do stanu zapalnego w mózgu (ang. *neuroinflammation*), uszkodzenia naczyń mózgowych i zaostrzenia zmian neurodegeneracyjnych. Uważa się, że utrata fizjologicznej funkcji apoE4 przyczynia się do patogenezy AD (21). Ryzyko wystąpienia AD jest 3-4 razy wyższe u osób z jednym allelem *APOE* $\epsilon 4$ i około 10-15 razy wyższe u osób z dwoma allelami *APOE* $\epsilon 4$ (19). Jednak częstość występowania różnych alleli i ryzyko związane z *APOE* jak i innymi wariantami genetycznymi mogą nie być takie same we wszystkich populacjach i różnią się w zależności od regionu geograficznego (22).

Za 30-50% przypadków AD mogą jednak odpowiadać czynniki modyfikowalne, czyli takie których wpływ na ryzyko rozwoju choroby można zmniejszyć poprzez zmianę m.in. stylu życia (rysunek 2). Komisja Lancet ds. zapobiegania demencji, interwencji i opieki (ang. *the Lancet Commission on dementia prevention, intervention, and care*) w swoim raporcie z 2024 roku (23) podaje, że wpływając na 12 najczęstszych

modyfikowalnych czynników ryzyka można zapobiec lub opóźnić rozwój nawet 40% przypadków demencji. Należą do nich między innymi uszkodzenia mózgu (urazy głowy), otyłość, nadciśnienie i choroby serca, palenie tytoniu i cukrzyca (4,24). Podejrzewa się, że znaczenie mogą mieć również epizody depresji, stres, zaburzenia snu oraz hiperlipidemia (4,24). Wśród modyfikowalnych czynników ryzyka coraz częściej podaje się również zaburzenia w funkcjonowaniu układu odpornościowego oraz infekcje (24), w tym także choroby infekcyjne w obrębie jamy ustnej, np. paradontozę (choroba zapalna przyzębia wywoływana przez bakterie) (25). Natomiast ochronny efekt w przypadku zaburzeń poznawczych mają aktywność fizyczna, aktywność intelektualna, zrównoważona dieta, ograniczenie spożywania alkoholu i innych używek oraz aktywność społeczna (24,26).

Modyfikowalne czynniki chroniące przed rozwojem AD

-  aktywność fizyczna
-  aktywność społeczna
-  aktywność intelektualna
-  zrównoważona dieta

Modyfikowalne czynniki ryzyka rozwoju AD

-  urazy głowy
-  otyłość i hiperlipidemia
-  nadciśnienie i choroby serca
-  palenie tytoniu
-  cukrzyca
-  depresja i stres
-  zaburzenia snu
-  infekcje
-  zaburzenia odpowiedzi odpornościowej

Rys. 2. Modyfikowalne czynniki wpływające na rozwój choroby Alzheimera

1.1.2. Patofizjologia choroby Alzheimera

Na przestrzeni lat powstało wiele hipotez za pomocą których starano się wyjaśnić przyczyny śmierci neuronów skutkujące degeneracją mózgu przy uwzględnieniu wszystkich zmian obserwowanych u osób z AD. Należą do nich hipoteza cholinergiczna, hipoteza kaskady amyloidu, hipoteza tau, hipoteza stanu zapalnego (27) oraz hipoteza infekcyjna (28). Mimo to wciąż żadna z nich samodzielnie nie wyjaśnia

złożonego mechanizmu rozwoju AD uwzględniając wszystkie jej aspekty. Wydaje się, że wszystkie proponowane rozwiązania mogą okazać się niezbędne do pełnego zrozumienia tego skomplikowanego schorzenia.

Jedną z najstarszych i najczęściej dyskutowanych jest hipoteza kaskady amyloidu autorstwa Johna Hardy'ego (29). Została zaproponowana w wyniku obserwacji charakterystycznych depozytów zewnątrzkomórkowych w postaci tzw. blaszek amyloidowych (płytek starczych) w mózgach pacjentów z AD. Głównym składnikiem blaszek są agregaty peptydowe amyloidu beta ($A\beta$) o długości od 40 do 42 aminokwasów (27). Według założeń hipotezy amyloidowej normalne mechanizmy oczyszczania $A\beta$ w warunkach AD są zaburzone, co prowadzi do ich nadmiernego gromadzenia się i tworzenia złogów. Peptyd $A\beta$ powstaje w wyniku enzymatycznego cięcia białka prekursora amyloidu β (ang. *amyloid precursor protein* – APP) na drodze szlaku amyloidogenicznego. Fizjologicznie APP jest białkiem błonowym typu I, które znajduje się w błonie plazmatycznej oraz w innych organellach błonowych. Funkcje APP są różnorodne i związane z neurogenezą i różnicowaniem komórek nerwowych, mechanizmami synaptycznymi, cyklem komórkowym i adhezją oraz metabolizmem wapnia (30), co więcej proponuje się, że może posiadać również właściwości przeciwdrobnoustrojowe (31). Jak wspomniano, największe znaczenie w rozwoju AD mają dwa typy $A\beta$ o długości 40 i 42 aminokwasów (odpowiednio $A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$). Spośród nich najgroźniejszą frakcją uwalnianego peptydu jest $A\beta_{42}$, który charakteryzuje się niższą rozpuszczalnością, wysoką neurotoksycznością i większą tendencją do agregacji niż $A\beta_{40}$. Mimo to wspólnie budują nierozpuszczalne blaszki, które blokują kanały jonowe, niszczą homeostazę wapniową neuronów, wywołują stres oksydacyjny, uszkodzenia mitochondriów i zaburzają gospodarkę energetyczną komórek doprowadzając w ostateczności do śmierci neuronów i utraty połączeń nerwowych (32,33). Dziś wiadomo także, że włókna $A\beta$ wewnątrz blaszek mogą być rozgałęzione i poprzeplatane innymi materiałami z mózgu, takimi jak małe pęcherzyki czy fragmenty błon lipidowych (34). Na poziomie fizjologicznym $A\beta$ zmniejsza aktywność pobudzającą kanałów potasowych i zmniejsza apoptozę neuronów dlatego sugeruje się, że fizjologicznym działaniem $A\beta$ podczas starzenia jest neuroprotekcja. Inne sugerowane fizjologiczne efekty $A\beta$ obejmują blokowanie nieszczelności w barierze krew-mózg (ang. *blood-brain barrier* – BBB), wspomaganie powrotu do zdrowia po pourazowym

uszkodzeniu mózgu i prawdopodobnie tłumienie zmian nowotworowych poprzez hamowanie wirusów onkogennych (35). Ponadto w miejscu docelowym A β moduluje reakcję zapalną w odpowiedzi na różnorodne czynniki środowiskowe i może wykazywać aktywność podobną do białek przeciwdrobnoustrojowych (ang. *antimicrobial peptides* – AMPs) będących częścią nieswoistej odpowiedzi odpornościowej (36). Przeciwgrzybicza oraz przeciwbakteryjna aktywność A β względem bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych została potwierdzona dla *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* (37). A β wykazuje również właściwości przeciwwirusowe względem wirusa opryszczki pospolitej typu 1 (ang. *Human herpes virus 1* – HHV-1), w badaniach *in vitro* działając równie skutecznie jak acyklowir, oraz przeciw szczepom grypy H1N1 i H3N2 powodując agregację cząstek wirusa (36). Natomiast w badaniach *in vivo* na myszach 5XFAD, które konstytutywnie wytwarzają ludzki A β , zakażenie gatunkiem *Salmonella typhimurium* skutkowało dłuższym czasem przeżycia zwierząt w porównaniu do szczepu dzikiego (36). Zgodnie z hipotezą kaskady amyloidowej, nagromadzenie A β zapoczątkowuje łańcuch procesów neurodegeneracyjnych, takich jak stan zapalny, stres oksydacyjny i akumulacja białka Tau, co ostatecznie prowadzi do objawów demencji. Choć hipoteza kaskady amyloidowej jest najlepiej zbadaną hipotezą, nie wyjaśnia ona w pełni złożonej etiologii AD, ze względu na udział innych czynników w rozwoju tej choroby (27).

Histopatologicznie, AD charakteryzuje się także obecnością wewnątrzkomórkowych splątków neurofibrylarnych (NFTs), zbudowanych z fosforylowanego białka Tau, które znajdują się w podkorowej istocie szarej i korze mózgowej. W przeciwieństwie do A β włókna Tau w splątkach lub nitkach są nierozgałęzione i mają tendencję do ustawiania się równolegle względem siebie (34). Fizjologiczna rola białka Tau, które występuje w dużej ilości w neuronach, to zdolność do wiązania i stabilizacji mikrotubul, jednak Tau odgrywa także rolę w pośredniczeniu transportu aksonalnego, strukturze i funkcji synaptycznej oraz neuronalnych szlakach sygnałowych (38).

Jednakże liczne obserwacje i badania eksperymentalne przeczą hipotezie amyloidowej. Naturalna historia progresji AD nie koreluje z tworzeniem się amyloidu w mózgu, dlatego amyloidu nie można powiązać przyczynowo z AD. Skany PET (ang. *positron emission tomography*) mózgów osób kognitywnie zdrowych często wyglądają

tak samo jak skany PET osób z AD. Podczas autopsji mózgów od osób kognitywnie zdrowych nawet 30% z nich miało typowe cechy tworzenia się amyloidu, podobne do tych, które znaleźć można w mózgach osób z AD (39). Pomimo, że zmiany histopatologiczne w mózgu pojawiają się w większej obfitości i są bardziej rozpowszechnione u osób z AD, wydaje się, że patologia A β oraz Tau nie jest wystarczająca do rozwoju pełnej formy choroby, a znaczenie mają również inne czynniki, środowiskowe i/lub genetyczne, które przyspieszają proces starzenia się mózgu i prowadzą do neurodegeneracji.

Hipoteza kaskady amyloidu została zaproponowana ponad trzy dekady temu, jednak od tamtej pory wiele prób klinicznych z zastosowaniem celowanych terapii ukierunkowanych na zmniejszenie stężenia A β nie przyniosło oczekiwanych rezultatów, co sugeruje potrzebę ponownego przyjrzenia się roli A β w etiologii AD i zastosowania nowego, świeżego podejścia (40). Na przestrzeni lat zaproponowano wiele nowych hipotez dotyczących patogenezy AD: hipoteza komórkowego stanu zapalnego czy też hipoteza zakładająca udział czynników zakaźnych (29). Szczególną rolę w patofizjologii AD może odgrywać starzenie się układu odpornościowego, którego nieprawidłowe funkcjonowanie u osób starszych może prowadzić do wielu chorób układowych (41). W przebiegu AD obserwuje się rozwój przewlekłego stanu zapalnego w mózgu (ang. *chronic neuroinflammation*) oraz innych częściach organizmu. Uważa się, że przewlekła odpowiedź zapalna o niskim nasileniu, związana z wiekiem oraz coraz częstszymi infekcjami u osób starszych, może przyczyniać się do progresji choroby. Ponadto obwodowe komórki odpornościowe, takie jak monocyty, makrofagi, neutrofile, komórki NK, czy limfocyty mogą przenikać do OUN przez nieszczelną/uszkodzoną BBB stając się dodatkowym źródłem mediatorów zapalnych i przyczyniając się w ten sposób do zaostrzenia stanu zapalnego w mózgu (29). **Obecnie czynniki zakaźne oraz rozregulowanie odpowiedzi odpornościowej stopniowo uznawane są za kluczowy element prowadzący do zmian neurodegeneracyjnych.**

1.2. Rola układu odpornościowego w przebiegu choroby Alzheimera

Chociaż złogi A β i depozyty białka Tau są uważane za charakterystyczne cechy AD, w ciągu ostatnich dwóch dekad badania genomiczne konsekwentnie wskazują na

centralną rolę mikrogleju oraz dysfunkcji neuroimmunologicznej w patogenezie AD. Dodatkowo literatura naukowa podkreśla potencjalne znaczenie obwodowych zmian immunologicznych, w szczególności sygnalizacji prozapalnej. Dowody na związek między obwodowymi czynnikami immunologicznymi a AD pochodzą głównie z badań epidemiologicznych i obserwacyjnych, które wykazują powiązania między krążącymi markerami zapalnymi a cechami neuropoznawczymi (42).

1.2.1. Stan zapalny w mózgu (*neuroinflammation*)

Stan zapalny (ang. *inflammation*) jest reakcją adaptacyjną organizmu na szkodliwe bodźce i czynniki: substancje chemiczne, patogeny, nieprawidłowe, obce białka i pozostałości po uszkodzonych komórkach (56). Zwykle wywoływany jest miejscowo przez komórki odpornościowe takie jak makrofagi, komórki tuczne oraz komórki dendrytyczne wydzielające mediatory stanu zapalnego w odpowiedzi na uszkodzenia. W wyniku aktywacji stanu zapalnego dochodzi do rozszerzenia i rozluźnienia naczyń krwionośnych, a następnie napływu osocza do uszkodzonej tkanki dzięki czemu zwiększa się dostępność takiego miejsca dla leukocytów, białek układu dopełniacza i przeciwciał. W przypadku usunięcia uszkodzenia dochodzi do wygaszenia reakcji zapalnej, a w poważniejszych sytuacjach do aktywacji odporności swoistej. Ostry, samoograniczający się stan zapalny (ang. *acute inflammation*) ma na celu obronę organizmu i przywrócenie homeostazy ustroju poprzez usunięcie szkodliwych substancji, po której następuje regeneracja tkanki (43). Jednak zmiana odpowiedzi zapalnej z ostrej i krótkotrwałej na długotrwałą (przewlekłą) (ang. *chronic inflammation*) zwłaszcza utrzymującą się na niskim poziomie może prowadzić do poważnych zmian i nieprawidłowego działania narządów wewnętrznych oraz zaburzeń fizjologii komórki. W efekcie uważa się, że przewlekły stan zapalny może mieć szczególne znaczenie w etiologii wielu schorzeń, w tym także AD (44).

Bardzo długo uważano, że mózg jest immunologicznie uprzywilejowany i niedostępny dla obwodowych komórek odpornościowych w normalnych, stabilnych warunkach, a sama koncepcja udziału stanu zapalnego w mózgu w przebiegu AD była przez długi czas ignorowana (45). Jednak obecne badania całkowicie zdefiniowały na nowo koncepcję odporności OUN, zmieniając ją z przekonania, że mózg jest

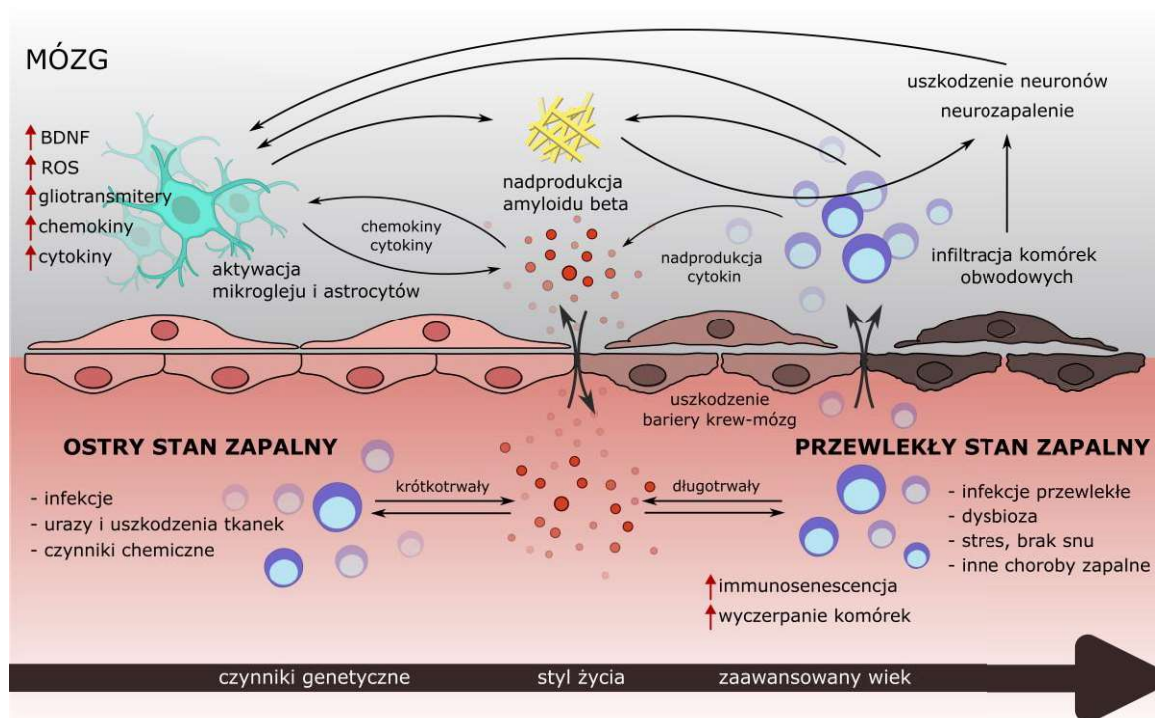
izolowanym organem, na uznanie kluczowej roli mechanizmów odpornościowych i interakcji neuroimmunologicznych w warunkach fizjologicznych i patologicznych. W porównaniu z obwodowym układem odpornościowym OUN jest unikalnym układem z regulowaną odpowiedzią immunologiczną. Dziś wiadomo, że może dochodzić do reakcji zapalnej w mózgu w odpowiedzi na czynniki stresowe, takie jak uraz mózgu, niedokrwienie, nagromadzenie toksycznych białek (np. A β), infekcje czy reakcje autoimmunologiczne (46). Obecnie uważa się, że stan zapalny w mózgu dobrze opisują cztery cechy: zwiększone uwalnianie cytokin, aktywacja komórek mikrogleju, migracja obwodowych komórek odpornościowych oraz zlokalizowane uszkodzenie tkanek (47).

Komórkami pośredniczącymi w odpowiedzi zapalnej w mózgu są przede wszystkim komórki mikrogleju (rezydujące makrofagi) oraz astrocyty (48). Mikroglej stanowi od 5 do 12% wszystkich komórek znajdujących się w OUN (49). Ich podstawowym zadaniem jest nieustanna filtracja i przeszukiwanie środowiska zewnątrzkomórkowego w poszukiwaniu patogenów oraz fragmentów uszkodzonych komórek, a także udział w ochronie i reorganizacji połączeń synaptycznych (50). Mikroglej utrzymuje homeostazę i prawidłowe funkcjonowanie OUN. W normalnych warunkach mikroglej pozostaje w nieaktywnej, spoczynkowej formie (fenotyp M2) badając układ nerwowy za pomocą licznych rozgałęzień cytoplazmatycznych (50). W wyniku aktywacji komórek dochodzi do zmiany fenotypu komórki, a tym samym zmian w ekspresji genów, co wpływa na repertuar markerów białkowych prezentowanych na ich powierzchni (51). Aktywowany mikroglej (fenotyp M1) przyjmuje formę ameboidalną o ograniczonej liczbie wypustek i rozrośniętej cytoplazmie (51). Zmiany funkcjonalne obejmują wzmożoną fagocytozę patogenów i resztek komórkowych, niszczenie uszkodzonych i zainfekowanych komórek oraz rekrutację obwodowych komórek odpornościowych (51). Aktywowane komórki mikrogleju wytwarzają i wydzielają znaczne ilości mediatorów stanu zapalnego i cytokin prozapalnych, takich jak TNF- α , IL-6, czy tlenek azotu (NO) (49). Obok mikrogleju aktywacji ulegają także astrocyty. Astrocyty odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy OUN i dynamicznie reagują na urazy i choroby. W normalnych warunkach ich aktywacja to pożądaný proces, ponieważ w tej formie wydzielają liczne cytokiny, chemokiny, czynniki wzrostu, białka macierzy zewnątrzkomórkowej, cząsteczki adhezyjne oraz gliotransmitery (52) wykazując efekt ochronny zwiększający przeżywalność neuronów, odporność na stres oksydacyjny oraz

stan zapalny. Dodatkowo pośredniczą w migracji neuronalnej oraz angiogenezie, utrzymują szczelność BBB, regulują mikrośrodowisko OUN poprzez detoksykację oraz egzocytozę makrocząsteczek, uczestniczą w odpowiedzi odpornościowej i metabolizmie energetycznym (53).

Aktywacja immunologiczna w OUN zawsze angażuje mikroglej i astrocyty, które w stanach niepatologicznych biorą udział w regulacji homeostazy tkanki mózgowej. W stanach patologicznych natomiast, gdy zawodzą normalne mechanizmy ograniczania stanu zapalnego, dochodzi do nieprawidłowej aktywacji i nadprodukcji czynników zapalnych, co prowadzi do przewlekłego stanu zapalnego w mózgu (54,55). Obecność przewlekłych reakcji neurozapalnych, w których pośredniczą zmieniony mikroglej (reaktywny mikroglej) i astrocyty (reaktywne astrocyty), prowadzi do zmniejszenia wytwarzania neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF) skutkując osłabieniem neurogenezy, ekscytotoksycznością, stresem oksydacyjnym i nadmierną apoptozą (41). Ponadto, skutkuje także osłabianiem wielu funkcji mózgu upośledzając zdolności poznawcze (56). Warto dodać, że o ile ostra odpowiedź immunologiczna w przypadku urazów jest ściśle regulowana i ograniczona czasowo u młodszych dorosłych, to u starszych dorosłych odpowiedź ta może być bardziej przedłużona, a zatem bardziej prawdopodobne jest zainicjowanie lub katalizowanie trwających procesów degeneracyjnych (42). Ograniczone czasowo, zwiększone wytwarzanie cytokin zapalnych, które występuje po ostrej odpowiedzi zapalnej, jest wielokrotnie większe niż to obserwowane w kontekście przewlekłego stanu zapalnego. Jednak rozróżnienie między ostrymi i przewlekłymi reakcjami zapalnymi nie zawsze jest proste, a przewlekłe reakcje zapalne mogą często następować po nieskutecznej ostrej reakcji zapalnej (42,43). Jak wspomniano wcześniej, o ile stan zapalny sam w sobie jest ważną i konieczną cechą odpowiedzi immunologicznej, to niestety jest potencjalnie szkodliwy w kontekście przewlekłej i niskiej aktywacji. Łagodny przewlekły stan zapalny o niskim stopniu nasilenia (ang. *low-grade chronic inflammation*) charakteryzuje się niewielkim wzrostem krążących cząsteczek zapalnych, co może wystąpić np. w wyniku klinicznych lub subklinicznych procesów chorobowych, zmian biologicznych związanych z wiekiem ale także na skutek toczącej się infekcji (42). Wyniki badań pokazują, że osoby, u których utrzymuje się podwyższony poziom czynników prozapalnych lub u których notuje się ich wzrost w czasie, wykazują pogorszenie

funkcjonowania mózgu (57–59) (rysunek 3). Inne, liczne badania kohortowe potwierdziły, że osoby o prawidłowych funkcjach poznawczych, u których stwierdzono podwyższone markery stanu zapalnego we krwi, są bardziej narażone na wystąpienie w przyszłości łagodnych zaburzeń poznawczych (ang. *mild cognitive impairment* – MCI) oraz otępienia typu AD (60–62). Jednak związek między markerami zapalnymi a AD różni się w zależności od stadium choroby, co oznacza, że dalszego zrozumienia wymaga to, w jaki sposób są one ze sobą powiązane i jaki jest dokładnie związek między białkami zapalnymi a ryzykiem demencji (42).



Rys. 3. Ostry i przewlekły stan zapalny oraz potencjalne mechanizmy biologiczne leżące u podstaw związku między stanem zapalnym a chorobą Alzheimera

1.2.2. Obwodowy układ odpornościowy

Proces starzenia się jest naturalnym zjawiskiem biologicznym, który dotyczy wszystkich organizmów żywych i prowadzi do nieodwracalnych zmian funkcjonalnych, utraty wydolności i równowagi wewnętrznej, zdolności do regeneracji, odpowiedzi na stres i presję środowiska zwiększając podatność organizmu na choroby i ryzyko śmierci. Zaburzenia działania układu odpornościowego wynikające z procesu starzenia określa się mianem immunosenescencji (63). Prowadzi ona do utraty odporności obejmującej przebudowę lub zanik narządów limfatycznych wraz z rozwojem długo utrzymujących

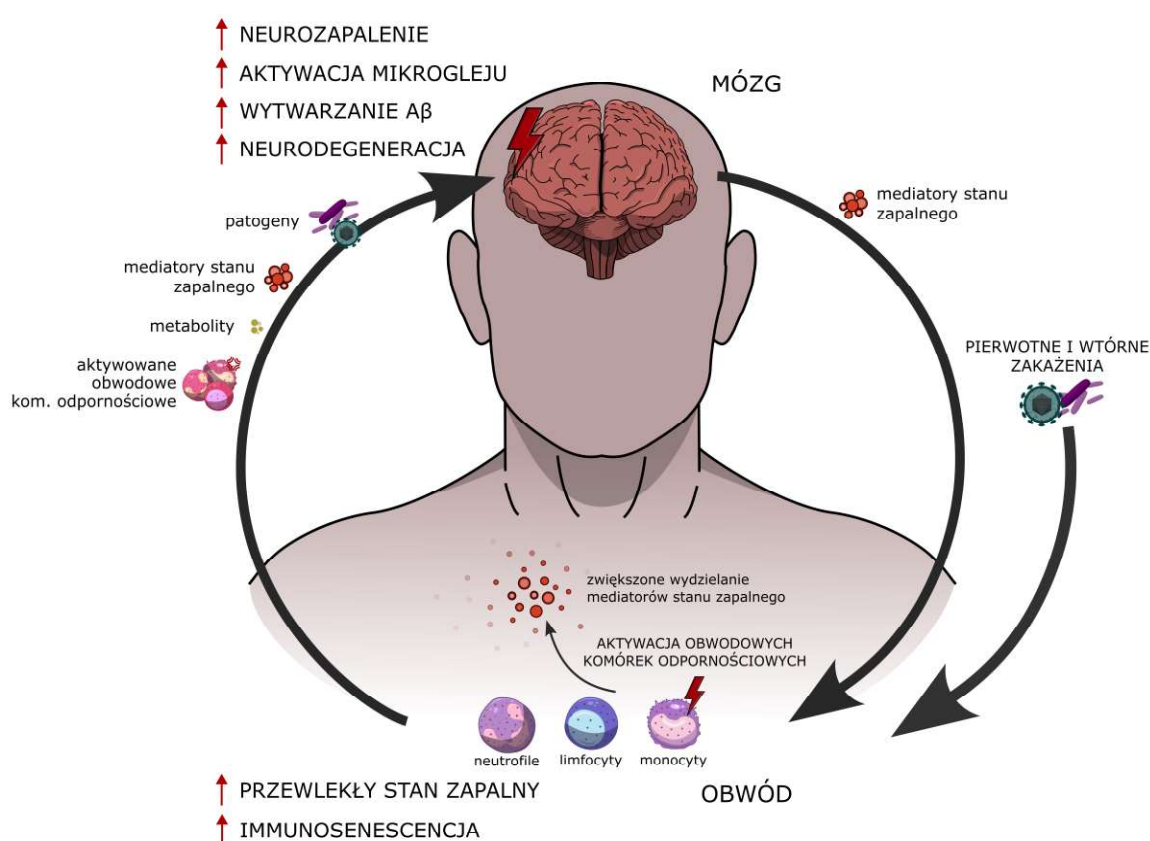
się ogólnoustrojowych stanów zapalnych, które wywołują zmiany w funkcjonowaniu i odpowiedzi komórek układu odpornościowego (63).

OUN to wyjątkowy układ ze ściśle regulowaną odpowiedzią immunologiczną, w której uczestniczy głównie mikroglej. Obwodowa odpowiedź odpornościowa m.in. na patogeny zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe angażuje natomiast komórki tak wrodzonego (neutrofile, monocyty/makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki NK (natural killer)) jak i nabytego (limfocyty T i B) układu immunologicznego. Cytokiny stanowią integralny składnik sieci sygnalizacyjnych między różnymi typami komórek w celu ograniczenia i eliminacji zagrożenia. Cytokiny wytwarzane przez komórki wrodzonego układu odpornościowego inicjują kaskadę zdarzeń w celu ograniczenia infekcji, w konsekwencji wpływają również na inne komórki odpornościowe, takie jak limfocyty (64). Badania wskazują, że odpowiedź zapalna na obwodzie, wywołana przez czynniki takie jak ogólnoustrojowa ekspozycja na lipopolisacharyd (LPS) lub infekcje wirusowe, może skutkować infiltracją komórek odpornościowych z obwodu do OUN (65). Obwodowy stan zapalny – stan zapalny występujący poza ośrodkowym układem nerwowym, został opisany jako potencjalny czynnik ryzyka AD i otępienia naczyniowego (66). Komórki odpornościowe oraz wytwarzane przez nie cytokiny prozapalne na obwodzie mogą przedostawać się przez BBB, której szczelność wraz z wiekiem maleje, zwiększając stan zapalny w mózgu, prowadząc do nadprodukcji A β i przyczyniając się do neurodegeneracji w konsekwencji prowadząc do patologii AD (67). Obwodowe komórki odpornościowe mają pewne funkcjonalne cechy wspólne z mikroglejem, w tym ekspresję receptorów toll-podobnych (TLR), co umożliwia ich aktywację przez A β lub wzorce molekularne związane z patogenami (ang. *pathogen-associated molecular patterns* – PAMPs). Z tego powodu zwiększona przepuszczalność BBB zwiększa prawdopodobieństwo zaangażowania m.in. obwodowych makrofagów w stan zapalny w OUN (65). Komórki obwodowego układu odpornościowego, takie jak neutrofile, monocyty, komórki NK, komórki dendrytyczne, limfocyty T, a nawet komórki B, odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej na terenie mózgu. Ostatnie doniesienia wskazują, że mogą one uczestniczyć w metabolizmie A β i kształtować odpowiedź zapalną u osób z AD (29). W przypadku neutrofili wykazano, że uszkodzają one BBB poprzez m.in. uwalnianie wolnych rodników, enzymów proteolitycznych i metaloproteinaz macierzy (68). Migracja neutrofili do kory mózgowej i hipokampa

uwalnia także IL-17, która powoduje cytotoksyczność i przerwanie BBB, co w konsekwencji przyciąga jeszcze więcej neutrofili do tego miejsca i nasila uszkodzenia (69). Makrofagi pochodzące z monocytów dostają się do OUN przez uszkodzoną BBB i tam odgrywają kluczową rolę w procesach demielinizacji oraz przyczyniają się do wydzielania czynników neurotroficznych i przeciwzapalnych, które regulują procesy neuropatyczne (65). W przypadku monocytów zauważano, że podczas rozwoju AD, liczba klasycznych komórek spada, podczas gdy liczba monocytów pośrednich CD14⁺⁺ CD16⁺⁺ oraz nieklasycznych monocytów CD14⁺ CD16⁺⁺ rośnie wraz z obciążeniem A β (29). Co więcej poziom białka CRP i białek układu dopełniacza (C1 i C8a) pochodzących z monocytów spada w stadium przedklinicznym, ale zaczyna znacznie rosnać w MCI oraz AD podkreślając przejście monocytów z fenotypu przeciwzapalnego do fenotypu zapalnego podczas rozwoju choroby (29). W stanach patologicznych następuje przenikanie komórek NK do OUN w czym pośredniczą chemokiny. Podczas trwającego stanu zapalnego mózgu komórki NK wchodzi w interakcje z komórkami glejowymi (mikroglej, astrocyty), wpływając na nie i na fizjologię OUN m.in. poprzez uwolnienie IFN- γ (70). Badania pokazują także, że deplecja komórek NK w mysim modelu AD (3xTg-AD) powodowała zmniejszenie stanu zapalnego w mózgu oraz poprawę zdolności poznawczych i neurogenezy, nie wpływając jednak na poziom złogów amyloidowych (71). Uwolnienie chemokin i cząsteczek adhezyjnych umożliwia także obwodowym komórkom dendrytycznym migrację do mózgu, gdzie mogą rozpoznawać antygeny i prezentować je limfocytom T, co prowadzi do ich aktywacji. Udział komórek T (głównie T CD4⁺) w tworzeniu prozapalnych mikrośrodków w mózgach osób z AD, jak również bardziej uogólnionych stanów prozapalnych na obwodzie, może wynikać ze zwiększonej odpowiedzi proliferacyjnej i wydzielania prozapalnych cytokin przez inaczej aktywowane limfocyty T w obecności rozpuszczalnego lub słabo zagregowanego A β (64).

Obecnie, po wielu latach badań, stan zapalny w mózgu uznaje się za trzecią, obok A β i białka Tau, patologię AD (72). Jednak przez wiele lat AD była postrzegana jako choroba, która dotyczy tylko mózgu, nawet jeśli neurozapalenie było uznawane za aktywny składnik choroby. Tymczasem wykazanie, że integralność BBB jest naruszona w AD pozwoliła wyjaśnić migrację obwodowych komórek odpornościowych (monocytów, komórek T czy neutrofili) do dotkniętego chorobą mózgu. Należy dodać, iż

komórki te nie tylko migrują do mózgu, ale mogą również powrócić do krążenia systemowego, tworząc błędne koło między obwodem a mózgiem. Ponadto uszkodzona BBB ułatwia recyrkulację mediatorów zapalenia, takich jak cytokiny, chemokiny i produkty aktywacji dopełniacza. Ta pętla sprzężenia zwrotnego między mózgiem a obwodem tworzy ciągłą komunikację między nimi (64) (rysunek 4).



Rys. 4. Model błędnego koła obrazujący udział obwodowego układu odpornościowego w patogenezie choroby Alzheimera

Podczas gdy rola wrodzonej odporności w mózgu (mikroglej) w neurodegeneracji była przedmiotem licznych badań, udział obwodowych wrodzonych komórek odpornościowych skupiał mniej uwagi badaczy. Tymczasem przewlekły stan zapalny na obwodzie, nasilający się wraz z wiekiem i infekcjami związanymi z wiekiem, może przyczyniać się do postępu choroby (73). Zakłada się, że podczas starzenia się aktywacja wrodzonych mechanizmów odpornościowych może być upośledzona, szczególnie w odpowiedzi na patogeny. Jednak dokładne przyczyny dysfunkcji obwodowych komórek odpornościowych są nadal nieznane.

Wciąż zatem brakuje pełnego zrozumienia roli obwodowych wrodzonych komórek odpornościowych i obwodowej wrodzonej odpowiedzi immunologicznej w AD.

1.3. Hipoteza infekcyjna rozwoju choroby Alzheimera

Hipoteza mówiąca o tym, że to infekcja może być przyczyną AD po raz pierwszy została zasugerowana przez odkrywcę choroby, Aloisa Alzheimera w 1906, jednak dopiero 90 lat później, dzięki rozwojowi technik biologii molekularnej, dostarczono pierwszych dowodów na jej poparcie (28). Przez wiele lat hipoteza kaskady amyloidu była uznawana za jedyną akceptowalną i popieraną przez świat naukowy. Wypowiedzi nielicznych naukowców, którzy zwracali uwagę na mikroorganizmy były pomijane lub ignorowane. Jednak badania ostatnich dwóch dekad dostarczyły intrygujących danych, sugerujących że te dwie idee mogą być ze sobą powiązane — infekcja może być początkiem niektórych przypadków AD poprzez wywoływanie zwiększonego wytwarzania A β i tworzenia się jego złogów (74). Wyniki badań coraz bardziej wskazywały na istotną rolę amyloidu w neuronach, nie jako po prostu toksycznego produktu, a jako białka pomagającego chronić mózg przed infekcją (białko przeciwdrobnoustrojowe, AMP). Jednak wiek, starzenie się układu odpornościowego i/lub obciążenia genetyczne mogą zakłócać kontrolę i równowagę w procesie eliminacji infekcji oraz kontroli rozwoju stanu zapalnego w mózgu, prowadząc do nadprodukcji A β oraz jego niewydajnego usuwania zmieniając jego działanie z ochronnego na szkodliwe (75). Patologiczne złogi A β i uszkodzenia powstałe w OUN podczas infekcji aktywują komórki glejowe, limfocyty i makrofagi oraz wyzwalają uwalnianie mediatorów zapalnych w celu wyeliminowania inwazyjnych patogenów. Jeśli aktywność czynników stymulujących i procesy zapalne są rozregulowane, organizm przechodzi z ostrej do przewlekłej reakcji zapalnej (76). Chociaż w literaturze naukowej do dziś nie ma konsensusu, proponowane są trzy scenariusze tłumaczące możliwy udział czynników zakaźnych w patologii AD (28). Pierwszy z nich zakłada udział różnych patogenów w procesie wyzwalającym wytwarzanie A β oraz agregację NFTs prowadząc do zaburzenia funkcji poznawczych i w efekcie AD. Druga hipoteza zakłada, że czynniki zakaźne oraz wywoływana przez nie infekcja to równoległy stan przyspieszający i zaostrzający przebieg AD, który rozwija się niezależnie od patologii A β i białka tau.

Trzecia hipoteza przeczy związkowi przyczynowo- skutkowemu pomiędzy AD a przebytymi zakażeniami. Obecność stanu zapalnego rozwija się z innych przyczyn i współtowarzyszy patogenezie AD, a zwiększona liczba infekcji u osób z AD może wynikać ze zwiększonej wrażliwości i osłabienia układu odpornościowego spowodowanych postępującymi zmianami neurodegeneracyjnymi (28). Hipoteza zakładająca udział mikroorganizmów w patogenezie AD jest ściśle powiązana z hipotezą zapalną, ponieważ to właśnie infekcje powodują rozwój stanu zapalnego (76).

Obecnie uważa się, że ogólnoustrojowy stan zapalny oraz infekcje mogą być kluczowym czynnikiem przyczyniającym się do patologii AD, wspierając hipotezę dwukierunkowej komunikacji między mózgiem a obwodowym układem odpornościowym (77). Niedawno zaproponowano, że obwodowy stan zapalny/infekcja obwodowa jest wręcz kluczowym czynnikiem przyczyniającym się do pogorszenia funkcji poznawczych związanych z postępowaniem AD (77). Co ważne, na modelu zwierzęcym wykazano, że działanie prozapalne produktów metabolizmu bakterii może być wzmocnione w obecności genotypu *APOE* ε4 i genotyp ten związany był z wyższym fenotypem prozapalnym mikrogleju. Zatem *APOE* ε4, Aβ i obwodowy stan zapalny oddziałują, wywołując uszkodzenie naczyń mózgowych i deficyty poznawcze (64). Przypuszcza się, że specyficzny fenotyp hiper-zapalny może powodować u niektórych osób nasilone reakcje zapalne w odpowiedzi na patogeny. Nadmierna odpowiedź zapalna w odpowiedzi na infekcję może być powiązana z określonymi allelami układu HLA, które mogą decydować o zmienionej fizjologii komórek odpornościowych, np. monocytów/makrofagów krwi obwodowej, które w odpowiedzi na antygen (np. LPS) wydzielają kilkakrotnie większe ilości mediatorów stanu zapalnego (78).

1.3.1. Patogeny uznawane za czynniki ryzyka rozwoju choroby Alzheimera

Coraz większa liczba badań naukowych wskazuje na różne czynniki zakaźne należące do bakterii, wirusów, pasożytów czy grzybów jako czynniki ryzyka chorób neurodegeneracyjnych i demencji (76).

Do najczęściej dyskutowanych wirusów w kontekście AD należą wirusy z rodziny *Herpesviridae* (79). Pionierem tych badań był zespół Ruth Itzhaki, który wskazał, że Aβ

jest bardzo ważną cechą AD, ale nie jest jej przyczyną (74). Pierwsze wskazówki sugerujące związek ludzkiego herpeswirusa typu 1 (HHV-1) z rozwojem AD pochodziły z obserwacji mózgow uszkodzonych w wyniku opryszczkowego zapalenia mózgu (ang. *herpes simplex encephalitis* – HSE). Obszary objęte infekcją w większości pokrywały się z obszarami, które dotknięte są zmianami neurodegeneracyjnymi w rozwoju AD (80,81). Co więcej w mózgach osób z AD znaleziono DNA HHV-1 (82). Obecnie, najwięcej dowodów na związek zakażeń wirusowych z AD dostarczono właśnie dla tych wirusów (83). Ich neurotropowy charakter, zwłaszcza HHV-1, wskazuje na możliwość przedostania się do wnętrza mózgu, gdzie mogą przechodzić w postać latentną. Czynniki takie jak silny stres, promieniowanie UV, stan zapalny czy inne infekcje, osłabiające działanie układu odpornościowego, mogą aktywować wirusa (reaktywacja infekcji latentnej) prowadząc do jego replikacji i uszkodzenia komórek nerwowych. Sugeruje się, że nosiciele wariantu genu *APOE* ε4 mogą być narażeni na częstszą reaktywację wirusa i poważniejsze uszkodzenia, co silnie zwiększa ryzyko rozwoju AD (83). Wśród pozostałych herpeswirusów, które mogą być związane z wyższym ryzykiem rozwoju chorób neurodegeneracyjnych, w tym AD, wymienia się wirusy opryszczki pospolitej typu 2 (ang. *human herpesvirus type 2* – HHV-2), ospy wietrznej i półpaśca (ang. *human herpesvirus type 3* – HHV-3), Epsteina-Barr (ang. *human herpesvirus type 4* – HHV-4; Epstein-Barr virus – EBV) (84), cytomegalii (ang. *human herpesvirus type 5* – HHV-5; cytomegalovirus – CMV) oraz rumienia nagłego (ang. *human herpesvirus type 6* – HHV-6) (83,85), a wśród innych rodzin także wirusy zapalenia wątroby typu C (ang. *hepatitis c virus* – HCV) (85) oraz grypy (ang. *influenza viruses*) (86).

Oprócz materiału genetycznego wirusów, w mózgach chorych zidentyfikowano również bakterie. Obecnie, o związek między zakażeniem bakteryjnym a patogenezą AD podejrzewa się między innymi: *Chlamydomphila pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, krętki (*Spirochaetes*) czy bakterie wchodzące w skład mikrobioty jelitowej.

C. pneumoniae to przenoszona drogą kropelkową bakteria wewnątrzkomórkowa odpowiedzialna za infekcje dolnych dróg oddechowych, powodująca zapalenie płuc oraz oskrzeli. Wykazano, że *C. pneumoniae* jest zdolna do zakażenia astrocytów, mikrogleju oraz komórek nerwowych (87) i znacznie częściej identyfikuje się ją w mózgach osób z AD niż poznawczo zdrowych ludzi. Stwierdzono, że bakterie te są

żywe i aktywne w momencie śmierci pacjentów (88). Największe nagromadzenie komórek zakażonych tą bakterią obserwowano w pobliżu złogów amyloidowych i NFTs (28). W przypadku pacjentów noszących allel *APOE* ε4 liczba zakażonych komórek była większa niż u osób z innymi wariantami tego genu (89), wydaje się, że wariant apolipoproteiny E4 sprzyja wiązaniu ciałek elementarnych bakterii (formy inwazyjne bakterii w formie małych komórek zawierające nukleoid) do powierzchni komórek mikrogleju i astrocytów (90,91).

Inną Gram-ujemną bakterią którą wiąże się z ryzykiem rozwoju AD jest *H. pylori* (28). Bakteria ta jest szeroko rozpowszechniona, zwłaszcza w krajach rozwijających się, gdzie wskaźnik infekcji wynosi 85-95%, podczas gdy w krajach rozwiniętych 30-50% (92). *H. pylori* jest pałeczką zasiedlającą błonę śluzową żołądka zwiększającą ryzyko rozwoju zapalenia błony śluzowej żołądka, choroby wrzodowej oraz raka żołądka (92). Zakażenie może powodować napływ leukocytów do zajętej błony śluzowej wywołując stan zapalny oraz aktywację neutrofilów, które uwalniają następnie duże ilości reaktywnych form tlenu (ROS) niszcząc okoliczną tkankę (93). *H. pylori* wywołuje stan zapalny na drodze aktywacji szlaku NF-κB (94), który może utrzymywać się przez długi czas, będąc stałym źródłem cytokin wydzielanych do krwiobiegu. Powstały w wyniku zakażenia stres oksydacyjny może następnie przyczyniać się do uszkodzenia BBB i napływu mediatorów stanu zapalnego oraz leukocytów do mózgu niekorzystnie wpływając na funkcjonowanie układu nerwowego (28). Podejrzewa się również, że może dojść do bezpośredniej infiltracji OUN przez *H. pylori* drogą ustno-nosowo-węchową lub poprzez zakażone monocyty, które przekraczając uszkodzoną BBB mogą przyczyniać się do neurodegeneracji (95). Dowodów na możliwy związek między zakażeniem *H. pylori* a AD dostarczają badania serologiczne. U pacjentów z AD stwierdzono wyższe stężenie przeciwciał IgG oraz IgA względem *H. pylori* niż u osób zdrowych. W innych badaniach zaobserwowano, że obecność przeciwciał względem *H. pylori* związana była z niższymi wynikami MMSE (test przesiewowy do oceny otępień) i podwyższonym stężeniem ufosforylowanego białka Tau w PMR (płyn mózgowo-rdzeniowy) (96).

Kolejnymi bakteriami diskutowanymi w kontekście hipotezy infekcyjnej AD są bakterie z rzędu krętków (*Spirochaetes*). Są to długie i kręte bakterie Gram-ujemne zdolne do aktywnego ruchu, spośród których trzy rodzaje: *Treponema*, *Borrelia*,

i *Leptospira* mogą powodować choroby u ludzi (97). Zaobserwowano, że przeciwciała IgG względem *Borrelia burgdorferi*, czynnika etiologicznego boreliozy, występowały częściej u osób z AD oraz MCI niż u osób zdrowych (98). Z kolei inny gatunek krętków *Treponema pallidum* spp. *pallidum* pojawiający się w przebiegu kiły układu nerwowego powoduje atrofię korową oraz akumulację A β (99). Bakteria ta może przetrwać wiele lat w różnych tkankach gospodarza po pierwotnym zakażeniu zajmując następnie OUN i powodując rozwój otępienia. DNA krętków oraz bakteryjny amyloid został odnaleziony w płytkach starczych mózgów osób z AD (100). Amyloid bakteryjny, podobnie jak amyloid eukariotyczny, jest niewielkim białkiem bogatym w struktury harmonijki beta, który bierze udział w tworzeniu biofilmu, adhezji, pomaga w infekcji komórek gospodarza oraz interakcji gospodarz-patogen (101). Układ odpornościowy rozpoznaje patologiczny amyloid zarówno bakteryjny jak i ludzki, z wykorzystaniem tych samych receptorów wyzwalających stan zapalny (102,103). Stymulując wytwarzanie TNF- α , IL-6 oraz IL-1 β , białko curli (bakteryjny amyloid) zmniejsza szczelność BBB, co może prowadzić do zaszczepienia krzyżowego zapoczątkowując agregację ludzkiego A β w mózgu (102). Formowanie biofilmu zawierającego bakteryjny amyloid może bezpośrednio wyzwać stan zapalny, który może objąć OUN. Krętki zdolne są do wytwarzania biofilmu, którego składniki odnajdywane są w płytkach starczych zlokalizowanych w mózgach osób z AD (100). Badania immunohistochemiczne oraz mikroskopii immunoelektronowej ujawniły, że białko A β PP (ang. *amyloid- β protein precursor*) lub inne amyloidogeniczne białko podobne do A β PP, jak również A β , obecne są w biofilmie tych bakterii (100).

Bakterie jelitowe, tworzące mikrobiotę jelitową również rozpatrywane są jako jeden z czynników, który może być związany z rozwojem AD (28). Głównie za sprawą koncepcji osi jelitowo-mózgowej, która stanowi system dwukierunkowej komunikacji oparty na interakcji bakterii z układem odpornościowym oraz substancjach chemicznych wytwarzanych przez mikroorganizmy zamieszkujące układ pokarmowy. Mikrobiota może oddziaływać na wiele fizjologicznych parametrów, włączając w to funkcje poznawcze jak pamięć, zdolność uczenia się i podejmowanie decyzji (104). Badania nad różnorodnością mikrobioty jelitowej ujawniły spadek obfitości bakterii typu *Firmicutes* oraz rodzaju *Bifidobacterium*, a także wyższą obfitości bakterii należących do *Bacteroidetes* u pacjentów z AD w porównaniu do osób zdrowych poznawczo (105).

Bacteroidetes jest typem Gram-ujemnych bakterii znanych z produkcji prozapalnych substancji, np. lipopolisacharydu (LPS) (28). LPS pochodzący z *Bacteroides fragilis* podobnie jak A β 42 jest rozpoznawany przez TLR2 i TLR4 oraz receptor CD14 znajdujące się na powierzchni mikrogleju (106). Jak pokazują badania *in vitro* aktywuje również szlak NF- κ B (p50/p65) w ludzkich komórkach mózgowych co może indukować stan zapalny i powodować neurodegenerację (106). Wśród innych bakterii, które mogłyby być zaangażowane w patogenezę AD wymienia się również *Enterococcus faecalis* i *Salmonella typhimurium* (28).

1.3.2. Mikrobiom jamy ustnej, paradontoza a choroba Alzheimera

Badania nad mikrobiotą człowieka dotyczą aktualnie wszystkich obszarów badań biomedycznych i w tym momencie są jedną z najbardziej eksplorowanych dziedzin nauk biologicznych (107). Począwszy od mikrobioty jelitowej aż po mikrobiotę jamy ustnej, obecne badania skupiają się na funkcjonalnych aspektach mikrobiomu i jego interakcji z organizmem gospodarza, dzięki czemu możliwe jest lepsze zrozumienie jej wpływu na zdrowie człowieka (108). Znaczne postępy w technikach badawczych, takie jak poprawa wydajności ekstrakcji wysokocząsteczkowego DNA, sekwencjonowanie następnej generacji (ang. *new generation sequencing*, NGS) o wysokiej przepustowości czy zaawansowane techniki hodowlane pozwalają na bardziej szczegółowe badania nad składem i funkcjonowaniem mikrobiomu (108). Pojawiająca się każdego roku znaczna liczba opracowań naukowych dotycząca mikrobiomu jednoznacznie wskazuje istotność tego tematu w kontekście zdrowia człowieka. Mikrobiota aktywnie oddziałuje z układem odpornościowym pozostając z nim w dynamicznej równowadze (109). Ich niezaburzona współpraca jest kluczowa dla zachowania homeostazy i utrzymywania w ryzach stanów zapalnych. W zamian za siedlisko do życia, mikroorganizmy wytwarzają białka, węglowodany, witaminy, kwasy tłuszczowe oraz inne metabolity za pomocą których komunikują się z najbliższym otoczeniem (109). Wiele z wytwarzanych przez mikrobiotę substancji jest korzystna i niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. Jednak, wytrącenie tego układu z równowagi może skutkować infiltracją patogennych mikroorganizmów oraz ich metabolitów do krwiobiegu oraz dalej do narządów wewnętrznych. Zakłócenie prawidłowego

współfunkcjonowania mikrobioty i komórek gospodarza (dysbioza) może prowadzić do rozwoju alergii, chorób autoimmunologicznych oraz upośledzać działanie wrażliwych układów jak OUN.

Obserwowane interakcje pomiędzy komórkami gospodarza, układem odpornościowym a drobnoustrojami dotyczą także mikrobioty jamy ustnej. Mikrobiota jamy ustnej uważana jest za drugą, zaraz po mikrobiocie jelitowej, najbardziej zróżnicowaną społeczność mikroorganizmów zasiedlających organizm ludzki. Charakteryzuje się zróżnicowaną strukturą, która odzwierciedla różnorodne mikrośrodowiska dostępne w jej obrębie (110). Presja selekcyjna ze strony gospodarza, napędzana wytwarzaniem i wydzielaniem licznych enzymów, przeciwciał oraz białek o aktywności przeciwbakteryjnej, jak lizozym czy laktoferyna, ściśle kontroluje skład gatunkowy mikrobioty. Kontrola selekcyjna ze strony gospodarza prowadzi także do powstawania przestrzennie wyspecjalizowanych struktur biofilmu, które pozostają wyjątkowo stabilne i odporne na stale zmieniające się warunki w obrębie jamy ustnej (110). W efekcie, zdolność społeczności mikroorganizmów zamieszkujących jamę ustną gospodarza do organizowania się w wielowarstwowy, miejscowo wyspecjalizowany biofilm stanowi główną oś wzajemnej komunikacji gospodarza i mikrobioty jamy ustnej u zdrowych ludzi. Zaburzenie równowagi pomiędzy gospodarzem i mikrobiotą może prowadzić do samonapędzających się zmian w strukturze i składzie mikroorganizmów skutkując rozwojem licznych patologii, w tym stanu zapalnego przyzębia, czyli paradontozy (110).

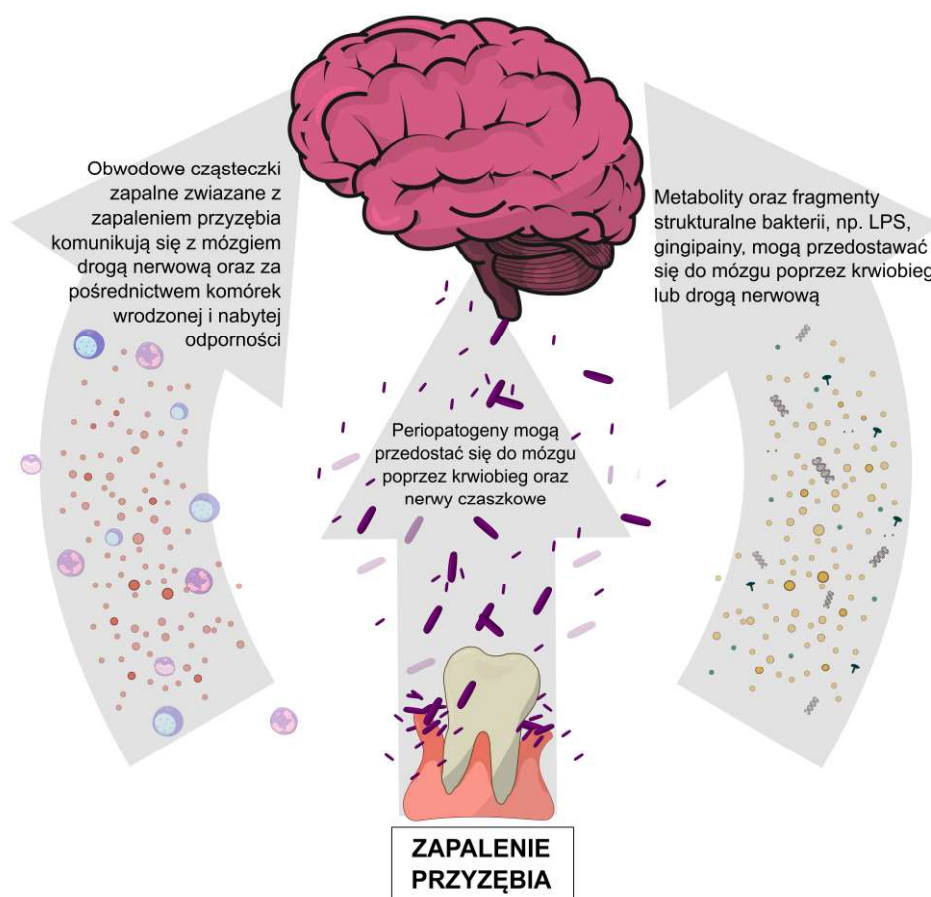
Zdrowie jamy ustnej jest kluczowe dla utrzymania równowagi mikrobiologicznej i ochrony przed patogenami. Prawidłowy skład mikrobioty jamy ustnej wspiera gospodarza tworząc symbiotyczny biofilm, który reguluje pH jamy ustnej i wstrzymuje rozrost patogennych bakterii (110). Tym samym dysbioza mikrobioty jamy ustnej może prowadzić do rozwoju wielu chorób, w tym chorób zapalnych jelit, nowotworów jelita grubego i trzustki, a także jak się przypuszcza AD (110). W ostatnich latach coraz częściej dyskutuje się na temat roli mikrobioty jamy ustnej i patogennych bakterii zaangażowanych w rozwój chorób przyzębia, w patogenezie AD, ponieważ wykazano, że zmiany i dysbioza w obrębie jamy ustnej mogą być związane z demencją i zaburzeniami poznawczymi (111,112). Wraz z wiekiem wzrasta ryzyko rozwoju zapalenia przyzębia (paradontozy), utraty zębów i próchnicy, zwłaszcza u osób

starszych, którym codzienna higiena jamy ustnej może sprawiać trudności (113,114). Socransky i wsp. (115) rozpoznali i nazwali tak zwany „czerwony kompleks”, czyli grupę trzech gatunków bakterii najczęściej związanych z zapaleniem przyzębia, na który składają się *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* i *Tanarella forsythia*. Jednak za główny czynnik etiologiczny zapalenia przyzębia uważany jest *P. gingivalis*.

Stan zapalny przyzębia, czyli paradontoza (ang. *periodontal disease*, PeD) jest poważną chorobą jamy ustnej, która charakteryzuje się przerostem, obrzękiem, krwawieniem i bólem dziąseł oraz nieświeżym oddechem (116). Postępująca paradontoza zajmuje tkanki okalające zęby wywołując miejscowy stan zapalny, który nieuchronnie prowadzi do utraty struktur podtrzymujących zęby, w tym więzadeł przyzębia, kości i tkanek miękkich (117). Rozpoczyna się zapaleniem dziąseł, najczęściej spowodowanym nagromadzoną płytką bakteryjną (118) i słabą higieną jamy ustnej. W wielu badaniach wykazano związek między zapaleniem przyzębia a ogólnoustrojowymi chorobami, np. chorobą niedokrwienną serca, chorobą naczyń mózgowych, niewydolnością serca (119), czy zaburzeniami neuropsychiatrycznymi (120). Oprócz indywidualnych czynników środowiskowych i osobniczych, kluczową przyczyną zapalenia przyzębia jest zaburzenie równowagi pomiędzy bakteriami komensalnymi i patogennymi (121). *P. gingivalis* uważany jest za kluczowy patogen ponieważ osłabiając działanie układu odpornościowego gospodarza sprzyja utrzymywaniu się stanu zapalnego (110). Bakteria ta wytwarza proteazy cysteinowe – gingipainy – które aktywują układ dopełniacza i wydzielanie cytokin przez neutrofile, jednocześnie hamując aktywność bójczą komórek względem bakterii poprzez blokowanie szlaków sygnałowych TLR. W efekcie *P. gingivalis* inicjuje powstawanie miejscowego stanu zapalnego unikając jednocześnie jego antybakteryjnego działania, co z kolei prowadzi do dalszego zaburzenia homeostazy i zmiany w funkcjonowaniu mikrobioty. Spowodowana przez stan zapalny i gingipainy destrukcja tkanek sprzyja infiltracji *P. gingivalis* oraz innych bakterii do krwiobiegu i okolicznych tkanek. Mikroorganizmy związane z jamą ustną znajdowano u ludzi w jelitach, płucach, sercu, czy mózgu (110). Dodatkowo, immunosenescencja sprzyja przerostowi bakterii beztlenowych, które wzbudzają nieswoistą odpowiedź odpornościową z wydzielaniem mediatorów stanu zapalnego powodując uszkodzenia w obrębie BBB (113). Umożliwia to rozprzestrzenianie się i rozwój bakterii oportunistycznych, które mogą stymulować rozwój AD (113). Liczne

badania pokazują, że z AD związany jest gorszy status periodontologiczny obejmujący słabszą higienę jamy ustnej, częstsze przypadki używania protez, uszkodzenia błony śluzowej (zapalenie warg, kandydoza), zmniejszoną ilość i jakość śliny, a także mniejszą liczbę zębów (114). Destrukcja tkanek podtrzymujących zęby prowadzi do wytworzenia kieszonek za pomocą których bakterie lub ich metabolity mogą przedostać się do krwiobiegu (122). Wyzwała to procesy prowadzące do wytworzenia ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej (bakteriemia, cytokinemia) w wyniku czego może dochodzić do uszkodzenia innych tkanek lub narządów, w tym mózgu (123), przyczyniając się do rozwoju neurozapalenia, a w następstwie neurodegeneracji (124,125) (rysunek 5). Gingipainy pochodzące z *P. gingivalis* znajdowano w sąsiedztwie neuronów, NFTs oraz złogów Aβ w mózgach osób z AD (110). Obecność metabolitów oraz samej bakterii w OUN powoduje aktywację układu odpornościowego, zwiększone wytwarzanie Aβ i idący za tym stan zapalny, a poziom obciążenia mózgu patogenną bakterią jest skorelowany z markerami AD, takimi jak patologia białka Tau. U pacjentów z AD stwierdzono podwyższony poziom przeciwciał względem różnych periopatogenów, w tym *P. gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, czy *Prevotella. intermedia* (126).

W badaniach kohortowych z 2017 roku wykazano, że osoby które były dotknięte zapaleniem przyzębia przez okres 10 lat miały 1,7 razy wyższe ryzyko rozwoju AD niż osoby zdrowe (127). Z kolei w innych badaniach ryzyko rozwoju demencji lub MCI było 1,22 razy wyższe dla osób z zapaleniem przyzębia oraz 1,21 razy wyższe dla osób bezzębnych względem osób zdrowych (128). Paradontoza związana była z 1,79 razy wyższym ryzykiem demencji w populacji Tajwanu powyżej 60 roku życia. W ostatnich latach ukazały się również liczne badania eksperymentalne na modelach zwierzęcych w których starano się uchwycić związek przyczynowo-skutkowy między AD a zapaleniem przyzębia (126). Zakażenie myszy *T. denticola* skutkowało hiperfosforylacją białka Tau i aktywacją stanu zapalnego w hipokampie (129). Podobny efekt uzyskano w innych badaniach zakażając myszy *T. denticola* lub *P. gingivalis*. Wykazano, że obecność *T. denticola* prowadziła do utraty kości zębodołowej oraz apoptozy neuronów (130). Wywołanie u myszy zapalenia przyzębia powoduje pozakomórkową akumulację Aβ. Badanie to sugeruje, że długotrwałe zakażenie



Rys. 5. Możliwy wpływ stanu zapalnego przyzębia (paradontoza) na mózg

periopatogenem (*P. gingivalis*) o niskim nasileniu może prowadzić do neuropatologii przypominającej AD (131). Negatywny wpływ na funkcjonowanie układu nerwowego wywierają również same metabolity bakterii. Długotrwałe, ogólnoustrojowe narażenie na LPS pochodzący z *P. gingivalis* (LPS-PG) prowadzi do rozwoju patologii podobnych do AD. Ekspozycja na LPS-PG wywołała u myszy problemy z uczeniem się i pamięcią oraz wewnątrzkomórkową akumulację A β w neuronach (132). Z kolei, wstrzyknięcie do mózgów myszy gingipain z *P. gingivalis* skutkowało śmiercią neuronów w ich hipokampach, podczas gdy zastosowanie inhibitora proteazy wykazało efekt ochronny przed neurotoksycznym działaniem tego enzymu (133). Badania *in vitro* na komórkach zwierzęcych: jajnika chomiczaka pręgowanego (CHO-7WD10) i ludzkich komórkach neuroblastomy (SH-SY5Y) wykazały, że sfingolipidy pochodzące z *P. gingivalis* powodowały zwiększoną sekrecję rozpuszczalnej formy A β oraz zwiększoną ekspresję prekursora amyloidu (APP). Co więcej, ludzkie komórki w odpowiedzi na sfingolipid charakteryzowały się wzmożoną hiperfosforylacją białka Tau. Zarówno badany lipid jak

i LPS-PG powodowały w badanych komórkach pojawienie się markerów fenotypu wydzielniczego (ang. *the senescence-associated secretory phenotype* – SASP), w tym beta-galaktozydazy, katepsyny B oraz cytokin prozapalnych, jak TNF- α oraz IL-6 (134).

Pomimo wielu doniesień łączących skład i aktywność mikrobioty z prawidłowym funkcjonowaniem układu nerwowego wciąż istnieje potrzeba prowadzenia takich badań zwłaszcza z udziałem pacjentów. Długoterminowe, wielkoskalowe badania nad mikrobiotą ludzką ze szczególnym uwzględnieniem wpływu stylu życia oraz czynników genetycznych, a także dobrze dobraną grupą kontrolną są niezbędne do oceny przyczynowości między zaburzeniami w składzie oraz funkcjonowania mikrobioty, a objawami ze strony układu nerwowego (135).

2. CEL PRACY

Aktualne dane eksperymentalne i epidemiologiczne wskazują na możliwy udział infekcji, stanu zapalnego oraz dysbiozy w rozwoju choroby Alzheimera (AD) (73). Opublikowane wyniki sugerują, że u osób, które doświadczają długotrwałego obciążenia z powodu toczącego się w organizmie stanu zapalnego, istnieje większe ryzyko pogorszenia się funkcji poznawczych i rozwoju demencji w kolejnych latach (136). To sugeruje, że infekcje, takie jak stan zapalny przyzębia (paradontoza, PeD) same w sobie a także utrzymujący się w konsekwencji przewlekły stan zapalny mogą przyczynić się do powstawania zaburzeń poznawczych. Infekcje mogą zatem stanowić jeden z czynników ryzyka AD. Możliwym mechanistycznym powiązaniem między AD i PeD może być związane z nimi zwiększone ogólnoustrojowe obciążenie zapalne i dysfunkcja obwodowych komórek odpornościowych.

Badania nad rolą PeD w progresji AD są uzasadnione z powodu licznych dowodów wskazujących na związek PeD z chorobami ogólnoustrojowymi jak choroby serca czy cukrzyca. Ponadto z powodu bliskiego umiejscowienia jamy ustnej oraz mózgu periopatogeny oraz ich metabolity jak i mediatory stanu zapalnego mogą przedostać się do OUN i tam inicjować lub wzmacniać toczący się stan zapalny.

Choć ostatnie badania dostarczają pewnych dowodów na to, że PeD może być powiązana z przedkliniczną postacią AD (137), jest to nadal pogląd wymagający weryfikacji w niezależnych próbach, szczególnie w badaniach na populacjach ludzkich. Do tej pory w żadnym badaniu klinicznym czy eksperymencie medycznym nie wykazano dokładnych mechanizmów mogących łączyć obie choroby. **Głównym celem badań była zatem kompleksowa analiza współzależności między AD i PeD na poziom klinicznym, funkcjonowania obwodowych komórek odpornościowych, molekularnym oraz mikrobiologicznym.**

HIPOTEZY I SZCZEGÓŁOWE CELE BADAWCZE:

H1: U pacjentów z chorobą Alzheimera (AD) obciążenie stanem zapalnym przyzębia (paradontoza, PeD) jest związane z zaburzeniami funkcji poznawczych i bardziej zaawansowaną postacią choroby.

C1: Ocena związku między stanem zaawansowania AD oraz paradontozą na podstawie analizy parametrów klinicznych, periodontologicznych (BoP, CAL, PD) oraz neuropsychologicznych (MMSE, MoCA).

H2: Współwystępowanie u pacjentów AD oraz PeD prowadzi do rozwoju ogólnoustrojowego stanu zapalnego wyrażającego się podwyższonym poziomem wytwarzania cząsteczek prozapalnych przez obwodowe komórki odpornościowe (ang. *peripheral blood leukocytes* - PBLs) oraz zwiększonym poziomem ekspresji genów związanych z aktywacją stanu zapalnego.

C2a: Analiza poziomu wytwarzanych cytokin: IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 oraz IL-15 przez PBLs w odpowiedzi na LPS-PG (LPS z *Porphyromonas gingivalis*) u pacjentów z AD i PeD w porównaniu do osób zdrowych.

C2b: Analiza poziomu ekspresji genów związanych z aktywacją i regulacją stanu zapalnego: *COX1*, *COX2*, *SOCS1*, *SOCS3*, *STAT1*, *STAT3*, *IRF1*, *IRF3*, *AP-1 (JUN)*, *PI3KR1*, *NFkB* u pacjentów z AD i PeD w porównaniu do osób zdrowych.

H3: Poziom nieswoistej odpowiedzi immunologicznej jest skorelowany ze współwystępowaniem AD oraz PeD. Pacjenci chorujący na AD oraz PeD będą charakteryzować się obecnością niedoborów nieswoistej odpowiedzi immunologicznej oraz zaburzoną odpowiedzią cytokinową.

C3a: Analiza związku pomiędzy poziomem nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, mierzonej testem oporności PBLs na zakażenie wirusem indykatorowym VSV (*vesicular stomatitis virus*), a współwystępowaniem AD i PeD.

C3b: Analiza poziomu wytwarzanych cytokin pro- i przeciwzapalnych w odpowiedzi na zakażenie komórek VSV u pacjentów z AD i PeD w porównaniu do osób zdrowych.

H4: Pacjenci z AD oraz PeD będą charakteryzowali się specyficznym fenotypem hiperzapalnym, który powoduje nasilone wydzielanie mediatorów stanu zapalnego.

C4a: Analiza częstości występowania polimorfizmów genów związanych z odpowiedzią immunologiczną: *HLA-DRB1* (rs9270856), *HLA-DRA* (rs3135344),

HLA-DQA1 (rs9272105), *FCGR2A* (R/H131) oraz *APOE* (rs429358;rs7412) u pacjentów z AD i PeD w porównaniu do osób zdrowych.

C4b: Analiza związku określonych alleli układu HLA oraz poziomu wytwarzanych mediatorów stanu zapalnego przez PBLs w odpowiedzi na LPS-PG.

H5: Współwystępowanie AD i PeD będzie wiązać się z dysbiozą jamy ustnej, osłabioną odpowiedzią obwodowych komórek odpornościowych i większym ogólnoustrojowym obciążeniem prozapalnym w AD.

C5a: Ocena różnorodności mikrobiomu jamy ustnej u pacjentów z AD i PeD w porównaniu do osób zdrowych.

C5b: Analiza związku między składem mikrobiomu jamy ustnej a odpowiedzią cytokinową PBLs na LPS-PG.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiały

3.1.1. Odczynniki chemiczne i płyny hodowlane

- 1-tioglicerol (TG) Promega, USA
- alkohol etylowy 96% Chempur, Polska
- alkohol izopropylowy 100% Avantor, Polska
- bufor TE wolny od nukleaz (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) EURx, Polska
- bufor węglanowy 0,1 M (NaHCO_3 , Na_2CO_3 , pH 9,5) Laboratorium Chemii Ogólnej (LChO), IITD PAN, Polska
- dimetylosulfotlenek (DMSO) Sigma, USA
- Gradisol G Aqua-med, Polska
- kwas octowy 5% (CH_3COOH) LCHO, IITD PAN, Polska
- kwas fosforowy 1 M (H_3PO_4) LCHO, IITD PAN, Polska
- L-glutamina 200 mM (100x) Biowest, Francja
- penicylina – streptomycyna roztwór (100x) Biowest, Francja
- płodowa surowica bydlęca (FBS) Sigma-Aldrich, USA
- RPMI-1640 – płyn hodowlany Roswell Park Memorial Institute LCHO, IITD PAN, Polska
- sól fizjologiczna buforowana fosforanem (PBS) LCHO, IITD PAN, Polska
- sól fizjologiczna buforowana fosforanem (PBS) z EDTA 3 mM LCHO, IITD PAN, Polska
- trypsyna-EDTA LCHO, IITD PAN, Polska
- woda demineralizowana LCHO, IITD PAN, Polska
- woda destylowana LCHO, IITD PAN, Polska
- woda wolna od nukleaz UltraPure™ Invitrogen, USA
- Tris-HCl 10 mM (pH 7,6) LCHO, IITD PAN, Polska
- trometamina (Tris) ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) SERVA, Niemcy
- trypan-blue 0,40% Bio-Rad, USA
- Tween® 20 ($\text{C}_{56}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$) Sigma-Aldrich, USA

3.1.2. Gotowe zestawy

- BD OptEIA™ TMB Substrate Reagent Set BD Biosciences, USA
- BD OptEIA™ Human IL-1 β ELISA Set II BD Biosciences, USA
- BD OptEIA™ Human IL-6 ELISA Set BD Biosciences, USA
- BD OptEIA™ Human IL-10 ELISA Set BD Biosciences, USA
- BD OptEIA™ Human IL-15 ELISA Set BD Biosciences, USA
- BD OptEIA™ Human TNF ELISA Set BD Biosciences, USA
- BD OptEIA™ Human IFN- γ ELISA Set BD Biosciences, USA
- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific, USA
- MiSeq Reagent Kit V3 Illumina, USA
- QIAamp DNA Mini QIAGEN, USA
- QIAseq 16S/ITS Region Panels QIAGEN, USA
- QuantiFluor dsDNA System Promega, USA
- ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System Promega, USA
- ReliaPrep™ Blood gDNA Mini Miniprep System Promega, USA
- SG qPCR Master Mix (2x) EURx, Polska
- TaqMan™ Genotyping Master Mix (2x) Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific, USA
- TaqMan™ SNP Genotyping Assay, human (40x) Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific, USA

3.1.3. Sprzęt i aparatura badawcza

- analizator hematologiczny Mythic 18 Cormay Diagnostic, Polska
- fluorometr Quantus Promega, USA
- inkubator Galaxy 170S New Brunswick, Eppendorf, Niemcy
- medyczna łaznia laboratoryjna MLL147 AJL electronic, Polska
- mikroskop Olympus CX31 Olympus, Japonia
- spektrofotometr DS-11+ DeNovix, USA

- spektrofotometr Multiskan RC Thermo Scientific, USA
- TapeStation 4200 Agilent Technologies, USA
- termocykler LightCycler® 480 II Roche, USA
- termocykler T300 Biometra®, Niemcy
- termoblok TB1 Biometra®, Niemcy
- waga laboratoryjna Radwag, Polska
- wirówka Centrifuge 5810 R Eppendorf, Niemcy
- worteks Mini-Shaker Biosan, USA
- worteks Multi-Vortex V-32 Biosan, USA
- worteks V-1 plus Biosan, USA
- zamrażarka niskotemperaturowa -86 °C Thermo Scientific, USA

3.1.4. Oprogramowanie komputerowe

- Inkscape Inkscape Team, licencja GPL
- Pakiet Microsoft 365 Microsoft, licencja OEM
- R-Studio RStudio, licencja GNU AGPL v3
- Labsystems Genesis wersja 3.05

3.1.5. Materiały zużywalne

- butelki do hodowli adherentnej TC 25 cm² i 75 cm² GoogLab Scientific, Polska
- High Sensitivity D1000 ScreenTape® Agilent Technologies, USA
- filtr Stericup® and Steritop™ Vacuum Driven Sterile Filters 0,22 µm Merck, Niemcy
- filtry strzykawkowe 0,22 µm GoogLab Scientific, Polska
- folia Adhesive PCR Seal Sarstedt, USA
- folia LightCycler® 480 Sealing Foil Roche, USA
- folia Sealing Tape Thermo Scientific, USA
- pipety serologiczne 5 ml i 10 ml GoogLab Scientific, Polska
- płytki do hodowli komórkowej 24-dołkowa Costar® Corning Incorporated, USA
- płytki do hodowli komórkowej 96-dołkowa Falcon® Corning Incorporated, USA

- płytki 96-dółkowe MaxiSorp Nunc Thermo Scientific, USA
- płytki Fast PCR Plate White 96 Sarstedt, USA
- probówki 0,5 ml Eppendorf, Niemcy
- probówki 1,5 ml Eppendorf, Niemcy
- probówki 2 ml Eppendorf, Niemcy
- probówki CryoTube™ Vials 2 ml Thermo Scientific, USA
- probówki VACUETTE® Greiner Bio-One, Austria
- probówki wirówkowe 15 ml i 50 ml GoogLab Scientific, Polska
- uniwersalne końcówki do pipet z filtrem 10 µl, 200 µl, 1000 µl GoogLab Scientific, Polska

3.1.6. Linia komórkowa i wirus indykatorowy

L929 – linia komórek fibroblastopodobnych otrzymana z podskórnej tkanki tłuszczowej myszy (ATCC CCL-1™). Linię otrzymano z Laboratorium Kolekcji Linii Komórkowych IITD PAN we Wrocławiu.

VSV (*vesicular stomatitis virus*) – wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (ATCC-VR-1238™), szczep Indiana, rodzina *Rhabdoviridae*, rodzaj *Vesiculovirus*. Wirus z kolekcji Laboratorium Wirusologii otrzymany od dr C. Bucklera z National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. VSV posiada otoczkę lipidową i materiał genetyczny w postaci ssRNA(-).

3.1.7. Lipopolisacharyd z *Porphyromonas gingivalis*

Lipopolisacharyd z *P. gingivalis* (LPS-PG) został zakupiony w firmie Invivogen (Francja). Liofilizat rekonstruowano w 1 ml ultra czystej wody, następnie rozporcjowano. Przechowywano w –20 °C.

3.1.8. Oligonukleotydy do reakcji real-time PCR

Oligonukleotydy (startery) do reakcji real-time PCR (tabela 1) zostały zakupione w firmie Genomed (Polska) w zliofilizowanej formie. Pelet oligonukleotydów rekonstruowano dodając 10 mM Tris-HCl o pH 7,6 tak aby otrzymać roztwór o stężeniu

100 μ M (100 pmoli/ μ l). Stężone startery przechowywano w -20°C , gdzie w alkalicznym roztworze zachowują stabilność przez ponad rok. Celem uniknięcia cyklu wielokrotnego rozmrażania i zamrażania do doświadczeń przygotowano roboczy roztwór starterów o stężeniu 10 μ M, który przechowywano w -20°C .

Tab. 1. Startery wykorzystane w analizie ekspresji genów metodą real-time PCR

Gen	NCBI RefSeq	Sekwencja 5' – 3'	Produkt	Źródło
<i>S18</i>	NM_022551	F: GCAGAATCCACGCCAGTACAAG R: GCTTGTGTGCCAGACCATGGC	107 pz	(138)
<i>SDHA</i>	NM_004168	F: GAGATGTGGTGTCTCGGTCCAT R: GCTGTCTCTGAAATGCCAGGCA	142 pz	(139)
<i>COX1</i>	NM_173704	F: TCTCAGGCTACACCCTAGACCA R: ATCGGGGTAGTCCGAGTAACGT	137 pz	(140)
<i>COX2</i>	NM_000963	F: CGGTGAACTCTGGCTAGACAG R: GCAAACCGTAGATGCTCAGGGA	155 pz	(141)
<i>SOCS1</i>	NM_003745	F: GGAAGTCTTTTCGCCCTTA R: AGCAGCTCGAAGAGGCAGTC	127 pz	(142)
<i>SOCS3</i>	NM_003955	F: CAAGGACGGAGACTTCGATT R: GGAGCCAGCGTGGATCTG	110 pz	(143)
<i>STAT1</i>	NM_007315	F: ATGGCAGTCTGGCGGCTGAATT R: CCAAACCGAGGCTGGCACAATTG	144 pz	(144)
<i>STAT3</i>	NM_139276	F: CTTTGAGACCGAGGTGTATCACC R: GGTCAGCATGTTGTACCACAGG	133 pz	(145)
<i>IRF1</i>	NM_002198	F: GTACCGGATGCTTCCACCTC R: GTCCGGCACAACCTTCCACTG	289 pz	BLAST Primer 5
<i>IRF3</i>	NM_001571	F: ACCAGCCGTGGACCAAGAG R: TACCAAGGCCCTGAGGCAC	65 pz	(146)
<i>AP-1 (JUN)</i>	NM_002228	F: CCTTGAAAGCTCAGAACTCGGAG R: TGCTGCGTTAGCATGAGTTGGC	124 pz	(147)
<i>PI3KR1</i>	NM_181523	F: CGCCTCTTCTTATCAAGCTCGTG R: GAAGCTGTGTAATTCTGCCAGG	108 pz	(148)
<i>NFkB</i>	NM_003998	F: AGAAGTCTTACCCTCAGGTCA R: CAGTTACAGTGCAGATCCCA	147 pz	(149)

F: starter przedni (*forward*), R: starter wsteczny (*reverse*).

3.1.9. Sondy TaqMan

Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP) genotypowano z wykorzystaniem sond TaqMan® (tabela 2) dostarczonych przez ThermoFisher Scientific (USA). Częstość alleli podano dla populacji europejskiej na podstawie bazy SNP National Library of Medicine (ALFA Project). Możliwe allele genu APOE przedstawiono w tabeli 3.

Tab. 2. Sondy TaqMan® wykorzystane w genotypowaniu SNP

Gen	SNP	Allele	Mutacja	Częstość
<i>APOE</i>	rs429358	T/C	Cys112Arg	T93% C7%
<i>APOE</i>	rs7412	C/T	Arg158Cys	C92% T8%
<i>HLA-DRB1</i>	rs9270856	A/G		A26% G73%
<i>HLA-DRA</i>	rs3135344	C/T		C29% T72%
<i>HLA-DQA1</i>	rs9272105	G/A		G46% A54%
<i>FCGR2A</i>	rs1801274	A/G	Arg131His	A51% G49%

Tab. 3. Możliwe allele genu *APOE*

Allel	rs429358	rs7412
E2	T	T
E3	T	C
E4	C	C

3.2. Metody

3.2.1. Kwestie etyczne

Niniejsze badania zostały przeprowadzone po uzyskaniu zgody nr KB – 76/2019 wydanej przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (UMW) z dnia 12 lutego 2019 roku. W badaniach wzięły udział tylko te osoby, które samodzielnie lub przez swoich opiekunów wyraziły na to zgodę. Wszyscy uczestnicy badania zostali poinformowani o charakterze i celach przeprowadzanego badania naukowego, a także możliwości wycofania zgody na udział w badaniach w każdym momencie ich trwania. Badania zostały przeprowadzone z zachowaniem anonimowości uniemożliwiającej identyfikację pacjentów przez osoby postronne.

3.2.2. Grupa badana

Grupę badaną stanowiło 68 uczestników: 36 pacjentów Katedry Psychiatrii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (UMW) z rozpoznaną chorobą Alzheimera (AD) oraz 32 kognitywnie zdrowe osoby. Wszyscy pacjenci zostali poddani szczegółowym badaniom neuropsychologicznym pod kątem kryteriów włączenia i wyłączenia z badania. W tym celu wykonano wywiad z pacjentami i ich opiekunami

oraz testy oceniające stopień zaburzeń poznawczych, w tym: test MMSE (ang. *Mini-Mental State Examination*), test MoCA (ang. *Montreal Cognitive Assessment*) oraz test rysowania zegara według Sunderlanda. Dodatkowo wykorzystując geriatryczną skalę oceny depresji (GDS) oceniono u pacjentów poziom zaburzeń depresyjnych.

Do kryteriów wyłączenia należały: wiek powyżej 90 lat, zdiagnozowane inne typy demencji niż AD lub inne towarzyszące choroby psychiatryczne, wskazania badania MRI świadczące o niedawno przebytej infekcji w mózgu, uzależnienie bądź nadużywanie alkoholu i substancji psychoaktywnych w ciągu ostatnich 2 lat, palenie wyrobów tytoniowych, przyjmowanie antybiotyków w ciągu ostatnich 6 miesięcy lub przebycie choroby infekcyjnej w ciągu ostatnich 3 miesięcy.

Badanie periodontologiczne w kierunku zapalenia przyzębia (paradontozy) zostało wykonane u wszystkich uczestników badania, włącznie z grupą kontrolną, w Katedrze Periodontologii UMW. Badania fizykalne jamy ustnej wykonano z wykorzystaniem lusterka dentystycznego oraz sondy periodontologicznej CP-15 (Hu Friedy, USA). Zbadano liczbę zębów z wyłączeniem trzecich zębów trzonowych oraz określono indeks zepsutych-brakujących-wypełnionych zębów stałych (ang. *Decayed, Missing and Filled Teeth index* – DMFT). Stan higieny jamy ustnej określono na podstawie indeksu płytki nazębnej wg Lange (ang. *Aproximal Plaque Index* – API) po uprzednim zabarwieniu zębów roztworem barwiącym. Wykonano badania głębokości sondowania kieszonek dziąsłowych (ang. *Pocket Depth* – PD) oraz utraty przyczepu łącznotkankowego (ang. *Clinical Attachment Loss* – CAL) w 6 miejscach dysto-, środkowo- i mezjalnopoliczkowych oraz w pozycjach językowych wszystkich zębów z wyjątkiem trzecich zębów trzonowych oraz badanie krwawienia podczas sondowania wg Langa (ang. *Bleeding on Probing* – BOP) zmierzone dla 4 punktów pomiarowych i wyrażony jako procentowa powierzchnia krwawienia. Zarejestrowano także wszelkie zmiany w błonie śluzowej jamy ustnej. Rozpoznanie kliniczne zapalenia przyzębia wykonano na podstawie nowej klasyfikacji chorób i schorzeń przyzębia i tkanek wokół implantów Amerykańskiej Akademii Periodontologii (APP) i Europejskiej Federacji Periodontologii (EFP) z 2017 roku. W trakcie badania przeprowadzono wywiad w którym zapytano pacjentów o nawyki higieniczne jamy ustnej, takie jak częstość szczotkowania i nitkowania zębów oraz płukania jamy ustnej.

3.2.3. Pobranie próbek krwi i śliny

Od wszystkich uczestników badania pobrano krew żylną z wykorzystaniem próżniowego systemu VACUETTE®. Pobrano do 12 ml krwi na heparynę litową, 4 ml na EDTA oraz 4 ml na surowicę. Próbkę śliny od pacjentów oraz osób zdrowych pobrano na czczo, przed myciem zębów i/lub płukaniem jamy ustnej. Pobrane zostało ok 2.5 ml śliny.

3.2.4. Morfologia krwi

Skład morfotyczny krwi obwodowej osób uczestniczących w badaniach została przeanalizowany jakościowo i ilościowo z wykorzystaniem analizatora hematologicznego Mythic 18 (Cormay Diagnostic, Polska). W tym celu do probówki wirówkowej o pojemności 0,5 ml przeniesiono 50 µl próbki krwi, którą następnie poddano badaniu z wykorzystaniem analizatora według instrukcji producenta. Badanie wykonano do 2 godzin po pobraniu materiału.

3.2.5. Prowadzenie hodowli komórkowych

Linie komórkową L929 prowadzono w plastikowych butelkach do hodowli adherentnej w temperaturze 37 °C i atmosferze składającej się w 95% z powietrza i 5% z dwutlenku węgla (5% CO₂). Komórki hodowano w płynie hodowlanym RPMI-1640 wzbogaconym inaktywowaną (30 min., 56 °C) płodową surowicą bydlęcą (FBS) o końcowym stężeniu 2%, a także 2 mM roztworem L-glutaminy oraz roztworem streptomycyny z penicyliną (płyn o takim składzie określanym jest dalej jako RPMI 2% FBS). Aby utrzymać ciągłość L929 konfluentną hodowlę pasażowano 2-3 razy w tygodniu. W tym celu płyn hodowlany usunięto, a powierzchnię komórek przemyto 3 ml 0,25% (w/v) trypsyny z 0,53 mM EDTA, którą następnie odciągnięto. Po odklejeniu komórek dodano świeżej pożywki RPMI 2% FBS, następnie zawiesinę komórek przeniesiono do nowego naczynia hodowlanego w stosunku 1/3-1/6. Uzupełniono do 20 ml świeżym płynem hodowlanym. Hodowlę inkubowano w cieplarni (37°C, 5% CO₂) do uzyskania konfluentnej hodowli.

3.2.6. Namnażanie VSV

VSV namnożono na 24-godzinnej hodowli L929 (konfluencja >90%) o wyjściowej gęstości $1,8 \times 10^5$ kom./ml. Płyn hodowlany usunięto, a na komórki naniesiono 20 ml inokulum VSV o mianie 10^5 TCID₅₀/ml. Komórki inkubowano w cieplarni (37°C, 5% CO₂) do osiągnięcia efektów cytopatycznych (ang. *cytopathic effects* – CPEs) obejmujących ponad 90% hodowli. Po 48 godzinach (100% CPEs) butelkę z zakażoną hodowlą zamrożono w -20 °C celem dezintegracji komórek. Następnie butelkę z hodowlą rozmrożono, a lizat odwirowano (10 min., 450 rcf). Nadsącz zebrano i rozporcjowano. Zawiesinę wirusa przechowywano w temperaturze -80 °C.

3.2.7. Oznaczanie miana VSV metodą TCID₅₀

Miano VSV zostało oznaczone z wykorzystaniem ilościowej metody TCID₅₀ (ang. *Tissue Culture Infective Dose 50%*) reprezentującej miano wirusa jako ilość rozcieńczeń inokulum niezbędnych do wywołania CPEs w 50% dołków zakażonej hodowli komórek gospodarza w określonym czasie. Zawiesinę wirusa rozcieńczono w 9 powtórzeniach na płaskodennej 96-dołkowej płytce metodą seryjnych rozcieńczeń w postępie logarytmicznym (dziesiętny szereg rozcieńczeń) w płynie RPMI 2% FBS. Kontrolę negatywną (kontrola hodowli) stanowił płyn hodowlany niezawierający wirusa. Rozcieńczenia naniesiono na 24-godzinną hodowlę L929 o wyjściowej gęstości $1,8 \times 10^5$ kom./ml (konfluencja >90%) i inkubowano 48 godzin w cieplarni (37°C, 5% CO₂) do momentu ustabilizowania CPEs. Charakterystyczne zmiany CPEs wywoływane przez wirusa obserwowano pod odwróconym mikroskopem świetlnym i oceniano według skali, gdzie „0” oznaczał brak CPEs; „1” CPEs < 25%; „2” CPEs = 50%; „3” CPEs > 75%; „4” CPEs = 100%. Dołki określono jako pozytywne gdy zaobserwowano w nich CPEs ≥ 1. Następnie obliczono miano VSV z wykorzystaniem metody Spearmana-Kärbera (150). Miano otrzymanego wirusa używanego w doświadczeniach wyniosło 6,83 logTCID₅₀ ($6,81 \times 10^7$ TCID₅₀/ml).

3.2.8. Izolacja leukocytów z krwi obwodowej

Pełną pulę leukocytów krwi obwodowej (ang. *peripheral blood leukocytes* – PBLs) izolowano w gradiencie stężeń Gradisolu G (Aqua-med, Polska) według

następującej procedury: 4 ml krwi obwodowej delikatnie nawarstwiono na 2,4 ml Gradisolu G, następnie zwirowano (30 min, 700 rcf). Po tym czasie warstwę komórek PBLs zebrano i przeniesiono do nowej probówki wirówkowej. Zawiesinę komórek uzupełniono płynem RPMI 2% FBS do objętości 12 ml, a następnie ponownie odwirowano (10 minut, 700 rcf). Nadsącz odrzucono. Komórki wypłukano jeszcze 2-krotnie przez zawieszenie osadu komórek w 5 ml RPMI 2% FBS i zwirowanie (5 minut, 700 rcf). Po ostatnim wirowaniu komórki zawieszono w 3 ml RPMI 2% FBS i obliczono stężenie. W tym celu przygotowano próbkę zawiesiny poprzez 10-krotne ($R = 10$) rozcieńczenie w 5% kwasie octowym celem pozbycia się erytrocytów z obrazu mikroskopu. Następnie w komorze Bürkera policzono średnią liczbę komórek z pięciu pól siatki zliczeniowej na podstawie czego obliczono stężenie PBLs wykorzystując następujący wzór:

$$\text{stężenie PBLs} = \text{średnia liczba komórek} \times R \times 10^4 [\text{kom.}/\text{ml}],$$

gdzie R to zastosowane rozcieńczenie. Żywotność komórek sprawdzono barwiąc komórki błękitem trypanu (TrypanBlue), w tym celu do 10 μl zawiesiny komórek dodano 10 μl 0,4% błękitu trypanu. Następnie 10 μl zawiesiny z barwnikiem przeniesiono na komorę Bürkera. Przy pomocy mikroskopu dla każdej próbki krwi dwukrotnie policzono liczbę martwych komórek (zabarwionych na niebiesko) na każde 100 komórek. We wszystkich wykonanych izolacjach żywotność komórek wyniosła ponad 90%.

3.2.9. Stymulacja PBLs LPS-PG

Na 24-dołkową płytkę naniesiono 1 mln komórek (leukocytów; PBLs) i uzupełniono płynem hodowlanym (RPMI 2% FBS) do objętości 1 ml. Następnie do komórek dodano 1 μl LPS-PG o stężeniu 1 mg/ml. Kontrolę negatywną stanowiły komórki nietraktowane zawieszone w płynie hodowlanym. Doświadczenie wykonano w dwóch niezależnych powtórzeniach. Komórki inkubowano przez 24 godziny w cieplarni (37°C , 5% CO_2). Po tym czasie zawiesinę ściągnięto i przeniesiono do probówki wirówkowej łącząc dwa powtórzenia w jedną próbkę, którą następnie zwirowano (5 min., 300 rcf) i rozporcjowano. Nadsącz przechowywano w -80°C do dalszych analiz. Dodatkowo dołki na płytce przemyto 1 ml zimnego roztworu PBS z 3 mM EDTA i połączono z pozostałym po wirowaniu osadem

komórkowym. Zawiesinę zwirowano (5 min., 300 rcf) po czym nadsącz odrzucono. Komórki przepłukano dwukrotnie 0,8 ml roztworu PBS. Komórki zawieszono w 250 µl buforu do mrożenia BL+TG Buffer (Promega, USA). Komórki do momentu izolacji RNA przechowywano w -80 °C.

3.2.10. Oznaczanie poziomu nieswoistej odpowiedzi immunologicznej – test oporności leukocytów na zakażenie VSV

Do probówki wirówkowej przeniesiono 1 mln komórek PBLs i uzupełniono do 900 µl płynem hodowlanym RPMI 2% FBS. Komórki zakażono dodając 100 µl inokulum VSV o mianie 1000 TCID₅₀/ml, następnie zawiesinę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 40 minut. Po adsorpcji wirusa komórki 3-krotnie wypłukano. W tym celu do zawiesiny dodano 3 ml płynu hodowlanego i zwirowano (5 min, 700 rcf), a nadsącz odrzucono. Procedurę powtórzono 2-krotnie. Otrzymany pelet zakażonych komórek zawieszono w 1 ml RPMI 2% FBS, który przeniesiono na 24-dołkową płytkę hodowlaną. Dodatkowo, 50 µl zawiesiny zakażonych komórek inkubowano w 4 °C przez 12 godzin (kontrola odpłukania wirusa). Kontrolę stanowiły komórki niezakażone (uwalnianie spontaniczne). Doświadczenie wykonano w dwóch niezależnych powtórzeniach. Zakażone komórki inkubowano w 37°C, 5% CO₂ przez 24 godziny. Po inkubacji zawiesinę ściągnięto i przeniesiono do probówki wirówkowej łącząc dwa powtórzenia w jedną próbkę, którą następnie zwirowano (5 min., 300 rcf). Z nadsączu pobrano 70 µl celem zmianowania wirusa, natomiast resztę rozporcjowano i przechowywano w -80°C. Osad komórek wypłukano i zawieszono w 250 µl buforu do mrożenia BL+TG Buffer według tej samej procedury jak w rozdziale 3.2.9.

3.2.11. Ilościowe oznaczenie stężenia cytokin

Stężenia sześciu cytokin: IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10 oraz IL-15 zmierzono w nadsączach pobranych z leukocytów (PBLs) stymulowanych LPS-PG, zakażonych VSV oraz nietraktowanych (kontrola). Oznaczenia wykonano metodą immunoenzymatyczną ELISA z wykorzystaniem gotowych zestawów firmy BD Bioscience (USA) zgodnie z instrukcją producenta.

Odpowiednie przeciwciała monoklonalne specyficzne względem jednego z badanych analitów (anty-IFN- γ , anty-TNF- α , anty-IL-1 β , anty-IL-6, anty-IL-10 lub anty-IL-15) rozcieńczono w 0,1 M buforze węglanowym (pH 9,5). Po 100 μ l odpowiedniego roztworu przeciwciała naniesiono na płytkę 96-dołkową, płytkę zabezpieczono folią ochronną i inkubowano całą noc w 4°C. Po inkubacji płytki opróżniono i 3-krotnie (300 μ l/dołek) wypłukano buforem Wash Buffer (PBS z 0,05% Tween-20). Płytki osuszono po czym do wszystkich dołków dodano 200 μ l Assay Diluent (PBS z 10% FBS), zabezpieczono folią i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Płytki opróżniono i wypłukano 3-krotnie jak poprzednio. Na tak przygotowane, osuszone płytki naniesiono po 100 μ l badanych próbek (odpowiednio rozcieńczonych), rozcieńczeń próbki standardowej oraz próbę zerową (blank). Płytki zabezpieczono folią i inkubowano w temp. pok. przez 2 godziny. Po tym czasie płytki opróżniono i 5-krotnie wypłukano jak poprzednio. Następnie do każdego dołka dodano po 100 μ l przeciwciał detekcyjnych skoniugowanych z peroksydazą chrzanową (HRP) rozcieńczonych w Assay Diluent. Płytki zabezpieczono i inkubowano w temp. pok. przez 1 godzinę, następnie płytki opróżniono i 7-krotnie wypłukano mieszając przez 1 minutę pomiędzy każdym płukaniem. Płytki osuszono, a do dołków dodano 100 μ l roztworu substratu (TBM + H₂O₂ w stosunku 1:1). Płytki inkubowano przez 30 minut w temp. pok. bez dostępu światła. Po tym czasie reakcję natychmiast zatrzymano dodając do każdego dołka po 50 μ l 1 M kwasu fosforowego (H₃PO₄). Zmierzono absorbancję przy długości fali 450 nm z korekcją 570 nm na czytniku mikroplatek Multiskan RC (Thermo Scientific, USA). Stężenia cytokin zostały obliczone na podstawie krzywej wzorcowej przez oprogramowanie Labsystems Genesis wersja 3.05.

3.2.12. *Izolacja RNA i synteza komplementarnego DNA*

RNA wyizolowano z PBLs przy pomocy zestawu ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega, USA) według instrukcji producenta. Wcześniej zebrany i zamrożony w BL+TG Buffer osad komórek rozmrożono. Do lizatu dodano 85 μ l 100% izopropanolu i krótko wymieszano. Cały lizat komórkowy przeniesiono na kolumnę ReliaPrep™ Minicolumn (Promega, USA), którą umieszczono w probówce wirówkowej 2 ml. Całość zwirowano (30 s, 14000 rcf). Przesącz usunięto, a na kolumnę dodano 500 μ l buforu

RNA Wash Solution. Próbki ponownie zwirowano (30 s, 14000 rcf). Przesącz usunięto, natomiast na kolumnę naniesiono 30 µl mieszaniny deoksyrybonukleazy I (DNazy I) (tabela 4) po czym inkubowano w temp. pok. przez 15 minut.

Tab. 4. Skład mieszaniny DNazy I

Odczynnik	Objętość na próbkę
Yellow Core Buffer	24 µl
0,09 M MnCl ₂	3 µl
DNaza I	3 µl

Po tym czasie na kolumnę naniesiono 200 µl Column Wash Solution i zwirowano (15 s, 14000 rcf). Przesącz usunięto, a kolumnę wypłukano dwukrotnie buforem RNA Wash Solution, najpierw 500 µl buforu z wirowaniem (30 s, 14000 rcf), następnie 300 µl buforu z wirowaniem (2 min, 14000 rcf). Kolumnę przeniesiono na nową probówkę wirówkową 1,5 ml. Na kolumnę naniesiono 30 µl wody wolnej do nukleaz i zwirowano (1 min, 14000 rcf). Stężenie i czystość RNA zmierzono na spektrofotometrze DS-11+ (DeNovix, USA).

Komplementarny DNA (cDNA) na matrycy RNA uzyskano wykonując reakcję odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem zestawu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) zawierający losowe startery. Reakcję wykonano według instrukcji załączonej przez producenta. W tym celu przygotowano mieszaninę reakcyjną według tabeli poniżej (tabela 5).

Tab. 5. Mieszanina reakcyjna do odwrotnej transkrypcji

Odczynnik	Objętość na reakcję
10X RT Buffer	2,0 µl
25X dNTP (100 mM)	0,8 µl
10X Losowe startery	2,0 µl
Odwrotna transkryptaza MultiScribe™	1,0 µl
H ₂ O	4,2 µl
Objętość całkowita	10 µl

W reakcji użyto 200 ng matrycy. Reakcję odwrotnej transkrypcji (warunki w tabeli 6) przeprowadzono z wykorzystaniem termocyklera T300 (Biometra). Otrzymany cDNA przechowywano w -20 °C.

Tab. 6. Warunki reakcji odwrotnej transkrypcji

Ustawienia	Krok 1	Krok 2	Krok 3	Krok 4
Temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
Czas	10 min	120 min	5 min	

3.2.13. Analiza ekspresji genów

Ekspresję genów *COX1*, *COX2*, *SOCS1*, *SOCS3*, *STAT1*, *STAT3*, *IRF1*, *IRF3*, *AP-1* (*JUN*), *PI3KR1* i *NF-κB* względem dwóch genów metabolizmu podstawowego *S18* i *SDHA* wykonano metodą ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) z wykorzystaniem systemu SYBR® Green i zestawu SG qPCR Master Mix (2x) (EURx, Polska). W tym celu na 96-dotkową płytkę reakcyjną naniesiono 5 µl matrycy zawierającej 2,5 ng cDNA oraz 10 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej parę starterów o stężeniu 0,5 µM każdy, polimerazę oraz 2,5 mM MgCl₂. Wszystkie odczynniki przygotowywano na lodzie. Następnie płytkę zabezpieczono termostabilną folią ochronną i krótko zwirowano. Reakcję PCR przeprowadzono z wykorzystaniem urządzenia LightCycler® 480 II (Roche, USA) w warunkach opisanych w tabeli 7. Reakcję prowadzono w dwóch powtórzeniach technicznych zarówno dla genów badanych jak i kontrolnych. Dodatkowo na każdej płytce przeprowadzono reakcję kalibracyjną.

Tab. 7. Warunki reakcji real-time PCR

Krok	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Preinkubacja	95°C	10 min	1
▶ Denaturacja	94°C	15 s	40
Hybrydyzacja	60°C	30 s	
Elongacja	72°C	30 s	
Krzywa topnienia	95°C	0,05°C/s	1
Chłodzenie	4°C		

W wyniku reakcji amplifikacji dla każdej próbki wyznaczono cykl progowy (C_t) na podstawie którego obliczono względną ekspresję korzystając z metody $\Delta\Delta C_t$ (151). W celu normalizacji wykorzystano dwa geny metabolizmu podstawowego: *SDHA* kodujący główną podjednostkę katalityczną dehydrogenazy bursztynianowej oraz *S18* kodujący białko małej podjednostki rybosomu 40S dla których obliczono średnią

geometryczną cyklu progowego. Wszystkie wyniki odniesiono do ustalonego kalibratora dla którego wariancja między poszczególnymi reakcjami wyniosła maksymalnie 0,29 C_t.

3.2.14. *Izolacja genomowego DNA*

Genomowe DNA (gDNA) wyizolowano z pełnej krwi żyłnej wszystkich uczestników badania z wykorzystaniem gotowego zestawu ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega, USA) zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. W tym celu próbki krwi rozmrożono doprowadzając do temp. pokojowej. Do 20 µl proteiny K dodano 200 µl krwi (pobranej na EDTA). Krótco wymieszano, dodano 200 µl Cell Lysis Buffer (Promega, USA) i ponownie wymieszano. Próbkę inkubowano w 56°C przez 10 minut. Po tym czasie krótco zwirowano, dodano 250 µl Binding Buffer (Promega, USA). Po wymieszaniu całość przeniesiono na kolumnę ReliaPrep™ Binding Column (Promega, USA) i zwirowano (1 min, 14000 rcf). Przesącz odrzucono, a kolumnę umieszczono w świeżej probówce wirówkowej 2 ml. Kolumnę wypłukano poprzez naniesienie 500 µl Column Wash Solution (Promega, USA) i zwirowanie (3 min, 14000 rcf). Płukanie powtórzono jeszcze dwa razy. Na koniec kolumnę przeniesiono do nowej probówki wirówkowej 1,5 ml i naniesiono na nią 100 µl wody wolnej od nukleaz (Promega, USA). Inkubowano w temp. pok. przez 5 minut. Następnie zwirowano (1 min, 14000 rcf). Stężenie i czystość gDNA zmierzono przy pomocy spektrofotometru DS-11+ (DeNovix, USA). Otrzymany materiał zabezpieczono i przechowywano w -20 °C.

3.2.15. *Genotypowanie polimorfizmów pojedynczego nukleotydu*

Genotypowanie polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) wykonano metodą sond TaqMan dla 5 genów: *HLA-DRB1*, *HLA-DRA*, *HLA-DQA1*, *FCGR2A* oraz *APOE*. Sondy z dedykowanymi starterami zostały zakupione wraz z zestawem TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems™, USA). Genotypowanie przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta TaqMan® SNP Genotyping Assays USER GUIDE (wersja z 29 września 2017 roku).

Genomowe DNA wszystkich uczestników badania, wyizolowane zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.2.14., sprowadzono do jednakowego stężenia 2,23 ng/µl. Następnie, przygotowano mieszaninę reakcyjną według tabeli poniżej (tabela 8)

Tab. 8. Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do genotypowania SNP

Odczynnik	Objętość na reakcję
10X TaqMan Master Mix	5,0 µl
20X TaqMan Genotyping Assay Mix	0,5 µl
Objętość całkowita	5,5 µl

Mieszaninę reakcyjną rozporcjowano po 5,5 µl, a następnie dodano 4,5 µl matrycy gDNA (10 ng DNA na reakcję). Do dołków z kontrolą negatywną (NTC) dodano 4,5 µl wody wolnej od nukleaz. Reakcję amplifikacji przeprowadzono w termocyklerze LightCycler® 480 II (Roche, USA) w poniższych warunkach (tabela 9). Objętość końcowa reakcji wyniosła 10 µl.

Tab. 9. Warunki reakcji genotypowania SNP

Krok	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Aktywacja enzymu AmliTaq Gold	95°C	10 min	1
→ Denaturacja	95°C	15 s	40
← Hybrydizacja i elongacja	60°C	60 s	
Chłodzenie	4°C		

Dyskryminację alleli przeprowadzono w oparciu o automatyczne przyporządkowanie sygnału fluorescencji z dwóch badanych kanałów FAM (465-510 nm) oraz VIC (533-580 nm) do odpowiedniego allelu według poniższego schematu (tabela 10). W przypadku homozygot sygnał pochodził z jednego kanału, w przypadku heterozygot sygnał pochodził w równym stopniu z dwóch kanałów.

Tab. 10. Dyskryminacja alleli na podstawie odczytu fluorescencji

SNP	FAM	VIC
rs429358	T	C
rs1801274	G	A
rs9270856	G	A
rs3135344	T	C
rs9272105	A	G
rs7412	T	C

3.2.16. *Izolacja bakteryjnego DNA*

Ślina wszystkich uczestników badania została pobrana do probówki wirówkowej 50 ml, a następnie krótko zwirowana celem odrzucenia nierozpuszczalnych resztek. Próbkę śliny rozporcjowano i przechowywano w -80°C . Bakteryjne DNA wyizolowano z wykorzystaniem gotowego zestawu do izolacji QIAamp DNA Mini (QIAGEN, USA) według instrukcji producenta. Próbkę śliny rozmrożono i doprowadzono do temperatury pokojowej. Do probówki wirówkowej 1,5 ml dodano 20 μl proteinazy K (QIAGEN, USA), 200 μl próbki śliny oraz 200 μl buforu AL (QIAGEN, USA). Próbkę wymieszano, a następnie inkubowano przez 10 minut w 56°C , po tym czasie krótko zwirowano i dodano 200 μl 96% alkoholu etylowego. Wymieszano, a następnie zwirowano. Całą objętość próbki naniesiono na kolumnę umieszczoną w probówce 2 ml. Próbkę zwirowano (1 min., 6000 rcf), po czym kolumnę przeniesiono do nowej probówki 2 ml. Przesącz odrzucono. Na kolumnę naniesiono 500 μl buforu AW1 (QIAGEN, USA), następnie próbkę zwirowano (1 min., 6000 rcf). Kolumnę przeniesiono na nową probówkę wirówkową 2 ml na którą naniesiono 500 μl buforu AW2 (QIAGEN, USA) i zwirowano (3 min., 14000 rcf). Przesącz odrzucono. Kolumnę przeniesiono do nowej probówki 1,5 ml i naniesiono 200 μl buforu do elucji AE (QIAGEN, USA). Próbkę inkubowano 5 minut w temp. pok., a następnie zwirowano (1 min., 6000 rcf). Stężenie DNA zmierzono względem buforu AE na spektrofotometrze DS-11+ (Denovix). Próbkę DNA przechowywano w -20°C .

3.2.17. *Przygotowanie bibliotek i sekwencjonowanie 16S rDNA*

W celu scharakteryzowania składu mikrobioty jamy ustnej wykonano analizę mikrobiomu próbek śliny pobranej na czczo od osób z AD oraz od osób kognitywnie zdrowych (ZDR). Zastosowano sekwencjonowanie NGS ampikonów regionów zmiennych V3-V4 oraz V7-V9 genu 16S rRNA kodującego małą podjednostkę rybosomu prokariotycznego (152) z wykorzystaniem zestawu QIAseq 16S/ITS Region Panels (QIAGEN, USA) według instrukcji producenta QIAseq® 16S/ITS Panel Handbook z listopada 2021. Analizę mikrobiomu wykonano z wykorzystaniem 23 próbek losowo wyodrębnionych spośród całej próby badanej (68 osób), tj. 12 osób (5 kobiet i 7 mężczyzn) z grupy AD oraz 11 osób (6 kobiet i 5 mężczyzn) z grupy ZDR.

W tym celu, zmierzono stężenie próbek DNA (matryca) wyizolowanych ze śliny z wykorzystaniem QuantiFluor dsDNA System (Promega, USA) na fluorymetrze Quantus (Promega, USA), a następnie rozcieńczono przy pomocy wody wolnej od nukleaz do stężenia 1 ng/μl. Amplifikację regionów V3V4 i V7V9 wykonano równocześnie w ramach jednej reakcji PCR. Wszystkie czynności wykonywano na lodzie. Do mieszaniny reakcyjnej (tabela 11) dodano 4 μl badanej matrycy, próbki wymieszano i krótko zwirowano.

Tab. 11. *Mieszanina reakcyjna dla amplifikacji regionów zmiennych V3V4 i V7V9*

Odczynnik	Objętość na reakcję
UCP Master Mix	2,5 μl
V3V4	1,0 μl
V7V9	1,0 μl
H ₂ O	1,5 μl
Objętość całkowita	6,0 μl

Przeprowadzono reakcję PCR w następujących warunkach (tabela 12).

Tab. 12. *Warunki reakcji amplifikacji regionów zmiennych V3V4 i V7V9*

Krok	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Preinkubacja	95°C	2 min	1
→ Denaturacja	95°C	30 s	20
Hybrydyzacja	50°C	30 s	
Elongacja	72°C	120 s	
Wydłużanie	72°C	7 min	1
Chłodzenie	4°C		

Po zakończonej reakcji PCR próbki krótko zwirowano i uzupełniono 40 μl wody UPC PCR (QIAGEN, USA). Następnie produkty PCR oczyszczono na kulkach magnetycznych. W tym celu do każdej próbki dodano po 55 μl QIAseq Beads (QIAGEN, USA). Próbkę inkubowano w temp. pok. przez 5 minut, po czym kulki odseparowano przy pomocy magnesu. Po rozdzieleniu nadsącz delikatnie usunięto. Produkt PCR odzyskano dodając 55 μl wody wolnej od nukleaz. Kulki magnetyczne ponownie odseparowano po czym 50 μl nadsączy, zawierającego produkt PCR, przeniesiono do

próbówki z 55 μ l QIAseq Beads. Dokładnie wymieszano i inkubowano w temp. pok. przez 5 minut. Zawiesinę rozdzielono i usunięto nadsącz. Następnie kulki magnetyczne wypłukano 200 μ l 80% alkoholu etylowego. Nadsącz usunięto a płukanie z alkoholem powtórzono. Kulki magnetyczne dokładnie wysuszone na powietrzu w temp. pok. Następnie odzyskano produkt PCR poprzez dodanie 35 μ l wody UCP PCR. Próbkę dokładnie wymieszano i inkubowano w temp. pok. przez 5 minut. Po rozdzieleniu zawiesiny przeniesiono 32,5 μ l nadsączu do nowej próbówki reakcyjnej.

Następnie przeprowadzono reakcje przyłączania indeksów. Do produktu PCR z amplifikowanymi fragmentami 16S dodano 17,5 μ l mieszaniny reakcyjnej (12,5 μ l MasterMix + 5 μ l wody UPC). Przeprowadzono reakcję PCR w następujących warunkach (tabela 13).

Tab. 13. *Warunki reakcji przyłączania indeksów*

Krok	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Preinkubacja	95°C	2 min	1
Denaturacja	95°C	30 s	
Hybrydyzacja	60°C	30 s	20
Elongacja	72°C	120 s	
Wydłużanie	72°C	7 min	1
Chłodzenie	4°C		

Po skończonej reakcji próbki krótko zwirowano, dodano 45 μ l QIAseq Beads i oczyszczono jak poprzednio. Oczyszczony produkt PCR z przyłączonymi indeksami odzyskano dodając 30 μ l wody wolnej od nukleaz. Zawiesinę rozdzielono przy pomocy magnesu i pobrano 25 μ l nadsączu. Produkt (biblioteki) zabezpieczono do sekwencjonowania przechowując w -20°C .

Biblioteki rozmrożono i zmierzono ich stężenie za pomocą QuantiFluor dsDNA, a następnie rozcieńczono do stężenia 1 ng/ μ l. Długość otrzymanych produktów PCR przygotowanych bibliotek 16S dla regionów V3V4 i V7V9 zanalizowano wykonując elektroforezę żelową z wykorzystaniem urządzenia TapeStation 4200 (Agilent Technologies, USA) poprzez naniesienie 1 μ l biblioteki na płytkę High Sensitivity D1000 ScreenTape® (Agilent Technologies, USA). Biblioteki rozcieńczono do stężenia 2 nM i połączono w jedną próbkę dodając jednakowe objętości każdej biblioteki DNA. Następnie połączone biblioteki zdenaturowano, w tym celu do 5 μ l 2 nM połączonych

bibliotek dodano 5 µl roztworu 0,2 N NaOH. Próbkę zwirowano (1 min, 280 rcf), a następnie inkubowano w temp. pok. przez 5 minut. Efektem procedury denaturacji było otrzymanie jednoniciowego DNA. W następnej kolejności do zdenaturowanej biblioteki dodano 990 µl schłodzonego do 4 °C buforu do hybrydyzacji z zestawu MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina, USA) jednocześnie rozcieńczając do końcowego stężenia 10 pM. Sekwencjonowanie przeprowadzono na aparacie MiSeq. Otrzymane sekwencje w formacie FASTQ zostały poddane analizie bioinformatycznej zgodnie z metodyką opisaną w pracy (153), co uwzględniało wstępne przygotowanie surowych odczytów sekwencji DNA, łączenia odczytów forward i reverse oraz wyników z dwóch badanych regionów zmiennych umożliwiając określenie taksonomicznego pochodzenia zbioru sekwencji. Klasyfikacja taksonomiczna została wykonana z wykorzystaniem bazy SILVA 128 (154).

3.2.18. *Analiza statystyczna*

Analizę statystyczną i bioinformatyczną wraz z wizualizacją wyników przeprowadzono wykorzystując zintegrowane środowisko programistyczne RStudio 2024.04.2 build 764 dla języka R (wersja 4.4.1) oraz arkusz kalkulacyjny Microsoft Excel (wersja 2406) z pakietu Microsoft 365.

Przed przystąpieniem do właściwej analizy statystycznej zebrane dane zostały odpowiednio przygotowane. W tym celu dokonano weryfikacji i oczyszczania danych, które sprawdzono pod kątem obecności potencjalnych duplikatów oraz brakujących wartości. Braki w danych, które objęły nie więcej niż 20% obserwacji dla poszczególnych zmiennych zostały imputowane stosując różne metody uzupełniania danych. Pojedyncze braki uzupełniono przy pomocy średniej lub mediany w zależności od charakteru zmiennej. Braki w liczbie granulocytów obliczono na podstawie procentowej zawartości granulocytów i ogólnej liczby leukocytów. Dla braków obejmujących stężenia cytokin oraz ekspresji genów wykorzystano współliniowość zmiennych dzięki czemu możliwe było imputowanie danych z wykorzystaniem regresji liniowej.

Testowanie hipotez przeprowadzono według następującego schematu. Dla wszystkich zmiennych ilościowych znajdujących się na skali ilorazowej lub interwałowej

obliczono podstawowe statystyki opisowe oraz wykonano testowanie normalności rozkładu przy pomocy testu Shapiro-Wilka uzupełniając analizę o ocenę wykresu kwantylowego. Dla wszystkich zmiennych znacznie odbiegających od rozkładu normalnego zastosowano przekształcenie Boxa-Coxa (155). W przypadku uzyskania satysfakcjonującej transformacji, zmienne testowano dalej w przekształconej formie. Dla zmiennych których rozkład z próby charakteryzował się rozkładem normalnym zastosowano testy parametryczne, natomiast dla zmiennych, które nie posiadały cech rozkładu Gaussa zastosowano testy nieparametryczne.

Wszystkie przytoczone w rozdziale *Cel pracy* hipotezy badawcze oraz szczegółowe cele badawcze zostały zweryfikowane z zastosowaniem następujących testów statystycznych: do oceny różnic w rozkładzie płci oraz częstości genotypów między grupami wykorzystano test niezależności chi-kwadrat Pearsona (z poprawką Yatesa na ciągłość dla tabel 2 na 2 z małą liczbą obserwacji) lub dokładny test Fishera, który wykorzystano w przypadku niewielkiej liczby zliczeń (dokładniejszy dla małych prób), zgodność rozkładu frekwencji alleli badanych polimorfizmów z prawem Hardy’ego-Weinberga sprawdzono z wykorzystaniem testu niezależności chi-kwadrat, w celu oceny istotności różnic między dwiema niezależnymi grupami wykonano test *t* Studenta dla grup o równych wariancjach oraz test *t* Welcha dla prób o nierównych wariancjach, lub w przypadku prób dla których rozkład porównywanych zmiennych nie spełniał założeń dotyczących normalności rozkładu, test *U* Manna-Whitneya. W badaniach zmierzono stężenia cytokin wytwarzanych przez komórki w odpowiedzi na stymulację. Jako, że stężenia cytokin przed i po stymulacji były od siebie zależne, tzn. wartość jednej była skorelowana z wartością drugiej, dla porównania czy wzrost wartości cytokin był istotny w obrębie każdej z grup wykonano test *t* Studenta dla par związanych. Przy porównywaniu większej liczby niezależnych grup niż dwie, wykonano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z testem *post hoc* Gamesa-Howella dla zmiennych niespełniających założeń o homogeniczności wariancji wewnątrzgrupowej zbadaną testem Levene’a. W przypadku danych niespełniających założeń o normalności rozkładu wykonano jednoczynnikową analizę wariancji dla rang Kruskala-Wallisa oraz test *post hoc* Dunna. Wpływ zapalenia przyzębia na odpowiedź cytokinową zbadano przy pomocy wielorakiej (wielozmiennej) regresji liniowej. Każdy model został oceniony na obecność obserwacji wpływowych z wykorzystaniem miary

dystansu Cook'a. Diagnostyka modelu obejmowała ocenę liniowości modelu zbadaną testem serii Walda-Wolfowitz, normalności składnika losowego zbadaną testem Shapiro-Wilka, oraz homoskedastyczności składnika losowego zbadanej testem Harrisona-McCabe'a. W przypadku porównania wielu różnych zmiennych dla których użycie regresji liniowej nie było możliwe z powodu niespełnienia wymaganych założeń (normalność rozkładu) wykonano analizę korelacji rang Spearmana. Różnice w korelacjach między grupami zbadano testem równości dwóch współczynników korelacji z transformacją Fishera (dalej test Fishera).

Ocena różnorodności składu mikrobioty została przeprowadzona na podstawie dwóch podstawowych wielkości stosowanych w ekologii: różnorodności alfa oraz beta.

Różnorodność alfa to względne zróżnicowanie gatunkowe w danym ekosystemie lub próbce, co w odniesieniu do mikrobioty określa taksonomiczną bioróżnorodność mikroorganizmów, czyli liczbę i równomierność rozkładu poszczególnych taksonów. Miara ta mierzy zmienność wewnętrzną próbki i może zostać opisana przez kilka wskaźników: (a) obserwowane cechy, czyli liczba wyodrębnionych w analizie bioinformatycznej wariantów sekwencji amplikonu (ang. *amplicon sequence variants* – ASV) będąca wypadkową sekwencji regionów zmiennych, w przypadku mikrobioty będzie odnosić się do liczby gatunków lub taksonów wyższego rzędu; (b) wskaźnik Shannona-Wienera (entropia Shannona), który ocenia równomierność rozłożenia poszczególnych taksonów w mikrobiomie składających się na badaną próbkę z uwzględnieniem ich liczby (156,157), może być interpretowany jako prawdopodobieństwo tego, że dwie losowe obserwacje badanego ekosystemu będą stanowiły różne taksony; (c) równocенność Pielou jest miarą bezpośrednio związaną ze wskaźnikiem Shannona, która ocenia równomierność gatunkową, tj. dysproporcje w liczności poszczególnych taksonów względem siebie (158); (d) wskaźnik różnorodności filogenetycznej Faitha (159), który ocenia różnorodność taksonów z uwzględnieniem pokrewieństwa pomiędzy nimi; (e) wskaźnik CHAO1, który mierzy różnorodność taksonów z uwzględnieniem rzadkich gatunków występujących w próbce tylko raz lub dwa razy, dzięki czemu możliwe jest dokładniejsze oszacowanie liczby gatunków w próbce (160) oraz (f) wskaźnik Simpsona, który ocenia równomierność i bogactwo gatunkowe w próbce jako prawdopodobieństwo wylosowania z próbki tego samego taksonu, przyjmuje wartości z zakresu [0,1], gdzie 1 oznacza, że próbka składa

się tylko z jednego gatunku lub jest zdominowana przez jeden gatunek. Do stwierdzenia różnic w rozkładzie wartości poszczególnych wskaźników różnorodności alfa pomiędzy grupami wykorzystano nieparametryczny testu Manna-Whitneya dla dwóch niezależnych grup.

Różnorodność beta określa różnice w obfitości i liczbie gatunków między dwoma ekosystemami lub próbkami. Do oceny próbek wykorzystano cztery miary: (a) odległość Jaccarda, która w sposób jakościowy określa jaka część taksonów jest wspólna dla dwóch porównywanych próbek przyjmując wartości z zakresu $[0,1]$, gdzie 0 oznacza, że wszystkie taksony są wspólne dla dwóch porównywanych próbek, a 1 oznacza największe niepodobieństwo czyli brak wspólnych taksonów; (b) odległość Bray-Curtisa, która w sposób ilościowy porównuje dwie próbki pod względem obfitości i liczby taksonów, podobnie jak w przypadku miary Jaccarda – 0 cechuje próbki identyczne, a 1 całkowicie do siebie niepodobne; (c) Unweighted UniFrac, która porównuje zbiorowiska (ekosystemy, próbki) mikroorganizmów w oparciu o odległość filogenetyczną między zestawami taksonów określając jak bardzo porównywane próbki są od siebie ewolucyjnie dywergentne (odległe) (161) oraz (d) Weighted UniFrac, która oprócz pokrewieństwa filogenetycznego między taksonami porównywanych próbek uwzględnia również ich obfitość (162). Obliczone wskaźniki różnorodności beta mierzą jak bardzo próbki lub ekosystemy różnią się od siebie porządkując obserwacje w formie macierzy niepodobieństwa (lub macierzy odległości). Taka macierz określa niepodobieństwo między i -tym i j -tym obiektem dla każdego z wyliczonych wskaźników różnorodności beta w n -wymiarowej przestrzeni. Dzięki Analizie Głównych Współrzędnych (ang. *Principal Coordinates Analysis* – PCoA) możliwe było znalezienie takich współrzędnych n -punktów w przestrzeni kartezjańskiej, które pozwoliły zredukować liczbę wymiarów i najlepiej scharakteryzować wzajemne ułożenie punktów umożliwiając rozdzielenie obiektów na grupy ze względu na porównywaną cechę (163) – w tym przypadku miar różnorodności beta. Istotność różnic w wartościach miar różnorodności beta między grupami (AD i ZDR) zbadano nieparametrycznym testem statystycznym permutacyjnej wielowymiarowej analizy wariancji (ang. *permutational multivariate analysis of variance*; PERMANOVA) dla 999 permutacji, gdzie zmienną zależną jest macierz niepodobieństwa a zmiennymi niezależnymi przynależność do

grupy *alzheimer* w interakcji ze zmiennymi periodontologicznymi i wskaźnikiem higieny międzyzębowej.

Względna obfitość taksonów została scharakteryzowana na poziomie typu (*phylum*), rodziny (*family*) oraz rodzaju (*genus*) względem badanych grup AD i ZDR z wykorzystaniem testu *U* Manna-Whitneya.

W celu uzupełnienia procedury wnioskowania, którą przeprowadzono w oparciu o testowanie istotności hipotez zerowych (ang. *Null Hypothesis Statistical Testing* – NHST) i umożliwienia wyciągnięcia bardziej praktycznych wniosków z przeprowadzonych badań wykorzystano wskaźniki wielkości efektu (164). Wielkość efektu stanowi obiektywny i zazwyczaj standaryzowany wskaźnik siły obserwowanego oddziaływania między zmiennymi, na podstawie którego można przewidywać realny efekt w populacji. Wykorzystanie wskaźników w pewnym stopniu niweluje niektóre ograniczenia metody NHST i pozwala ocenić wagę wyników naukowych. W tabeli 14 zamieszczono wykorzystane wskaźniki wielkości efektu w zależności od testu statystycznego wraz z interpretacją.

W pracy przyjęto typowy poziom prawdopodobieństwa testowego $\alpha = 0,05$. Błąd pierwszego rodzaju kontrolowano stosując poprawki wartości *p* metodą Benjamini-Hochberga.

Tab. 14. Wskaźniki wielkości efektu wraz z interpretacją

Test statystyczny	Wskaźnik siły efektu	Interpretacja
t – Studenta t – Welcha	d Cohena	0,10 – bardzo mały 0,20 – mały 0,50 – umiarkowany 0,80 – silny 1,20 – bardzo silny 2,00 – ogromny ^a
U Manna-Whitneya	r_G (korelacja dwuseryjna Glassa)	0,00 – 0,30 – słaby 0,31 – 0,50 – umiarkowany 0,51 – 0,70 – silny 0,71 – 1,00 – bardzo silny
Analiza wariancji (ANOVA)	η^2 (eta-kwadrat)	0,01 – słaby 0,06 – umiarkowany
H Kruskala-Wallisa	ε^2 (epsilon-kwadrat)	0,14 – silny
Analiza regresji liniowej	skorygowane R^2	0,02 – słaby 0,13 – umiarkowany 0,26 – silny
Korelacja rang Spearmana	ρ (rho)	0,00 – 0,20 – słaby (prawie nic nieznaczący) 0,20 – 0,40 – niski (wyraźny, ale słaby) 0,40 – 0,70 – umiarkowany (rzeczywisty) 0,70 – 0,90 – wysoki (znaczny) 0,90 – 1,00 – bardzo wysoki (pewny) ^b
Chi-kwadrat	ϕ (phi)	0,10 – słaby 0,30 – umiarkowany 0,50 – silny
Test dokładny Fishera	OR (iloraz szans)	1,5 – słaby 2,5 – umiarkowany 4,0 – silny

Interpretacja wskaźników dla wartości bezwzględnych. Źródło: (164–167); a – rozszerzona skala wg Sawilowsky’ego (168); b – skala wg Guilforda (169).

4. WYNIKI

4.1. Charakterystyka grupy badanej

W badaniu wzięto udział 68 osób, w tym 36 osób (52,9%) z klinicznie stwierdzoną chorobą Alzheimera (grupa AD) w wieku 44-90 lat w tym 20 kobiet (55,6%) w przedziale wieku 47-82 lata oraz 16 mężczyzn (44,4%) w przedziale wieku 44-90 lat. Ze względu na kliniczną postać choroby pacjenci zostali zakwalifikowani do trzech grup na podstawie klasyfikacji DSM-5 (ang. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*): łagodna postać AD (7 osób; 19,4%), umiarkowana postać AD (18 osób; 50,0%) oraz poważna postać AD (11 osób; 30,6%). Grupę kontrolną stanowiły 32 kognitywnie zdrowe osoby (47,1%) (grupa ZDR) w wieku 50-80 lat w tym 18 kobiet (56,3%) w przedziale wieku 51-80 lat i 14 mężczyzn (43,8%) w przedziale wieku 50-75 lat. Nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładzie płci między mężczyznami i kobietami wewnątrz grup AD i ZDR. Grupę AD scharakteryzowano pod kątem wyników testów MMSE i MoCA. Rozkład zmiennych psychiatrycznych dla grupy AD zamieszczono w tabeli 15. Stan higieny jamy ustnej oraz przyzębia został scharakteryzowany u wszystkich uczestników badania za pomocą określonych wskaźników periodontologicznych takich jak: ilościowa ocena powierzchni krwawiących dziąseł (BOP – *Bleeding on Probing*), głębokość sondowania kieszonek dziąsłowych (PD – *Pocket Depth*), wskaźnik utraty przyczepu łącznotkankowego (CAL – *Clinical Attachment Loss*) oraz wskaźnik ilości płytki nazębnej w przestrzeniach międzyzębowych (API – *Approximal Plaque Index*).

Podstawowe statystyki opisowe charakteryzujące: wiek, płeć, MMSE, MoCA, stopień zaawansowania AD oraz zmienne periodontologiczne w obu grupach zamieszczono w tabeli 15.

Tab. 15. Podstawowe statystyki opisowe charakteryzujące wiek, płeć, MMSE, MoCA, stopień zaawansowania AD (DSM-5) oraz zmienne periodontologiczne w obu grupach

Zmienna	Grupa	Mediana	MAD	Min-Max
Wiek	AD	71	8,90	44-90
	Kontrola	64	9,64	50-80
Płeć	Grupa	Kobiety	Mężczyźni	%Mężczyzn
	AD	20	16	44,4
	Kontrola	18	14	43,7
MMSE	Grupa AD	Mediana	MAD	Min-Max
	Kobiety	18,5	5,19	10-23
	Mężczyźni	17,0	3,71	9-24
MoCA	Grupa AD	Mediana	MAD	Min-Max
	Kobiety	15	2,96	5-22
	Mężczyźni	14	4,45	4-24
DSM-5	Grupa AD	Łagodna	Umiarkowana	Poważna
	Kobiety	3	12	5
	%	15,0	60,0	0,25
	Mężczyźni	4	6	6
	%	25,0	37,5	37,5
BOP [%]	Grupa	Mediana	MAD	Min-Max
	AD	17,0	0,00	0-100
	Kontrola	10,5	24,46	2-88
API [%]	Grupa	Mediana	MAD	Min-Max
	AD	100	25,20	10-100
	Kontrola	37	5,19	0-100
PD [mm]	Grupa	Mediana	MAD	Min-Max
	AD	2,0	0,00	1,0-3,6
	Kontrola	2,0	0,35	1,1-2,8
CAL [mm]	Grupa	Mediana	MAD	Min-Max
	AD	0,5	0,70	0,0-5,0
	Kontrola	0,7	0,73	0,0-6,3

MAD – bezwzględne odchylenie medianowe.

Dodatkowo grupa badana została scharakteryzowana pod kątem statusu socjodemograficznego i ekonomicznego opartego na miejscu zamieszkania i poziomie wykształcenia oraz nawykach higienizacyjnych zębów. Zebrane dane zostały przedstawione w tabeli 16. W grupie AD większość osób miała wykształcenie wyższe (47,2%) podczas gdy w grupie ZDR największy odsetek stanowiły osoby o wykształceniu średnim (62,5%). Pod względem nawyków higienizacyjnych zębów osoby zdrowe poznaczco lepiej dbały o jamę ustną szczotkując zęby dwa razy dziennie (93,8%

uczestników badania), nitkując (37,5%) oraz płucząc (34,4%) zęby, podczas gdy w grupie AD dwa razy dziennie zęby szczotkowało jedynie 47,2% uczestników badania i większość nie nitkowała (91,7%) ani nie płukała (94,4%) zębów. Różnice w nawykach higienizacyjnych zębów zostały również opisane w oparciu o miarę DMFT (ang. *Decay-Missing-Filled Teeth*) (170), która stanowi sumę zębów objętych próchnicą, brakujących i zawierających wypełnienie. DMFT jest w epidemiologii często używaną miarą do oceny częstości występowania próchnicy i oceny ogólnego stanu jamy ustnej. Przeciętna wartość DMFT w grupie ZDR wyniosła 17,0 (mediana), natomiast w grupie AD 16,0. Osoby zdrowe charakteryzowały się przeciętnie większą liczbą wypełnień (9 zębów) niż osoby z AD (6 zębów). Obie grupy miały podobną liczbę zębów, która w grupie ZDR wyniosła przeciętnie 23 zęby, natomiast w grupie AD 22 zęby. W grupie AD 44% osób miało przynajmniej jeden ząb z próchnicą, natomiast w grupie ZDR takich osób stwierdzono 41%.

Tab. 16. Status socjodemograficzny i nawyki higienizacyjne zębów osób z grupy badanej oraz kontrolnej

Cecha		AD			ZDR		
		n	%	%skum.	n	%	%skum.
Wykształcenie	podstawowe	4	11,1%	11,1%	0	0%	0,0%
	średnie	15	41,7%	52,8%	20	62,5%	62,5%
	wyższe	17	47,2%	100,0%	12	37,5%	100,0%
Miejsce zamieszkania	małe miasto	7	19,4%	19,4%	0	0,0%	0,0%
	średnie miasto	8	22,2%	41,7%	1	3,1%	3,1%
	duże miasto	21	58,3%	100,0%	31	96,9%	100,0%
Szczotkowanie zębów	rzadziej	5	13,9%	13,9%	0	0,0%	0,0%
	1 raz dziennie	13	36,1%	50,0%	2	6,3%	6,3%
	2 razy dziennie	17	47,2%	97,2%	30	93,8%	100,0%
	częściej	1	2,8%	100,0%	0	0,0%	100,0%
Nitkowanie zębów	nie	33	91,7%	91,7%	20	62,5%	62,5%
	tak	3	8,3%	100,0%	12	37,5%	100,0%
Płukanie zębów	nie	34	94,4%	94,4%	21	65,6%	65,6%
	tak	2	5,6%	100,0%	11	34,4%	100,0%

4.2. Ocena zmian w profilach komórek immunologicznych krwi obwodowej

W pierwszym etapie badań przeprowadzono analizę składu komórek immunologicznych krwi obwodowej w celu określenia możliwego powiązania z AD. Podstawowe statystyki opisowe dla obu grup zostały przedstawione w tabeli 17.

Tab. 17. Podstawowe statystyki opisowe elementów morfotycznych krwi

Grupa	Zmienna		Min.	Q1	Mdn	MAD	Q3	Maks.
AD	leukocyty	$\times 10^3/\mu\text{l}$	3,8	4,8	5,9	1,1	6,8	10,4
	limfocyty	$\times 10^3/\mu\text{l}$	0,8	1,3	1,6	0,4	2,0	3,1
	monocyty	$\times 10^3/\mu\text{l}$	0,1	0,2	0,3	0,1	0,4	0,5
	granulocyty	$\times 10^3/\mu\text{l}$	2,2	3,2	4,0	0,8	4,7	7,1
	limfocyty	%	15,3	21,3	27,6	5,9	31,3	52,4
	monocyty	%	2,5	3,8	4,7	0,9	5,5	10,0
	granulocyty	%	44,0	64,0	67,7	7,0	75,2	78,4
	erytrocyty	$\times 10^6/\mu\text{l}$	4,2	5,1	5,8	0,8	6,6	7,4
	hemoglobina	g/dl	13,3	16,0	18,1	1,8	19,8	23,5
	trombocyty	$\times 10^3/\mu\text{l}$	59,0	85,8	141,0	53,0	183,0	332,0
ZDR	leukocyty	$\times 10^3/\mu\text{l}$	4,2	5,4	7,0	0,95	7,7	10,9
	limfocyty	$\times 10^3/\mu\text{l}$	0,9	1,6	2,0	0,35	2,2	3,6
	monocyty	$\times 10^3/\mu\text{l}$	0,0	0,3	0,4	0,10	0,5	0,8
	granulocyty	$\times 10^3/\mu\text{l}$	2,3	3,6	4,9	0,70	5,2	7,0
	limfocyty	%	13,8	25,7	29,9	3,75	33,1	38,9
	monocyty	%	0,6	4,4	5,6	1,30	7,1	10,3
	granulocyty	%	52,9	61,5	65,0	3,75	68,7	82,6
	erytrocyty	$\times 10^6/\mu\text{l}$	2,2	4,8	5,1	0,50	5,6	6,9
	hemoglobina	g/dl	12,4	14,8	15,9	1,40	17,5	19,7
	trombocyty	$\times 10^3/\mu\text{l}$	102,0	155,0	197,0	40,00	231,3	314,0

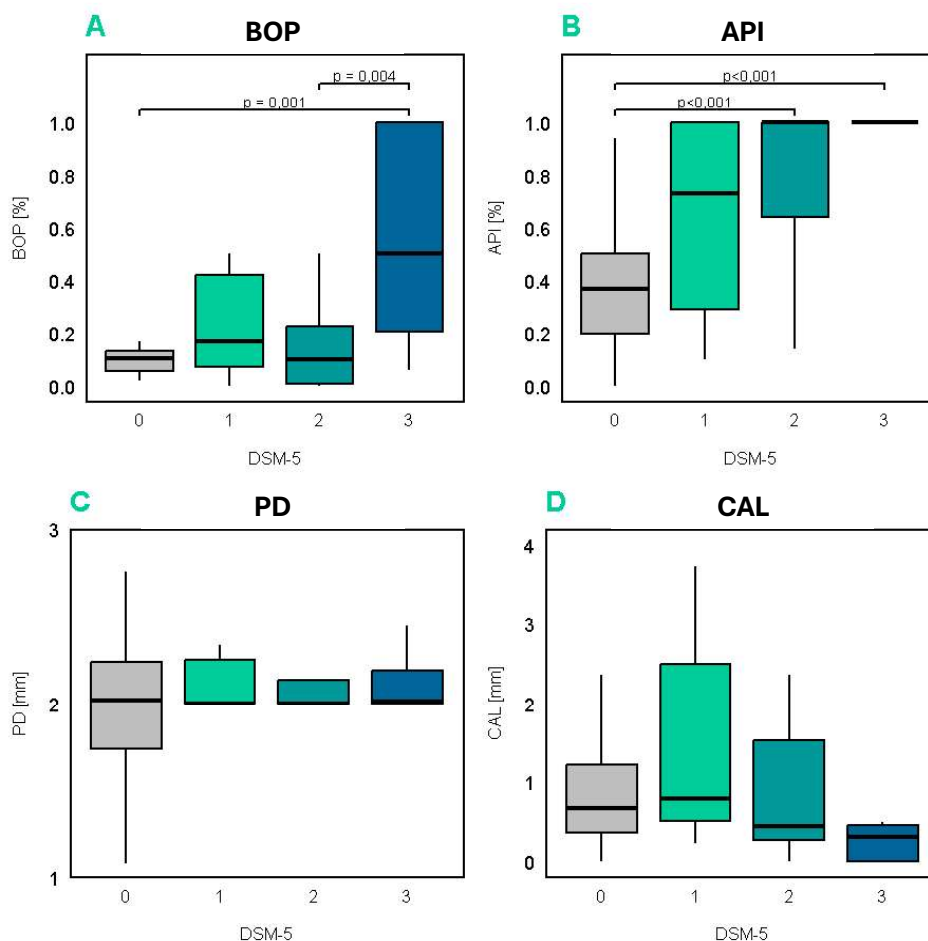
Min. – wartość minimalna; *Q1* i *Q3* - kwantyle dolny i górny; *Mdn* – mediana; *MAD* – bezwzględne odchylenie od mediany; *Maks.* – wartość maksymalna; AD – grupa osób z chorobą Alzheimera; ZDR – grupa osób zdrowych poznawczo.

Przeciętna liczba białych krwinek (leukocytów) w grupie AD była istotnie niższa ($U = 376,5$; $p = 0,014$; $p_{(BH)} = 0,027$; $r_G = -0,30$) w porównaniu do osób zdrowych (ZDR), dlatego celem określenia, które z poszczególnych subpopulacji leukocytów istotnie różnią się między grupami wykonano porównania przy pomocy testu U Manna-Whitneya z poprawką Benjamini-Hochberga porównując jedynie bezwzględną liczbę komórek. Liczba limfocytów w grupie pacjentów AD była istotnie niższa w porównaniu do grupy kontrolnej ($U = 391$; $p = 0,023$; $p_{(BH)} = 0,028$; $r_G = -0,28$). Podobne wyniki zaobserwowano w przypadku *monocytów*, gdzie średnia liczba tych komórek u pacjentów z AD była

znacząco niższa niż w grupie osób zdrowych poznawczo ($U = 384,5$; $p = 0,016$; $p_{(BH)} = 0,027$; $r_G = -0,28$). Natomiast w przypadku granulocytów nie stwierdzono istotnych różnic w liczebności między grupami AD i ZDR ($U = 418$; $p = 0,053$; $p_{(BH)} = 0,053$; $r_G = -0,23$). Dodatkowo, zidentyfikowano różnice w składnikach morfotycznych krwi, które nie są bezpośrednio związane z funkcjonowaniem układu odpornościowego. W przypadku erytrocytów zaobserwowano, że pacjenci z AD charakteryzowali podwyższoną ilością czerwonych krwinek w porównaniu do osób zdrowych ($U = 768,5$; $p = 0,018$; $p_{(BH)} = 0,027$; $r_G = 0,28$). Natomiast liczba płytek krwi była niższa w grupie AD w porównaniu do grupy osób zdrowych ($U = 296,5$; $p < 0,001$; $p_{(BH)} = 0,004$; $r_G = -0,41$).

4.3. Ocena związku między stanem zaawansowania choroby Alzheimera oraz stanem zapalnym przyzębia (paradontoza)

AD charakteryzuje się różnym stopniem zaawansowania, dlatego w pierwszej kolejności zbadano czy pacjenci z AD różnią się od siebie i osób zdrowych poznawczo pod względem uzyskanych wartości wskaźników periodontologicznych (BOP, API, PD oraz CAL) oznaczanych w przypadku diagnostyki paradontozy (PeD). W analizie danych stopień zaawansowania AD oznaczono od 1 do 3, posługując się klasyfikacją DSM-5, gdzie: **1** – łagodna postać AD; **2** – umiarkowana postać AD; **3** – zaawansowana postać AD. Stwierdzono istotne różnice w rozkładach wartości zmiennych BOP ($H(3) = 13,77$; $p = 0,003$; $\eta^2 = 0,17$) oraz API ($H(3) = 30,47$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,43$). Nie stwierdzono istotnych różnic dla pozostałych zmiennych PD ($H(3) = 3,37$; $p = 0,338$; $\eta^2 = 0,005$) oraz CAL ($H(3) = 4,18$; $p = 0,243$; $\eta^2 = 0,02$).



Rys. 6. Rozkład wskaźników periodontologicznych ze względu na stopień zaawansowania AD

Na czterech panelach przedstawiających wykresy pudełkowe zamieszczono rozkład wskaźników periodontologicznych, gdzie: **(A)** zmienna BOP; **(B)** zmienna API; **(C)** zmienna PD; **(D)** zmienna CAL. Na osi rzędnych uwzględniono wartości wskaźników w odpowiadających im jednostkach, natomiast na osi odciętych stopień zaawansowania AD według klasyfikacji DSM-5, gdzie: **1** – łagodna postać AD ($n = 7$); **2** – umiarkowana postać AD ($n = 18$); **3** – zaawansowana postać choroby ($n = 11$). Grupę osób zdrowych poznawczo (ZDR) zakodowano na skali jako **0** ($n = 32$). Na wykresach zaznaczono wartość prawdopodobieństwa testowego p z poprawką Benjamini-Hochberga dla testu *post hoc* Dunna wykonanego po analizie wariancji testem Kruskala-Wallisa dla czterech niezależnych grup. Na pudełku oznaczono podstawowe statystyki opisowe w tym medianę, górny kwartył (Q3) oraz dolny kwartył (Q1). Za pomocą górnego wąsa oznaczono wartość maksymalną, a za pomocą dolnego wąsa wartość minimalną. Punkty oznaczają wartości odstające znajdujące się powyżej i poniżej $1,5 \times IQR$ (IQR – rozstęp międzykwartyłowy).

Analiza wybranych parametrów klinicznych pozwoliła zatem wykazać, że wraz ze stopniem klinicznego zaawansowania AD (wg DMS-5) pogarsza się stan periodontologiczny pacjentów, co przejawia się zwiększonym krwawieniem dziąseł (wyższy wskaźnik BOP) oraz wzrostem ilości przestrzeni międzyzębowych zajętych przez płytkę nazębną (wyższy wskaźnik API). Aby jeszcze dokładniej zbadać zależność

między AD i PeD wykonano analizę korelacji między parametrami oceny neuropsychologicznej (wyniki testów MMSE i MoCA) oraz wskaźnikiem periodontologicznym BOP przy uwzględnieniu liczby zębów, co lepiej odzwierciedla jak duża powierzchnia tkanek przyzębia jest objęta krwawieniem i stanem zapalnym (BOPxT). Uwzględniono także wiek i płeć pacjentów oraz liczbę zębów.

W tabeli 18 przedstawiono wyniki dla zmiennej MMSE. Jak wykazano na liczbę punktów uzyskanych w teście MMSE wpływa przede wszystkim wskaźnik $\sqrt{BOPxT}$ ($p = 0,004$). Wartość współczynnika kierunkowego prostej jest ujemna i wynosi $\beta = -1,434$ co oznacza, że wraz ze wzrostem wartości BOPxT (wzrost stanu zapalnego przyzębia) liczba punktów na skali MMSE spada (średnio o 1,434 pkt.) dla pacjentów będących w tym samym wieku. Drugim czynnikiem związanym z MMSE jest wiek pacjentów. Współczynnik kierunkowy dla tej zmiennej jest ujemny i wynosi $\beta = -0,150$, co oznacza, że wraz z wiekiem spada liczba punktów uzyskana przez pacjentów w teście MMSE (spadek średnio o 0,15 punktu) dla pacjentów o takim samym wskaźniku BOPxT. Nie stwierdzono natomiast różnic płciowych w wartościach MMSE ($p = 0,322$), czyli zależność MMSE od BOPxT jest taka sama u kobiet i u mężczyzn.

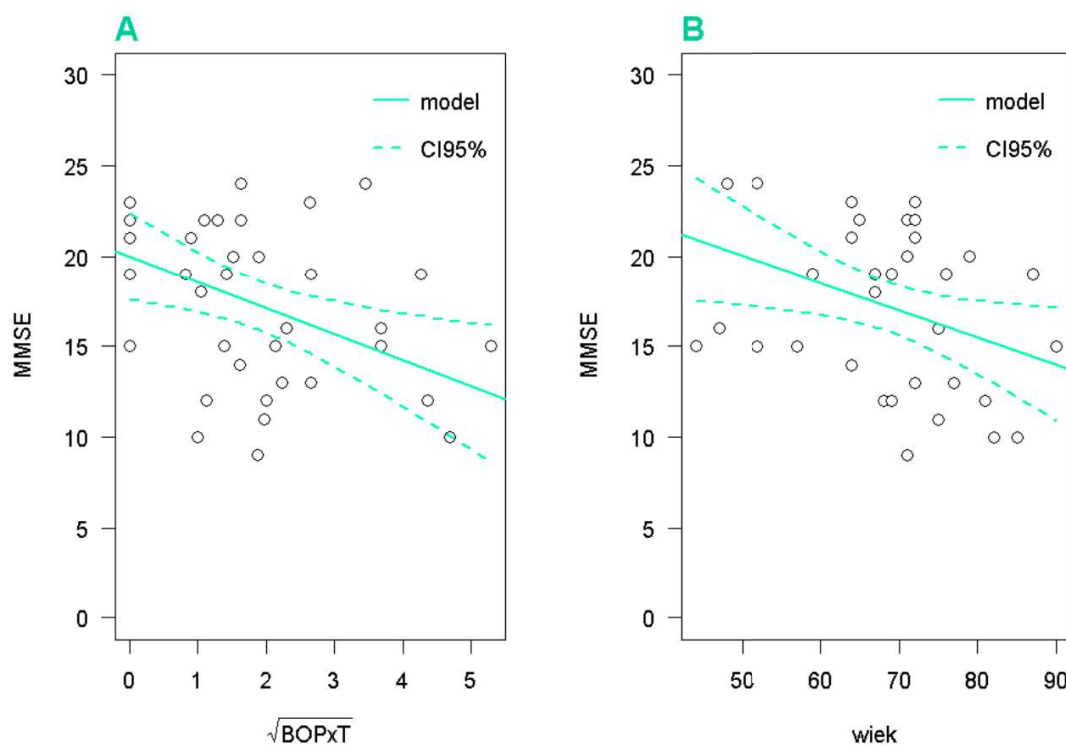
Tab. 18. Wyniki analizy regresji liniowej. Zmienne związane ze stanem zaawansowania AD określonym na podstawie testu MMSE

Zmienna	β	SE	CI95%	$\beta_{\text{stand.}}$	t	p
(stała)	30,214	4,779	20,490 39,937	0,000	6,32	<0,001
$\sqrt{BOPxT}$	-1,434	0,507	-2,465 -0,450	-0,450	-2,83	0,004
wiek	-0,150	0,064	-0,279 -0,376	-0,376	-2,35	0,012

$F(2;33) = 5,19$; $p = 0,011$; skorygowany $R^2 = 0,19$; Normalność składnika losowego wyliczono testem Shapiro-Wilka ($W = 0,96$; $p = 0,224$), homoskedastyczność składnika losowego zbadano testem Harrisona-McCabe'a ($b = 0,60$; $p = 0,815$), natomiast liniowość modelu określono testem serii Walda-Wolfowitza ($Z = -1,22$; $p = 0,223$). Nie stwierdzono obecności obserwacji wpływowych ($\forall_i$ dystans Cook'a $< F(3;33) = 0,19$ dla $\alpha = 0,1$). Zaokrąglono do trzech cyfr znaczących. $\sqrt{BOPxT}$ – znormalizowany (transformacja: pierwiastek kwadratowy) iloczyn wskaźnika powierzchni krwawiących dziąseł i liczby zębów; MMSE – test oceny dysfunkcji poznawczych; β – współczynnik regresji liniowej; $\beta_{\text{stand.}}$ – standaryzowany współczynnik regresji liniowej; CI95% – przedział ufności 95% (ang. *confident interval*).

Na rysunku 7A zamieszczono graficzną reprezentację modelu regresji zależności MMSE od $\sqrt{BOPxT}$ dla przeciętnego wieku (średnia $[M] = 68,3$ lat) osób w grupie AD.

Wpływ wieku na oczekiwaną liczbę punktów MMSE w zależności od przeciętnego wskaźnika $\sqrt{\text{BOPxT}}$ ($M = 1,89$) zaprezentowano na rysunku 7B.



Rys. 7. Analiza regresji liniowej zmiennej zależnej MMSE

Na osi odciętych panelu (A) zmienna BOPxT na skali potęgowej; (B) zmienna wiek; na osi rzędnych MMSE. Linią ciągłą narysowano model regresji, natomiast linią przerywaną zaznaczono przedziały ufności krzywej modelu.

Analizowano także ewentualną zależność pomiędzy zmienną MoCA a zmiennymi BOPxT, wiek i płeć pacjenta. Wyniki pokazały, że na liczbę punktów w teście MoCA wpływa zmienna $\sqrt{\text{BOPxT}}$ ($p = 0,032$) oraz wiek ($p = 0,004$). Wartość współczynnika kierunkowego prostej dla zmiennej BOPxT jest ujemna i wynosi $\beta = -0,975$, co oznacza, że wraz ze wzrostem wartości BOPxT (wzrost stanu zapalnego przyzębia) liczba punktów na skali MoCA jest o 0,975 pkt. mniejsza dla pacjentów będących w tym samym wieku. Dla wieku współczynnik regresji liniowej również jest ujemny i wynosi $\beta = -0,182$, co oznacza, że wraz z wiekiem liczba punktów uzyskanych przez pacjentów w teście MoCA będzie spadać średnio o 0,182 pkt. dla osób o takim samym wskaźniku $\sqrt{\text{BOPxT}}$. W tabeli 19 przedstawiono wynik analizy dla zmiennej MoCA od $\sqrt{\text{BOPxT}}$.

Tab. 19. Analiza regresji liniowej. Zmienne związane ze stanem zaawansowania AD określonym na podstawie testu MoCA

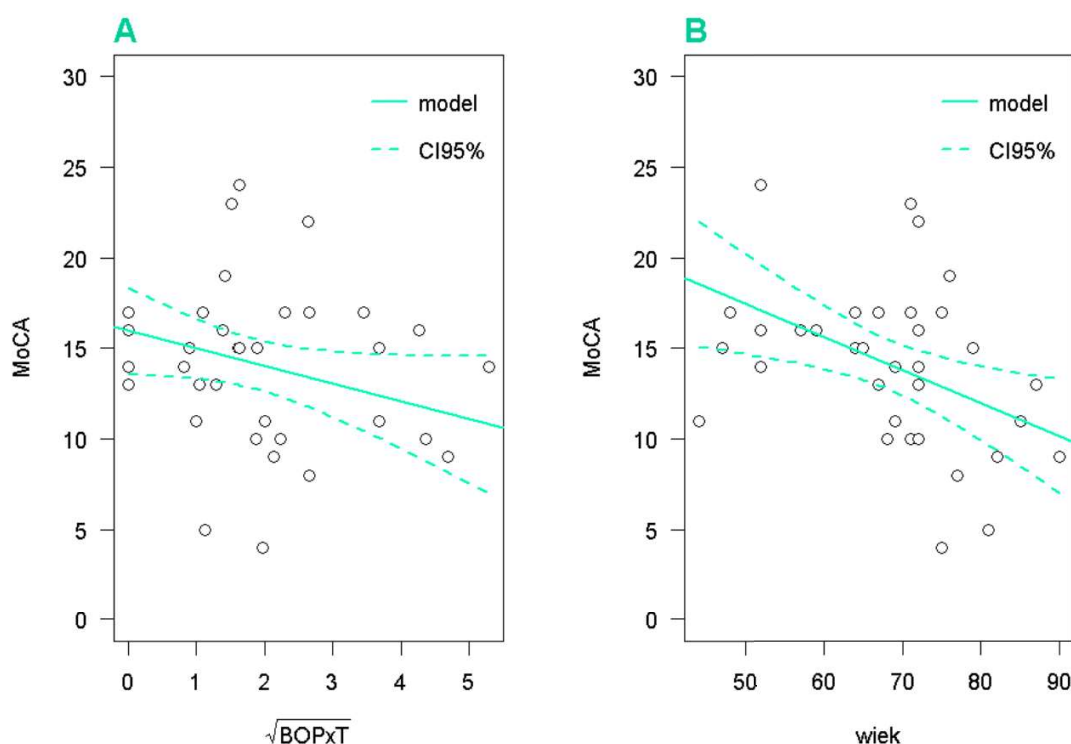
Zmienna	β	SE	CI95%		$\beta_{\text{stand.}}$	t	p
(stała)	28,404	4,809	18,620	38,187	0,000	5,906	<0,001
$\sqrt{\text{BOPxT}}$	-0,975	0,510	-2,012	0,063	-0,309	-1,912	0,032
wiek	-0,182	0,064	-0,312	-0,052	-0,462	-2,849	0,004

$F(2;33) = 4,631$; $p = 0,017$; skorygowany $R^2 = 0,172$. Normalność składnika losowego wyliczono testem Shapiro-Wilka ($W = 0,96$; $p = 0,186$), homoskedastyczność składnika losowego zbadano testem Harrisona-McCabe'a ($b = 0,46$; $p = 0,376$), natomiast liniowość modelu określono testem serii Walda-Wolfowitza ($Z = -0,66$; $p = 0,509$). Nie stwierdzono obecności obserwacji wpływowych ($\forall_i$ dystans Cook'a $< F(3;33) = 0,19$ dla $\alpha = 0,1$). Zaokrąglono do trzech cyfr znaczących. $\sqrt{\text{BOPxT}}$ – znormalizowany (transformacja: pierwiastek kwadratowy) iloczyn wskaźnika powierzchni krwawiących dziąseł z liczbą zębów; MoCA – test oceny dysfunkcji poznawczych; β – współczynnik regresji liniowej; $\beta_{\text{stand.}}$ – standaryzowany współczynnik regresji liniowej; CI95% – przedział ufności 95% (ang. *confident interval*).

Na rysunku 8A zamieszczono graficzną interpretację modelu zmiennej MoCA od $\sqrt{\text{BOPxT}}$ dla przeciętnego wieku pacjentów ($M = 68,3$ lat), natomiast na rysunku 8B taki sam model dla zmiennej wieku i pacjentów o przeciętnym wskaźniku $\sqrt{\text{BOPxT}}$ ($M = 1,89$). W tym przypadku również nie stwierdzono, aby płeć pacjenta miała znaczenie dla osiąganych wartości MoCA ($p = 0,942$) przy takiej samej wartości BOPxT.

Analizowano także pozostałe zmienne periodontologiczne związane z zapaleniem przyzębia jednak nie wykazano związku wskaźników CAL oraz PD z wartościami MMSE i MoCA (dodatek → tabele D1-D4).

W kolejnym etapie badań wykonano doświadczenia mające na celu ustalenie czy współwystępowanie u pacjentów AD oraz PeD prowadzi do rozwoju ogólnoustrojowego stanu zapalnego wyrażającego się podwyższonym poziomem wytwarzania cząsteczek prozapalnych przez obwodowe komórki odpornościowe oraz zwiększonym poziomem ekspresji genów związanych z aktywacją stanu zapalnego.



Rys. 8. Analiza regresji liniowej zmiennej zależnej MoCA

Na osi odciętych panelu (A) zmienna BOPxT na skali potęgowej; (B) zmienna wiek; na osi rzędnych MoCA. Linia ciągłą narysowano model regresji, natomiast linią przerywaną zaznaczono przedziały ufności krzywej modelu.

4.4. Analiza poziomu wytwarzanych cytokin: IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 i IL-15 przez PBLs w odpowiedzi na LPS-PG

Świeżo izolowane leukocyty krwi obwodowej (PBLs) *ex vivo* wszystkich uczestników badania (AD oraz ZDR) traktowano LPS-em pochodzącym z periopatogenu *Porphyromonas gingivalis* (LPS-PG) o końcowym stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$, w celu oceny aktywacji odpowiedzi odpornościowej oraz jej intensywności. Po 24 godzinach inkubacji w supernatantach zebranych z hodowli leukocytów zmierzono stężenia wybranych cytokin pro- i przeciwzapalnych: IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 i IL-15 uwolnione przez komórki w odpowiedzi na podany antygen.

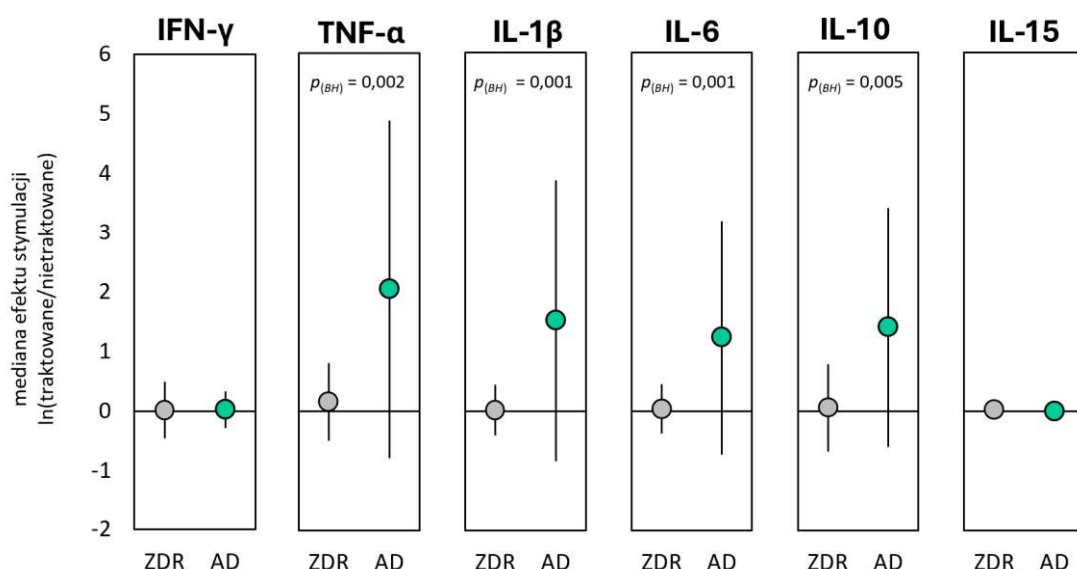
Po pierwsze, zgodnie z oczekiwaniami, PBLs wszystkich uczestników badania odpowiadały wzrostem wytwarzania TNF- α , IL-1 β , IL-6 oraz IL-10 w odpowiedzi na LPS-PG, ale nie IFN- γ i IL-15. Po drugie wykazano istotne różnice w stężeniu cytokin uwalnianych spontanicznie przez komórki nietraktowane LPS-PG między pacjentami

AD i ZDR. Pacjenci AD charakteryzowali się istotnie niższymi stężeniami TNF- α , IL-1 β , IL-6 w porównaniu do osób zdrowych. Komórki pacjentów z AD wytwarzały także mniej IL-10. Po traktowaniu komórek LPS-PG nastąpił wzrost wytwarzania badanych cytokin w grupach AD i ZDR. Wartości finalnie osiągnęły podobny średni poziom u pacjentów AD i ZDR.

Biorąc pod uwagę powyższe postanowiono zbadać różnice w odpowiedzi odpornościowej komórek i w ten sposób wnioskować o kondycji/statusie PBLs osób kognitywnie zdrowych oraz chorych z AD. Aby ocenić intensywność odpowiedzi odpornościowej PBLs w odpowiedzi na podany antygen (LPS-PG) wprowadzono miarę *efektu stymulacji* (ES), którą stanowi logarytm naturalny ilorazu stężeń wytwarzanej cytokiny po i przed stymulacją, wyrażoną wzorem:

$$ES_j^i = \ln \left(\frac{\text{traktowane}}{\text{nietraktowane}} \right) = \ln(\text{traktowane}) - \ln(\text{nietraktowane}),$$

gdzie i to cytokina badana w odpowiedzi na traktowanie LPS-PG (j). *Efekt stymulacji* dla badanych cytokin zaprezentowano na rysunku 9. Na podstawie miary ES zaobserwowano, że odpowiedź odpornościowa PBLs *ex vivo* na LPS-PG była znacznie wyższa w grupie AD, w której nastąpił średnio większy wzrost stężenie cytokin: **TNF- α** ($U = 311$; $p = 0,001$; $p(BH) = 0,002$; $rG = -0,39$), **IL-1 β** ($U = 289$; $p < 0,001$; $p(BH) = 0,001$; $rG = -0,43$), **IL-6** ($U = 296$; $p < 0,001$; $p(BH) = 0,001$; $rG = -0,42$) oraz **IL-10** ($U = 340$; $p = 0,003$; $p(BH) = 0,005$; $rG = -0,35$) niż w grupie kontrolnej ZDR. Poziom wytwarzanych cytokin IFN- γ oraz IL-15 po traktowaniu PBLs LPS-PG nie różnił się między grupami.



Rys. 9. Ocena odpowiedzi odpornościowej PBLs – efekt stymulacji LPS-PG

Punkty oznaczają medianę efektu stymulacji na logarytmicznej skali, wąsy to medianowe odchylenie bezwzględne (MAD), $p_{(BH)}$ – skorygowana wartość p metodą Benjamini-Hochberga.

4.5. Wpływ współwystępowania AD i PeD na odpowiedź odpornościową PBLs na LPS-PG

Jak wykazano powyżej, PBLs izolowane od pacjentów z AD charakteryzowały się *ex vivo* większym wyrzutem wydzielania cytokin po stymulacji LPS-PG, pochodzącym od jednego z najbardziej znanych periopatogenów przyczyniających się do rozwoju PeD. Wpływ współwystępowania PeD i AD na stopień ogólnoustrojowego stanu zapalnego wyrażającego się wytwarzaniem cytokin: IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 i IL-15, zbadano dalej przy pomocy wielorakiej regresji liniowej.

Dla każdej z sześciu cytokin: IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 i IL-15 przeprowadzono indywidualną analizę regresji liniowej wykorzystując podejście eksploracyjne w stosunku do zmiennych periodontologicznych (BOP $\times$ T, CAL i PD). Jako, że grupy różnią się pod względem nawyków higienizacyjnych zębów w analizie uwzględniono także wskaźnik higieny API, czyli wskaźnik higieny międzyzębowej określony na podstawie ilości płytki nazębnej. Pozwoliło to spośród czterech zmiennych objaśniających wytypować tę, która najlepiej tłumaczy różnice w obserwowanych stężeniach badanych cytokin z uwzględnieniem wieku oraz płci pacjentów (AD) i osób zdrowych poznawczo (ZDR).