

Istotne zależności między AD i PeD opisujące funkcjonowanie/status immunologiczny obwodowych komórek odpornościowych zauważono w przypadku cytokiny przeciwzapalnej IL-10 oraz prozapalnej IL-6, które odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi na antygeny bakteryjne. W tabeli 20 zaprezentowano wyniki analizy regresji liniowej dla zmiennej $\ln(C_{IL-10})$ tj. zlogarytmowanego stężenie **IL-10**. Na poziom tej cytokiny wpływały zarówno występowanie AD ($p = 0,024$), wiek ($p = 0,002$), jak i wskaźnik higieny przestrzeni międzyczębowych w interakcji z obecnością AD oznaczonej jako $\sqrt{API} \times alzheimer$ ($p = 0,047$). Istotna interakcja oznacza, że wartość wskaźnika API była związana ze stężeniem IL-10 tylko u pacjentów z AD. Dobrze zobrazował to wykres rozrzutu przedstawiony na rysunku 10. Na wykresie pokazano, że ZDR (czarna linia) utrzymują stabilną oczekiwaną wartość $\ln(C_{IL-10})$ wraz ze wzrostem API. Wykazano zatem, że wyższa wartość API, świadcząca o gorszej higienie jamy ustnej pacjentów z AD, związana jest z mniejszym wytwarzaniem IL-10 w następstwie stymulacji komórek LPS-PG. Takiej zależności nie zaobserwowano dla ZDR ($p = 0,925$).

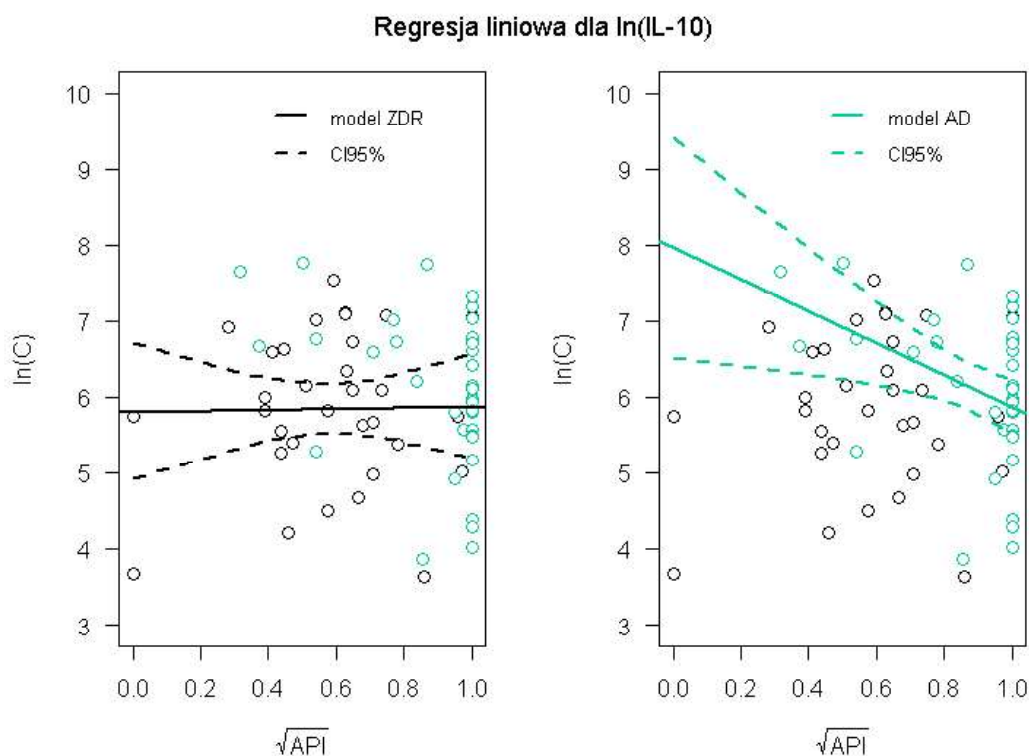
Tab. 20. Analiza regresji liniowej dla $\ln(C_{IL-10})$

Zmienna	β	CI95%	SE	$\beta_{stand.}$	t	p
(stała)	3,368	1,742 4,993	0,813	-0,104	4,141	<0,001
alzheimer	1,962	0,269 3,656	0,848	0,570	2,315	0,024
$\sqrt{API}$	0,068	-1,372 1,509	0,721	-0,057	0,095	0,925
wiek	0,039	0,015 0,062	0,012	0,314	3,276	0,002
$\sqrt{API} \times alzheimer$	-2,163	-4,296 -0,031	1,067	-0,628	-2,028	0,047

$F(3;64) = 4,457$; $p = 0,003$; skorygowany $R^2 = 0,171$. Normalność składnika losowego wyliczono testem Shapiro-Wilka ($W = 0,967$; $p = 0,067$), homoskedastyczność składnika losowego zbadano testem Harrisona-McCabe'a ($b = 0,395$; $p = 0,106$), natomiast liniowość modelu określono testem serii Walda-Wolfowitza ($Z = -0,816$; $p = 0,415$). Nie stwierdzono obecności obserwacji wpływowych ($\forall_i$ dystans Cook'a < $F(3;68) = 0,32$ dla $\alpha = 0,1$). $\sqrt{API}$ – znormalizowany (transformacja: *piersiastek kwadratowy*) wskaźnik higieny międzyczębowej; *alzheimer* – zmienna nominalna klasyfikująca do grupy osób zdrowych poznawczo [0] lub chorych [1]; β – niestandardyzowany współczynnik regresji liniowej; SE – błąd standardowy; $\beta_{stand.}$ – standaryzowany współczynnik regresji liniowej; t – wynik testu t; F – wynik analizy wariancji; CI95% – przedział ufności 95% (ang. *confident interval*). Zmienna zależna: logarytm naturalny stężenia interleukiny 10. Zaokrąglono do trzech miejsc po przecinku.

Komórki pacjentów AD z dobrą higieną jamy ustnej (niskie wartości API) wytwarzały wyższe stężenia IL-10 niż osoby zdrowe poznawczo. Nie wykazano

różnic płciowych ($p=0,290$), PBLs kobiet i mężczyzn z AD i PeD odpowiadały tak samo.



Rys. 10. Analiza regresji liniowej dla $\ln(C_{\text{IL-10}})$

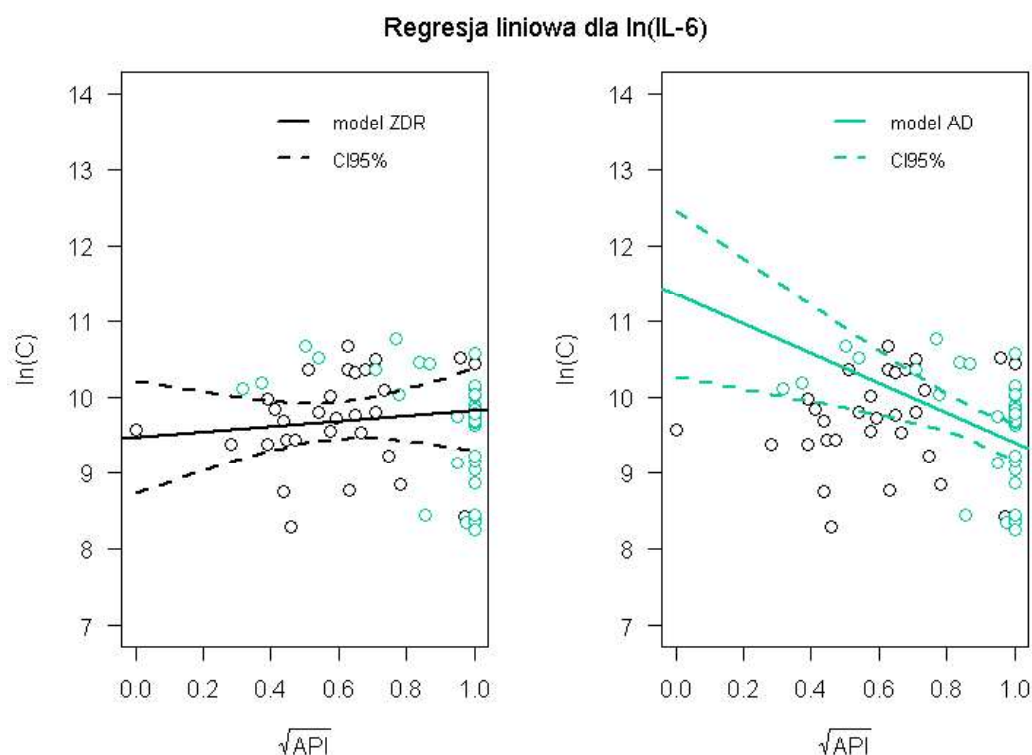
Na osi odciętych zmienna API na skali potęgowej, na osi rzędnych logarytm naturalny stężenia IL-10. Turkusowe punkty odpowiadają obserwacjom z grupy osób AD, na czarno zaznaczono grupę osób zdrowych poznawczo. Linia ciągłą narysowano model regresji, natomiast linią przerywaną zaznaczono przedziały ufności krzywej modelu. Modele obliczone dla średniego wieku każdej z grup: $M_{\text{AD}} = 68,3$ lata, $M_{\text{ZDR}} = 63,3$ lata.

Podobną zależność zauważono w przypadku **IL-6**. Badano zależność zmiennej $\ln(C_{\text{IL-6}})$ od $\sqrt{\text{API}}$. W tabeli 21 przedstawiono wyniki analizy regresji liniowej dla zmiennej zależnej $\ln(C_{\text{IL-6}})$. Na oczekiwaną wartość stężenia IL-6 wpływała zmienna *alzheimer* ($p = 0,008$) oraz interakcja zmiennych $\sqrt{\text{API}} \times \text{alzheimer}$ ($p = 0,007$). Zauważono, że u pacjentów z AD wraz ze wzrostem wartości API wartość $\ln(C_{\text{IL-6}})$ była niższa, czyli gorsza higiena jamy ustnej związana jest z wytwarzaniem mniejszych ilości IL-6 przez PBLs pacjentów z AD w następstwie stymulacji komórek LPS-PG. Model regresji liniowej zaprezentowano na rysunku 11.

Tab. 21. Analiza regresji liniowej dla $\ln(C_{IL-6})$

Zmienna	β	CI95%		SE	$\beta_{stand.}$	t	p
(stała)	8,485	7,248	9,722	0,618	0,322	13,724	<0,001
alzheimer	1,812	0,495	3,130	0,659	0,189	2,752	0,008
$\sqrt{API}$	0,363	-0,823	1,549	0,593	0,324	0,612	0,543
wiek	0,016	-0,001	0,033	0,008	0,165	1,840	0,071
$\sqrt{API} \times alzheimer$	-2,324	-4,000	-0,648	0,838	-1,106	-2,774	0,007

$F(3;64) = 3,57$; $p = 0,011$; skorygowany $R^2 = 0,14$. Normalność składnika losowego wyliczono testem Shapiro-Wilka ($W = 0,95$; $p = 0,016$), homoskedastyczność składnika losowego zbadano testem Harrisona-McCabe'a ($b = 0,56$; $p = 0,777$), natomiast liniowość modelu określono testem serii Walda-Wolfowitza ($Z = -3,03$; $p = 0,002$). Nie stwierdzono obecności obserwacji wpływowych ($\forall_i$ dystans Cook'a $< F(3;68) = 0,32$ dla $\alpha = 0,1$). $\sqrt{API}$ – znormalizowany (transformacja: *pierwiastek kwadratowy*) wskaźnik higieny międzyzębowej; alzheimer – zmienna nominalna klasyfikująca do grupy osób zdrowych poznawczo [0] lub chorych [1]; β – niestandardyzowany współczynnik regresji liniowej; SE – błąd standardowy; $\beta_{stand.}$ – standaryzowany współczynnik regresji liniowej; t – wynik testu t; F – wynik analizy wariancji; CI95% – przedział ufności 95% (ang. *confident interval*). Zmienna zależna: logarytm naturalny stężenia interleukiny 1. Zaokrąglono do trzech miejsc po przecinku.



Rys. 11. Analiza regresji liniowej dla $\ln(C_{IL-6})$

Na osi odciętych zmienna API na skali potęgowej, na osi rzędnych logarytm naturalny stężenia IL-6. Linia ciągłą narysowano model regresji, natomiast linią przerywaną zaznaczono przedziały ufności krzywej modelu. Modele obliczone dla średniego wieku każdej z grup: $M_{AD} = 68,3$ lata, $M_{ZDR} = 63,3$ lata.

Komórki pacjentów z AD, którzy charakteryzowali się dobrą higieną jamy ustnej (niskie wartości *API*) wytwarzały wyższe stężenia IL-6 niż osoby zdrowe poznawczo. Nie wykazano różnic płciowych ($p = 0,667$), PBLs kobiet i mężczyzn z AD i PeD odpowiadały tak samo.

4.6. Analiza poziomu ekspresji genów związanych z aktywacją i regulacją stanu zapalnego: *COX1*, *COX2*, *SOCS1*, *SOCS3*, *STAT1*, *STAT3*, *IRF1*, *IRF3*, *AP-1 (JUN)*, *PI3KR1*, *NFkB* w odpowiedzi na LPS-PG

W następnym kroku zbadano czy stan zapalny przyzębia scharakteryzowany przez trzy zmienne periodontologiczne (BOPxT, PD i CAL) oraz *API* był związany z różną aktywacją stanu zapalnego wśród pacjentów AD i osób zdrowych poznawczo po stymulacji komórek LPS-PG na poziomie ekspresji genów *NFkB*, *PI3KR1*, *AP-1 (JUN)*, *IRF1*, *IRF3*, *STAT1*, *STAT3*, *SOCS1*, *SOCS3*, *COX1* i *COX2*. W tabeli 22 przedstawiono wyniki dotyczące różnic względnej ekspresji genów między grupą ZDR a grupą pacjentów z AD.

Tab. 22. Porównanie względnej ekspresji genów związanych z aktywacją i regulacją stanu zapalnego wraz z testem *t* Welcha dla różnic między grupami

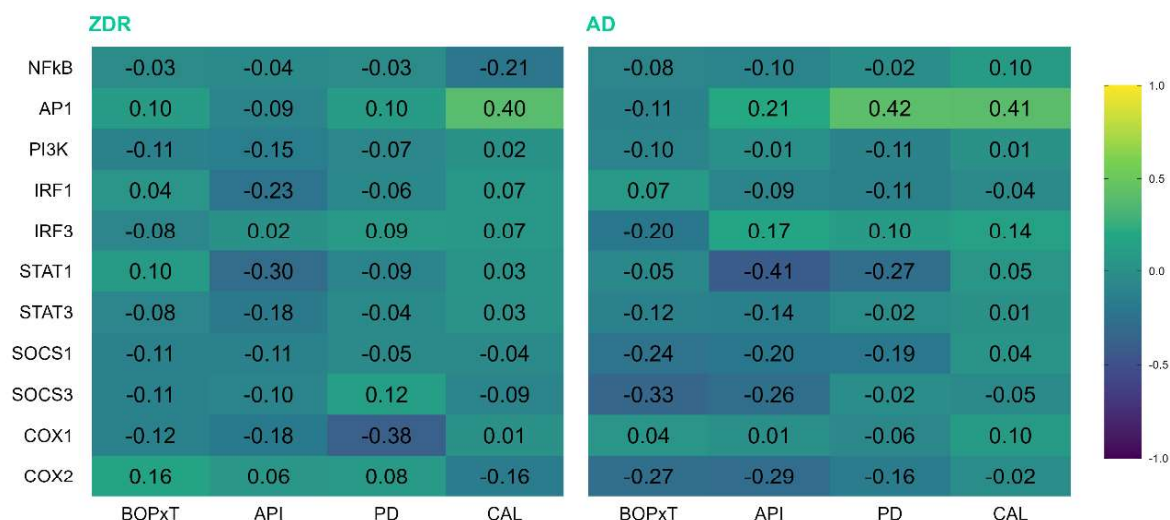
Geny	ZDR		AD		<i>t</i>	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>p_{BH}</i>	95% CI		<i>d</i>
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>					<i>LL</i>	<i>UL</i>	
<i>NFkB</i>	2,780	1,405	2,305	1,546	-1,99	64,9	0,051	0,140	-0,00	0,83	0,36
<i>AP-1</i>	0,936	1,473	1,031	1,468	-1,04	64,9	0,303	0,442	-0,07	0,03	-0,26
<i>PI3K</i>	1,377	1,243	1,157	1,453	2,37	57,4	0,021	0,140	0,03	0,32	0,44
<i>IRF1</i>	1,060	1,361	0,881	1,560	2,00	62,5	0,049	0,140	0,06	-0,13	0,30
<i>IRF3</i>	1,837	1,230	1,878	1,212	-0,45	63,6	0,651	0,716	-0,12	0,07	-0,08
<i>STAT1</i>	1,680	1,617	1,350	1,824	1,67	65,3	0,100	0,221	-0,04	0,48	0,23
<i>STAT3</i>	2,320	1,270	2,176	1,676	0,67	50,6	0,506	0,618	-0,13	0,26	-0,05
<i>SOCS1</i>	9,181	1,465	7,290	1,645	2,157	64,7	0,035	0,140	0,02	0,44	0,39
<i>SOCS3</i>	24,001	1,575	20,552	1,856	1,187	63,8	0,239	0,439	-0,11	0,42	0,11
<i>COX1</i>	0,658	1,352	0,671	1,403	-0,241	66,0	0,810	0,809	-0,17	0,14	-0,10
<i>COX2</i>	5,004	2,670	3,832	3,383	1,00	65,4	0,322	0,442	-0,27	0,80	-0,02

Istotność różnic między grupami zbadano testem *t* Welcha dla niezależnych prób o różnych wariancjach z poprawką wartości *p* metodą Benjamini-Hochberga; ZDR – grupa osób zdrowych poznawczo ($n = 32$); AD – grupa osób z AD ($n = 36$); *n* – liczba obserwacji; *M* – średnia arytmetyczna znormalizowanych danych (transformacja: *logarytm naturalny*); *SD* – odchylenie standardowe; *t* – wartość statystyki testowej; *p* – wartość prawdopodobieństwa testowego dla testu *t*; *CI* – przedział ufności dla różnicy między średnimi; *LL* i *UL* – dolna i górna granica przedziału ufności, *d* – wskaźnik siły efektu *d* Cohena.

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji badanych genów między grupami ZDR i AD. Warto jednak zauważyć, że leukocyty osób zdrowych poznawczo (ZDR) charakteryzowały się wyższą względną ekspresją genów niż pacjenci z AD. Można to zauważyć zwłaszcza w przypadku genów *NFkB*, *PI3K*, *IRF1*, *STAT1* oraz *SOCS1*, dla których wskaźniki „siły efektu różnic między grupami (**d**)” były wysokie (tabela 22). Odwrotnie było w przypadku genów *AP-1*, *IRF3* oraz *COX1* dla których to pacjenci AD przyjmowali nieznacznie wyższe wartości względnej ekspresji.

Aby dowiedzieć się, czy współwystępowanie AD i PeD związane jest ze zmianami na poziomie ekspresji badanych genów zbadano korelacje między względną ekspresją badanych genów i zmiennymi BOPxT, API, CAL i PD. Na rysunku 12 zamieszczono mapę korelacji rang Spearmana względnej ekspresji badanych genów oraz stanu zapalnego przyzębia (PeD) opisanego zmiennymi periodontologicznymi. Przeprowadzona analiza korelacji wykazała, że żaden ze współczynników korelacji rho nie był istotny statystycznie ($p > 0,05$).

Pomimo braku istotności, zaobserwowano jednak że niektóre współczynniki korelacji wykazały stosunkowo wysokie wartości. Na przykład, dla korelacji między zmiennymi CAL i względnej ekspresji genu *AP-1* stwierdzono współczynniki rho $> 0,4$ zarówno w grupie ZDR jak i AD. W tym przypadku współczynniki były dodatnie, co oznacza, że wraz ze wzrostem jednej zmiennej rośnie druga zmienna. Podobną wartość korelacja rho = 0,42 otrzymano dla zmiennych PD i względnej ekspresji genu *AP-1*, ale tylko w przypadku grupy AD. Umiarkowanie silne, negatywne relacje zaobserwowano również dla genu *STAT1* i zmiennej API w obu grupach. W przypadku osób zdrowych zaobserwowano negatywną korelację dla zmiennej PD oraz genu *COX1* ze współczynnikiem korelacji rho = -0,38. Ujemna wartość współczynnika rho oznacza, że wraz ze wzrostem jednej zmiennej następuje spadek drugiej zmiennej. Wysokie wartości współczynników korelacji, nawet pomimo braku istotności, mogą sugerować potencjalne zależności, które mogą mieć praktyczne biologiczne implikacje. Brak istotności może wynikać z małej grupy badanej oraz innych czynników zakłócających.



Rys. 12. Mapa korelacji rang Spearmana względnej ekspresji genów związanych z aktywacją i regulacją stanu zapalnego oraz zmiennych periodontologicznych dla dwóch grup

Na panelu ZDR zamieszczono mapę ciepłą dla korelacji rang Spearmana grupy osób zdrowych poznawczo, na panelu AD zamieszczono mapę ciepłą dla korelacji rang Spearmana grupy pacjentów z AD. Prawdopodobieństwo testowe (p) obliczone z uwzględnieniem poprawki Benjamini-Hochberga. Brak istotnych korelacji przy założeniu wartości krytycznej prawdopodobieństwa $\alpha = 0,05$. Wartości $p > 0,05$ nie zamieszczono. Na osi odciętych zamieszczono wskaźniki periodontologiczne, natomiast na osi rzędnych ekspresję badanych genów. Na wykresie zastosowano ciągłą skalę kolorów do przedstawienia współczynników korelacji rho wraz z ich nominalną wartością.

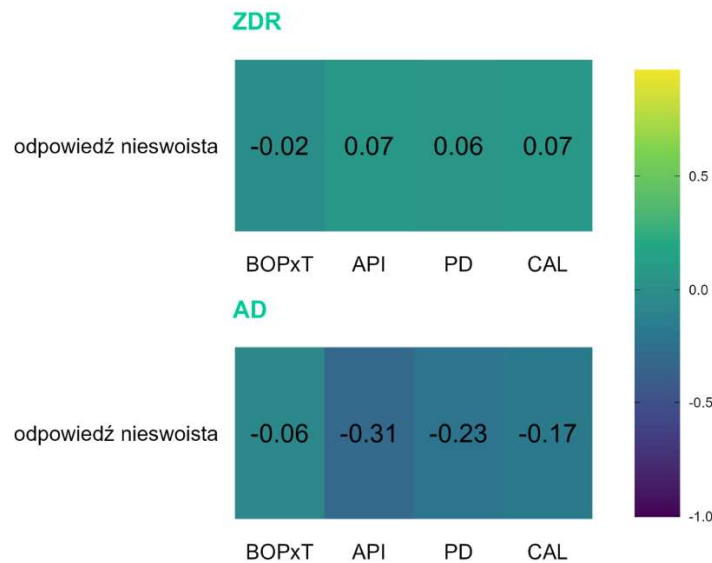
W kolejnym etapie badań oceniono, czy poziom nieswoistej odpowiedzi immunologicznej jest skorelowany z obciążeniem AD oraz PeD, a także czy pacjenci chorujący na AD oraz PeD będą charakteryzować się obecnością niedoborów nieswoistej odpowiedzi immunologicznej oraz zaburzoną odpowiedzią cytokinową.

4.7. Analiza związku pomiędzy poziomem nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, mierzonej testem oporności PBLs na zakażenie wirusem indykatorowym VSV, a współwystępowaniem AD i PeD

Aby odpowiedzieć na pytanie czy istnieje związek między współwystępowaniem AD i PeD a poziomem nieswoistej odpowiedzi odpornościowej, PBLs wszystkich uczestników badania zostały poddane ocenie wrażliwości *ex vivo* na zakażenie wirusem indykatorowym (VSV). Poziom nieswoistej odpowiedzi odpornościowej został oceniony na podstawie miana wirusa wyrażonego w skali TCID₅₀ (skala log), gdzie miano wirusa 0 – 1 log oznaczało wysoki poziom nieswoistej odpowiedzi odpornościowej (oporność PBLs na zakażenie VSV); miano wirusa >1 log oznaczało częściowe niedobory

nieswoistej odpowiedzi odpornościowej (częściowa wrażliwość leukocytów na zakażenie VSV); natomiast miano wirusa ≥ 4 log wskazywało na znaczne deficyty odporności przejawiające się całkowitym brakiem oporności na zakażenie VSV.

Na rysunku 13 zamieszczono mapę ciepła korelacji rang Spearmana wskaźników periodontologicznych BOPxT, API, PD i CAL oraz poziomu odporności nieswoistej. Nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji ($p > 0.05$) między zmiennymi w żadnej z badanych grup (AD i ZDR). Zauważono jednak, że w przypadku pacjentów z AD wyraźnie widoczny jest kierunek zmian, podczas gdy w grupie osób zdrowych poznawczo w ogóle nie ma takiej tendencji. W grupie ZDR wartości współczynników korelacji rho były bliskie zera, co oznacza brak związku między poziomem odporności nieswoistej leukocytów (opornością komórek na zakażenie VSV) oraz wartościami wskaźników periodontologicznych. Stan zapalny przyzębia (PeD) nie jest zatem związany z badanym mechanizmem/statusem obwodowych komórek odpornościowych u osób zdrowych poznawczo (ZDR). W grupie AD natomiast, wartości współczynników korelacji rho były ujemne (najbardziej dla wskaźnika higieny jamy ustnej – API), co oznacza, że spadek wartości jednej zmiennej powoduje wzrost drugiej. W przypadku badanych zmiennych periodontologicznych jak i statusu immunologicznego komórek oznacza to zależność odwrotnie proporcjonalną tj. u pacjentów z AD wzrost wartości parametrów periodontologicznych, zwłaszcza wskaźnika higieny jamy ustnej API, wiąże się z większą opornością komórek na zakażenie VSV tj. niższym mianem wirusa.



Rys. 13. Korelacja wskaźników periodontologicznych z poziomem odpowiedzi nieswoistej (wyrażonej jako odporność PBLs na zakażenie VSV)

Na panelu AD zamieszczono mapę ciepłą dla korelacji rang Spearmana grupy AD, na panelu ZDR zamieszczono mapę ciepłą dla korelacji rang Spearmana grupy ZDR. Prawdopodobieństwo testowe (p) obliczone z uwzględnieniem poprawki Benjamini-Hochberga. Brak istotnych korelacji przy założeniu wartości krytycznej prawdopodobieństwa $\alpha = 0,05$. Wartości $p > 0,05$ nie zamieszczono. Na wykresie zastosowano ciągłą skalę kolorów do przedstawienia współczynników korelacji rho wraz z ich nominalną wartością.

4.8. Analiza poziomu wytwarzanych cytokin pro- i przeciwzapalnych przez PBLs w odpowiedzi na zakażenie VSV

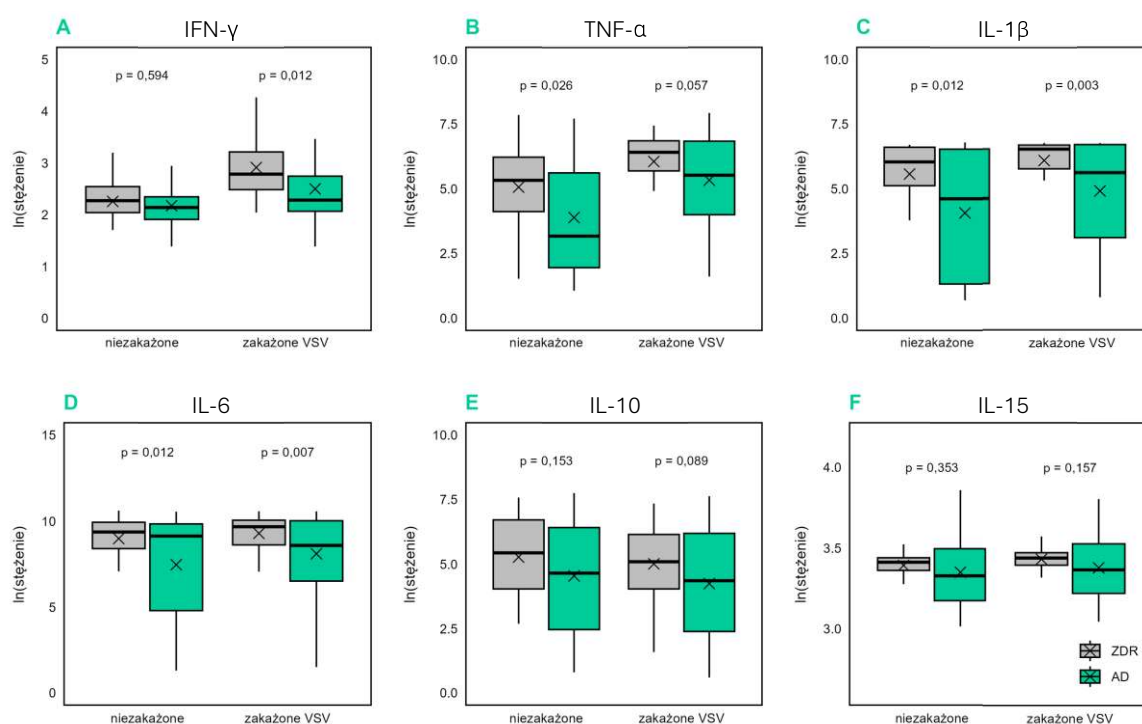
Po zakażeniu PBLs *ex vivo* wirusem indykatorowym (VSV), hodowano je przez 24 godziny po czym w supernatantach zebranych z nad hodowli oznaczono stężenia cytokin pro- i przeciwzapalnych: IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 oraz IL-15. Wyniki analizy wykazały, że leukocyty zarówno ZDR jak i AD odpowiedziały istotnym wzrostem wytwarzania cytokin IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 oraz IL-15 w odpowiedzi na antygen wirusowy. Natomiast w przypadku IL-10 stwierdzono obniżenie wytwarzania tej cytokiny w obu grupach w odpowiedzi na VSV. Dalej wykonano porównania międzygrupowe (AD vs ZDR), aby sprawdzić czy PBLs odpowiadają podobną czy różną ilością badanych cytokin. Wyniki zamieszczono w tabeli 23 Analiza średnich wykazała, że PBLs pacjentów z AD w odpowiedzi na VSV wytworzyły istotnie mniej IFN- γ ($e^{2,50} = 12,18$ pg/ml) niż osoby zdrowe poznawczo ($e^{2,91} = 18,36$ pg/ml) ($p = 0,012$). Podobnie w przypadku wytwarzania TNF- α zaobserwowano mniejsze ilości cytokiny ($e^{5,34} = 208,51$ pg/ml),

podczas gdy grupa ZDR wytworzyła ponad dwukrotnie więcej tej cytokiny ($e^{6,06} = 428,38$ pg/ml) ($p = 0,057$). W przypadku **IL-1 β** , również komórki pacjentów z AD wytwarzały niższe stężenia tej cytokiny ($e^{4,91} = 135,64$ pg/ml) niż osoby zdrowe ($e^{6,09} = 441,42$ pg/ml) w odpowiedzi na VSV ($p = 0,003$). PBLs pacjentów z AD charakteryzowały się również niższym średnim stężeniem **IL-6** ($e^{8,11} = 3327,58$ pg/ml) w porównaniu do grupy ZDR ($e^{8,11} = 10829,18$ pg/ml) ($p = 0,007$). Na rysunku 14 przedstawiono rozkład stężeń badanych cytokin uwalnianych przez obwodowe komórki odpornościowe spontanicznie i w odpowiedzi na antygen wirusowy.

Tab. 23. Porównanie poziomu cytokin wytwarzanych przez PBLs niezakażonych i zakażonych VSV wraz z testem *t* Welcha dla różnic między grupami

Cytokiny		ZDR		AD		<i>t</i>	<i>df</i>	<i>p</i> _(BH)	95% CI		
		<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>				<i>LL</i>	<i>UL</i>	<i>d</i>
IFN- γ	niezakażone	2,07	0,97	2,17	0,47	-0,54	43,4	0,594	-0,48	0,28	-0,14
	zakażone VSV	2,91	0,60	2,50	0,73	2,57	65,6	0,012	0,09	0,73	0,62
TNF- α	niezakażone	5,07	1,60	3,89	2,18	2,55	63,9	0,026	0,26	2,10	0,61
	zakażone VSV	6,06	1,36	5,34	1,70	1,94	65,4	0,057	-0,02	1,46	0,47
IL-1 β	niezakażone	5,57	1,42	4,07	2,38	3,21	58,2	0,012	0,57	2,44	0,76
	zakażone VSV	6,09	0,99	4,91	2,03	3,09	52,1	0,003	0,41	1,94	0,72
IL-6	niezakażone	8,99	1,44	7,24	3,12	3,02	50,5	0,012	0,59	2,91	0,71
	zakażone VSV	9,29	1,16	8,11	2,20	2,81	54,2	0,007	0,34	2,02	0,66
IL-10	niezakażone	5,28	1,46	4,55	2,13	1,66	62,2	0,153	-0,15	1,60	0,39
	zakażone VSV	5,02	1,45	4,25	2,16	1,73	61,6	0,089	-0,12	1,65	0,41
IL-15	niezakażone	3,39	0,09	3,35	0,22	1,06	47,7	0,353	-0,04	0,12	0,25
	zakażone VSV	3,43	0,09	3,38	0,20	1,44	48,97	0,157	-0,02	0,13	0,34

W tabeli przedstawiono transformowane dane $x' = \ln(x)$. Aby uzyskać oryginalne wartości należy przeprowadzić re-transformację $x = e^{x'}$. Istotność różnic między grupami zbadano testem *t* Welcha dla niezależnych prób o różnych wariancjach. ZDR – grupa osób zdrowych poznawczo ($n = 32$); AD – grupa osób z chorobą Alzheimera ($n = 36$); *n* – liczba obserwacji; *M* – średnia arytmetyczna znormalizowanych danych (transformacja: *logarytm naturalny*); *SD* – odchylenie standardowe; *t* – wartość statystyki testowej; *p* – wartość prawdopodobieństwa testowego dla testu *t*; *CI* – przedział ufności dla różnicy między średnimi; *LL* i *UL* – dolna i górna granica przedziału ufności, *d* – wskaźnik siły efektu *d* Cohena.



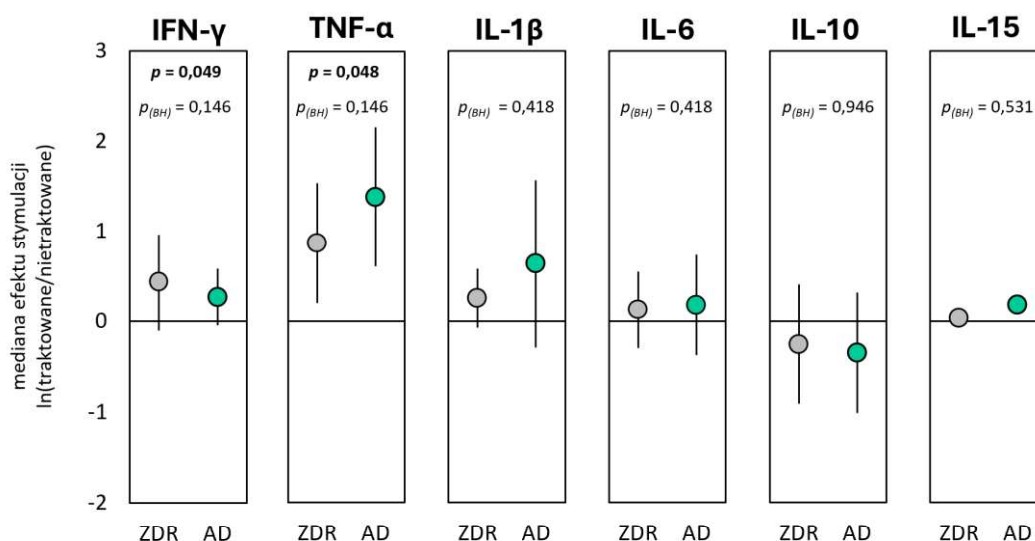
Rys. 14. Wpływ zakażenia VSV na wytwarzanie cytokin przez PBLs *ex vivo* w grupie AD i ZDR

Za pomocą X oznaczono średnie. Górna krawędź pudełka Q3 (kwantyl 3), środkową linią pudełka oznaczono medianę, dolna krawędź pudełka Q1 (kwantyl 1). Wąsy oznaczają wartości maksymalne i minimalne niebędące wartościami odstającymi. Na panelach zamieszczono: (A) IFN- γ ; (B) TNF- α ; (C) IL-1 β ; (D) IL-6; (E) IL-10 oraz (F) IL-15. Na szaro zaznaczono grupę ZDR, na turkusowo grupę AD.

W obu grupach zbadano także efekt stymulacji (ES) tj. różnicę między poziomem badanej cytokiny wytwarzanej przez PBLs niezakażone VSV i zakażone wirusem. Następnie porównano, aby dowiedzieć się czy występowały różnice między AD i ZDR. Zaobserwowano, że leukocyty pacjentów z AD charakteryzowały się słabszym ES w odpowiedzi na zakażenie VSV pod względem **IFN- γ** ($U = 737$; $p = 0,049$; $p_{(BH)} = 0,146$; $r_G = 0,24$), czyli wytwarzały mniej tej cytokiny niż komórki izolowane od ZDR. W przypadku **TNF- α** natomiast zaobserwowano większy efekt stymulacji wirusem dla PBLs od AD niż od ZDR ($U = 415$; $p = 0,048$; $p_{(BH)} = 0,146$; $r_G = -0,24$). Mimo iż przytoczone dane odnoszą się do analizy wartości p przed zastosowaniem poprawki Benjamini-Hochberga (po poprawce p traci istotność) to są one dowodem na to, że w przypadku odpowiedzi na antygen wirusowy komórki pacjentów chorych na AD odpowiadają zupełnie inaczej niż osób z grupy kontrolnej. Podobnie, większy efekt stymulacji PBLs *ex vivo* od pacjentów z AD wystąpił w przypadku **IL-1 β** ($U = 487$; $p = 0,279$; $p_{(BH)} = 0,418$; $r_G = -0,13$); **IL-6** ($U = 415$; $p = 0,242$; $p_{(BH)} = 0,418$; $r_G = -0,14$) oraz **IL-15** ($U = 639$;

$p = 0,442$; $p_{(BH)} = 0,531$; $r_G = 0,09$), a mniejszy efekt stymulacji zaobserwowano dla **IL-10** ($U = 582$; $p = 0,946$; $p_{(BH)} = 0,946$; $r_G = 0,01$). Analiza nie wykazała istotności statystycznej dla badanych analitów. Rezultaty zaprezentowano na rysunku 15.

W następnym kroku przeprowadzono doświadczenia mające na celu ustalenie czy współwystępowanie AD i PeD jest związane ze zmienioną odpowiedzią cytokinową PBLs na zakażenie VSV.



Rys. 15. Efekt stymulacji VSV dla wszystkich przebadanych cytokin

Punkty oznaczają medianę efektu stymulacji na logarytmicznej skali, wąsy to medianowe odchylenie bezwzględne (MAD).

4.9. Wpływ współwystępowania AD i PeD na odpowiedź odpornościową obwodowych komórek immunologicznych na VSV

Celem analizy wpływu współwystępowania obu chorób na przeciwwirusową odpowiedź odpornościową obwodowych komórek immunologicznych (PBLs), wyrażoną wytwarzaniem cytokin IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 oraz IL-15, wykonano wieloraką analizę regresji liniowej z interakcją zmiennej *alzheimer*, zmiennymi periodontologicznymi: BOPxT, PD i CAL oraz zmienną opisującą higienę jamy ustnej (API) uwzględniając wpływ wieku oraz płci uczestników badania. Przyjęto, że jeśli współwystępowanie AD i PeD prowadzi do zmiany w odpowiedzi odpornościowej obwodowych komórek immunologicznych w analizie regresji liniowej będzie to

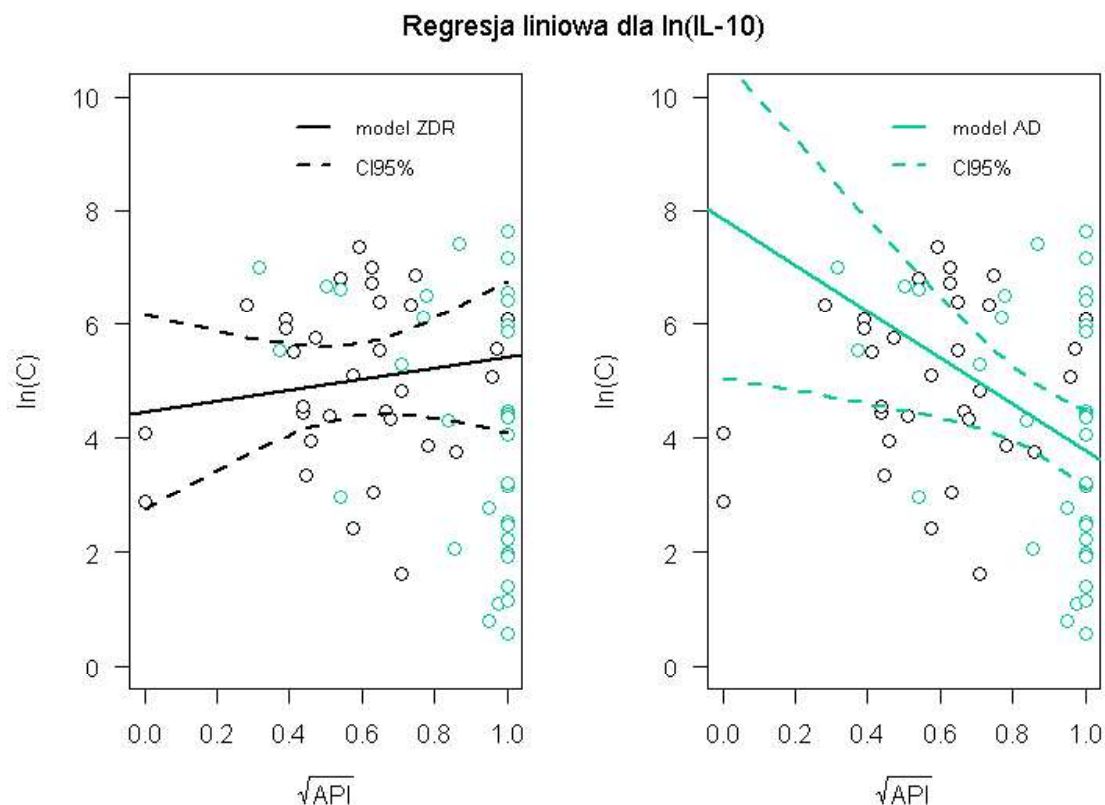
uwidocznione jako istotny współczynnik interakcyjny dla zmiennych periodontologicznych oraz zmiennej alzheimer.

Stwierdzono istotną zależność ilości wytwarzanej **IL-10** od wskaźnika higieny międzyzębowej (API). Gorsza higiena jamy ustnej pacjentów z AD związana jest z wytwarzaniem mniejszych ilości tej cytokiny przez PBLs w odpowiedzi na zakażenie VSV. Takiego efektu nie widać u osób zdrowych poznawczo. Wyniki dla IL-10 były niezależne od wieku oraz płci pacjentów. W tabeli 24 zaprezentowano wyniki analizy regresji liniowej dla zmiennej $\ln(C_{IL-10})$, natomiast graficzną reprezentację modelu na rysunku 16.

Tab. 24. Analiza regresji liniowej dla $\ln(C_{IL-10})$

Zmienna	β	CI95%	SE	$\beta_{stand.}$	t	p
(stała)	4,465	2,743 6,187	0,862	0,022	5,181	<0,001
alzheimer	0,955	2,743 3,727	1,387	0,182	0,689	0,494
$\sqrt{API}$	3,386	0,095 6,677	1,647	0,051	2,056	0,044
$\sqrt{API} \times alzheimer$	-5,010	-9,160 -0,861	2,077	-0,376	-2,412	0,019

$F(3;64) = 3,482$; $p = 0,021$; skorygowany $R^2 = 0,1$. Normalność składnika losowego wyliczono testem Shapiro-Wilka ($W = 0,987$; $p = 0,693$), homoskedastyczność składnika losowego zbadano testem Harrisona-McCabe'a ($b = 0,601$; $p = 0,866$), natomiast liniowość modelu określono testem serii Walda-Wolfowitza ($Z = -1,164$; $p = 0,007$). Nie stwierdzono obecności obserwacji wpływowych ($\forall_i$ dystans Cook'a < $F(3;68) = 0,32$ dla $\alpha = 0,1$). $\sqrt{API}$ – znormalizowany (transformacja: *pierwiastek kwadratowy*) wskaźnik higieny międzyzębowej; alzheimer – zmienna nominalna klasyfikująca do grupy osób zdrowych poznawczo [0] lub chorych [1]; β – niestandardyzowany współczynnik regresji liniowej; SE – błąd standardowy; $\beta_{stand.}$ – standaryzowany współczynnik regresji liniowej; t – wynik testu t; F – wynik analizy wariancji; CI95% – przedział ufności 95% (ang. *confident interval*). Zmienna zależna: logarytm naturalny stężenia interleukiny 10. Zaokrąglono do trzech miejsc po przecinku.



Rys. 16. Analiza regresji liniowej dla $\ln(C_{IL-10})$

Na osi odciętych zmienna API na skali potęgowej, na osi rzędnych logarytm naturalny stężenia IL-10. Turkusowe punkty odpowiadają obserwacjom z grupy osób AD, na czarno zaznaczono grupę osób zdrowych poznawczo. Linią ciągłą narysowano model regresji, natomiast linią przerywaną zaznaczono przedziały ufności krzywej modelu. Modele obliczone dla średniego wieku każdej z grup: $M_{AD} = 68,3$ lata, $M_{ZDR} = 63,3$ lata.

W przypadku pozostałych cytokin nie zaobserwowano istotnych interakcji. Kolejnym etapem badań była ocena, czy pacjenci z AD oraz PeD charakteryzowali się specyficznym fenotypem hiper zapalnym, który powoduje nasilone wydzielanie mediatorów stanu zapalnego.

4.10. Analiza częstości występowania polimorfizmów genów związanych z odpowiedzią immunologiczną u pacjentów z AD i PeD

Przeprowadzono genotypowanie polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism*; SNP) w czterech genach związanych z odpowiedzią odpornościową: *FCGR2A* (rs1801274), *HLA-DRB1* (rs9270856), *HLA-DRA* (rs3135344), *HLA-DQA1* (rs9272105) oraz dwóch SNP rs429358 i rs7412 związanych z genem *APOE*, które składają się na trzy warianty genu kodujące

następujące izoformy białka apolipoproteiny E: apoE2, apoE3 i apoE4 (171). Apolipoproteina E jest białkiem powierzchniowym zaangażowanym w metabolizm lipidów poprzez regulację aktywności receptorów LDLR (ang. *Low-Density Lipoprotein Receptor*) (171). Dodatkowo cząsteczka ta wiąże i uczestniczy w transporcie lipidów oraz cholesterolu we krwi (172). Trzy najczęstsze izoformy apoE różnią się przede wszystkim powinowactwem do receptora LDL oraz preferencją wiązania poszczególnych frakcji lipoprotein. apoE3 i apoE2 preferencyjnie wiążą lipoproteinę o wysokiej gęstości (HDL), podczas gdy ApoE4 chętniej wiąże lipoproteinę o niskiej (LDL) oraz bardzo niskiej gęstości (VLDL) (172). Obecność wariantu apoE4 związana jest z wyższym ryzykiem rozwoju AD (173), zakażenia wirusowego (174,175) oraz bakteryjnego (91).

W wyniku genotypowania genu *HLA-DQA1* otrzymano jednakowy genotyp dla wszystkich uczestników badania dlatego zdecydowano się na usunięcie tego genu z dalszych analiz.

W pierwszym etapie zbadano czy otrzymane stosunki frekwencji alleli oraz częstości genotypów pochodzą z populacji spełniającej założenia prawa Hardy’ego-Weinberga. Na podstawie testu χ^2 Pearsona nie stwierdzono odstępstw obserwowanych proporcji genotypów od rozkładu Hardy’ego-Weinberga (tabela 25)

Tab. 25. Testowanie prawa Hard'wego-Weinberga metodą chi-kwadrat Pearsona z poprawką Yatesa na ciągłość wraz z licznością genotypów

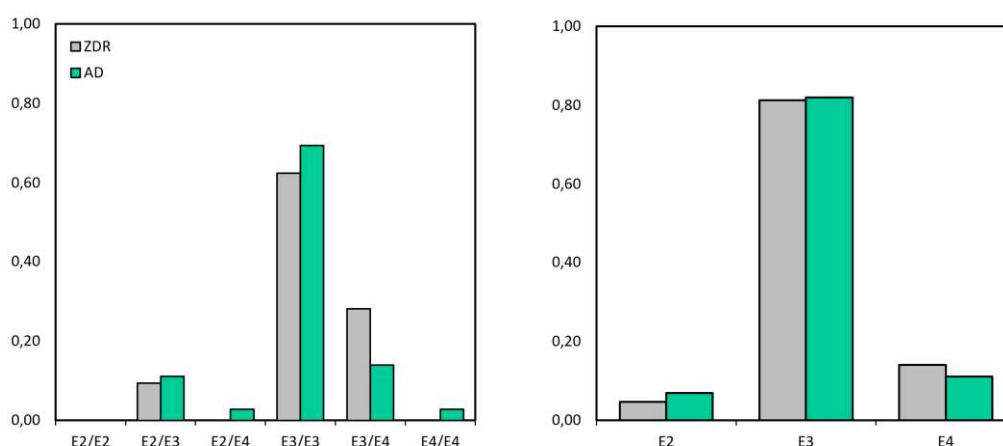
Gen	SNP	Grupa	Licznosc			χ^2	df	p
			AA	AG	GG			
FCGR2A	rs1801274	ZDR	13	13	6	0,69	1	0,407
		AD	11	18	7	0,01	1	0,940
HLA-DRB1	rs9270856	Grupa	AA	AG	GG	χ^2	df	p
			AA	AG	GG			
HLA-DRB1	rs9270856	ZDR	3	11	18	0,45	1	0,501
		AD	1	18	17	2,18	1	0,140
HLA-DRA	rs3135344	Grupa	CC	CT	TT	χ^2	df	p
			CC	CT	TT			
HLA-DRA	rs3135344	ZDR	2	15	15	0,48	1	0,487
		AD	1	13	22	0,32	1	0,570
APOE	rs429358	Grupa	CC	CT	TT	χ^2	df	p
			CC	CT	TT			
APOE	rs429358	ZDR	0	9	23	0,86	1	0,355
		AD	1	6	29	0,88	1	0,348
APOE	rs7412	Grupa	CC	CT	TT	χ^2	df	p
			CC	CT	TT			
APOE	rs7412	ZDR	29	3	0	0,08	1	0,781
		AD	31	5	0	0,20	1	0,654

χ^2 – wartość statystyki testowej chi-kwadrat; df – liczba stopni swobody; p – wartość prawdopodobieństwa testowego; SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu.

W następnym kroku zliczono częstości występowania poszczególnych genotypów w grupach AD i ZDR. W przypadku genu *FCGR2A* (rs1801274) najrzadszym genotypem był GG, którego odsetek dla grupy AD wyniósł 19,4%, natomiast w grupie ZDR 18,8%. Chorzy nieznacznie częściej byli heterozygotami (50,0%) w porównaniu do osób kognitywnie zdrowych (40,6%), odwrotnie niż w przypadku homozygot AA, które częściej były obserwowane w grupie osób zdrowych (40,6%) niż chorych (30,6%). Nie stwierdzono istotnych różnic w częstości występowania genotypów *FCGR2A* między grupami osób zdrowych i chorych ($\chi^2(2) = 0,82$; $p = 0,664$; $\phi = 0,10$). Genotypowanie *HLA-DRB1* (rs9270856) ujawniło największy udział heterozygot AG i homozygot GG w grupie AD (odpowiednio 50,0% i 47,2%) oraz grupie ZDR (odpowiednio 34,4% i 56,2%). Stwierdzono pojedyncze przypadki homozygot AA zarówno w grupie chorych (2,8%) jak i zdrowych (9,4%). Jako, że wśród zliczeń znalazło się tylko kilka przypadków tego genotypu zastosowano bardziej odpowiedni dokładny test Fishera na podstawie którego nie stwierdzono różnic w częstości poszczególnych genotypów *HLA-DRB1* między grupami AD i ZDR ($p = 0,296$). Częstość heterozygot CT genu *HLA-DRA* (rs3135344) w grupie AD wyniosła 36,1%, natomiast w grupie ZDR 46,9%. Podobnie częsty był genotyp TT w grupie AD 61,1% oraz w grupie ZDR 46,9%. Homozygoty CC były

rzadkie zarówno dla osób z AD (2,8%) jak i osób zdrowych poznawczo (6,2%). Grupy AD i ZDR nie różnią się rozkładem częstości poszczególnych genotypów *HLA-DRA* (rs3135344) (test dokładny Fishera: $p=0,485$). Podsumowując, częstości poszczególnych genotypów genów *FCGR2A*, *HLA-DRB1* oraz *HLA-DRA* były takie same w grupie osób zdrowych jak i chorych.

Oznaczenie *APOE* wykonano w celu porównania wpływu SNP badanych genów związanych z odpowiedzią odpornościową do znanego wskaźnika związanego z wyższym ryzykiem rozwoju AD. Co ciekawe, nie stwierdzono różnic w częstości poszczególnych genotypów między grupą AD i ZDR (test dokładny Fishera: $p = 0,434$) (rysunek 17).



Rys. 17. Częstość genotypów oraz alleli *APOE* ε4 w grupie ZDR i AD

Na osi rzędnych zamieszczono częstość genotypów oraz alleli; E2, E3, E4 – allele genu *APOE*; ZDR – grupa osób zdrowych poznawczo; AD – grupa osób z chorobą Alzheimera.

Postanowiono więc porównać obserwowaną częstość alleli *APOE* w grupie badanej do próby kohortowej populacji kaukaskiej osób zdrowych poznawczo oraz osób z AD (176). Częstość obserwowanych alleli w grupie AD jest istotnie różna od oczekiwanej na podstawie badań kohortowych ($\chi^2(2) = 10,36$; $p = 0,006$; $\phi = 1,73$), w przypadku grupy ZDR nie stwierdzono różnic w rozkładzie alleli w porównaniu do osób zdrowych poznawczo z przytoczonych badań kohortowych ($\chi^2(2) = 0$; $p = 1,000$; $\phi = 0$). Oznacza to, że częstość alleli E2, E3 i E4 w grupie AD był inny niż oczekujemy dla tej populacji. Wśród osób z populacji kaukaskiej z AD udział poszczególnych alleli *APOE*

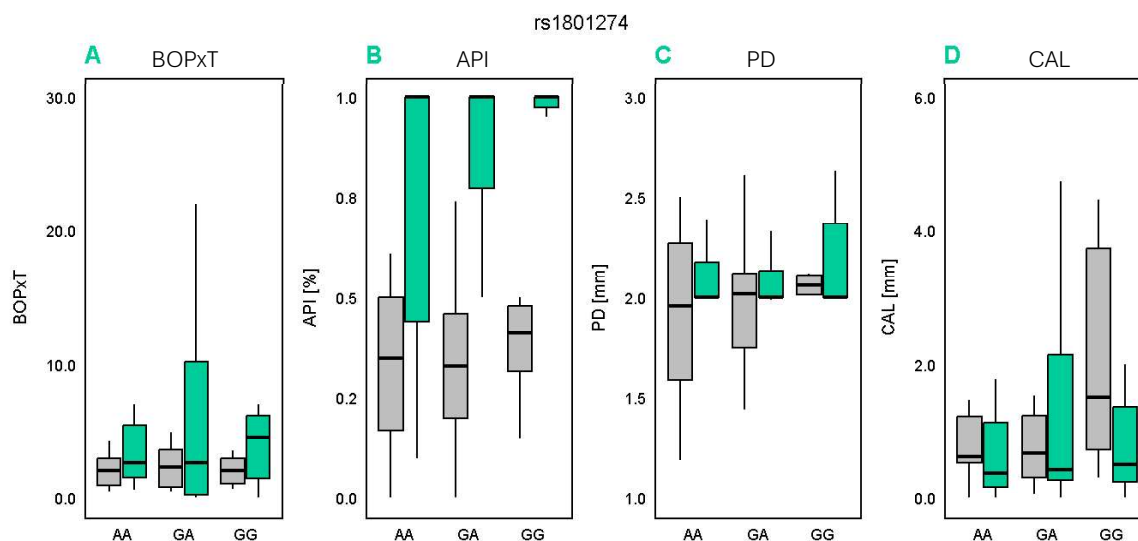
wyniósł odpowiednio 3,9%, 59,4% oraz 36,7% dla E2, E3 i E4 (176) podczas gdy w badaniach własnych pośród osób z AD 6,9% pacjentów posiadało allel E2, 81,9% allel E3 oraz 11,1% allel E4. Oznacza to, że w tych badaniach grupa AD posiadała istotnie mniejszy odsetek osób z allelem E4 i większy z allelami E2 i E3. Rozkład alleli *APOE* dla grupy ZDR zgadzał się z oczekiwanym dla populacji zdrowej. W grupie ZDR 4,7% osób posiadało allel E2, 81,3% E3 oraz 14,1% E4. Nie stwierdzono istotnych różnic z oczekiwanym rozkładem poszczególnych alleli dla populacji zdrowej, który wyniósł odpowiednio 8,4%, 77,9% i 13,7% (176).

W badaniach przyjęto sposób testowania wpływu PeD poprzez wskaźniki periodontologiczne: BOPxT, PD, CAL oraz API. Aby odpowiedzieć na pytanie czy częstość występowania poszczególnych polimorfizmów genów związanych z odpowiedzią immunologiczną była różna u pacjentów z AD i PeD w porównaniu do osób zdrowych zbadano rozkład wskaźników BOPxT, API, CAL i PD dla poszczególnych genotypów w grupach AD i ZDR.

Założono, że im bardziej zaawansowana PeD tym gorszymi parametrami klinicznymi będzie charakteryzować się dana osoba, dlatego jeśli istnieje związek poszczególnych genotypów z PeD, osoby z obciążającym genotypem powinny posiadać wyższe wartości parametrów BOPxT i CAL oraz odbiegającą od normy wartość PD. Dodatkowo, aby wykluczyć wpływ higieny jamy ustnej uczestników badania na obserwowane wyniki, a więc potencjalnej współzależność tego jak pacjenci dbają o jamę ustną ze stanem przyzębia sprawdzono czy istnieją różnice we wskaźniku higieny między dziąsłowej API dla poszczególnych genotypów i grup.

Na rysunku 18 zaprezentowano rozkład zmiennych periodontologicznych dla SNP (rs1801274) genu *FCGR2A*. Pacjenci z grupy AD charakteryzowali się wyższymi wartościami BOPxT i API oraz podobnymi PD niż osoby zdrowe poznawczo. Wśród osób ZDR przeciętna wartość CAL była nieznacznie wyższa dla homozygot GG ($Mdm = 1,50$, $MAD = 1,51$) w porównaniu do pozostałych genotypów oraz homozygot GG w grupie AD ($Mdm = 0,50$, $MAD = 0,74$). Stosując test Kruskala-Wallisa nie stwierdzono istotnych różnic w przeciętnych wartościach BOPxT ($H(5) = 2,50$; $p = 0,776$; $\eta^2 = -0,04$), PD ($H(5) = 3,39$; $p = 0,639$; $\eta^2 = -0,02$) oraz CAL ($H(5) = 3,65$; $p = 0,600$; $\eta^2 = -0,02$). W przypadku zmiennej API stwierdzono istotne różnice ($H(5) = 28,692$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,38$) o dużej sile efektu. Zastosowano więc test *post hoc* Dunna z korektą

Benjamini-Hochberga. Wartości statystyk testowych dla wszystkich grup zamieszczono w Dodatku w tabeli D5. Na podstawie analizy okazało się, że istotne różnice w przeciętnych wartościach API dotyczyły tylko genotypów między grupami AD i ZDR co wyraźnie widać na rysunku 18B. Osoby z AD (zaznaczone na rysunku na turkusowo) charakteryzowały się istotnie wyższymi wartościami wskaźnika higieny (API) niż osoby z grupy ZDR (zaznaczone na szaro) niezależnie od posiadanego genotypu. Zarówno w obrębie grupy AD jak i ZDR nie stwierdzono istotnych różnic w API w zależności od posiadanego genotypu. Innymi słowy, oznacza to, że osoby z genotypami AA, GA i GG miały przeciętnie takie same wartości wskaźnika API w grupie AD (odpowiednio, $Mdm_{AA} = 1$; $Mdm_{AG} = 1$, $Mdm_{GG} = 1$). Podobnie w przypadku grupy ZDR, osoby te charakteryzowały się przeciętnie takimi samymi wartościami API w zależności od posiadanego SNP ($Mdm_{AA} = 0,35$; $Mdm_{AG} = 0,33$, $Mdm_{GG} = 0,41$). Brak różnic między genotypami wewnątrz grup AD i ZDR świadczy o braku wpływu SNP rs1801274 na wartości zmiennych periodontologicznych i kondycję przyzębia zarówno dla ZDR jak i osób obciążonych z AD.

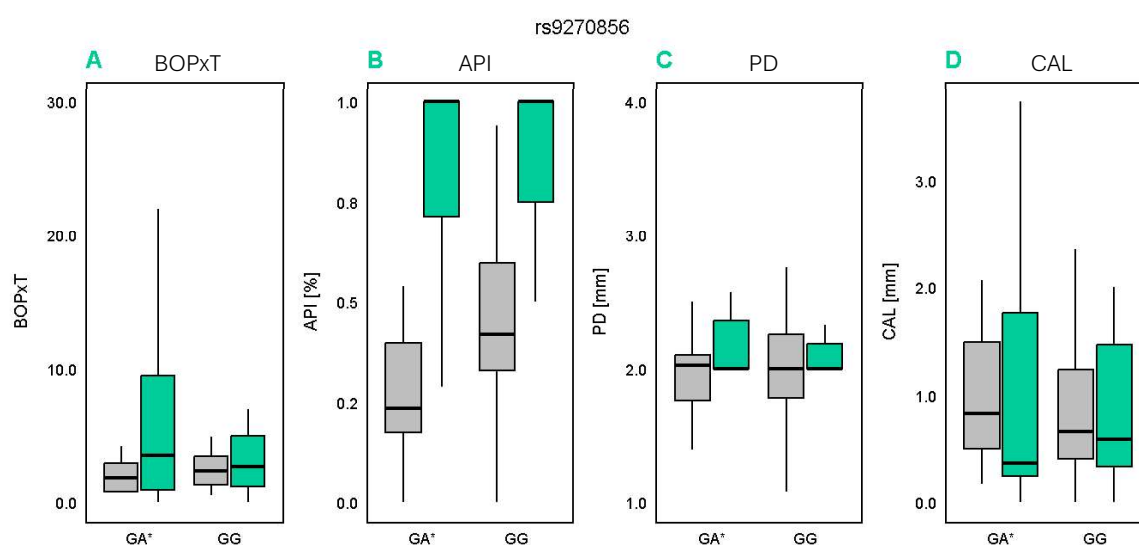


Rys. 18. Rozkład zmiennych periodontologicznych dla poszczególnych genotypów FCGR2A (rs1801274)

Na wykresie zamieszczono wykresy pudełkowe. Górna krawędź pudełka Q3 (kwartył 3), środkową linią pudełka oznaczono medianę, dolna krawędź pudełka Q1 (kwartył 1). Wąsy oznaczają wartości maksymalne i minimalne niebędące wartościami odstającymi. Na panelach zamieszczono: (A) BOPxT; (B) API; (C) PD; (D) CAL. Na szaro zaznaczono grupę ZDR, na turkusowo grupę AD.

Wśród polimorfizmów genów *HLA-DRB1* oraz *HLA-DRA* obu badanych grup zidentyfikowano tylko pojedyncze przypadki homozygot AA (rs9270856) oraz CC (rs3135344) co było niewystarczające do wydzielenia ich jako osobne podgrupy i porównania w ich obrębie rozkładu innych zmiennych. Z tego powodu rzadkie genotypy włączono do grupy heterozygot, a taki zabieg odpowiednio oznaczono przy pomocy gwiazdki (*).

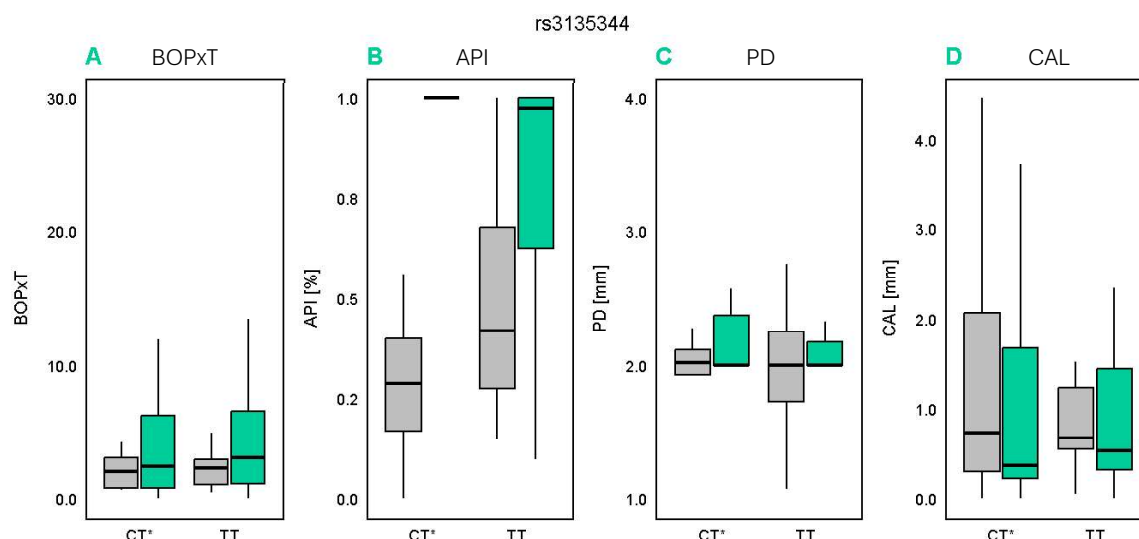
Analiza SNP (rs9270856) genu *HLA-DRB1* nie wykazała różnic w rozkładach zmiennych BOPxT ($H(3) = 2,08$; $p = 0,555$; $\eta^2 = -0,01$), PD ($H(3) = 2,04$; $p = 0,564$; $\eta^2 \approx 0$) oraz CAL ($H(3) = 2,23$; $p = 0,525$; $\eta^2 \approx 0$). Podobnie jak wcześniej jedynie API istotnie różni się pomiędzy grupami ($H(3) = 29,23$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,41$) ale dalsza analiza i wykonanie testu *post hoc* Dunna wykazała, że różnice dotyczą jedynie porównań międzygrupowych AD i ZDR (rysunek 19B). Wartości statystyk testowych dla wszystkich grup zamieszczono w Dodatku w tabeli D6. Obecność mutacji typu SNP (rs1801274) w genie *HLA-DRB1* nie ma wpływu na stan przyzębia zarówno wśród osób chorych jak i zdrowych.



Rys. 19. Rozkład zmiennych periodontologicznych dla poszczególnych genotypów *HLA-DRB1* (rs9270856)

Na wykresie zamieszczono wykresy pudełkowe. Górna krawędź pudełka Q3 (kwartyl 3), środkową linią pudełka oznaczono medianę, dolną krawędź pudełka Q1 (kwartyl 1). Wąsy oznaczają wartości maksymalne i minimalne niebędące wartościami odstającymi. Na panelach zamieszczono: (A) BOPxT; (B) API; (C) PD; (D) CAL. Na szaro zaznaczono grupę ZDR, na turkusowo grupę AD.

Na rysunku 20 zamieszczono rozkład zmiennych periodontologicznych dla poszczególnych genotypów *HLA-DRA* (rs3135344). W tym przypadku również nie zaobserwowano istotnych różnic w przeciętnych wartościach zmiennych BOPxT ($H(3) = 2,01$; $p = 0,569$; $\eta^2 = -0,02$), PD ($H(3) = 2,28$; $p = 0,515$; $\eta^2 \approx 0$) oraz CAL ($H(3) = 1,46$; $p = 0,692$; $\eta^2 \approx 0$). Wynik analizy okazał się istotny jedynie w przypadku zmiennej API ($H(3) = 29,78$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,42$), jednak dotyczył on jedynie różnic pomiędzy grupą AD i ZDR (rysunek 20B). Wartości statystyk testowych dla wszystkich grup zamieszczono w Dodatku w tabeli D7. Nie ma wystarczających dowodów by uznać, że mutacje w obrębie *HLA-DRA* (rs3135344) są związane z rozwojem stanu zapalnego przyzębia i że wpływ ten jest różny dla grupy AD i ZDR.



Rys. 20. Rozkład zmiennych periodontologicznych dla poszczególnych genotypów *HLA-DRA* (rs3135344)

Na wykresie zamieszczono wykresy pudełkowe. Górna krawędź pudełka Q3 (kwartyl 3), środkową linią pudełka oznaczono medianę, dolna krawędź pudełka Q1 (kwartyl 1). Wąsy oznaczają wartości maksymalne i minimalne niebędące wartościami odstającymi. Na panelach zamieszczono: (A) BOPxT; (B) API; (C) PD; (D) CAL. Na szaro zaznaczono grupę ZDR, na turkusowo grupę AD.

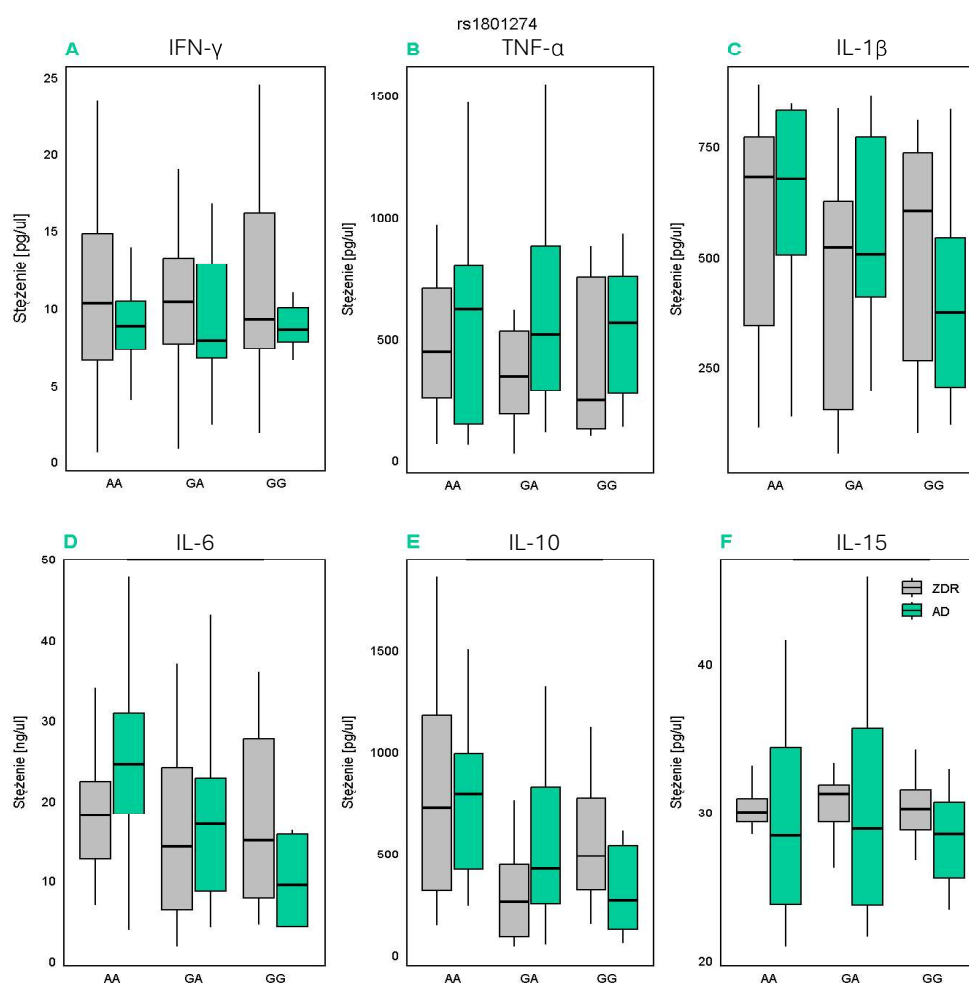
Podsumowując, nie stwierdzono aby badane polimorfizmy genów były związane z występowaniem PeD u osób dotkniętych AD.

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

Aby zbadać potencjalny związek SNP genów układu HLA z odpowiedzią odpornościową leukocytów stymulowanych *ex vivo* LPS-PG w grupach AD i ZDR

wykonano analizę rozkładu stężeń cytokin IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 i IL-15 dla poszczególnych genotypów.

Na rysunku 21 zamieszczono wykresy rozkładów stężeń dla wszystkich badanych analitów z rozdziałem na genotypy **rs1801274** genu *FCGR2A*. Istotność różnic zbadano jednoczynnikową analizą wariancji (ANOVA) dla prób niezależnych i zlogarytmowanych stężeń cytokin. Na podstawie wyników nie stwierdzono istotnych różnic w wariancjach cytokin: IFN- γ ($F(5;62) = 0,14$; $p = 0,981$; $\eta^2 = 0,01$); TNF- α ($F(5;62) = 0,62$; $p = 0,685$; $\eta^2 = 0,05$); IL-1 β ($F(5;62) = 1,20$; $p = 0,317$; $\eta^2 = 0,09$); IL-6 ($F(5;62) = 1,12$; $p = 0,361$; $\eta^2 = 0,08$); IL-15 ($F(5;62) = 0,209$; $p = 0,958$; $\eta^2 = 0,02$).

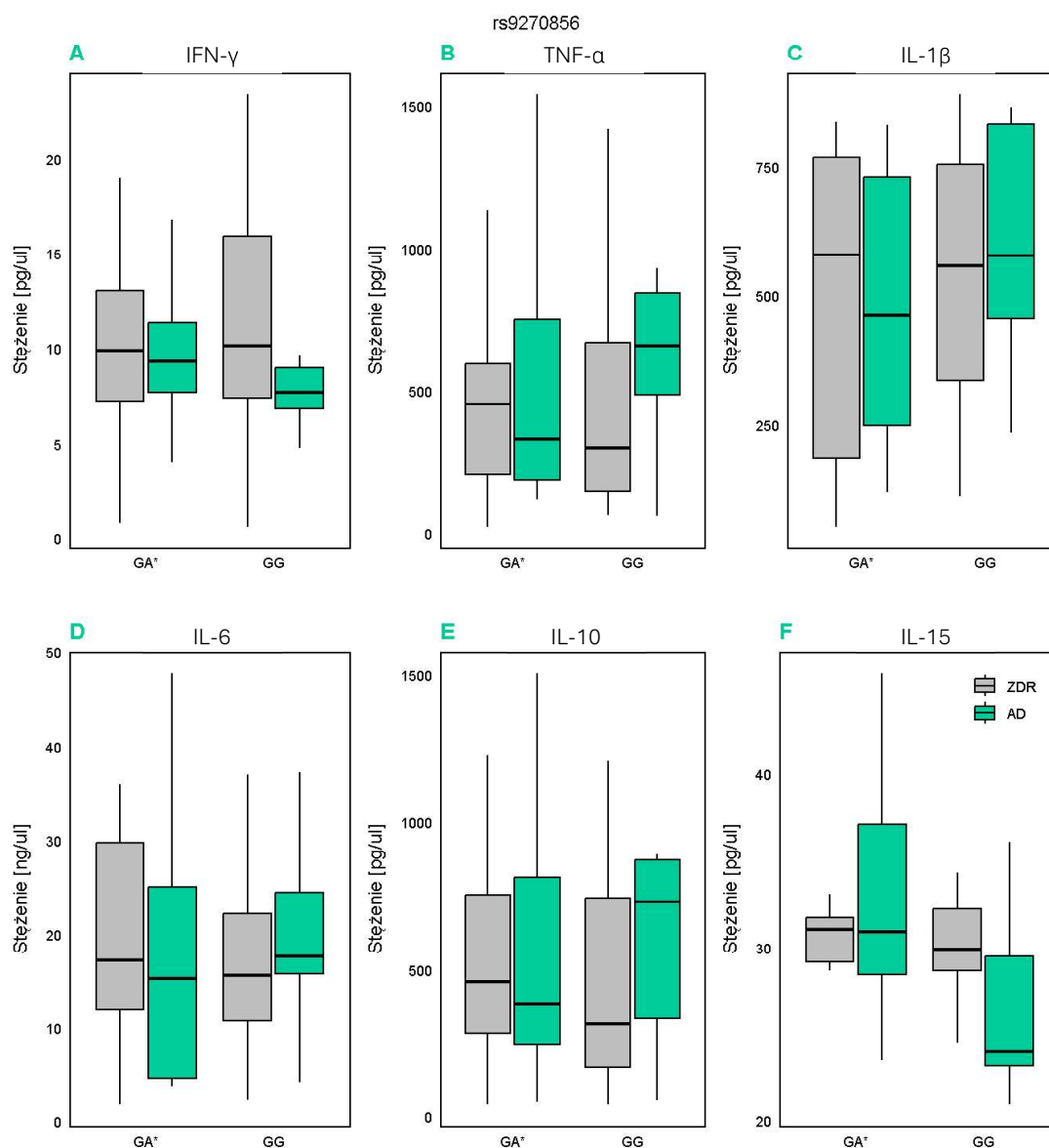


Rys. 21. Rozkład stężeń cytokin dla poszczególnych genotypów rs1801274

Na wykresie zamieszczono wykresy pudełkowe. Górna krawędź pudełka Q3 (kwartył 3), środkową linię pudełka oznaczono medianę, dolną krawędź pudełka Q1 (kwartył 1). Wąsy oznaczają wartości maksymalne i minimalne niebędące wartościami odstającymi. Na panelach zamieszczono: (A) IFN- γ ; (B) TNF- α ; (C) IL-1 β ; (D) IL-6; (E) IL-10 oraz (F) IL-15. Na szaro zaznaczono grupę ZDR, na turkusowo grupę AD.

Stwierdzono natomiast znaczące różnice w rozkładzie wariancji dla cytokiny **IL-10** ($F(5;62) = 3,07$; $p = 0,015$; $\eta^2 = 0,20$) co w dalszej analizie testem Gamesa-Howella wykazało istotne różnice między grupą osób AD o genotypie AA oraz osób ZDR o genotypie GA ($p = 0,011$), a także wśród osób zdrowych między genotypami AA i GA ($p = 0,048$). Pomimo braku istotności widać jednak tendencję, że w grupie AD leukocyty krwi obwodowej osób o genotypie GG wytwarzają mniej IL-1 β , IL-6 oraz IL-10 niż homozygoty AA i heterozygoty GA podczas gdy w grupie ZDR nie widać takiej relacji w przypadku IL-1 β oraz IL-6. W grupie ZDR z genotypem GA zaobserwowano, iż PBLs wytwarzają mniej IL-10 ($Mdm = 261,2$ pg/ μ l, $MAD = 269,2$ pg/ μ l) niż wśród osób z genotypem AA ($Mdm = 728,3$ pg/ μ l, $MAD = 671,3$ pg/ μ l) i homozygot GG ($Mdm = 486,4$ pg/ μ l, $MAD = 392,5$ pg/ μ l).

W przypadku SNP **rs9270856** genu *HLA-DRB1* (rysunek 22) również nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładach testowanych cytokin: IFN- γ ($F(3;64) = 0,256$; $p = 0,857$; $\eta^2 = 0,01$); TNF- α ($F(3;64) = 1,20$; $p = 0,317$; $\eta^2 = 0,05$); IL-1 β ($F(3;64) = 1,45$; $p = 0,236$; $\eta^2 = 0,06$); IL-6 ($F(1;66) = 0,755$; $p = 0,388$; $\eta^2 \approx 0$); IL-10 ($F(3;64) = 0,758$; $p = 0,535$; $\eta^2 = 0,03$). Jedynie w przypadku **IL-15** ($F(1;66) = 5,038$; $p = 0,003$; $\eta^2 = 0,19$) wyniki analizy statystycznej wskazały na istotne różnice o umiarkowanej sile efektu. Analiza *post hoc* ujawniła znaczące różnice między genotypem GA* i GG w grupie AD ($p = 0,023$). Obecność niektórych genotypów rs9270856 związana jest z nieistotnymi, ale wartymi uwagi, różnicami w stężeniach badanych cytokin. Szczególnie widoczna była różnica w przeciętnej ilości TNF- α dla homozygot GG w grupie AD ($Mdm = 658,8$ pg/ μ l, $MAD = 275,6$ pg/ μ l) w stosunku do genotypu GA* ($Mdm = 331,0$ pg/ μ l, $MAD = 304,2$ pg/ μ l). Podobne różnice zaobserwowano dla cytokiny IL-10 i genotypu GG ($Mdm = 577,2$ pg/ μ l, $MAD = 257,7$ pg/ μ l), podczas gdy dla genotypu GA* stężenie tej cytokiny było niższe ($Mdm = 461,0$ pg/ μ l, $MAD = 318,6$ pg/ μ l).



Rys. 22. Rozkład stężeń cytokin dla poszczególnych genotypów rs9270856

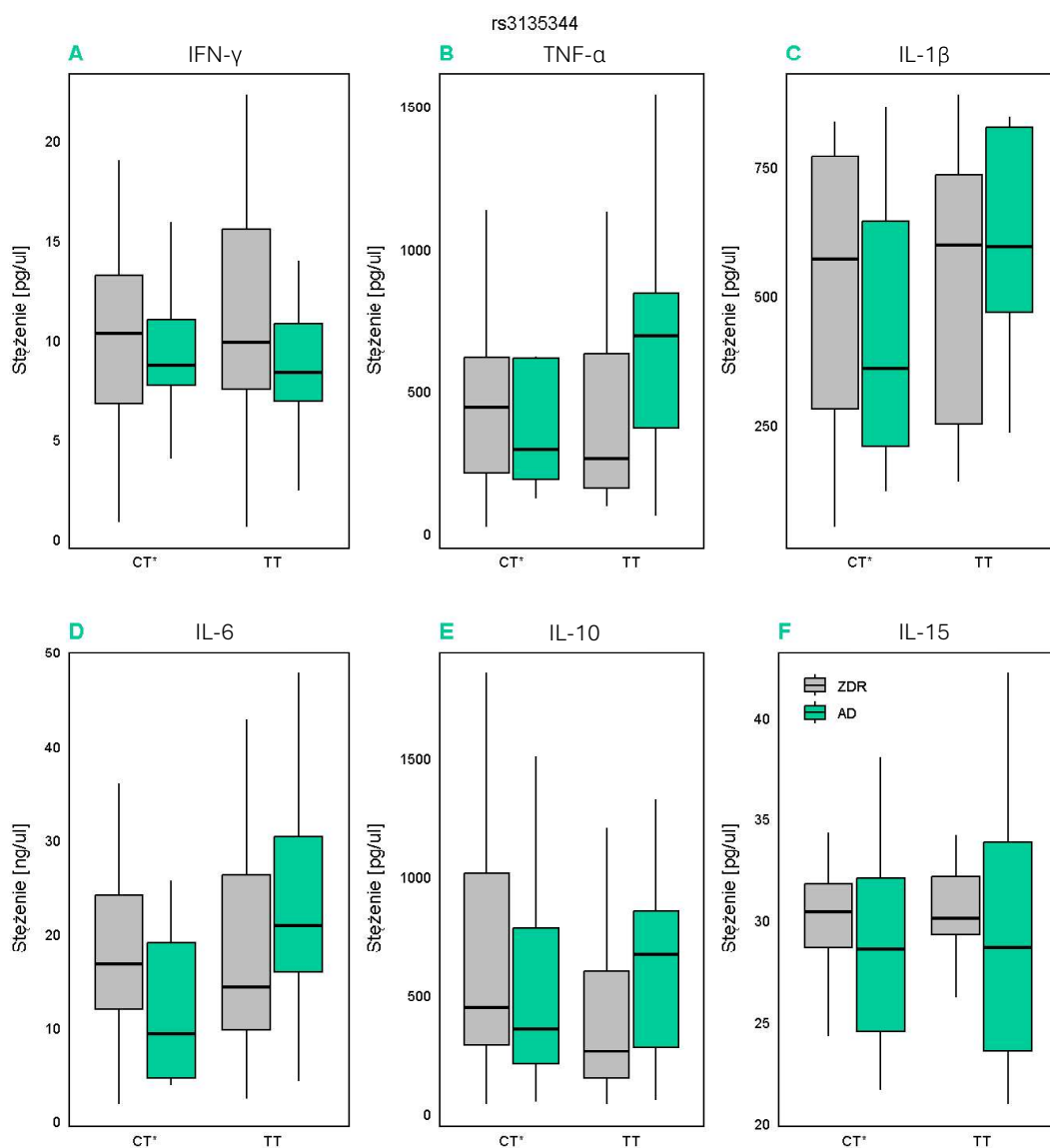
Na wykresie zamieszczono wykresy pudełkowe. Górna krawędź pudełka Q3 (kwartyl 3), środkową linią pudełka oznaczono medianę, dolna krawędź pudełka Q1 (kwartyl 1). Wąsy oznaczają wartości maksymalne i minimalne niebędące wartościami odstającymi. Na panelach zamieszczono: (A) IFN-γ; (B) TNF-α; (C) IL-1β; (D) IL-6; (E) IL-10 oraz (F) IL-15. Na szaro zaznaczono grupę ZDR, na turkusowo grupę AD.

Nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładach stężeń dla żadnej z przebadanych cytokin: IFN-γ ($F(3;64) = 0,30$; $p = 0,824$; $\eta^2 = 0,01$); TNF-α ($F(3;64) = 1,06$; $p = 0,371$; $\eta^2 = 0,05$); IL-1β ($F(3;64) = 2,00$; $p = 0,123$; $\eta^2 = 0,08$); IL-6 ($F(3;64) = 1,89$; $p = 0,139$; $\eta^2 = 0,08$); IL-10 ($F(3;64) = 1,12$; $p = 0,346$; $\eta^2 = 0,05$); IL-15 ($F(3;64) = 0,254$; $p = 0,858$; $\eta^2 = 0,01$) w zależności od genotypu polimorfizmu **rs3135344** genu HLA-DRA (rysunek 23). Pomimo braku istotnych różnic, w danych zaobserwowano pewne zależności,

szczególnie w grupie osób chorych. Homozygoty TT wykazały tendencję do wytwarzania większych ilości cytokin **TNF- α** (*Mdm* = 695,8 pg/ μ l, *MAD* = 298,7 pg/ μ l), **IL-1 β** (*Mdm* = 595,4 pg/ μ l, *MAD* = 281,4 pg/ μ l), IL-6 (*Mdm* = 20,8 ng/ μ l, *MAD* = 12,1 ng/ μ l) oraz **IL-10** (*Mdm* = 670,2 pg/ μ l, *MAD* = 414,9 pg/ μ l) niż heterozygoty CT z homozygotami CC (grupa CT*). Natomiast, w grupie osób zdrowych nie stwierdzono podobnej relacji, dla TNF- α i IL-10 tendencja ta jest odwrotna – homozygoty TT wytwarzają niższe ilości tej cytokiny niż heterozygoty z homozygotami CT*. Warto zwrócić również uwagę na różnicę w ilości wytwarzanej cytokiny IL-1 β pomiędzy grupą AD i ZDR dla genotypu CT*.

Podsumowując, potwierdzono zależność polimorfizmów rs1801274 genu *FCGRA2* oraz rs9270856 genu *HLA-DRB1* z odpowiedzią odpornościową PBLs na LPS-PG wyrażoną wytwarzaniem cytokin pro- i przeciwzapalnych, głównie w przypadku IL-10 oraz IL-15 zarówno wśród osób chorych (AD) i zdrowych poznawczo (ZDR). Wykazano, że u osób z grupy ZDR obecność genotypu AA w genie *FCGRA2* związana była z istotnie wyższym wytwarzaniem IL-10. Podobnie w przypadku grupy AD, osoby z tym genotypem wykazywały tendencję do wydzielania większych ilości cytokiny przeciwzapalnej (IL-10). Natomiast obecność genotypu GG w genie *HLA-DRB1* związana była z istotnie wyższym wytwarzaniem i wydzielaniem IL-15 w porównaniu do genotypu GA*. Takiej zależności nie zaobserwowano dla osób zdrowych (ZDR). Genotyp GG genu *HLA-DRB1* związany był również z wyższymi ilościami cytokin pro- i przeciwzapalnych, odpowiednio TNF- α i IL-10, ale tylko w przypadku grupy AD. W przypadku SNP w genie *HLA-DRA* zaobserwowano, że osoby z AD o genotypie TT charakteryzują się wyższymi ilościami wytwarzanych cytokin w odpowiedzi na LPS-PG, w tym TNF- α , IL-1 β oraz IL-10. W przypadku osób zdrowych nie zaobserwowano, aby genotyp był związany z różnicami w wytwarzaniu mediatorów stanu zapalnego.

Ostatni etap badań dotyczył analizy, mającej na celu wykazać czy współwystępowanie AD i PeD będzie wiązać się z dysbiozą jamy ustnej, osłabioną odpowiedzią obwodowych komórek odpornościowych i większym ogólnoustrojowym obciążeniem prozapalnym w AD.



Rys. 23. Rozkład stężeń cytokin dla poszczególnych genotypów rs3135344

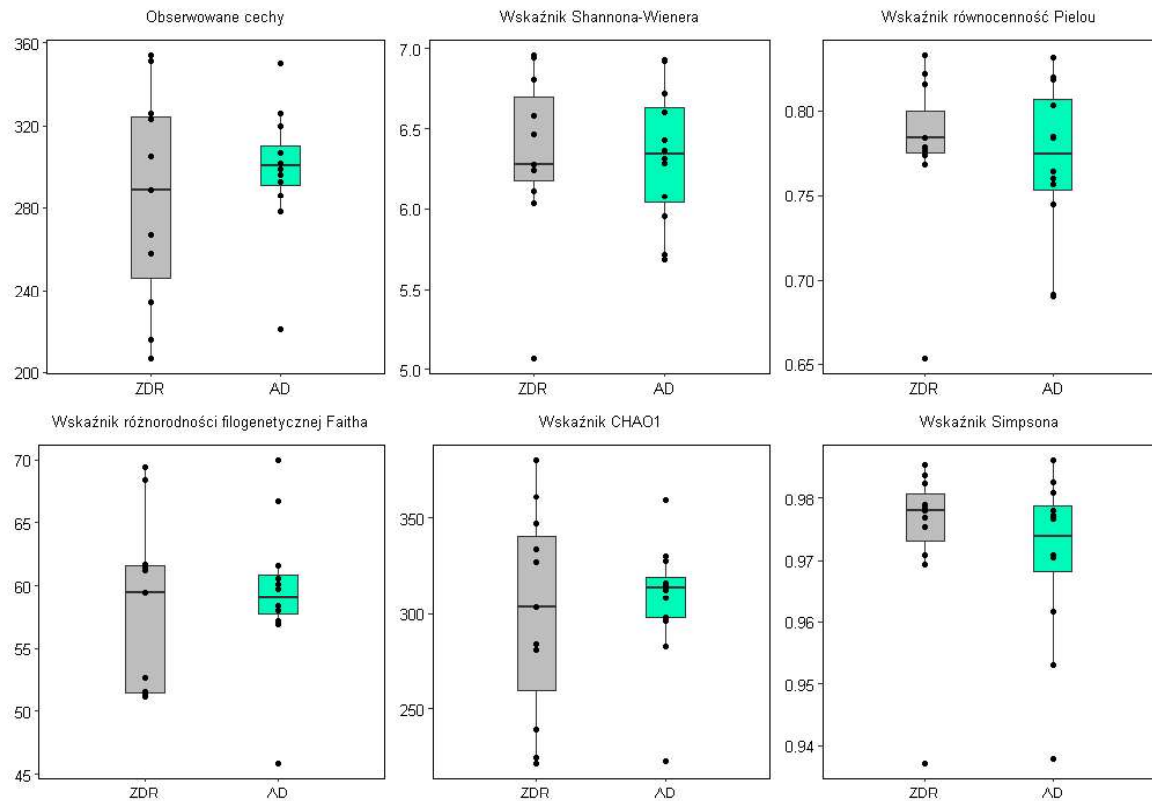
Na wykresie zamieszczono wykresy pudełkowe. Górna krawędź pudełka Q3 (kwartyl 3), środkową linią pudełka oznaczono medianę, dolną krawędź pudełka Q1 (kwartyl 1). Wąsy oznaczają wartości maksymalne i minimalne niebędące wartościami odstającymi. Na panelach zamieszczono: (A) IFN- γ ; (B) TNF- α ; (C) IL-1 β ; (D) IL-6; (E) IL-10 oraz (F) IL-15. Na szaro zaznaczono grupę ZDR, na turkusowo grupę AD.

4.12. Ocena różnorodności mikrobiomu jamy ustnej u pacjentów z AD i PeD

Różnorodność alfa - czyli różnorodność bakterii w jednym siedlisku (ślina), bierze pod uwagę dwa główne aspekty: bogactwo gatunkowe (ile jest różnych rodzajów bakterii/gatunków) oraz równomierność gatunkową, czyli rozmieszczenie (obfitość) tych gatunków, wskazując czy jeden organizm dominuje (jest bardziej obfity) nad

innymi. Mikrobiom osób z chorobą Alzheimera (AD) oraz osób kognitywnie zdrowych (ZDR) opisany został z wykorzystaniem sześciu wskaźników różnorodności alfa, miar określających zróżnicowanie taksonów w poszczególnych próbkach śliny, które zostały pobrane od uczestników badania. W pierwszym kroku porównano różnice między wartościami centralnymi grup z wykorzystaniem testu Manna-Whitneya stosując korektę wartości p metodą Benjamini-Hochberga. Wyniki analizy okazały się nieistotne dla obserwowanych cech ($U = 57,5$; $p = 0,622$; $p_{(BH)} = 0,928$; $r_G = 0,11$), wskaźnika Shannona-Wienera ($U = 63$; $p = 0,880$; $p_{(BH)} = 0,928$; $r_G = 0,04$), wskaźnika równocенności Pielou ($U = 57$; $p = 0,607$; $p_{(BH)} = 0,928$; $r_G = 0,12$), wskaźnika różnorodności filogenetycznej Faitha ($U = 61$; $p = 0,786$; $p_{(BH)} = 0,928$; $r_G = 0,06$), wskaźnika CHAO1 ($U = 64$; $p = 0,928$; $p_{(BH)} = 0,928$; $r_G = 0,03$) oraz wskaźnika Simpsona ($U = 78$; $p = 0,486$; $p_{(BH)} = 0,928$; $r_G = 0,15$). W żadnym z badanych wskaźników nie stwierdzono istotnych różnic w różnorodności alfa między grupami ZDR i AD co oznacza, że różnorodność mikrobiomu, równomierność rozkładu taksonów oraz obfitość gatunkowa wewnątrz próbek jest przeciętnie taka sama dla osób z AD oraz ZDR. Na rysunku 24 przedstawiono wykresy pudełkowe dla wskaźników różnorodności alfa. Można zauważyć, że osoby ZDR w większości przypadków charakteryzowały się większym rozrzutem wskaźników. Z tego powodu zbadano również, czy wariancje obu grup centrowane wokół mediany były identyczne. W tym celu wykorzystano nieparametryczny test Flignera-Killeena na homogeniczność wariancji stosując korektę Benjamini-Hochberga. Na podstawie wyników testu nie stwierdzono istotnych różnic w wariancjach badanych zmiennych między grupami osób zdrowych (ZDR) oraz chorych (AD) po zastosowaniu korekty wartości p . Wynik analizy okazał się nieistotny dla obserwowanych cech ($\chi^2(1) = 4,18$; **$p = 0,041$** ; $p_{(BH)} = 0,348$; $\varepsilon^2 = 0,12$), chociaż warto zaznaczyć, że surowa wartość p wskazywała na istotność takiej różnicy. Grupa osób zdrowych charakteryzowała się niższą wartością obserwowanych cech ($Mdm = 289,0$) z wyższą miarą rozrzutu ($MAD = 54,9$) niż osoby z AD ($Mdm = 300,5$; $MAD = 16,3$). **Co może oznaczać, że osoby zdrowe (ZDR) były bardziej zróżnicowane pod względem mikrobiomu jamy ustnej niż osoby z AD.** Wartość wskaźnika siły efektu eta kwadrat ($\varepsilon^2 = 0,12$) wskazuje, że efekt ten był umiarkowany. W przypadku pozostałych zmiennych nie stwierdzono istotnych różnic w wariancjach: wskaźnika Shannona-Wienera ($\chi^2(1) = 0,09$; $p = 0,764$; $p_{(BH)} = 0,928$; $\varepsilon^2 = 0,04$); równocенności Pielou ($\chi^2(1) = 1,37$;

$p = 0,242$; $p_{(BH)} = 0,718$; $\varepsilon^2 = 0,02$); różnorodności filogenetycznej Faitha ($\chi^2 (1) = 1,08$; $p = 0,299$; $p_{(BH)} = 0,718$; $\varepsilon^2 = 0,003$); CHAO1 ($\chi^2 (1) = 3,61$; $p = 0,058$; $p_{(BH)} = 0,348$; $\varepsilon^2 = 0,10$) oraz Simpsona ($\chi^2 (1) = 1,20$; $p = 0,273$; $p_{(BH)} = 0,718$; $\varepsilon^2 = 0,01$).

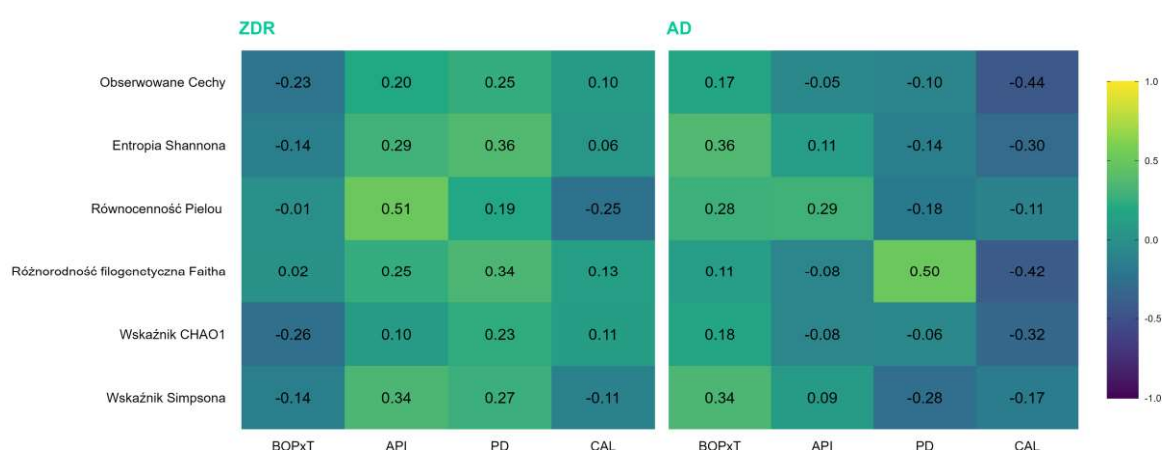


Rys. 24. Wskaźniki różnorodności alfa dla osób z AD i ZDR

Na rysunku przedstawiono wykresy pudełkowe w sześciu panelach, po jednym dla każdego wskaźnika różnorodności alfa. Na każdym panelu porównano dwie grupy: grupę osób zdrowych poznawczo (ZDR) oraz grupę osób z chorobą Alzheimera (AD). Punktami oznaczono obserwacje. Różnice w medianach zbadano testem Manna-Whitneya z korekcją Benjamini-Hochberga. Nie stwierdzono różnic między grupami dla wskaźników: obserwowanych cech ($U = 57,5$; $p = 0,622$; $p_{(BH)} = 0,928$; $r_G = 0,109$), Shannona-Wienera ($U = 63$; $p = 0,880$; $p_{(BH)} = 0,928$; $r_G = 0,038$), równocenności Pielou ($U = 57$; $p = 0,607$; $p_{(BH)} = 0,928$; $r_G = 0,115$), różnorodności filogenetycznej Faitha ($U = 61$; $p = 0,786$; $p_{(BH)} = 0,928$; $r_G = 0,064$), CHAO1 ($U = 64$; $p = 0,928$; $p_{(BH)} = 0,928$; $r_G = 0,026$) oraz Simpsona ($U = 78$; $p = 0,486$; $p_{(BH)} = 0,928$; $r_G = 0,154$).

Aby odpowiedzieć na pytanie czy różnorodność mikrobiomu osób z AD i osób kognitywnie zdrowych różni się w obu grupach w zależności od parametrów periodontologicznych (BOPxT, PD i CAL) oraz wskaźnika higieny API wykonano test rang Spearmana. Analiza wykazała, że żadna z rozpatrywanych par zmiennych nie wykazała statystycznie istotnych korelacji. Wartości współczynników korelacji rho zaprezentowano na rysunku 25. Niemniej, pomimo braku istotności w przypadku części zmiennych zaobserwowano umiarkowane korelacje (skala Guillaforda). W grupie osób

ZDR równocенność Pielou jest dodatnio skorelowana ze zmienną API, co może oznaczać powiązanie higieny jamy ustnej z równomiernością gatunkową mikrobioty. W grupie AD zaobserwowano natomiast dodatnią korelację między różnorodnością filogenetyczną Faitha oraz zmienną PD, a także negatywne korelacje dla wskaźnika CAL oraz obserwowanych cech i różnorodności Faitha. Celem porównania czy obserwowane wskaźniki korelacji były istotnie różne między grupami ZDR i AD wykonano test równości współczynników korelacji z transformacją Fishera oraz korektą wartości p metodą Benjamini-Hochberga.



Rys. 25. Korelacja rang Spearmana dla wskaźników różnorodności alfa i zmiennych periodontologicznych

Na panelu AD zamieszczono mapę ciepłą dla korelacji rang Spearmana grupy AD, na panelu ZDR zamieszczono mapę ciepłą dla korelacji rang Spearmana grupy ZDR. Prawdopodobieństwo testowe (p) obliczone z uwzględnieniem poprawki Benjamini-Hochberga. Brak istotnych korelacji przy założeniu wartości krytycznej prawdopodobieństwa $\alpha = 0,05$. Wartości $p > 0,05$ nie zamieszczono. Na wykresie zastosowano ciągłą skalę kolorów do przedstawienia współczynników korelacji rho wraz z ich nominalną wartością.

Wynik analizy zaprezentowany na rysunku 26 wykazał, że nie ma istotnych różnic w wartościach współczynników rho między grupami.

Podsumowując, różnorodność mikrobiomu jamy ustnej w przebadanych próbkach śliny wyrażona jako różnorodność alfa nie różni się pomiędzy grupą osób zdrowych poznawczo (ZDR) i dotkniętych chorobą Alzheimera (AD). Oznacza to, że ogólna różnorodność mikrobiologiczna pacjentów z AD i grupy kontrolnej była taka sama. Jednak **zauważono bardzo wyraźną tendencję, że osoby zdrowe (ZDR) mogą być bardziej zróżnicowane pod względem mikrobiomu jamy ustnej niż osoby z AD na co wskazuje istotna wartość p przed zastosowaniem poprawki Benjamini-Hochberga,**

a brak różnic pomiędzy grupami może wynikać z niewielkiej liczby przebadanych próbek. Osoby zdrowe charakteryzowały się nieco większą wariancją obserwowanych cech niż pacjenci.

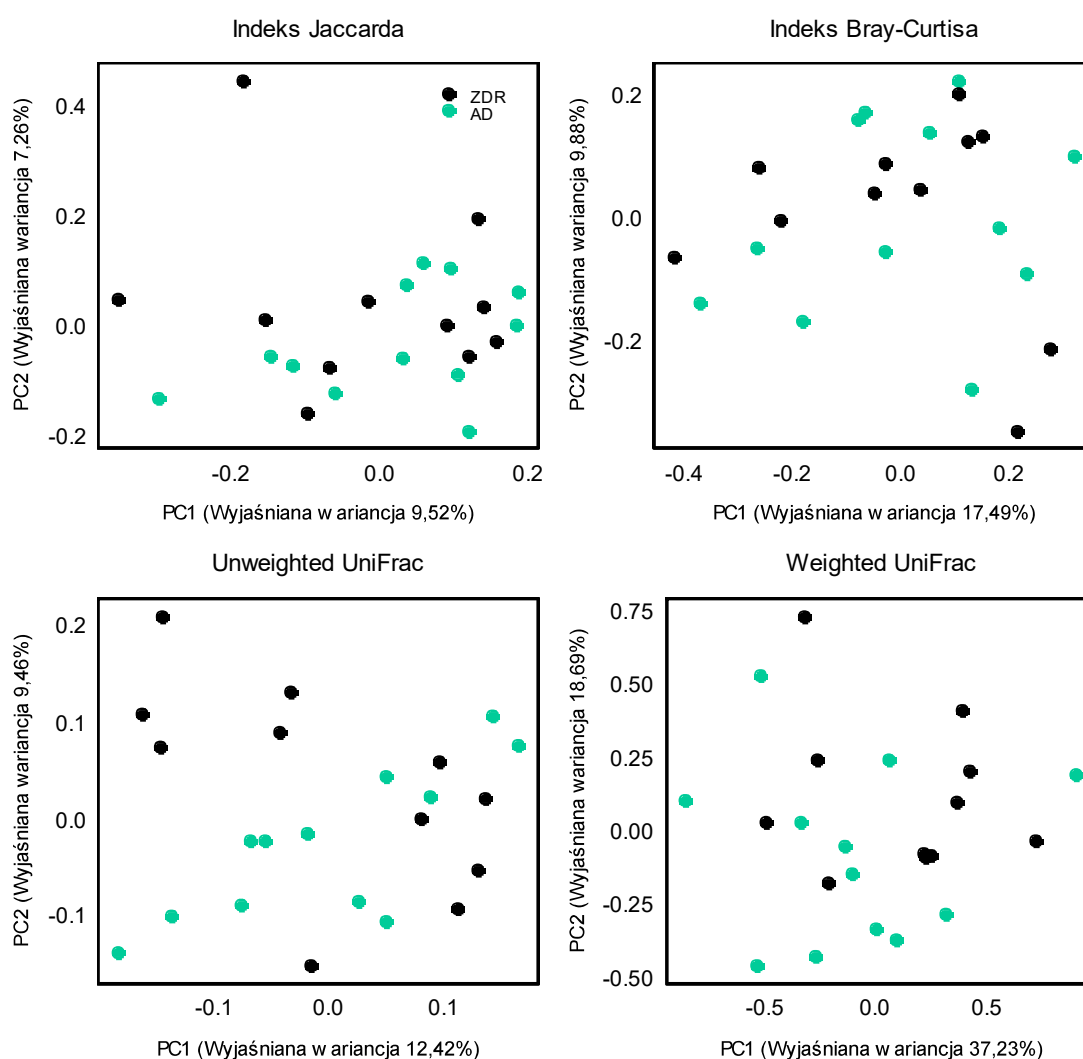
Test Fishera AD vs. ZDR				
Obserwowane Cechy	0.777	0.777	0.777	0.768
Entropia Shannona	0.768	0.820	0.768	0.777
Równocенność Pielou	0.777	0.777	0.777	0.861
Różnorodność filogenetyczna Faitha	0.907	0.777	0.819	0.768
Wskaźnik CHAO1	0.768	0.830	0.777	0.768
Wskaźnik Simpsona	0.768	0.777	0.768	0.928
	BOPxT	API	PD	CAL

Rys. 26. Wartość prawdopodobieństwa testowego dla testu Fishera z korektą Bejamini-Hochberga dla wskaźników różnorodności alfa i zmiennych periodontologicznych

Może to oznaczać, że osoby zdrowe charakteryzują się większą zmiennością osobniczą niż osoby z AD. Podobnie wyższą różnorodnością cechowały się próbki osób z grupy ZDR pod względem wskaźnika CHAO1 określającej bogactwo gatunkowe próbek w porównaniu do osób z AD. Różnorodność alfa nie koreluje ze zmianą wartości współczynników periodontologicznych w żadnej z badanych grup. Pomimo braku istotności można jednak zaobserwować pewne zależności. W przypadku korelacji zmiennych określających różnorodność gatunkową ze zmiennymi określającymi stan zapalny przyzębia można było zauważyć, że osoby z AD cechowały się generalnie niższą różnorodnością alfa wraz ze wzrostem utraty przyczepu CAL co może oznaczać, że wraz z zaawansowaniem PeD dochodzi do zmniejszenia różnorodności mikrobioty jamy ustnej osób z AD.

Różnorodność beta – czyli różnice między społecznościami bakterii dwóch siedlisk (AD i ZDR). Ocenę różnic w składzie mikrobiomu jamy ustnej pomiędzy próbkami śliny dla dwóch grup przeprowadzono z wykorzystaniem czterech miar różnorodności beta: wskaźnika Jaccarda, Bray-Curtisa, Unweighted i Weighted UniFrac

(*Materiały i Metody*). Miary wskaźników wyrażone jako macierze odległości poddano analizie PCoA w celu wizualizacji różnic między grupami na dwuwymiarową płaszczyznę i przedstawiono na rysunku 27. W żadnym z zastosowanych wskaźników nie wyodrębniono jednoznacznego rozróżnienia na grupę AD oraz ZDR. W celu zbadania czy istnieją istotne różnice między grupami w różnorodności taksonów i czy mają one związek z PeD przeprowadzono nieparametryczny test PERMANOVA z interakcją dla 999 permutacji. Testowane zmienne periodontologiczne obejmowały cztery wskaźniki (BOPxT, API, PD, CAL) w interakcji ze zmienną alzheimer.

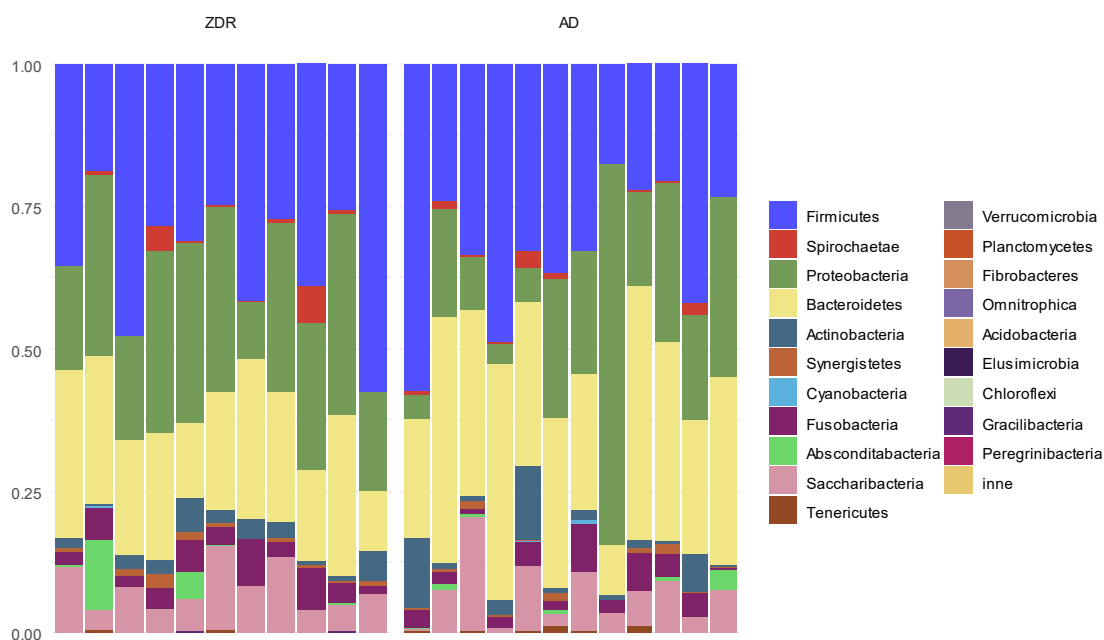


Rys. 27. Analiza głównych współrzędnych (PCoA)

Homogeniczność dyspersji sprawdzono testem ANOVA dla wskaźnika Jaccarda ($F(1;21) = 0,110$; $p = 0,744$; $\eta^2 = 0,005$), wskaźnika Bray-Curtisa ($F(1;21) = 0,994$; $p = 0,330$; $\eta^2 = 0,045$), Unweighted UniFrac ($F(1;21) = 0,144$; $p = 0,708$; $\eta^2 = 0,007$) oraz Weighted UniFrac ($F(1;21) = 1,092$; $p = 0,308$; $\eta^2 = 0,049$). Na turkusowo zaznaczono grupę osób z chorobą Alzheimera (AD), na czarno grupę osób zdrowych poznawczo (ZDR). PC1 – pierwsza główna współrzędna, PC2 – druga główna współrzędna, w nawiasach podano procent wyjaśnianej zmienności wariancji przez zastosowaną główną współrzędną.

Na podstawie analizy nie stwierdzono istotnych różnic między grupami AD i ZDR dla żadnego z zastosowanych wskaźników różnorodności beta i wskaźników periodontologicznych. Zbiorczo przedstawiono wyniki tylko dla interakcji BOPxT, API, PD i CAL ze zmienną alzheimer dla poszczególnych wskaźników różnorodności beta w Dodatku (Tabele D8-D11). Mikrobiomy jamy ustnej osób zdrowych i chorych nie stanowią osobnych grup, a zmienne periodontologiczne nie tłumaczą obserwowanej zmienności w różnorodności beta.

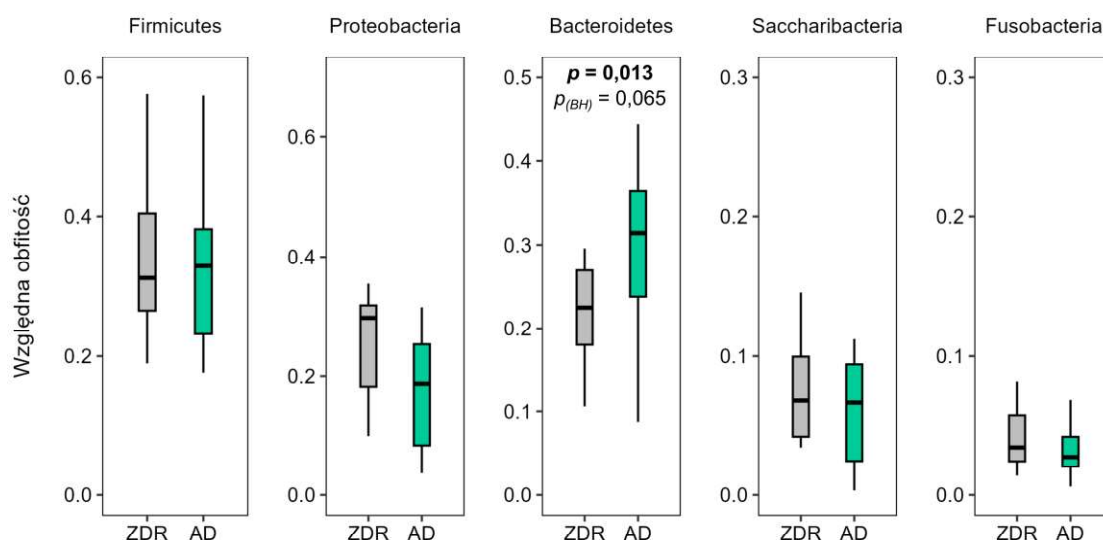
W kolejnym etapie scharakteryzowano obie grupy – AD i ZDR – na poziomie typu (*phylum*), rodziny (*family*) oraz rodzaju (*genus*) dla wybranych taksonów względem ich obfitości. Na rysunku 28 przedstawiono porównanie struktury taksonów mikrobiomu (względnej obfitości) dla grupy ZDR i AD na poziomie typu (*phylum*). Każdy wariant sekwencji ampliconu (ASV) został jednoznacznie zaklasyfikowany do jednego z 20 wyodrębnionych typów bakterii. Obserwacje, które nie mogły być przyporządkowane do żadnego z taksonów tego rzędu zostały włączone do grupy *inne*. Pięcioma najbardziej dominującymi typami bakterii w zbadanych próbkach śliny były: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Saccharibacteria* oraz *Fusobacteria*.



Rys. 28. Porównanie struktury taksonów mikrobioty grupy ZDR i AD na poziomie typu (*phylum*)

Szczególnie istotne w kontekście mikrobioty jamy ustnej są *Saccharibacteria* oraz *Fusobacteria*, wśród których znajdują się bakterie naturalnie zasiedlające jamę

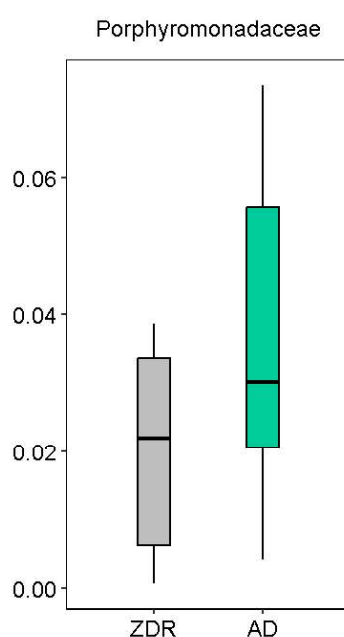
ustną człowieka. Na rysunku 29 przedstawiono wykresy pudełkowe przedstawiające rozkład względnej obfitości pięciu najliczniej reprezentowanych typów bakterii. Stosując test *U* Manna-Whitneya stwierdzono, że nie ma istotnych różnic pomiędzy grupami we względnej obfitości *Firmicutes* ($U = 74$; $p = 0,651$; $p_{(BH)} = 0,651$; $r_G = 0,10$), *Saccharibacteria* ($U = 79$; $p = 0,449$; $p_{(BH)} = 0,561$; $r_G = 0,17$) oraz *Fusobacteria* ($U = 80$; $p = 0,413$; $p_{(BH)} = 0,561$; $r_G = 0,18$). W przypadku *Bacteroidetes* stwierdzono istotne różnice we względnej obfitości dla nieskorygowanej wartości prawdopodobieństwa ($U = 26$; **$p = 0,013$** ; $p_{(BH)} = 0,065$; $r_G = 0,51$). Analiza median wykazała, że osoby z AD charakteryzują się wyższą względną obfitością *Bacteroidetes* ($Mdn = 0,31$; $MAD = 0,11$) niż ZDR ($Mdn = 0,22$; $MAD = 0,08$). Wartość współczynnika korelacji dwuseryjnej Glassa (r_G), wskazała na silny związek względnej obfitości *Bacteroidetes* z obecnością AD ($r_G = 0,51$). Pomimo braku istotności zaobserwowano również różnice o umiarkowanej sile efektu we względnej obfitości *Proteobacteria* ($U = 92$; $p = 0,118$; $p_{(BH)} = 0,295$; $r_G = 0,33$). Osoby zdrowe poznawczo charakteryzowały się wyższą względną obfitością bakterii należących do typu *Proteobacteria* ($Mdn = 0,29$; $MAD = 0,06$) niż osoby z AD ($Mdn = 0,19$; $MAD = 0,14$).



Rys. 29. Względna obfitość taksonów na poziomie typu (phylum) dla pięciu najliczniej reprezentowanych taksonów

Na wykresie zamieszczono wykresy pudełkowe. Górna krawędź pudełka Q3 (kwantyl 3), środkową linią pudełka oznaczono medianę, dolna krawędź pudełka Q1 (kwantyl 1). Wąsy oznaczają wartości maksymalne i minimalne niebędące wartościami odstającymi. Na szaro zaznaczono grupę ZDR, na turkusowo grupę AD.

Na poziomie rodziny (*family*) jednoznacznie zidentyfikowano 92 taksony. Na tym poziomie zbadano różnice we względnej obfitości dla rodziny *Porphyromonadaceae*, do której należą dwie z trzech bakterii składających się na tzw. „czerwony kompleks”, czyli *Tannerella forsythia* i *Porphyromonas gingivalis*, które są najczęstszą przyczyną PeD. Różnice w rozkładzie względnej obfitości *Porphyromonadaceae* między grupami zaprezentowano na rysunku 30. Pomimo braku istotności ($U = 48$, $p = 0,287$, $r_G = 0,23$), grupa AD charakteryzuje się wyższą przeciętną względną obfitością *Porphyromonadaceae* ($Mdm = 0,030$) niż grupa osób zdrowych poznawczo ($Mdm = 0,022$).

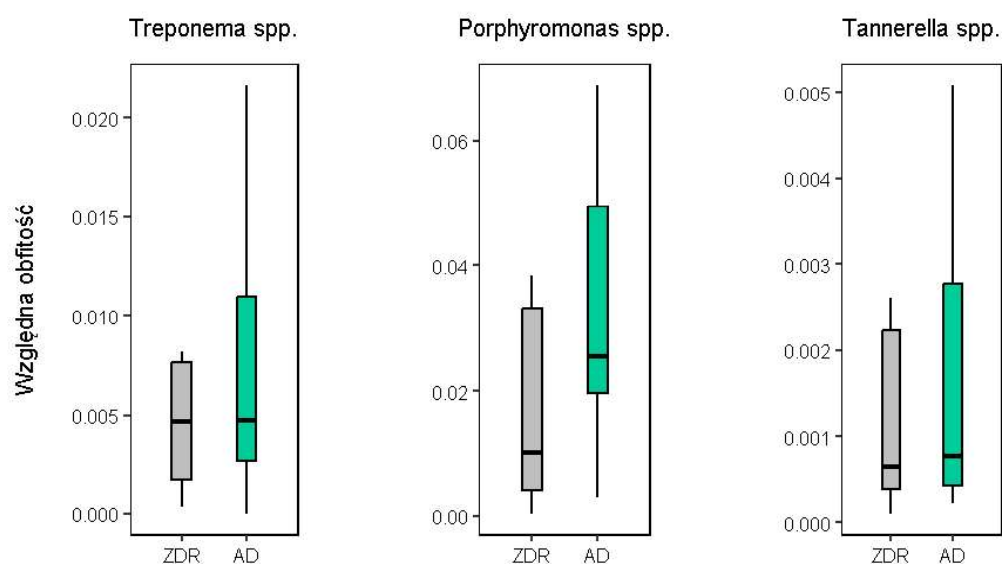


Rys. 30. Względna obfitość rodziny *Porphyromonadaceae*

Na wykresie zamieszczono wykresy pudełkowe. Górna krawędź pudełka Q3 (kwantyl 3), środkową linią pudełka oznaczono medianę, dolną krawędź pudełka Q1 (kwantyl 1). Wąsy oznaczają wartości maksymalne i minimalne niebędące wartościami odstającymi. Na szaro zaznaczono grupę ZDR, na turkusowo grupę AD.

Na najniższym możliwym do zidentyfikowania poziomie taksonomicznym przebadano względną obfitość bakterii wchodzących w skład „czerwonego kompleksu” w obu grupach. Oprócz *T. forsythia* i *P. gingivalis* w skład grupy wchodzi również *T. denticola* należąca do rodziny *Treponemataceae*. Analizę obfitości wykonano na poziomie rodzaju (*genus*) uwzględniając taksony *Tannerella* spp., *Porphyromonas* spp. oraz *Treponema* spp. Grupy AD i ZDR porównano z wykorzystaniem testu *U* Manna-

Whitneya z korekcją Bejamini-Hochberga. Na rysunku 31 zamieszczono wykresy pudełkowe rozkładu względnej obfitości porównywanych taksonów dla dwóch grup. Statystycznie nie wykazano różnic we względnej obfitości *Tannerella* spp. ($U = 65$; $p = 0,976$; $p_{(BH)} = 0,976$; $r_G = 0,01$), *Porphyromonas* spp. ($U = 45$; $p = 0,212$; $p_{(BH)} = 0,636$; $r_G = 0,27$) oraz *Treponema* spp. ($U = 62$; $p = 0,833$; $p_{(BH)} = 0,976$; $r_G = 0,05$) między grupami. Na rysunku 31 można jednak zauważyć, że względna obfitość *Porphyromonas* spp. różniła się między grupami AD i ZDR. Wykonano zatem dalsze porównania. Analiza median wykazała, że osoby z AD charakteryzowały się wyższą względną obfitością tej bakterii ($Mdm = 0,02$; $MAD = 0,02$) niż osoby zdrowe poznawczo ($Mdm = 0,01$; $MAD = 0,01$).



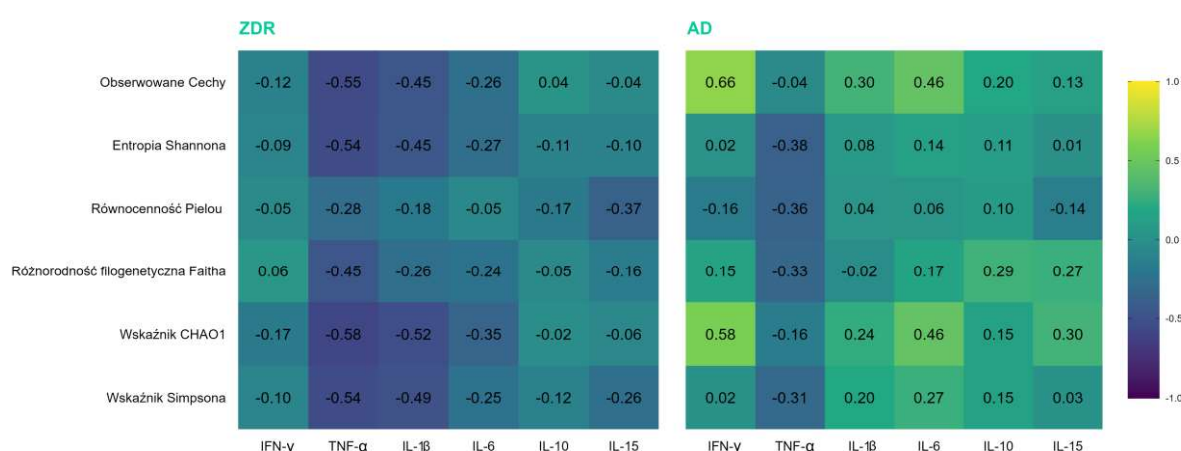
Rys. 31. Względna obfitość taksonów *Tannerella* spp., *Porphyromonas* spp. oraz *Treponema* spp.

Na wykresie zamieszczono wykresy pudełkowe. Górna krawędź pudełka Q3 (kwantyl 3), środkową linię pudełka oznaczono medianę, dolna krawędź pudełka Q1 (kwantyl 1). Wąsy oznaczają wartości maksymalne i minimalne niebędące wartościami odstającymi. Kropkami oznaczono wartości odstające. Na szaro zaznaczono grupę ZDR, na turkusowo grupę AD.

Podsumowując, pacjenci z AD charakteryzowali się wyższą względną obfitością *Bacteroidetes*, a także wyższym udziałem *Porphyromonadaceae* i *Porphyromonas* spp. w mikrobiocie jamy ustnej niż grupa ZDR. Dodatkowo, zaobserwowano, że osoby zdrowe poznawczo posiadały wyższy udział *Proteobacteria* we względnej obfitości niż chorzy z AD.

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

Ocenę związku między różnorodnością składu mikrobiomu śliny pacjentów wyrażonej przez wskaźniki różnorodności alfa a odpowiedzią cytokinową leukocytów *ex vivo* w grupach AD i ZDR przeanalizowano przy pomocy analizy korelacji rang Spearmana z korektą Benjamini-Hochberga. Wyniki analizy nie wykazały aby współczynniki korelacji rho były istotnie różne od zera (rysunek 32), jednak analiza wartości współczynników dla niektórych z par zmiennych wskazała umiarkowaną zależność, która może mieć rzeczywisty efekt (skala Guilforda).



Rys. 32. Mapa korelacji rang Spearmana dla wskaźników różnorodności alfa i stężeń cytokin. Prawdopodobieństwo testowe (p) obliczone z uwzględnieniem poprawki Benjamini-Hochberga. Brak istotnych korelacji przy założeniu wartości krytycznej prawdopodobieństwa $\alpha = 0,05$. Wartości $p > 0,05$ nie zamieszczono. Na osi odciętych zamieszczono cytokiny, natomiast na osi rzędnych wskaźniki różnorodności alfa. Na wykresie zastosowano ciągłą skalę kolorów do przedstawienia współczynników korelacji rho wraz z ich nominalną wartością.

Najsilniejszą korelacją różnorodności alfa z badanymi cytokinami charakteryzowały się osoby z AD. Zależność ilości uwalnianego IFN- γ z obserwowanymi cechami i indeksem CHAO1 wyniosła odpowiednio $\rho = 0,66$ i $\rho = 0,58$ podczas gdy osoby zdrowe poznawczo posiadały ujemną wartość korelacji (odpowiednio $\rho = -0,12$ i $\rho = -0,17$), co oznacza słabą zależność. W obu grupach zaobserwowano ujemną korelację różnorodności alfa ze stężeniem TNF- α , jednak to w grupie ZDR zależność ta przyjmuje wyższe bezwzględne wartości, podobnie jak w przypadku IL-1 β .

Zaobserwowano tendencję do uwalniania znacznie większych ilości cytokin przez PBLs w odpowiedzi na LPS-PG wśród osób z AD o wyższej różnorodności alfa

(obserwowane cechy i indeks CHAO1) w porównaniu do grupy ZDR, u których wraz ze wzrostem różnorodności alfa obserwowano, że leukocyty krwi obwodowej uwalniają znacznie mniejsze ilości cytokin pro- i przeciwzapalnych.

Otrzymane dla badanych grup współczynniki korelacji rho przeanalizowano pod kątem różnic międzygrupowych za pomocą testu Fishera z transformacją z (177) stosując poprawkę Bejamini-Hochberga. Na rysunku 33 zamieszczono wartość skorygowanego prawdopodobieństwa testowego testu Fishera badającego różnice w korelacjach Spearmana pomiędzy grupą AD i ZDR. Pomimo umiarkowanie silnego efektu dla niektórych zmiennych nie stwierdzono istotnych różnic we współczynnikach rho pomiędzy grupami.

Test Fishera AD vs. ZDR

Obserwowane Cechy	0.536	0.760	0.536	0.542	0.902	0.902
Entropia Shannona	0.902	0.902	0.760	0.891	0.902	0.902
Równocенność Pielou	0.902	0.905	0.902	0.902	0.902	0.902
Różnorodność filogenetyczna Faitha	0.905	0.902	0.902	0.891	0.902	0.891
Wskaźnik CHAO1	0.536	0.763	0.536	0.536	0.902	0.902
Wskaźnik Simpsona	0.902	0.902	0.556	0.760	0.902	0.902
	IFN- γ	TNF- α	IL-1 β	IL-6	IL-10	IL-15

Rys. 33. Wartość prawdopodobieństwa testowego dla testu Fishera z korektą Bejamini-Hochberga

Podsumowując, nie stwierdzono istotnego związku pomiędzy różnorodnością mikrobioty jamy ustnej a odpowiedzią cytokinową zarówno w grupie ZDR jak i osób z AD. Jednak pomimo małej grupy badanej zaobserwowano ciekawe zależności. **Osoby zdrowe poznawczo charakteryzowały się silniejszą korelacją ilości wytwarzanego TNF- α w odpowiedzi na LPS-PG z różnorodnością alfa, co oznacza że większa różnorodność mikrobioty jamy ustnej skutkowała mniejszą produkcją tej cytokiny niż wśród osób z AD. W przypadku osób z grupy AD większe ilości wydzielonych IFN- γ i IL-6 związane były z wyższą różnorodnością mikrobioty w tej grupie.**

5. DYSKUSJA

Oprócz patologii amyloidu- β i białka tau także stan zapalny został powiązany z rozwojem i postępem choroby Alzheimera (AD). Pomimo wielu lat badań, wciąż nie jest jasne jakie mogą być potencjalne źródła przewlekłego stanu zapalnego w AD. Jednak ogólnoustrojowy stan zapalny, rozwijający się na skutek infekcji, wydaje się wspierać hipotezę zapalną rozwoju AD. Liczne badania eksperymentalne również wskazują na mikroorganizmy/infekcje jako jeden z czynników ryzyka rozwoju AD (76,178). Obecnie AD jest uznawana za chorobę ogólnoustrojową z silnym komponentem zapalnym w mózgu i na obwodzie (77,179).

Od ponad dekady pojawiają się dowody sugerujące związek między spadkiem funkcji poznawczych u osób z demencją a paradontozą (PeD) – chorobą zapalną jamy ustnej wywołaną infekcją bakteryjną. Wstępne badania potwierdzają, że stan zapalny wywołany przez periopatogeny, może być jednym z czynników przyspieszających rozwój AD (180), jednak związek między patogenezą PeD i AD nadal nie został w pełni wyjaśniony, co uzasadnia potrzebę dalszych prac w tym obszarze. Brakuje molekularnych podstaw wyjaśniających relację, która łączy te dwie choroby oraz jednoznacznych dowodów na zmiany w funkcjonowaniu komórek odpornościowych. Badania nad rolą PeD w patologii AD są w pełni uzasadnione: po pierwsze, ze względu na potwierdzony związek PeD z szeregiem chorób układowych, takich jak choroby układu krążenia, nowotwory jamy ustnej i jelita grubego, problemy żołądkowo-jelitowe, czy cukrzyca (126); po drugie, ze względu na bliskie położenie anatomiczne jamy ustnej i mózgu oraz możliwość łatwego dostępu patogenów jamy ustnej i ich produktów do mózgu; po trzecie, częstość występowania PeD wśród pacjentów z AD jest wyższa niż w ogólnej populacji osób starszych (181). Pojawia się zatem pytanie, czy obwodowe komórki odpornościowe, wystawione na ciągłe działanie periopatogenów oraz produktów ich metabolizmu, mogą wpływać na procesy zapalne w mózgu, które z kolei nasilają postęp AD. Dlatego głównym celem badań była kompleksowa analiza współzależności między AD i PeD na poziomie klinicznym, na poziomie funkcjonowania obwodowych komórek odpornościowych, molekularnym oraz mikrobiologicznym. Zrozumienie tych zależności w połączeniu z najnowszymi danymi literaturowymi miało

na celu opracowanie w przyszłości nowych strategii postępowania/leczenia AD, które mogłyby zapobiegać lub spowalniać postęp choroby.

W niniejszej pracy po raz pierwszy pokazano, że może istnieć rzeczywisty związek między chorobą Alzheimera (AD) a paradontozą (PeD). Na podstawie badań wykonanych z udziałem 68 osób i analizy uzyskanych danych z wykorzystaniem modelu regresji liniowej wykazano, że wraz z pogarszaniem się funkcji poznawczych, mierzonych testami MMSE i MoCA, rośnie także obciążenie zapalne tkanek przyzębia, mierzone stopniem krwawienia dziąseł z uwzględnieniem liczby zębów (BOPxT). Wprowadzenie tej miary pozwoliło na lepsze zobrazowanie wielkości powierzchni tkanek przyzębia objętych stanem zapalnym, co może mieć istotne implikacje kliniczne w rozwoju AD. Udowodniono również, że stan zapalny przyzębia jest większy u osób z zaawansowaną postacią AD w porównaniu do osób zdrowych ale również w stosunku do osób o łagodnej i umiarkowanej postaci AD. Oznacza to, że stan zaawansowania AD i PeD są ze sobą dodatnio skorelowane. Współwystępowanie znanych czynników ryzyka AD wraz z PeD może być znaczące dla relacji tych dwóch chorób sugerując ich niezależny rozwój. Podobnie jak stan zapalny przyzębia, AD również uważana jest za chorobę o podłożu zapalnym, związanym zwłaszcza ze stanem zapalnym w mózgu (neuroinflammation), ale również z ogólnoustrojowym stanem zapalnym charakteryzującym się podwyższonymi markerami stanu zapalnego obecnymi we krwi takimi jak IL-1 β , TNF- α , czy IL-12 (182). Mimo to, można przypuszczać, że miejscowy stan zapalny w jamie ustnej jest raczej wynikiem lokalnych zmian w obrębie przyzębia aniżeli wynikiem ogólnoustrojowego zapalenia lub zmian zapalnych w mózgu. Ma to szczególne znaczenie dla osób chorych. Dodatkowe źródło cząsteczek prozapalnych, które mogą łatwo przedostawać się do krwiobiegu z pewnością wpływa negatywnie na ogólny stan, i tak już osłabionego pacjenta, co może przyczyniać się do szybszej i bardziej agresywnej progresji AD. Opublikowane dotychczas prace wykorzystujące metaanalizę danych potwierdzają, że obecność paradontozy wiąże się z wyższym ryzykiem rozwoju demencji w przyszłości (25,183–187), jednocześnie podkreślając, że wymagane są dalsze badania a obserwowane zależności mogą być obarczone dużym ryzykiem błędu. W badaniach retrospektywnych (127) potwierdzono wyższe ryzyko rozwoju AD ($OR = 1,707$) u osób z 10-letnim narażeniem na PeD. Jednocześnie zaznaczono, że u pacjentów z paradontozą stwierdzono również istotnie częstszą

hiperlipidemię, depresję, urazy mózgu oraz występowanie innych chorób współistniejących w porównaniu do osób nienarażonych. Dodatkowo, pacjenci częściej zamieszkują obszary o wysokim współczynniku urbanizacji, co może wiązać się np. z wyższym narażeniem na zanieczyszczenia powietrza. Jedną z pierwszych prób klinicznego powiązania obu chorób były badania prowadzone m. in. przez zespół Gil-Montoya i wsp. (188) w populacji Granady, w Hiszpanii. Autorzy pracy wykazali, że ogólny stan zdrowia jamy ustnej u osób z deficytami poznawczymi był gorszy niż w grupie osób zdrowych. Ryzyko upośledzenia funkcji poznawczych było 1,72-krotnie większe u osób z mniejszą liczbą zębów. Ponadto, podobnie jak w prezentowanych tutaj badaniach, autorzy wykazali, że wskaźnik krwawienia dziąseł był istotnie związany ze stopniem upośledzenia funkcji poznawczych. Dodatkowo autorzy wykazali umiarkowane i statystycznie istotne powiązanie między parametrem CAL a upośledzeniem funkcji poznawczych. Badania Gil-Montoya i wsp. (188) nie wyjaśniają jednak w pełni związku między AD i PeD, głównie ze względu na zastosowane metody badawcze (wykorzystanie tzw. Phototestu do oceny zaburzeń poznawczych) i niejednorodną grupę badaną, którą w tym przypadku stanowiły osoby z różnym zaawansowaniem deficytów poznawczych z czego 70% stanowili pacjenci z AD a pozostałe 30% osoby z inną formą demencji. Odpowiednie narzędzia diagnostyczne są niezbędne do prawidłowej oceny funkcji poznawczych, dlatego w ocenie klinicznej uczestników prezentowanego w pracy badania wykorzystane zostały testy MMSE oraz MoCA, które obecnie są najczęściej stosowanymi skalami w ocenie funkcji poznawczych. W innych badaniach Kamer i wsp. (189) potwierdzili zależność utraty przyczepu łącznotkankowego (CAL) od stopnia obciążenia białkiem A β w mózgach starszych osób kognitywnie zdrowych przy uwzględnieniu zmiennych zaburzających takich jak wiek, obciążenie apolipoproteiną E oraz palenie (189). Może to oznaczać, że stan zapalny obecny w jamie ustnej jest istotnym czynnikiem ryzyka AD, jednak na podstawie przeprowadzonych badań autorzy nie mogli w pełni wnioskować o związku przyczynowo skutkowym. W badaniach podłużnych (longitudinalnych) przeprowadzonych przez Ide i wsp. (190) trwających 6 miesięcy stwierdzono większe pogorszenie funkcji poznawczych u osób z zapaleniem przyzębia niż u osób ze zdrowym przyzębiem, jednak zależność ta dotyczyła jedynie testu ADAS-COG (ang. *Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale*). Stosując test standaryzowany MMSE

uwzględniając jednocześnie wiek i płeć pacjentów nie stwierdzono istotnej różnicy w punktacji MMSE. Chociaż dowody z badań wykazują, że infekcje przyzębia nasilają patologię AD i zwiększają ilość odkładanego A β , a przewlekły stan zapalny przyzębia może przyspieszać rozwój AD poprzez ogólnoustrojową odpowiedź układu odpornościowego, wciąż potrzebne są dalsze badania aby zrozumieć dokładny mechanizm molekularny i rolę nieswoistej odpowiedzi immunologicznej w patofizjologii AD (191).

Stan zapalny jest cechą wspólną AD i PeD, co oznacza, że elementem pośredniczącym między tymi dwoma schorzeniami jest układ odpornościowy. Zmiany funkcjonalności obwodowych komórek odpornościowych, które krążą między obwodem a mózgiem mogą być ważnym mechanizmem leżącym u podstaw związku AD i PeD. Istotnym aspektem, wartym szczególnego podkreślenia, jest w tym przypadku analiza składu morfotycznego krwi. Wiele badań wskazuje bowiem na zmiany w rozkładzie m.in. limfocytów (192,193) u osób z AD, co może okazać się użyteczne w kontekście poszukiwania wczesnych markerów choroby (194). Analiza profilu komórek immunologicznych krwi obwodowej wykazała, że pacjenci z AD charakteryzowali się istotnie mniejszą ogólną liczbą białych krwinek, w tym limfocytów i monocytów niż osoby zdrowe poznawczo. Różnice w subpopulacjach i rozkładzie poszczególnych rodzajów komórek odpornościowych mogą mieć swoje odzwierciedlenie w obserwowanych różnicach w odpowiedzi odpornościowej u pacjentów i osób zdrowych. Można także wnioskować, że profil komórek odpornościowych osób obciążonych AD jako pierwszy wskazuje na potencjalne niedobory immunologiczne zarówno wrodzonej jak i nabytej odporności. W badaniach Richartz-Salzbunger i wsp. u osób z AD stwierdzono spadek liczby limfocytów T (CD3⁺) przy niewielkim wzroście subpopulacji CD4⁺ i spadku liczby CD8⁺, a także spadek liczby limfocytów B (CD19⁺). Nie stwierdzono natomiast zmian w liczbie komórek NK (CD16⁺56⁺) (192). Spadek w liczbie komórek odpornościowych oraz zmiana w proporcji poszczególnych populacji i subpopulacji może wiązać się z przedwczesną immunosenescencją u osób z AD będąc jedną z przyczyn zmian w funkcjonowaniu odpowiedzi zapalnej (192). W naszych badaniach szczególnie ważna wydaje się również mniejsza liczba monocytów zaobserwowana u pacjentów AD w porównaniu do osób zdrowych poznawczo. Jak pokazano w badaniach Luo i wsp., mniejsza liczba

monocytów jest związana z wyższym ryzykiem rozwoju AD (195) co potwierdza istotną rolę nieswoistej odpowiedzi odpornościowej w patogenezie choroby. Autorzy wykazali bowiem, że monocyty regulują poziom A β we krwi, a przywrócenie sprawnej fagocytozy A β przez monocyty krwi stanowi potencjalną strategię terapeutyczną w AD. Wzrost obciążenia białkiem amyloidowym wraz z wiekiem, przy równoczesnym spadku liczby komórek zaangażowanych w jego usuwanie, może prowadzić do nadmiernej akumulacji A β i wzmożonego stanu zapalnego (196). Wraz z rozwojem AD zdolność fagocytarna monocytów maleje, zwiększa się natomiast ich aktywność prozapalna upośledzając funkcjonowanie układu odpornościowego na obwodzie (197). Dodatkowo, na skutek zwiększonej przepuszczalności BBB, aktywowane monocyty wraz z innymi komórkami odpornościowymi mogą przedostawać się do mózgu będąc jedną z przyczyn rozwijającego się tam stanu zapalnego (198). Oprócz zmniejszonej ilości najważniejszych subpopulacji leukocytów w niniejszych badaniach zaobserwowano również, że pacjenci z AD charakteryzowali się mniejszą liczbą płytek krwi niż osoby zdrowe poznawczo. Płytki krwi są głównym źródłem A β w osoczu, jako że są zdolne do wytwarzania APP i enzymów degradujących APP – sekretaz. Uszkodzenia naczyń krwionośnych obserwowane w AD powodowane są właśnie przez aktywowane płytki krwi, które w wyniku degranulacji uwalniają A β (194). W efekcie obserwuje się korelację stosunku różnych izoform APP z progresją AD (199). Aktywowane płytki krwi mogą tworzyć agregaty lub konglomeraty z leukocytami (199) co może powodować uszkodzenia naczyń krwionośnych. Wykazano, że aktywowane płytki krwi mogą wiązać się do złogów A β w mózgach myszy powodując okluzję naczyń krwionośnych i zaburzając mikrocyrkulację krwi prowadząc do neurodegeneracji (194). Być może obserwowany tutaj niższy udział płytek krwi u pacjentów z AD związany jest z ich nadmierną aktywacją i odkładaniem w postaci agregatów w mózgu oraz naczyniach krwionośnych. Pogląd taki wymaga jednak weryfikacji i dalszych badań. W prezentowanych badaniach zaobserwowano również, że osoby z AD charakteryzowały się wyższymi stężeniami erytrocytów oraz hemoglobiny niż osoby zdrowe poznawczo. Erytrocyty wiążą się z krążącym A β we krwi, którego stężenie wewnątrz tych komórek może być nawet kilkanaście razy wyższe niż w surowicy. Powoduje to zmiany morfologiczne i funkcjonalne erytrocytów (194). W efekcie, nawet 98% erytrocytów osób z AD jest związana z A β . Powoduje to stres oksydacyjny,

wydzielanie ROS oraz akumulację charakterystycznych dla erytrocytów markerów uszkodzenia, jak peroksydacja lipidów, co prowadzi do zaburzenia podstawowej funkcji erytrocytów i zmniejszenia transportu tlenu, a w następstwie hipoksję (194). W badaniach obserwacyjnych, Chen i wsp. wykazali, że osoby z AD charakteryzują się mniejszą ilością erytrocytów oraz hemoglobiny niż osoby zdrowe (193), do podobnych wniosków doszli Winchester z wsp. (200). Pomimo odwrotnej obserwacji w niniejszych badaniach, wydaje się że zmiany ilościowe erytrocytów mogą być związane z postępującymi zmianami neurodegeneracyjnymi, a na końcowy wynik doświadczeń mogła w tym przypadku wpłynąć także wielkość grupy badanej. W tych badaniach nie przeprowadzono analizy związku składu morfotycznego krwi z parametrami periodontologicznymi, jednak w przyszłości takie badania mogłyby pozwolić odpowiedzieć na pytanie, czy infekcja w obrębie jamy ustnej skutkująca przewlekłym miejscowym stanem zapalnym może wpływać na profil komórek odpornościowych przyczyniając się do przedwczesnej immunosenescencji co w dalszej perspektywie może przyczyniać się do zmian w funkcjonowaniu obwodowego układu odpornościowego.

Porównanie funkcjonalne aktywności leukocytów pacjentów z AD i osób zdrowych poznawczo przeprowadzono na świeżo izolowanych leukocytach krwi obwodowej (PBLs) *ex vivo*, które poddawano działaniu LPS-u pochodzącego z *P. gingivalis*. *P. gingivalis* obok *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *T. denticola* oraz *Campylobacter rectus* należy do bakterii związanych z zapaleniem przyzębia (126). *P. gingivalis* uwalnia pęcherzyki błony zewnętrznej zawierające lipopolisacharydy (LPS), które mogą przenikać do tkanek przyzębia. Badania wskazują, że periopatogeny oraz ich metabolity mogą dalej przedostawać się do krwioobiegu oraz organów wewnętrznych, w tym mózgu wywołując nie tylko miejscowy, ale także ogólnoustrojowy stan zapalny. Obecność patogenów związanych z PeD w mózgach pacjentów z AD może odgrywać kluczową rolę w inicjacji procesów zapalnych i neurodegeneracyjnych. Wybrany układ badawczy tj. świeżo izolowane PBLs oraz ocena ilości wytwarzanych mediatorów stanu zapalnego może w bardziej wiarygodny sposób zobrazować odpowiedź odpornościową komórek oraz jej intensywność jako reakcję na kontrolowane czynniki, dzięki czemu możliwe jest lepsze zrozumienie mechanizmów molekularnych stojących za taką odpowiedzią. Pomiar poziomu czynników stanu zapalnego w surowicy, choć użyteczny,

jest tak naprawdę wypadkową wielu efektów i w przypadku osób obciążonych AD może być zaburzony m.in. przez cząsteczki zapalne obecne w płynie mózgowo rdzeniowym (PMR), którego niewielkie ilości napływają każdego dnia z OUN na obwód (201,202). W istocie, hipoteza zwiększonego stanu zapalnego u osób z AD była wielokrotnie dyskutowana i wiązana z wyższym poziomem cytokin prozapalnych w surowicy krwi (203).

Wybór LPS-PG w naszych badaniach nie był przypadkowy, ponieważ jak wspomniano *P. gingivalis* jest ważnym czynnikiem etiologicznym zapalenia przyzębia. W niniejszych badaniach stwierdzono, że PBLs izolowane od pacjentów z AD charakteryzowały się niższą aktywnością spontaniczną skutkującą uwalnianiem istotnie mniejszych ilości cytokin prozapalnych: TNF- α , IL-1 β i IL-6 niż osoby zdrowe poznawczo. Wytwarzały także mniej cytokiny przeciwzapalnej – IL-10. Po stymulacji LPS-em, komórki zarówno osób zdrowych jak i pacjentów z AD odpowiedziały istotnym wzrostem wydzielania cytokin TNF- α , IL-1 β , IL-6 oraz IL-10 osiągając podobne stężenia w obu grupach. Jednak silniejszą odpowiedzią zapalną, czyli większym wyrzutem badanych cytokin TNF- α , IL-1 β , IL-6 oraz IL-10 cechowały się PBLs osób z AD. We wcześniejszych badaniach pilotażowych naszego zespołu, mających na celu analizę funkcjonalności PBLs u osób z AD wybraliśmy klasyczny antygen bakteryjny pochodzący z *E. coli* (LPS-EC) (204) stosowany w tego typu analizach. Wykazaliśmy, że stymulacja komórek LPS-EC powoduje istotny wzrost wytwarzania cytokin: TNF- α , IL-1 β , IL-6 oraz IL-10. Porównując ówczesne badania z obecnymi zauważyliśmy, że stymulacja komórek LPS-EC powodowała wydzielanie ogólnie większych ilości cytokin niż w przypadku LPS-PG, co wskazuje, że wykorzystanie LPS-u pochodzącego z innej bakterii wiąże się z różną odpowiedzią komórek odpornościowych pacjentów z AD. Netea i wsp. postulują, że przestrzenny kształt lipidu A może być głównym źródłem zmienności między LPS-ami *E. coli* oraz *P. gingivalis* (205). Łańcuchy lipidu A LPS-u pochodzącego z *P. gingivalis* tworzą asymetryczny, cylindryczny kształt stworzony z pięciu łańcuchów podczas gdy LPS *E. coli* tworzy szerszy cylinder z 6 łańcuchów. Może to powodować powstawanie zawał sterycznych w efekcie czego aktywowane zostają różne receptory TLR na powierzchni komórek. Autorzy uważają, że w przypadku LPS-EC aktywowany jest głównie TLR4 podczas gdy w przypadku *P. gingivalis* jest to TLR2. Ma to swoje konsekwencje biologiczne w aktywacji wewnątrzkomórkowych szlaków

sygnałowych i w efekcie ilości wytwarzanych cytokin. Aktywacja TLR4 skutkuje silniejszą odpowiedzią z wydzieleniem większych ilości TNF- α , IL-1 β oraz IFN- γ niż w przypadku TLR2 (205). Jednak zespół Ogawa i wsp. w badaniach z 2002 roku nie potwierdził takiej hipotezy. Badacze wykazali, że LPS-PG również aktywuje TLR4, a aktywacja TLR2 może pochodzić od nieznanych składników bakteryjnych (206). Z kolei w najnowszych badaniach z 2024 roku, zespół Schuster i wsp. zwraca uwagę, że komercyjnie dostępne LPS-y pochodzące z *P. gingivalis* są słabszymi aktywatorami niż żywa bakteria lub inne aktywatory jak fimbrie *P. gingivalis* czy LPS-EC (207), a zakażenie fibroblastów dziąsłowych żywą bakterią przebiega głównie z aktywacją TLR2. Niemniej, aktywacja komórek z wykorzystaniem LPS-PG przebiega ze słabszą odpowiedzią obwodowych komórek odpornościowych niż w przypadku LPS-EC, co zaobserwowaliśmy w naszych badaniach. O tym, że LPS-PG może powodować odmienną aktywację komórek odpornościowych informują badania Alizadehgharib S i wsp. (208), gdzie badacze zaobserwowali wyższe stężenia uwalnianych cytokin IL-1 β i IL-6 przez ludzkie mononuklearne komórki odpornościowe (ang. *peripheral blood mononuclear cells* – PBMCs) pochodzące od zdrowych dawców krwi w odpowiedzi na LPS-EC w porównaniu do LPS-PG (208). Wyjaśnieniem zaobserwowanych przez nas efektów może być z jednej strony immunologiczne wyczerpanie komórek, które obciążone wciąż trwającą infekcją i związanym z tym przewlekłym stanem zapalnym o niskim nasileniu same wytwarzają w sposób ciągły, chociaż na niskich poziomach, cząsteczki zapalne. Wyczerpanie komórek może być z kolei połączone z nieprawidłowym wzorcem odpowiedzi odpornościowej tj. hiperstymulacją. W prezentowanych tu badaniach komórki izolowane od pacjentów z AD wykazywały cechy wyczerpania i mogły charakteryzować się wysokimi markerami wyczerpania, dlatego spontanicznie wytwarzały mniejsze ilości cząsteczek stanu zapalnego niż leukocyty osób zdrowych. Mimo tego zareagowały silniej na stymulację LPS-PG, co wskazuje na zjawisko hiperstymulacji. Z drugiej strony nasze obserwacje mogą wynikać z innego zjawiska, a mianowicie tolerancji immunologicznej na LPS-PG. W badaniach *in vitro* wykazano, że traktowanie ludzkich komórek THP-1 (monocyty) przy pomocy LPS-PG skutkuje osłabieniem odpowiedzi tych komórek podczas następnej aktywacji i jest to efekt specyficzny dla tego rodzaju LPS-u, gdyż takiej zależności nie zaobserwowano dla LPS-EC (209). Proces ten może być pewnym rodzajem adaptacji ewolucyjnej *P. gingivalis* w którym LPS tej bakterii

naśladuje przeciwzapalne działanie IL-10. Z drugiej strony długotrwały kontakt komórek układu odpornościowego z LPS-PG może prowadzić do wykształcenia tzw. pamięci immunologicznej związanej z odpowiedzią nieswoistą (ang. *innate immune memory*) (210). Długotrwały lub wielokrotny kontakt z różnego rodzaju cząsteczkami PAMP może prowadzić do zmian epigenetycznych wynikających z treningu odpowiedzi nieswoistej (ang. *innate training*). Różnice we wcześniejszej ekspozycji osób uczestniczących w badaniu na LPS-PG oraz ogólna kondycja/status komórek odpornościowych osób zdrowych może tłumaczyć wyższe ilości cytokin wydzielanych przez ich PBLs przed stymulacją i silniejszą aktywacją komórek po stymulacji u osób z AD.

Kolejnym etapem kompleksowej analizy możliwych powiązań między AD i PeD była ocena kondycji/statusu obwodowych komórek odpornościowych pacjentów z AD biorąc pod uwagę obciążenie PeD. Tego typu badania mające na celu wyjaśnienie mechanizmów leżących u podstaw AD i PeD są nowatorskie i wymagały skomplikowanej analizy statystycznej, nie były wcześniej publikowane i łączą w sobie zarówno dane kliniczne jak i eksperymentalne. Badania uwzględniały obecność lub brak demencji, wartość wskaźników periodontologicznych opisujących PeD oraz poziom odpowiedzi PBLs na LPS-PG wyrażony poziomem cytokin pro- i przeciwzapalnych. Na podstawie naszych doświadczeń udało nam się częściowo opisać tę zależność. Jak się okazało zdolność PBLs pacjentów z AD do wytwarzania przeciwzapalnej IL-10 oraz prozapalnej IL-6, które odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi na antygeny bakteryjne, była ściśle związana z wartością API. Wyższa wartość wskaźnika API świadcząca o gorszej higienie jamy ustnej była związana z niższym stężeniem tych cytokin. Takiej zależności nie zaobserwowano dla komórek osób zdrowych poznawczo, co wskazuje na różnice funkcjonalne obwodowych komórek odpornościowych między osobami zdrowymi poznawczo i chorymi. Wnioskujemy, że gorsza higiena jamy ustnej może być związana z większą ekspozycją na różnego rodzaju mikroorganizmy i wydzielane przez nie endotoksyny, co stymuluje receptory TLR i może prowadzić do nadmiernej aktywacji komórek, a w dalszej perspektywie nadmiernego ich wyczerpania. Ponadto, część bakterii, m.in. *P. gingivalis* może mieć zdolność do zmniejszania wydzielania cytokin przeciwzapalnych, w tym IL-10 (211). Zatem leukocyty osób z przewlekłym zapaleniem przyzębia będą charakteryzowały się zahamowanym wytwarzaniem cytokin przeciwzapalnych, których ważnym źródłem są np. monocyty.

Dalsza analiza współzależności AD i PeD oraz próba wyjaśnienia mechanizmów tej relacji była prowadzona także na poziomie transkryptomu. Podjęta została próba porównania względnej ekspresji genów związanych z aktywacją i regulacją stanu zapalnego u osób z AD oraz zdrowych w tej samej grupie wiekowej. W tym celu zbadano względną ekspresję następujących genów: *NFKB1*, który koduje podjednostkę czynnika transkrypcyjnego NF-κB regulującego ekspresję genów związanych z funkcjonowaniem zarówno swoistej jak i nieswoistej odpowiedzi odpornościowej, jest aktywowany w odpowiedzi na czynniki fizyczne jak promieniowanie UV oraz chemiczne i biologiczne, w tym wolne rodniki, cytokiny oraz antygeny (212); *PI3KR1*, który koduje regulatorową podjednostkę alfa enzymu kinazy fosfatydylinozytolu-3 uczestniczącą w szlaku przekazywania sygnału z receptorów dla cytokin oraz szlaku aktywującym limfocyty T i B; *AP-1 (c-JUN)*, który koduje białko c-Jun i razem z białkiem c-Fos tworzą czynnik transkrypcyjny AP-1. c-Jun jest zaangażowany w regulowanie proliferacji, apoptozy i przeżycia komórek, a także nowotworzenia i morfogenezy tkanek (213); *IRF1* i *IRF3* kodują interferonowe białka regulatorowe będące częścią sygnalizacji w szlakach TLR, zaangażowane są w aktywację ekspresji interferonów, głównie w odpowiedzi na zakażenia wirusowe (214); *STAT1* i *STAT3* kodują czynniki transkrypcyjne z rodziny STAT, czyli przekaźników sygnału i aktywatorów transkrypcji, białka te w wyniku fosforylacji ulegają aktywacji w odpowiedzi na cytokiny i czynniki wzrostu i uczestniczą w nieswoistej odpowiedzi odpornościowej (215); *SOCS1* i *SOCS3* kodują białka supresora sygnalizacji cytokinowej, które są zaangażowane w blokowanie ścieżki sygnałowej JAK-STAT, regulując wydzielanie cytokin i czynników wzrostu (215); *COX1* i *COX2* kodują odpowiednio konstytutywną oraz indukowaną cyklooksygenazę, pierwsza z nich zaangażowana jest w syntezę prostaglandyny, prostacykliny i tromboksanu regulujące działanie układu pokarmowego i krwionośnego, natomiast COX-2 związana jest z aktywacją stanu zapalnego (216). Uzyskane przez nas rezultaty były bardzo interesujące wyznaczając ścieżkę do dalszego zgłębiania tego zagadnienia. Po pierwsze, wykazaliśmy, że leukocyty osób zdrowych poznawczo charakteryzowały się wyższą względną ekspresją prawie wszystkich badanych genów w porównaniu do pacjentów z AD. W kilku przypadkach różnica ta była istotna statystycznie, którą utraciono po zastosowaniu poprawki na wielokrotne testowanie. Nie należy jednak uznawać tego wyniku za nieistotny ponieważ analiza siły obserwowanego efektu różnic

między grupami była wysoka, co wskazuje na potrzebę dalszych badań zwłaszcza na większej grupie badanej. W przypadku tego typu badań wielkość próby jest bardzo ważna i może stanowić istotne ograniczenie badania. Niemniej jednak sugeruje to związek obserwowanego efektu z wcześniej opisanymi zależnościami w wytwarzaniu cytokin przez PBLs. Jak wspomniano wcześniej, LPS-PG może aktywować szlaki z zaangażowaniem TLR2. Mniejsza ekspresja NFκB w komórkach chorych z AD może sugerować brak silnej odpowiedzi komórek na LPS-PG. W istocie, odpowiedź komórkowa, głównie monocytów na ten rodzaj LPS-u jest słabsza i związana z nietypowym mechanizmem odpowiedzi odpornościowej (217).

Powiązanie AD i PeD z poziomem ekspresji badanych genów okazało się dużym wyzwaniem i nie było dotychczas badane zwłaszcza w badaniach populacji ludzkiej. Uzyskane wyniki nie pozwoliły jednoznacznie wykazać, że współwystępowanie obu chorób (mierzone wskaźnikami neuropsychologicznymi oraz periodontologicznymi) wiąże się istotnie ze zwiększonym poziomem ekspresji genów związanych z aktywacją i regulacją odpowiedzi zapalnej. Zaobserwowano jednak, że większa ekspresja genu *AP1* w PBLs w odpowiedzi na LPS-PG była związana z utratą przyczepu (wyższe CAL) zarówno w grupie osób zdrowych jak i osób z AD, a w przypadku pacjentów z AD również w odniesieniu do głębokości sondowania (wyższe PD). Negatywną korelację dla grupy AD stwierdzono także w przypadku genu *STAT1* i wskaźnika higieny API. Czynniki transkrypcyjne AP-1 był już wcześniej wiązany z destrukcją tkanek przyzębia i PeD. Według badań Yelins'ka i wsp. (218) wzrost poziomu czynnika transkrypcyjnego AP-1 koreluje z wytwarzaniem tlenku azotu (NO) i anionorodnika nadadtlenkowego ($O_2^{\bullet-}$) w tkankach przyzębia w przebiegu ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej na modelu szczurzym. Ponadto, *JUN*, *FOS*, *KLF2*, *THBS1* i *WIF1* zostały zidentyfikowane jako kluczowe regulatory w zapaleniu przyzębia i potwierdzono, że są silnie ekspresjonowane w zapalnej tkance przyzębia (219). Jun i Fos są podjednostkami czynnika transkrypcyjnego AP-1. Aktywacja receptorów Toll-podobnych (TLR) stymuluje produkcję wielu cytokin i ostatecznie aktywuje AP-1. Makrofagi M1 regulują TLR4/AP-1 i promują niszczenie kości zębodołowej w zapaleniu przyzębia (220).

Uzyskane w tych badaniach wysokie wartości współczynników korelacji, nawet pomimo braku istotności, mogą sugerować potencjalne zależności i wskazywać na praktyczne biologiczne implikacje. Wydaje się, iż rzeczywiście może to świadczyć o tym,

że zwiększona ekspresja *AP-1* wiąże się z rozwojem, a zwłaszcza nasileniem stanu zapalnego przyzębia (PeD), u pacjentów z AD o czym świadczą otrzymane wyższe wartości wskaźników CAL i PD. Powyżej opisano, że w odpowiedzi na LPS-PG obwodowe komórki odpornościowe (PBLs) pacjentów z AD odpowiadają gwałtownym wyrzutem cytokin prozapalnych TNF- α , IL-1 β , IL-6 oraz przeciwzapalnej IL-10, co również może być tłumaczone większą ekspresją *AP-1*. Mechanizmy odpowiedzi zapalnej wywołanej przez LPS badane były wcześniej przez Liu X i wsp. (221). Autorzy potwierdzili, że LPS wyraźnie zwiększył wytwarzanie IL-6, IL-8 i TNF- α oraz ekspresję m.in. *AP-1* w komórkach linii ludzkich monocytów THP-1.

We wcześniejszych pracach naszego zespołu wykazaliśmy, że oporność leukocytów krwi obwodowej (PBLs) na zakażenia wirusowe jest wskaźnikiem kondycji wrodzonego układu odpornościowego. Najsilniejszą oporność PBLs na zakażenie wirusowe zaobserwowano *ex vivo* i utrzymywała się ona *in vivo* jako jedna z reakcji wrodzonej odporności w zdrowym organizmie (222,223). Na potrzeby wspomnianych badań i oceny poziomu wrodzonej odporności opracowano test oparty na oporności obwodowych komórek odpornościowych *ex vivo* na zakażenie wirusem indykatorowym, tj. pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV). Wirus ten został wybrany spośród innych badanych wirusów ludzkich i zwierzęcych. Wirus namnaża się w większości ludzkich i zwierzęcych komórek oraz nie powoduje naturalnych zakażeń w populacji europejskiej, co stanowi o jego przydatności przy ocenie odpowiedzi nieswoistej leukocytów (222). Na podstawie replikacji VSV w ludzkich PBLs ocenianej metodą TCID₅₀ oznaczano poziom odporności wrodzonej. Miano VSV wynoszące 0-1 logTCID₅₀ wskazuje na całkowitą oporność komórek na zakażenie wirusem (wysoki poziom wrodzonej odporności), miano VSV >1 logTCID₅₀ jest uważane za częściową oporność lub brak oporności przy mianie wynoszącym ≥ 4 log (niedobór wrodzonej odporności). Stwierdzono również, że wrodzona przeciwwirusowa odpowiedź immunologiczna PBLs jest związana z wiekiem i indywidualnie zróżnicowana (220).

Wyniki poprzedniego badania naszego zespołu pokazały, że poziom wrodzonej odpowiedzi odpornościowej koreluje z klinicznym nasileniem AD (224). Wraz ze stopniem zaawansowania choroby pogarsza się wrodzona odporność pacjentów. Wskazywało to na istotne upośledzenie wrodzonych mechanizmów immunologicznych w tej grupie chorych i wskazywało na potencjalny cel przyszłych terapii. W niniejszych

badaniach podjęto próbę oceny stopnia wrodzonej odpowiedzi immunologicznej u pacjentów z AD obciążonych także PeD, czyli próbę sprawdzenia czy obecność przewlekłego stanu zapalnego przyzębia będzie dodatkowo obciążać wrodzony układ odpornościowy. Przyjęto założenie, że pacjenci z AD i PeD będą osobami o niskiej odporności i dużej wrażliwości na zakażenie VSV. Na początek, podobnie jak w poprzednim badaniu, potwierdzono, że stopień odporności wrodzonej koreluje z nasileniem AD (dane niezaprezentowane w pracy). Jednak wprowadzenie dodatkowych zmiennych periodontologicznych do modelu analizy statystycznej nie potwierdziło wcześniejszych założeń. Zauważono jednak, że u pacjentów z AD wzrost wskaźnika higieny jamy ustnej API wiązał się z większą opornością komórek na zakażenie VSV i niższym mianem wirusa, co oznacza, że gorsza higiena jamy ustnej u tych osób może wiązać się z wyższą odpornością nieswoistą. Pierwsze nasuwające się wyjaśnienie to zmieniony profil komórek odpornościowych, który wykazaliśmy u pacjentów tego badania, czyli zmniejszoną liczbę białych krwinek zwłaszcza monocytów i limfocytów. Z wcześniejszych badań opublikowanych przez nasz zespół wiemy natomiast, że VSV replikuje się tylko w monocytach i komórkach dendrytycznych pochodzących z monocytów (225). Mniejsza liczba monocytów, czyli komórek docelowych dla wirusa być może była związana z jego niższą replikacją. Co więcej, u osób z zapaleniem przyzębia stwierdzono wzrost ekspresji markerów związanych z odpornością nieswoistą na monocytach i neutrofilach w porównaniu do osób bez zapalenia przyzębia (226), co paradoksalnie może przyczyniać się do większej odporności tak aktywowanych komórek na zakażenie VSV. Jednak biorąc pod uwagę fakt, że w tych badaniach, w wyniku zakażenia komórek VSV pacjenci z AD charakteryzowali się istotnie niższymi stężeniami wydzielonych cytokin IFN- γ , IL-1 β , IL-6 oraz TNF- α można przypuszczać, że cechują się oni jednak niższą odpornością niż osoby zdrowe. Być może jest to przyczyną nie do końca jednoznacznych wyników i wskazuje na konieczność dalszych eksperymentów w tym obszarze. Zmiany w funkcjonowaniu odpowiedzi nieswoistej są zależne od wieku co jest dobrze udokumentowane w literaturze naukowej (227) i obejmują one zmiany w odpowiedzi zapalnej z tendencją do generowania silniejszego stanu zapalnego, zmian w liczbie i stosunku poszczególnych subpopulacji komórek odpornościowych oraz ekspresji receptorów TLR, a także osłabienia funkcji wyspecjalizowanych komórek, np. neutrofilów.

AD jest silnie związana i zależna od funkcjonowania układu odpornościowego (228), zwłaszcza astrocytów i mikrogleju w mózgu (229), ale również obwodowych komórek odpornościowych (64). Zatem na podstawie przeprowadzonych badań można przypuszczać, że komórki osób z AD charakteryzują się znacznym wyczerpaniem skutkującym wytwarzaniem mniejszych ilości cytokin prozapalnych przy jednocześnie nadmiernym wzbudzeniu w wyniku aktywacji, co z kolei prowadzi do wydzielania znacznych ilości mediatorów zapalnych. Dodatkowo, funkcjonowanie komórek odpornościowych jest zaburzone, co objawia się między innymi słabszą odpornością na zakażenie. Próba wyjaśnienia współzależności między AD i PeD na poziomie analizy wytwarzania mediatorów stanu zapalnego w odpowiedzi na infekcję wirusową (w teście oporności PBLs na VSV) pozwoliła wykazać, że gorsza higiena jamy ustnej (wyższy wskaźnik API) pacjentów z AD związana jest z wytwarzaniem istotnie mniejszych ilości IL-10 przez PBLs. Takiego efektu nie widać u osób zdrowych poznawczo. Już sam kontakt PBLs z wirusem powoduje u pacjentów z AD znacznie mniejszą odpowiedź cytokinową. W przypadku odpowiedzi komórek odpornościowych na LPS-PG obserwowany był efekt gwałtownego wyrzutu tj. hiperstymulacji, tymczasem reakcja na antygen wirusowy skutkowała słabszym efektem immunologicznym. Te obserwacje wyraźnie sugerują, że obwodowe komórki odpornościowe osób z AD obciążonych dodatkowo PeD, w zależności od czynników genetycznych i środowiskowych balansują pomiędzy nadmierną aktywacją a wyczerpaniem immunologicznym w zależności od działania czynnika zakaźnego oraz klinicznego zaawansowania każdego ze schorzeń.

W następnym kroku zbadano związek wybranych polimorfizmów genów układu HLA (DRB1, DRA) oraz receptora regionu Fc (*FCGR2A*) z odpowiedzią cytokinową pacjentów oraz osób zdrowych poznawczo, a także związek obecności poszczególnych genotypów z zaawansowaniem stanu zapalnego przyzębia poprzez ocenę wartości wskaźników periodontologicznych przy obecności poszczególnych genotypów. Pierwotnym założeniem było to, że pacjenci z AD oraz PeD będą charakteryzowali się specyficznym fenotypem hiper zapalnym, który powoduje nasilone wydzielanie mediatorów stanu zapalnego. Nie stwierdzono różnic w rozkładzie genotypów pomiędzy grupami AD i ZDR w kontekście rozpatrywanych polimorfizmów. Odsetek poszczególnych genotypów rs1801274 (gen *FCGR2A*), rs9270856 (*HLA-DRB1*), rs3135344 (*HLA-DRA*) oraz, co zaskakujące, dwóch genotypów genu *APOE* jest taki sam

w obu grupach. Udział poszczególnych alleli *APOE* w populacji osób z AD wynosi odpowiednio 3,9%, 59,4% oraz 36,7% dla E2, E3 i E4 (176) podczas gdy w niniejszych badaniach wyniósł on 6,9% dla allelu E2, 81,9% dla allelu E3 i 11,1% dla allelu E4, co oznacza że udział allelu E4 był ponad 3 razy niższy w badanej grupie osób z AD w porównaniu do populacji kaukaskiej. Obserwowane różnice mogą wynikać z reprezentacji osób z AD przed 65 rokiem życia. Młodszy pacjenci z AD częściej wykazują atypowe formy AD, które związane są z EOAD (230) i mogą nie być reprezentatywne dla sporadycznej formy AD i badań dotyczących modyfikowalnych czynników ryzyka. W badaniach tych nie kontrolowano czy osoby włączone do badania były FAD czy SAD, a prawie 20% osób w momencie badania miała poniżej 65 roku życia. AD w takim wieku zalicza się do EOAD czyli choroby o wczesnym początku i może być związana z mutacjami o prawie pełnej penetracji w genach *PSEN1*, *PSEN2* i *APP* (231). Grupę FAD cechują mutacje, które prawie na pewno będą prowadzić do rozwoju jakiejś formy demencji. Taka grupa rozwinię AD niezależnie od tego czy inne czynniki ryzyka zaistnieją w życiu takich osób czy nie i zwykle stanę się to przed 65 rokiem życia. Mimo to nie zdecydowano się na usunięcie osób poniżej 65 roku życia z badanej grupy z kilku powodów. Jako, że wiek był jedynym predyktorem na podstawie, którego można było podejrzewać czy dany przypadek AD jest FAD lub SAD można byłoby popełnić błąd usuwając osobę, która z innych przyczyn zachorowała przed 65 rokiem życia. Wiek ten jest jedynie wartością przed którą AD o wczesnym początku może się pojawić lub nie, nie można wykluczyć jednak innych przyczyn, które prowadzą do EOAD i nie są związane z FAD. Podobnie w przypadku SAD, który z przyczyn innych niż genetyczne może pojawić się przed 65 rokiem życia. Drugim problemem jest brak informacji o czasie chorowania, gdyż niewykluczone, że osoby po 65 roku życia w badanej grupie są FAD. Dlatego sam wiek jest niewystarczający do wykluczenia osób z badania gdyż było wysokie ryzyko pomyłki, zwłaszcza że grupa AD składała się z 36 osób, a osób poniżej 65 roku życia zidentyfikowano w liczbie 7 co stanowi prawie 20%. Usunięcie zbyt dużej liczby badanych osób stworzyłoby w grupie duże dysproporcje, ponad to jeśli zebrana próbka stanowi poprawną reprezentację wszystkich osób z AD to udział osób z FAD powinien wynosić w niej około 5% (232).

Jako, że badane polimorfizmy są związane z funkcjonowaniem układu odpornościowego przebadano wpływ poszczególnych genotypów na ilości

wytwarzanych cytokin w odpowiedzi na stymulację komórek LPS-PG. Stwierdzono istotne różnice w produkcji cytokiny IL-10 między grupami osób z AD i genotypem AA oraz osób zdrowych poznawczo z genotypem GA genu *FCGR2A* (rs1801274) oraz tendencję do uwalniania mniejszych ilości IL-1 β , IL-6 oraz IL-10 w grupie osób z AD wraz z obecnością allelu G w tym SNP. Gen *FCGR2A* kodujący izoformę receptora dla części stałej immunoglobuliny G podklasy Fc γ RII (CD32) podlega ekspresji na wielu komórkach układu odpornościowego, w tym na monocytach, makrofagach oraz neutrofilach, a jego aktywacja związana jest z wydzielaniem cytokin prozapalnych, wzmożoną fagocytozą oraz zwiększoną cytotoksycznością (233). Obecność allelu G (Arg131) w obrębie genu kodującego ten receptor związana jest z wyższą śmiertelnością wśród zakażonych COVID-19 (234), czy szybszym przebiegiem HIV (235). W naszych badaniach wykazaliśmy, że obecność tego allelu wiązała się z tendencją do wytwarzania mniejszych ilości IL-1 β , IL-6 oraz IL-10. Może wynikać to ze sposobu odpowiedzi tego receptora w zależności od izoformy którą przyjmuje. Genotyp AA (His131) uważany jest za genotyp o wysokim powinowactwie do IgG2 i IgG3, podczas gdy obecność argininy zmniejsza zdolność tego receptora do wiązania przeciwciał (236). Zatem wariant AA będzie wiązał się z silniejszą odpowiedzią zapalną. Część badań wskazuje, że obecność allelu A związana jest z chorobami o podłożu zapalnym (237,238). W innych natomiast to allel G uważany jest czynnikiem ryzyka (239,240). Polimorfizm tego genu ma także znaczenie w odpowiedzi na stosowane terapie. W badaniach wpływu leku immunosupresyjnego abataceptu na efektywność leczenia reumatoidalnego zapalenia stawów obecność allelu A w SNP genu *FCGR2A* związana była z wyższą skutecznością terapii (wg kryterium EULAR) (241). Wydaje się, że w chorobach o podłożu zapalnym silniejszym czynnikiem ryzyka jest genotyp AA, podczas gdy w zakażeniach w których ważna jest silna odpowiedź czynnikiem ryzyka będzie genotyp GG, który charakteryzuje się niższym powinowactwem. Nie stwierdzono, aby pacjenci z AD istotnie różnili się pod kątem odpowiedzi zapalnej między sobą w zależności od posiadanego genotypu genu *FCGR2A*. Jedyną istotną różnicą była ilość uwalnianej IL-10 między osobami zdrowymi o genotypie AA oraz osobami z AD o genotypie GA, gdzie pacjenci charakteryzowali się przeciętnie niższymi stężeniami tej cytokiny. Obserwacja niższego poziomu cytokiny przeciwzapalnej IL-10 w zależności od obecności allelu G w naszych badaniach nie pokrywa się z badaniami

Kozicky i wsp. (2018) (242). Jednak w przypadku cytokin prozapalnych jak IL-6, tendencja jest taka sama i to obecność allelu A jest związana z wyższymi ilościami tej cytokiny. Różnice w odpowiedzi odnośnie IL-10 mogą wynikać z obecności nieznanych różnic między grupami ZDR i AD, które powodują taki efekt. Dodatkowo, w badaniach Kozicky i wsp. zastosowano inny model badawczy, w którym stymulowano jedynie monocyty, natomiast komórki nieadherentne zostały usunięte. Co więcej, użyto LPS pochodzący z *E. coli*, który jak diskutowano powyżej, prawdopodobnie działa poprzez aktywację innych szlaków i jest znacznie silniejszym induktorem niż LPS-PG.

W przypadku genu *HLA-DRB1* (rs9270856) stwierdzono istotne różnice jedynie w kontekście wytwarzania IL-15. Pacjenci AD z genotypem GG wytwarzali istotnie mniej tej cytokiny w porównaniu do pacjentów z genotypem GA*. Takiej różnicy nie zaobserwowano natomiast dla grupy ZDR. Gen *HLA-DRB1* koduje łańcuch beta receptora powierzchniowego HLA-DR będącego ligandem dla receptora TLR limfocytów T-pomocniczych. Receptor ten znajduje się na komórkach prezentujących antygen, jak makrofagi, limfocyty B oraz komórki dendrytyczne (243). Polimorfizmy w genie *HLA-DRB1* są związane z reumatoidalnym zapaleniem stawów (244) oraz słonowatością (245). Co więcej stwierdzono związek polimorfizmów *HLA-DRB1* z ryzykiem rozwoju AD (246,247). Znaleźć można również doniesienia o związku niektórych genotypów *HLA-DRB1* z wczesnym rozwojem zapalenia przyzębia (248). W literaturze brak jest jednak bezpośredniego odniesienia do badanego SNP (rs9270856). W niniejszych badaniach nie stwierdzono aby któryś z genotypów tego genu był istotnie częstszy w grupie AD niż u osób zdrowych, nie stwierdzono także aby był związany z różnicami w rozkładzie wskaźników periodontologicznych.

W przypadku genu *HLA-DRA* (rs3135344) nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupami i genotypami. Zaobserwowano jednak tendencję w której osoby z grupy AD charakteryzują się wyższym wytwarzaniem TNF- α , IL-1 β i IL-6 przy obecności genotypu TT, czego nie widać w przypadku osób zdrowych. Gen *HLA-DRA* koduje łańcuch alfa receptora powierzchniowego HLA-DR. Wzrost ekspresji genu *HLA-DRA* wiąże się z wyższym ryzykiem wystąpienia AD o późnym początku (249). Sam wariant tego genu (rs3135344) również może być związany z etiologią AD (250). Allel T genu *HLA-DRA* (rs3135344) związany jest jednocześnie z AD oraz krążącym receptorem ACE2, a także z częstszą hospitalizacją pacjentów w wyniku zakażenia COVID-19.

W badaniach własnych allel T wiązał się z tendencją do wytwarzania wyższych ilości cytokin TNF- α , IL-1 β oraz IL-6 w odpowiedzi na stymulację komórek LPS-PG. Może to oznaczać, że obecność allelu T związana jest z silniejszą odpowiedzią zapalną. Nie zaobserwowano różnic w poziomie cytokin w grupie osób zdrowych w zależności od genotypu.

Celem odpowiedzi na pytanie, czy badane polimorfizmy w rozpatrywanych genach są związane ze stanem zapalnym przyzębia zbadano rozkład zmiennych periodontologicznych w zależności od genotypu w grupach osób zdrowych poznawczo oraz osób z AD. Nie stwierdzono istotnych różnic dla zmiennych periodontologicznych w zależności od genotypu w żadnej z grup. Stwierdzono natomiast różnice we wskaźniku higieny między zębowej ale tylko między grupami, co oznacza, że pacjenci charakteryzowali się gorszą higieną jamy ustnej niezależnie od posiadanego genotypu. Pacjenci i osoby zdrowe posiadające takie same rozpatrywane allele nie różnią się pod względem przeciętnych wartości BOPxT, API, PD i CAL. Oznacza to, że allele te nie mają wpływu na obserwowane wartości tych zmiennych i istnieje inny czynnik, który powoduje różnice między grupami AD i ZDR, zwłaszcza dla wskaźnika API.

Dodatkowo, w niniejszej pracy przeprowadzono również pilotażowe badania nad składem i różnorodnością mikrobiomu jamy ustnej grupy badanej. Kluczowym aspektem tych badań była ocena czy współwystępowanie AD oraz PeD wiąże się z różnicami w mikrobiomie uczestników badania i zmienioną odpowiedzią cytokinową komórek odpornościowych w odpowiedzi na LPS-PG. Takie badania nie były dotychczas prowadzone. Dużo większym zainteresowaniem środowiska naukowego cieszą się bowiem badania różnic w składzie mikrobioty jelitowej między osobami zdrowymi oraz obciążonymi chorobami neurodegeneracyjnymi (251,252). Wyniki okazały się niezwykle interesujące i potencjalnie wytyczyły dalsze kierunki badań naszego zespołu. Mimo, iż żaden ze wskaźników różnorodności alfa nie okazał się istotnie różny pomiędzy osobami z AD i zdrowymi, zaobserwowano jednak większe zróżnicowanie osobnicze osób zdrowych poznawczo pod względem różnorodności alfa niż wśród osób z AD. Zbadano zatem wariancje tych wskaźników. W przypadku obserwowanych cech, czyli liczby wyodrębnionych taksonów, stwierdzono że pomimo braku istotności po zastosowaniu korekty wartości p , istnieją pewne różnice w rozkładzie liczby obserwowanych gatunków mikroorganizmów między grupą osób zdrowych i chorych,

co może sugerować, że grupa AD była bardziej jednorodna. Duże zróżnicowanie grupy zdrowej może wynikać z obecności większej liczby czynników środowiskowych różnicujących osoby zdrowe poznawczo. Osoby z AD zmagają się z wieloma ograniczeniami wynikającymi z postępu choroby. Być może ograniczenia te sprawiają, że osoby z AD są do siebie bardziej podobne pod względem stylu życia, nawyków higienizacyjnych zębów, stosowanej diety, ilości przyjmowanych płynów czy leków co może istotnie wpływać na skład mikrobioty jamy ustnej. Przeanalizowano także różnorodność mikrobiomu pod kątem różnorodności beta określającej różnicę składu pomiędzy badanymi grupami. Zastosowane wskaźniki różnorodności beta (wskaźnik Jaccarda, Bray-Curtisa, Unweighted i Weighted UniFrac) nie różniły się między badanymi grupami. Oznacza to, że grupy te są podobne ze względu na skład gatunkowy mikroorganizmów, jego obfitość oraz podobieństwo ewolucyjne.

Aby zbadać czy różnorodność mikrobiomu wśród pacjentów z AD i osób zdrowych różni się w zależności od obecności dodatkowego obciążenia jakim jest PeD przeprowadzono badanie korelacyjne wskaźników periodontologicznych ze wskaźnikami różnorodności alfa. Mimo braku istotnego związku pomiędzy różnorodnością alfa i wskaźnikami periodontologicznymi zaobserwowano jednak pewne wyraźne korelacje, które warto zaznaczyć. U osób zdrowych poznawczo zaobserwowano, że wskaźnik higieny międzyzębowej związany jest z równomiernością gatunkową mikroorganizmów, co oznacza że osoby zdrowe doświadczają większych dysproporcji w liczebności poszczególnych taksonów względem siebie niż osoby z AD. Jest to szczególnie ciekawe z uwagi na fakt, że w naszych badaniach wykazano, iż pomimo tego że większość osób zdrowych dbała podobnie o higienę jamy ustnej charakteryzują się oni dużym zróżnicowaniem pod względem wskaźnika higieny. Naturalne wydaje się, że im gorsza higiena jamy ustnej tym większe zaburzenia w proporcjach między mikroorganizmami. Być może jednak regularne szczotkowanie stwarza presję selekcyjną oraz przyczynia się do mechanicznego usuwania podatnych, nie związanych z biofilmem bakterii, co powoduje dysproporcje w poszczególnych taksonach. Takiej zależności nie obserwuje się u osób z AD gdyż większość z nich charakteryzuje się bardzo słabą higieną jamy ustnej przy jednocześnie dużym zróżnicowaniu nawyków higienizacyjnych zębów, prawdopodobnie zależnym od stopnia zaawansowania choroby. Rzadsze szczotkowanie zębów może sprzyjać

ustaleniu pewnej równowagi gatunkowej mikroorganizmów w przypadku gdy nie ma się do czynienia z patologicznym przerostem bakterii patogennych. Wyrażna negatywna korelacja ubytku przyczepu (CAL), która świadczy o zaawansowaniu zapalenia przyzębia, z liczbą obserwowanych gatunków zdaje się potwierdzać ten pogląd. W przypadku zmian chorobowych, zwłaszcza takich jak paradontoza dochodzi do zmiany w liczbie i proporcjach mikroorganizmów. Przykładowo, szczotkowanie języka nie wpływa na zmiany w różnorodnościach alfa i beta mikrobioty języka, ale istotnie zwiększa obfitość bakterii *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella nanceiensis* i *Veillonella parvula* oraz zmniejsza obfitość *Prevotella histicola* (253). Z kolei płukanie i nitkowanie zębów dwa razy dziennie wiąże się z większym udziałem *Proteobacteria* i mniejszą różnorodnością mikrobioty (254). Wśród osób z AD zaobserwowano również, że głębokość kieszonek dziąsłowych związana jest z wyższym pokrewieństwem ewolucyjnym mikroorganizmów (255). Może wynikać to ze specyficznego mikrośrodowiska jakie zdaje się zapewniać powiększająca się kieszonka dziąsłowa. W efekcie, jest to miejsce gdzie dobrze mogą rozwijać się pewne specyficzne bakterie, które ze względu na swoje wymagania środowiskowe częściej mogą być ze sobą spokrewnione. Jednak negatywna korelacja dla wskaźnika utraty przyczepu i różnorodności filogenetycznej wśród osób z AD zdaje się wykluczać taki pogląd. Porównanie różnorodności i składu gatunkowego płytkich i głębokich kieszonek dziąsłowych u osób z PeD wykazało, że głębokie kieszonki charakteryzują się wyższą różnorodnością i większą liczbą gatunków w porównaniu do miejsc płytkich (255). Większa obfitość mikroorganizmów w głębokich kieszonkach obejmowała peripatogeny takie jak *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Treponema* i *Fusobacterium* podczas gdy w płytszych kieszonkach dominowały bakterie z rodzaju *Streptococcus*, *Rothia*, *Veillonella* i *Actinomyces*. Różnorodność mikrobiomu zmienia się zatem wraz z zaawansowaniem klinicznym choroby przyzębia. W przypadku pozostałych cech różnorodności alfa i wskaźników periodontologicznych, a przede wszystkim z uwzględnieniem stanu zapalnego przyzębia, nie stwierdzono wyraźnych i silnych korelacji zarówno wśród osób zdrowych poznawczo jak i osób z AD. Nie stwierdzono także, aby obserwowane korelacje były istotnie różne między grupami AD i ZDR. Mimo tego, że nie udało się jednoznacznie potwierdzić omawianych zależności w różnorodności mikrobiomu i wskaźników periodontologicznych wydaje się, że

zaobserwowane różnice wyznaczają cel dalszych badań, które będą mogły zostać wykonane z zastosowaniem nieco zmienionych w stosunku do zastosowanych tutaj metod izolacji genomowego DNA oraz przede wszystkim z wykorzystaniem większej liczby próbek śliny od osób badanych. Podobną analizę związku współwystępowania AD i PeD wykonano dla różnorodności beta. W tym wypadku wykorzystano test permutacyjny (PERMANOVA), który nie wykazał istotnego związku stanu zapalnego, higieny międzyzębowej, głębokości kieszonek oraz utraty przyczepu z żadnym z zastosowanych wskaźników różnorodności beta.

Aby sprawdzić związek między składem mikrobiomu jamy ustnej a odpowiedzią cytokinową PBLs na LPS-PG wykonano analizę korelacji różnorodności alfa z poziomem wytwarzanych cytokin. Zaobserwowano, że wśród osób z AD ilość wytwarzanego IFN- γ oraz IL-6 związana była z wyższymi wartościami wskaźników obserwowanych cech oraz indeksu CHAO1, co oznacza, że wyższa odpowiedź zapalna związana jest z większą liczbą gatunków oraz rzadkich gatunków mikroorganizmów. Natomiast w przypadku osób zdrowych relacja ta była odwrotna i słabsza, im większa liczba gatunków tym mniejsza ilość wytwarzanych cytokin. Efekt ten jest szczególnie silny w przypadku TNF- α , który wykazuje negatywną korelację ze wszystkimi wskaźnikami różnorodności alfa zarówno wśród osób z AD jak i zdrowych poznawczo.

Wydaje się, że osoby z AD charakteryzują się mikrobiomem, który sprzyja wzmożonej odpowiedzi zapalnej w wyniku stymulacji LPS-PG. Specyficzna relacja układu odpornościowego pacjentów z mikrobiomem jamy ustnej sprzyja takiej odpowiedzi, gdyż obwodowe komórki odpornościowe są stale pobudzane przez napływające z jamy ustnej metabolity i patogeny. Komórki ulegają nadmiernej stymulacji, co prowadzi do ich wyczerpania w wyniku immunosenescencji, a przy pojawieniu się antygeny - do hiperaktywacji. Prawdopodobnie w przypadku osób zdrowych poznawczo aktywacja obwodowych komórek odpornościowych nie była aż tak powszechna, a ich komórki odpowiadające prawidłowo w zależności od stopnia higieny jamy ustnej i czynników środowiskowych reagują wytworzeniem mniejszych ilości cytokin wraz ze wzrostem różnorodności mikrobiomu. Relacja aktywacji obwodowych komórek odpornościowych *ex vivo* w odpowiedzi na antygen z różnorodnością mikrobiomu jamy ustnej wymaga jednak dalszych, szczegółowych badań.

W następnym etapie przeprowadzono analizę różnic w obfitości poszczególnych taksonów mikroorganizmów. W związku z brakiem różnic w różnorodności alfa i beta między porównywanymi grupami, do analizy różnic obfitości dla arbitralnie wybranych taksonów zdecydowano się na użycie nieparametrycznego testu Manna-Whitneya. Dane dotyczące względnej obfitości mają charakter kompozycyjny i znajdują się w sympleksie, dlatego zaleca się użycie bardziej zaawansowanych metod statystycznych jak np. ANCOM-BC2 (256). Wyniki dotyczące mikrobiomu w niniejszych badaniach stanowią wstępną analizę, która w przyszłych badaniach, rozszerzonych o większą próbkę statystyczną, może zostać zweryfikowana stosując bardziej odpowiednie metody. W tym badaniu, na poziomie typu (*phylum*), zarówno w grupie osób zdrowych jak i osób z AD wykazano, że najliczniej reprezentowanymi mikroorganizmami w jamie ustnej są *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Saccharibacteria* oraz *Fusobacteria*. Częściowo potwierdza to dane literaturowe, które podają że niezmienną chorobowo, prawidłową mikrobiota jamy ustnej człowieka obejmuje sześć głównych typów mikroorganizmów *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* oraz *Fusobacteria*, które wspólnie stanowią nawet 94% wszystkich taksonów. Pozostałe 6% taksonów stanowią między innymi *Saccharibacteria*, *Synergistetes*, SR1, *Gracilibacteria*, *Chlamydia*, *Chloroflexi*, *Tenericutes* i *Chlorobi* (257). Zarówno wśród osób zdrowych poznawczo jak i osób z AD stwierdzono niewielki udział krętków *Spirochaetes* oraz *Actinobacteria*. Bakterie z typu *Spirochaetes* są cienkimi, spiralnymi lub falistymi organizmami o bardzo dużej ruchliwości. *Spirochaetes* należą do bakterii Gram-ujemnych, wśród których zidentyfikowano ponad 90 gatunków w tym chorobotwórcze *Treponema* spp., *Leptospira* spp. oraz *Borrelia* spp. (258). Z kolei *Actinobacteria* są Gram-dodatnimi pałeczkami spośród których większość bytuje w glebie. W kontekście zdrowia człowieka znacznie kliniczne mają bakterie z rodzaju *Actinomyces*, które zasiedlają błony śluzowe człowieka i mogą wywoływać choroby przyzębia oraz próchnicę zębów. *Actinomyces* wchodzi w skład mikrobiomu jamy ustnej żyjąc w ślinie, płytce nazębnej oraz zdrowych powierzchniach dziąseł (259). Nie stwierdzono istotnych różnic we względnej obfitości *Firmicutes*, *Saccharibacteria* oraz *Fusobacteria* pomiędzy zdrowymi poznawczo oraz grupą AD. Zaobserwowano jednak, że pacjenci z AD charakteryzowali się wyższym udziałem *Bacteroidetes* i niższym *Proteobacteria* niż osoby zdrowe poznawczo. Analiza

taksonomiczna w badaniach Wu i wsp. wykazała, że pacjenci z AD mieli niższą liczebność *Fusobacterium* i zwiększony stosunek *Firmicutes/Bacteroidetes* (F/B) w porównaniu do osób zdrowych co może sugerować obecność ogólnoustrojowego stanu zapalnego (260). Odwrotną zależność zaobserwowano w tych badaniach. Osoby zdrowe poznawczo charakteryzowały się wyższym stosunkiem F/B. Spontaniczne wydzielanie cytokin zapalnych przez osoby zdrowe było wyższe niż u pacjentów AD. Jednak przyczyna, dlaczego to osoby zdrowe charakteryzują się stosunkiem F/B świadczącym o wyższym ogólnoustrojowym stanie zapalnym, nie jest do końca jasna. Być może jest to wynik złożonych relacji pomiędzy zapalnym charakterem AD, wyczerpaniem komórek odpornościowych w wyniku przewlekłej stymulacji i immunosenescencji a także zmian związanych z wiekiem. Stosunek F/B nie jest stały w czasie i podlega zmianom w ciągu życia w którym to dorośli charakteryzują się zwykle wyższymi wartościami F/B niż dzieci i osoby starsze (261). Ponad to większy udział *Bacteroidetes* może być związany z zaburzeniami usuwania złogów amyloidowych. Jak wykazano w pracy Wasén i wsp. zakażenie myszy *Bacteroidetes fragilis* skutkowało zwiększeniem obciążenia A β , zwiększoną ekspresją enzymów zaangażowanych w obróbkę amyloidu, zmniejszoną fagocytozę oraz degradacją białek w komórkach mikrogleju (262). Zatem można wnioskować, iż obecność *Bacteroidetes* spp., którą wykazano w niniejszym badaniu, może być związana z patogenezą AD. Negatywny wpływ wykazuje także sam LPS *Bacteroides fragilis*, który jest silnym induktorem szlaku NF- κ B i jest rozpoznawany przez TLR2 i TLR4 jak również receptory mikrogleju CD14 (263). Pomimo tego, że *Bacteroides fragilis* związany jest głównie z mikrobiotą jelitową, potencjalny udział tej bakterii w patogenezie AD może sugerować, że inni przedstawiciele *Bacteroidetes* spp. mogą być równie zaangażowani w ten proces. *Bacteroides fragilis* oraz *P. gingivalis* wytwarzają podobne białka, które są zaangażowane w pozyskiwanie hemu i przyczyniają się do zaburzenia funkcjonowania mikrobiomu, co może świadczyć o istotnym udziale zarówno mikrobiomu jamy ustnej jak i mikrobiomu jelitowego w chorobach układowych oraz neurodegeneracyjnych i stanowić ważny czynnik ryzyka AD (264).

Jako, że w badaniach tych skupiono się na wpływie LPS-u pochodzącego z *P. gingivalis* zbadano również względne różnice w obfitości rodziny (*family*) *Porphyromonadaceae*. Osoby z AD charakteryzowały się wyższą względną obfitością

Porphyromonadaceae niż osoby zdrowe poznawczo. Natomiast na poziomie rodzaju (*genus*) przebadano różnice względnej obfitości dla bakterii wchodzących w skład „czerwonego kompleksu” zaproponowanego przez Socransky i wsp. (115). Nie stwierdzono istotnych różnic we względnej obfitości *Tannerella* spp. oraz *Treponema* spp. między grupami osób zdrowych i chorych. Zaobserwowano jednak, że obfitość *Porphyromonas* spp. w grupie osób z AD jest wyższa niż w grupie osób zdrowych poznawczo. Zwiększenie ilości badanych próbek prawdopodobnie pozwoliłoby potwierdzić te wyniki. W badaniach Troci i wsp. wykazano wyższą obfitość *Porphyromonadaceae* w mikrobiocie fekalnej oraz *Porphyromonas* spp., *Leptotrichia* spp. i *Tannerella* spp. w mikrobiocie jamy ustnej. Co więcej, obfitość *Porphyromonas* spp. jest skorelowana z ilością Aβ w PMR (265). Zespół Franciotti i wsp. porównał obfitość *P. gingivalis* w jamie ustnej osób z chorobami neurodegeneracyjnymi, osób z zaburzeniami neurologicznymi ale bez chorób neurodegeneracyjnych oraz osób zdrowych. Obfitość *P. gingivalis* była najwyższa u osób z chorobami neurodegeneracyjnymi, a najniższa wśród osób zdrowych. Obecność tej bakterii korelowała również z obecnością przeciwciał anty-*P. gingivalis* ale tylko w przypadku osób bez zmian neurodegeneracyjnych, co może sugerować, że u pacjentów z chorobą neurodegeneracyjną zaburzona zostaje odpowiedź swoista skutkująca niskim poziomem przeciwciał (266).

Przeprowadzone badania cechują się pewnymi ograniczeniami. Najważniejszym z nich jest problem wielkości próby badanej. Według założeń próba powinna liczyć 120 osób, w tym 60 osób z AD i 60 osób zdrowych poznawczo. Założenia zostały spełnione tylko w 56% z kilku przyczyn. Najważniejszą przyczyną nieuzyskania pełnej grupy była pandemia COVID-19, która rozpoczęła się pod koniec 2019 roku, a do Polski dotarła na początku 2020 roku. Jako, że osoby żyjące z demencją, z racji swojego wieku oraz obciążenia chorobą, były szczególnie narażone na zakażenie wirusem SARS-CoV-2 rekrutacja pacjentów została wstrzymana i nie udało się jej ponownie wznowić. Dostęp do grupy osób zdrowych poznawczo również był utrudniony ze względu na obostrzenia, zwłaszcza na początku pandemii, jak również ze względu na specyfikę badań, która wymagała przeprowadzenia badania periodontologicznego w obrębie jamy ustnej. Z tego samego powodu znacznie ograniczona była próba badana w oznaczeniach genetycznych. W badaniach poszukujących związku polimorfizmów

genów z cechami klinicznymi choroby, w tym przypadku współwystępowania AD i PeD, wymagana jest bardzo duża ilość analizowanych próbek. W przeciwnym razie uzyskanie wiarygodnych wyników może być utrudnione, mimo zastosowania czułych metod analizy statystycznej. Kolejnym ograniczeniem była liczba próbek śliny, w której analizowano skład mikrobioty. Mimo to, udało się jednak wykryć ciekawe zależności i wyznaczyć dalsze kierunki badań w tym obszarze.

PODSUMOWANIE

W przebiegu choroby Alzheimera (AD) dochodzi do istotnych zmian w profilu obwodowych komórek odpornościowych, których ogólna ilość jak i ilość poszczególnych subpopulacji leukocytów istotnie zmniejsza się w porównaniu do osób zdrowych poznawczo. Może to być jedną z przyczyn osłabionej odpowiedzi odpornościowej przeciwko antygenom bakteryjnym i wirusowym oraz wskazywać na potencjalne niedobory immunologiczne w tej grupie chorych.

Na podstawie analizy parametrów klinicznych można wnioskować, że istnieje ścisły związek między występowaniem AD i paradontozy (PeD). Obciążenie stanem zapalnym przyzębia u pacjentów demencyjnych może istotnie wpływać na pogarszanie się funkcji poznawczych i postęp AD. Jest to podstawą do zwrócenia szczególnej uwagi na konieczność leczenia PeD w terapii osób dotkniętych AD.

Obwodowe komórki odpornościowe (PBLs) *ex vivo* pacjentów obciążonych AD charakteryzują się zmniejszonym wytwarzaniem cząsteczek stanu zapalnego, co może być oznaką obniżonej funkcjonalności w stosunku do osób zdrowych. Zaobserwowano także, iż obecność antygeny bakteryjnego LPS-PG (LPS z *P. gingivalis*) prowadzi do gwałtownej odpowiedzi odpornościowej u pacjentów z AD w stosunku do osób zdrowych. Przejawia się to większym wyrzutem mediatorów stanu zapalnego, co może z kolei wskazywać, że ulegają one hiperaktywacji.

Współwystępowanie AD i PeD wpływa na kondycję/status obwodowych komórek odpornościowych. Można wnioskować, że PBLs wykazują oznaki wyczerpania, ponieważ wraz z pogarszającym się statusem periodontologicznym pacjenta chorującego na AD odpowiadają istotnie mniejszym wytwarzaniem cytokin pro- i przeciwzapalnych ważnych w odpowiedzi przeciwbakteryjnej.

Zwiększona ekspresja genu *AP-1* wiąże się z nasileniem stanu zapalnego przyzębia (PeD) u pacjentów z AD, co może także tłumaczyć większy wyrzut cytokin przez obwodowe komórki odpornościowe w odpowiedzi na LPS-PG.

Obciążenie stanem zapalnym przyzębia (PeD) nie jest związane z poziomem wrodzonej odporności u osób zdrowych poznawczo (ZDR). Tymczasem u osób z AD PeD i wrażliwość PBLs na zakażenie wirusowe mogą być ze sobą ujemnie skorelowane, co może wynikać ze zmienionego profilu komórek odpornościowych.

W wyniku zakażenia komórek VSV pacjenci z AD charakteryzowali się istotnie niższymi stężeniami wydzielonych cytokin prozapalnych w związku z tym można przypuszczać, że cechują się oni ogólnie niższą wrodzoną odpornością niż osoby zdrowe.

Badane polimorfizmy genów *APOE* (rs429358;rs7412), *HLA-DRB1* (rs9270856), *HLA-DRA* (rs3135344), *HLA-DQA1* (rs9272105), *FCGR2A* (R/H131) nie są związane z większą odpowiedzią zapalną u pacjentów z AD obciążonych dodatkowo PeD.

Mikrobiota jamy ustnej różni się między osobami zdrowymi poznawczo a chorymi z AD. Pacjenci z AD charakteryzowali się wyższym udziałem *Bacteroidetes* i niższym *Proteobacteria* niż osoby zdrowe poznawczo. Obecność *Bacteroidetes* spp. może być związana z patogenezą AD. Chorzy z AD charakteryzują się wyższą przeciętną względną obfitością bakterii z rodziny *Porphyromonadaceae* niż osoby zdrowe. Występuje u nich także wyższa względna obfitość bakterii *Porphyromonas* spp.

Specyficzny skład mikrobioty i stosunek jednych szczepów do drugich może być związany z obecnością ogólnoustrojowego stanu zapalnego.

6. WNIOSKI KOŃCOWE

1. Obecnie priorytetem w dziedzinie zdrowia psychicznego powinno być wdrożenie diagnostyki stanu zapalnego przyzębia (paradontoza) wśród osób z zaburzeniami funkcji poznawczych oraz demencją, zwłaszcza typu alzheimerowskiego (AD).
2. Należy rozważyć włączenie leczenia paradontozy na stałe do protokołu leczenia/postępowania z pacjentami demencyjnymi, ale także z osobami wykazującymi łagodne zaburzenia poznawcze.
3. Paradontoza, jako choroba infekcyjna i zapalna, jest dodatkowym, znacznym, obciążeniem dla układu odpornościowego pacjentów cierpiących na chorobę Alzheimera, co wpływa na ogólną kondycję i status obwodowych komórek odpornościowych oraz powoduje utrzymywanie się przewlekłego ogólnoustrojowego stanu zapalnego o niskim nasileniu.
4. U pacjentów z chorobą Alzheimera działanie obwodowego układu odpornościowego jest znacznie osłabione, przez co nie jest on wydolny w walce z czynnikami zakaźnymi. Komórki odpornościowe wykazują oznaki wyczerpania, a w obecności antygenów bakteryjnych czy wirusowych ulegają nadmiernej aktywacji. W przyszłości należy zatem rozważyć włączenie terapii poprawiających deficyty immunologiczne wśród osób z zaburzeniami poznawczymi i demencją typu AD.
5. Personel medyczny tj. pielęgniarki, lekarze psychiatrzy oraz stomatolodzy powinni być szkoleni w kierunku bieżącego informowania pacjentów o koniecznej profilaktyce paradontozy, aby uniknąć przyszłych konsekwencji dla zdrowia psychicznego.

7. PRZYSZŁE KIERUNKI BADAŃ

Rezultaty badań wykonanych w niniejszej pracy pokazują, że paradontoza, czyli stan zapalny przyzębia, jest czynnikiem inicjującym rozwój i sprzyjającym progresji zaburzeń poznawczych i choroby Alzheimera m.in. poprzez negatywny wpływ na obwodowy układ odpornościowy. Miejscowy stan zapalny, toczący się przez lata powoduje przejście w ogólnoustrojowe obciążenie zapalne, co prowadzi do dysfunkcji i niewydolności komórek odpornościowych. Dokładne mechanizmy związane z zaburzeniem wrodzonych jak i nabytych reakcji odpornościowych to dalszy kierunek badań w tym obszarze.

W przyszłości wyniki przedstawionych tu badań powinny zostać wykorzystane do podnoszenia świadomości społeczeństwa na temat zdrowia i higieny jamy ustnej jako ważnego czynnika profilaktycznego w walce z chorobami demencyjnymi takimi jak choroba Alzheimera.

Należy wykorzystać wyniki niniejszej pracy w planowaniu dalszych badań naukowych, badań eksperymentalnych i klinicznych, mających na celu wykazanie czy leczenie paradontozy może korzystnie wpłynąć na obwodowy układ odpornościowy, zmniejszyć deficyty immunologiczne oraz poprawić jakość życia chorych, a w konsekwencji także zredukować bądź spowolnić postęp zaburzeń poznawczych i choroby Alzheimera.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Lamprey RNL, Chaulagain B, Trivedi R, Gothwal A, Layek B, Singh J. A Review of the Common Neurodegenerative Disorders: Current Therapeutic Approaches and the Potential Role of Nanotherapeutics. *Int J Mol Sci.* **2022**; 23(3):1851.
2. Goedert M, Spillantini MG. A century of Alzheimer's disease. *Science.* **2006**; 314(5800):777–81, 2006.
3. 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* **2023**; 19(4):1598–695.
4. Zhang XX, Tian Y, Wang ZT, Ma YH, Tan L, Yu JT. The Epidemiology of Alzheimer's Disease Modifiable Risk Factors and Prevention. *J Prev Alzheimers Dis.* **2021**; 8(3):313–21.
5. Dementia in Europe Yearbook 2019 Estimating the prevalence of dementia in Europe. [dostęp dnia 7 listopada **2022**: https://www.alzheimer-europe.org/sites/default/files/alzheimer_europe_dementia_in_europe_yearbook_2019.pdf]
6. Global status report on the public health response to dementia. [dostęp dnia 20 lutego **2023**: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240033245>]
7. The top 10 causes of death. [dostęp dnia 1 marca **2023**: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>]
8. Ahmad F, Zulifqar H, Malik T. Classification of Alzheimer disease among susceptible brain regions. *Int J Imaging Syst Technol.* **2019**; 29(3):222–33.
9. Bekdash RA. The Cholinergic System, the Adrenergic System and the Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* **2021**; 28;22(3):1273.
10. Soares C, Da Ros LU, Machado LS, Rocha A, Lazzarotto G, Carello-Collar G, et al. The glutamatergic system in Alzheimer's disease: a systematic review with meta-analysis. *Mol Psychiatry.* **2024**; 16;1–13.
11. Pal MM. Glutamate: The Master Neurotransmitter and Its Implications in Chronic Stress and Mood Disorders. *Front Hum Neurosci.* **2021**; 29;15:722323.
12. Vermunt L, Sikkes SAM, van den Hout A, Handels R, Bos I, van der Flier WM, et al. Duration of Preclinical, Prodromal and Dementia Alzheimer Disease Stages in Relation to Age, Sex, and APOE genotype. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc.* **2019**; 15(7):888–98.
13. Andrade-Guerrero J, Santiago-Balmaseda A, Jeronimo-Aguilar P, Vargas-Rodríguez I, Cadena-Suárez AR, Sánchez-Garibay C, et al. Alzheimer's Disease: An Updated Overview of Its Genetics. *Int J Mol Sci.* **2023**; 24(4):3754.
14. Cao J, Hou J, Ping J, Cai D. Advances in developing novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* **2018**; 13(1):64.
15. Sutherland K, Li T, Cao C. Alzheimer's Disease and the Immune System. *SOJ Neurol.* **2015**; 2(1).

16. Salloway S, Chalkias S, Barkhof F, Burkett P, Barakos J, Purcell D, et al. Amyloid-Related Imaging Abnormalities in 2 Phase 3 Studies Evaluating Aducanumab in Patients With Early Alzheimer Disease. *JAMA Neurol.* **2022**; 79(1):1–10.
17. Knopman DS, Jones DT, Greicius MD. Failure to demonstrate efficacy of aducanumab: An analysis of the EMERGE and ENGAGE trials as reported by Biogen, December 2019. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc.* **2021**; 17(4):696–701.
18. van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P, Bateman RJ, Chen C, Gee M, et al. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.* **2023**; 388(1):9–21.
19. Li Y, Macyszko JR, Liu CC, Bu G. ApoE4 reduction: An emerging and promising therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* **2022**; 115:20–8.
20. Flowers SA, Rebeck GW. APOE in the normal brain. *Neurobiol Dis.* **2020**; 136:104724.
21. Kloske CM, Wilcock DM. The Important Interface Between Apolipoprotein E and Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Front Immunol.* **2020**; 11:754.
22. Abondio P, Sazzini M, Garagnani P, Boattini A, Monti D, Franceschi C, et al. The Genetic Variability of APOE in Different Human Populations and Its Implications for Longevity. *Genes.* **2019**; 10(3):222.
23. Livingston G, Huntley J, Liu KY, Costafreda SG, Selbæk G, Alladi S, et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2024 report of the Lancet standing Commission. *The Lancet.* **2024**; 404(10452):572–628.
24. Armstrong RA. Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol.* **2019**; 57(2):87–105.
25. Dziedzic A. Is Periodontitis Associated with Age-Related Cognitive Impairment? The Systematic Review, Confounders Assessment and Meta-Analysis of Clinical Studies. *Int J Mol Sci.* **2022**; 23(23):15320.
26. Baumgart M, Snyder HM, Carrillo MC, Fazio S, Kim H, Johns H. Summary of the evidence on modifiable risk factors for cognitive decline and dementia: A population-based perspective. *Alzheimers Dement.* **2015**; 11(6):718–26.
27. Nasb M, Tao W, Chen N. Alzheimer's Disease Puzzle: Delving into Pathogenesis Hypotheses. *Aging Dis.* **2024**; 15(1):43–73.
28. Butler L, Walker KA. The Role of Chronic Infection in Alzheimer's Disease: Instigators, Co-conspirators, or Bystanders? *Curr Clin Microbiol Rep.* **2021**.
29. Wu KM, Zhang YR, Huang YY, Dong Q, Tan L, Yu JT. The role of the immune system in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev.* **2021**; 70:101409.
30. Orobets KS, Karamyshev AL. Amyloid Precursor Protein and Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* **2023**; 24(19):14794.
31. Moir RD, Lathe R, Tanzi RE. The antimicrobial protection hypothesis of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* **2018**; 14(12):1602–14.
32. Kumar A, Singh A, Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol Rep.* **2015**; 67(2):195–203.

33. Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int J Nanomedicine*. **2019**;14:5541–54.
34. Scheres SHW. Alzheimer's plaques and tangles revealed by 3D microscopy. *Nature*. **2024**; 631(8022):747–8.
35. Morley JE, Farr SA, Nguyen AD, Xu F. What is the Physiological Function of Amyloid-Beta Protein? *J Nutr Health Aging*. **2019**; 23(3):225–6.
36. Gosztyla ML, Brothers HM, Robinson SR. Alzheimer's Amyloid- β is an Antimicrobial Peptide: A Review of the Evidence. *J Alzheimers Dis*. **2018**; 62(4):1495–506.
37. Prosswimmer T, Heng A, Daggett V. Mechanistic insights into the role of amyloid- β in innate immunity. *Sci Rep*. **2024**; 14(1):5376.
38. Tapia-Rojas C, Cabezas-Opazo F, Deaton CA, Vergara EH, Johnson GVW, Quintanilla RA. It's all about tau. *Prog Neurobiol*. **2019**; 175:54–76.
39. Kurkinen M, Futek M, Futek K, Beszlej JA, Kurpas D, Leszek J. The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: Should We Change Our Thinking? *Biomolecules*. **2023**; 13(3):453.
40. Zhang Y, Chen H, Li R, Sterling K, Song W. Amyloid β -based therapy for Alzheimer's disease: challenges, successes and future. *Signal Transduct Target Ther*. **2023**; 8(1):1–26.
41. Barbé-Tuana F, Funchal G, Schmitz CRR, Maurmann RM, Bauer ME. The interplay between immunosenescence and age-related diseases. *Semin Immunopathol*. **2020**; 42(5):545–57.
42. Walker KA, Le Page LM, Terrando N, Duggan MR, Heneka MT, Bettcher BM. The role of peripheral inflammatory insults in Alzheimer's disease: a review and research roadmap. *Mol Neurodegener*. **2023**; 18(1):37.
43. Medzhitov R. The spectrum of inflammatory responses. *Science*. **2021**; 374(6571):1070–5.
44. Furman D, Campisi J, Verdin E, Carrera-Bastos P, Targ S, Franceschi C, et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med*. **2019**; 25(12):1822–32.
45. Jorfi M, Maaser-Hecker A, Tanzi RE. The neuroimmune axis of Alzheimer's disease. *Genome Med*. **2023**; 15(1):6.
46. Guo L, Li X, Gould T, Wang ZY, Cao W. T cell aging and Alzheimer's disease. *Front Immunol*. **2023**; 14.
47. Konsman JP. Cytokines in the Brain and Neuroinflammation: We Didn't Starve the Fire! *Pharmaceuticals*. **2022**; 15(2):140.
48. Callender LA, Carroll EC, Beal RWJ, Chambers ES, Nourshargh S, Akbar AN, et al. Human CD8⁺ EMRA T cells display a senescence-associated secretory phenotype regulated by p38 MAPK. *Aging Cell*. **2018**; 17(1):e12675.

49. Spangenberg EE, Green KN. Inflammation in Alzheimer's Disease: Lessons learned from microglia-depletion models. *Brain Behav Immun*. **2017**; 61:1–11.
50. Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol*. **2017**; 35:441–68.
51. Woodburn SC, Bollinger JL, Wohleb ES. The semantics of microglia activation: neuroinflammation, homeostasis, and stress. *J Neuroinflammation*. **2021**; 18(1):258.
52. Li K, Li J, Zheng J, Qin S. Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. *Aging Dis*. **2019**; 10(3):664–75.
53. Gradisnik L, Velnar T. Astrocytes in the central nervous system and their functions in health and disease: A review. *World J Clin Cases*. **2023**; 11(15):3385–94.
54. Sochocka M, Diniz BS, Leszek J. Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? *Mol Neurobiol*. **2017**; 54(10):8071–89.
55. Ding ZB, Song LJ, Wang Q, Kumar G, Yan YQ, Ma CG. Astrocytes: a double-edged sword in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res*. **2021**; 16(9):1702–10.
56. Di Benedetto S, Müller L, Wenger E, Düzel S, Pawelec G. Contribution of neuroinflammation and immunity to brain aging and the mitigating effects of physical and cognitive interventions. *Neurosci Biobehav Rev*. **2017**; 75:114–28.
57. O'Donovan A, Baborik A, Sidney S, Launer LJ, Yaffe K. Relationships of Inflammation Trajectories with White Matter Volume and Integrity in Midlife. *Brain Behav Immun*. **2021**; 91:81–8.
58. Walker KA, Windham BG, Power MC, Hoogeveen RC, Folsom AR, Ballantyne CM, et al. The association of mid-to late-life systemic inflammation with white matter structure in older adults: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Neurobiol Aging*. **2018**; 68:26–33.
59. Lindbergh CA, Casaletto KB, Staffaroni AM, Elahi F, Walters SM, You M, et al. Systemic Tumor Necrosis Factor-Alpha Trajectories Relate to Brain Health in Typically Aging Older Adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. **2020**; 75(8):1558–65.
60. Darweesh SKL, Wolters FJ, Ikram MA, de Wolf F, Bos D, Hofman A. Inflammatory markers and the risk of dementia and Alzheimer's disease: A meta-analysis. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc*. **2018**; 14(11):1450–9.
61. Koyama A, O'Brien J, Weuve J, Blacker D, Metti AL, Yaffe K. The role of peripheral inflammatory markers in dementia and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. **2013**; 68(4):433–40.
62. Gross AL, Walker KA, Moghekar AR, Pettigrew C, Soldan A, Albert MS, et al. Plasma Markers of Inflammation Linked to Clinical Progression and Decline During Preclinical AD. *Front Aging Neurosci*. **2019**; 11:229.
63. Bowirrat A. Immunosenescence and Aging: Neuroinflammation Is a Prominent Feature of Alzheimer's Disease and Is a Likely Contributor to Neurodegenerative Disease Pathogenesis. *J Pers Med*. **2022**; 12(11):1817.

64. Le Page A, Dupuis G, Frost EH, Larbi A, Pawelec G, Witkowski JM, et al. Role of the peripheral innate immune system in the development of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.* **2018**; 107:59–66.
65. Adamu A, Li S, Gao F, Xue G. The role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases: current understanding and future therapeutic targets. *Front Aging Neurosci.* **2024**; 16.
66. Shen XN, Niu LD, Wang YJ, Cao XP, Liu Q, Tan L, et al. Inflammatory markers in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis and systematic review of 170 studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **2019**; 90(5):590–8.
67. Nevalainen T, Autio A, Hurme M. Composition of the infiltrating immune cells in the brain of healthy individuals: effect of aging. *Immun Ageing.* **2022**; 19(1):45.
68. Guo Y, Zeng H, Gao C. The Role of Neutrophil Extracellular Traps in Central Nervous System Diseases and Prospects for Clinical Application. *Oxid Med Cell Longev.* 2021; **2021**:9931742.
69. Spiteri AG, Wishart CL, Pamphlett R, Locatelli G, King NJC. Microglia and monocytes in inflammatory CNS disease: integrating phenotype and function. *Acta Neuropathol (Berl).* **2022**; 143(2):179–224.
70. Cabeza-Cabrerizo M, Cardoso A, Minutti CM, Pereira da Costa M, Reis e Sousa C. Dendritic Cells Revisited. *Annu Rev Immunol.* **2021**; 39:131–66.
71. Zhang Y, Fung ITH, Sankar P, Chen X, Robison LS, Ye L, et al. Depletion of NK Cells Improves Cognitive Function in the Alzheimer Disease Mouse Model. *J Immunol.* **2020**; 205(2):502–10.
72. Kinney JW, Bemiller SM, Murtishaw AS, Leisgang AM, Salazar AM, Lamb BT. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement Transl Res Clin Interv.* **2018**; 4:575–90.
73. Butler L, Walker KA. The Role of Chronic Infection in Alzheimer's Disease: Instigators, Co-conspirators, or Bystanders? *Curr Clin Microbiol Rep.* **2021**; 8(4):199–212.
74. Abbott A. Are infections seeding some cases of Alzheimer's disease? *Nature.* **2020**; 587(7832):22–5.
75. Sochocka M, Donskow-Łysoniewska K, Diniz BS, Kurpas D, Brzozowska E, Leszek J. The Gut Microbiome Alterations and Inflammation-Driven Pathogenesis of Alzheimer's Disease-a Critical Review. *Mol Neurobiol.* **2019**; 56(3):1841–51.
76. Landry RL, Embers ME. Does Dementia Have a Microbial Cause? *NeuroSci.* **2022**; 3(2):262–83.
77. Teixeira FB, Saito MT, Matheus FC, Prediger RD, Yamada ES, Maia CSF, et al. Periodontitis and Alzheimer's Disease: A Possible Comorbidity between Oral Chronic Inflammatory Condition and Neuroinflammation. *Front Aging Neurosci.* **2017**; 9:327.
78. Prapas P, Anagnostouli M. Macrophages and HLA-Class II Alleles in Multiple Sclerosis: Insights in Therapeutic Dynamics. *Int J Mol Sci.* **2024**; 25(13):7354.

79. Sait A, Angeli C, Doig AJ, Day PJR. Viral Involvement in Alzheimer's Disease. *ACS Chem Neurosci*. **2021**; 12(7):1049–60.
80. Dobson CB, Itzhaki RF. Herpes simplex virus type 1 and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. **1999**; 20(4):457–65.
81. Yong SJ, Yong MH, Teoh SL, Soga T, Parhar I, Chew J, et al. The Hippocampal Vulnerability to Herpes Simplex Virus Type I Infection: Relevance to Alzheimer's Disease and Memory Impairment. *Front Cell Neurosci*. **2021**; 15:695738.
82. Jamieson GA, Maitland NJ, Wilcock GK, Craske J, Itzhaki RF. Latent herpes simplex virus type 1 in normal and Alzheimer's disease brains. *J Med Virol*. **1991**; 33(4):224–7.
83. Itzhaki RF. Overwhelming Evidence for a Major Role for Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV1) in Alzheimer's Disease (AD); Underwhelming Evidence against. *Vaccines*. **2021**; 9(6):679.
84. Huang SY, Yang YX, Kuo K, Li HQ, Shen XN, Chen SD, et al. Herpesvirus infections and Alzheimer's disease: a Mendelian randomization study. *Alzheimers Res Ther*. **2021**; 13(1):158.
85. Ochnik M, Sochocka M. Role of viral infections in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Postępy Hig Med Dośw*. **2018**; 72:861–74.
86. Levine KS, Leonard HL, Blauwendraat C, Iwaki H, Johnson N, Bandres-Ciga S, et al. Virus exposure and neurodegenerative disease risk across national biobanks. *Neuron*. **2023**; 111(7):1086-1093.e2.
87. Gérard HC, Dreses-Werringloer U, Wildt KS, Deka S, Oszust C, Balin BJ, et al. Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae in the Alzheimer's brain. *FEMS Immunol Med Microbiol*. **2006**; 48(3):355–66.
88. Balin BJ, Gérard HC, Arking EJ, Appelt DM, Branigan PJ, Abrams JT, et al. Identification and localization of Chlamydia pneumoniae in the Alzheimer's brain. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. **1998**; 187(1):23–42.
89. Gérard HC, Wildt KL, Whittum-Hudson JA, Lai Z, Ager J, Hudson AP. The load of Chlamydia pneumoniae in the Alzheimer's brain varies with APOE genotype. *Microb Pathog*. **2005**; 39(1–2):19–26.
90. Balin BJ, Hammond CJ, Little CS, Hingley ST, Al-Atrache Z, Appelt DM, et al. Chlamydia pneumoniae: An Etiologic Agent for Late-Onset Dementia. *Front Aging Neurosci*. **2018**; 10:302.
91. Gérard HC, Fomicheva E, Whittum-Hudson JA, Hudson AP. Apolipoprotein E4 enhances attachment of Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae elementary bodies to host cells. *Microb Pathog*. **2008**; 44(4):279–85.
92. Bashir SK, Khan MB. Overview of *Helicobacter pylori* Infection, Prevalence, Risk Factors, and Its Prevention. *Adv Gut Microbiome Res*. **2023**; 2023:e9747027.
93. Kountouras J, Chatzopoulos D, Zavos C. Reactive oxygen metabolites and upper gastrointestinal diseases. *Hepatogastroenterology*. **2001**; 48(39):743–51.

94. Cuomo P, Papaiani M, Sansone C, Iannelli A, Iannelli D, Medaglia C, et al. An In Vitro Model to Investigate the Role of Helicobacter Pylori in Type 2 Diabetes, Obesity, Alzheimer's Disease and Cardiometabolic Disease. *Int J Mol Sci.* **2020**; 21(21):8369.
95. Doulberis M, Kotronis G, Thomann R, Polyzos SA, Boziki M, Gialamprinou D, et al. Review: Impact of Helicobacter pylori on Alzheimer's disease: What do we know so far? *Helicobacter.* **2018**; 23(1).
96. Roubaud-Baudron C, Krolak-Salmon P, Quadrio I, Mégraud F, Salles N. Impact of chronic Helicobacter pylori infection on Alzheimer's disease: preliminary results. *Neurobiol Aging.* **2012**; 33(5):1009.e11-1009.e19.
97. Cole JR. 5 - Spirochetes. In: Carter GR, Cole JR, editors. Diagnostic Procedure in Veterinary Bacteriology and Mycology (Fifth Edition). *San Diego: Academic Press*; **1990**, str.41–60.
98. Herrera-Landero A, Amaya-Sánchez LE, D Hyver de Las-Deses C, Solórzano-Santos F, Gordillo-Pérez MG. Borrelia burgdorferi as a risk factor for Alzheimer's dementia and mild cognitive impairment. *Eur Geriatr Med.* **2019**; 10(3):493–500.
99. Miklossy J. Biology and Neuropathology of Dementia in Syphilis and Lyme Disease. Handbook of Clinical Neurology. *Elsevier*; **2008**; 89: 825–44.
100. Miklossy J. Bacterial Amyloid and DNA are Important Constituents of Senile Plaques: Further Evidence of the Spirochetal and Biofilm Nature of Senile Plaques. *J Alzheimers Dis JAD.* **2016**; 53(4):1459–73.
101. Zhou Y, Blanco L, Smith DR, Chapman MR. Bacterial Amyloids. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* **2012**; 849:303–20.
102. Miller AL, Bessho S, Grando K, Tükel Ç. Microbiome or Infections: Amyloid-Containing Biofilms as a Trigger for Complex Human Diseases. *Front Immunol.* **2021**;12.
103. Tükel C, Wilson RP, Nishimori JH, Pezeshki M, Chromy BA, Bäumlér AJ. Responses to amyloids of microbial and host origin are mediated through toll-like receptor 2. *Cell Host Microbe.* **2009**; 6(1):45–53.
104. Montiel-Castro A, González-Cervantes R, Bravo-Ruiseco G, Pacheco-Lopez G. The microbiota-gut-brain axis: neurobehavioral correlates, health and sociality. *Front Integr Neurosci.* **2013**; 7.
105. Vogt NM, Kerby RL, Dill-McFarland KA, Harding SJ, Merluzzi AP, Johnson SC, et al. Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Sci Rep.* **2017**; 7:13537.
106. Lukiw WJ. Bacteroides fragilis Lipopolysaccharide and Inflammatory Signaling in Alzheimer's Disease. *Front Microbiol.* **2016**; 7:1544.
107. Foster JA. Modulating brain function with microbiota. *Science.* **2022**; 376(6596):936–7.
108. Gao Y, Li D, Liu YX. Microbiome research outlook: past, present, and future. *Protein Cell.* **2023**; 14(10):709–12.
109. Yoo JY, Groer M, Dutra SVO, Sarkar A, McSkimming DI. Gut Microbiota and Immune System Interactions. *Microorganisms.* **2020**; 8(10):1587.

110. Tuganbaev T, Yoshida K, Honda K. The effects of oral microbiota on health. *Science*. **2022**; 376(6596):934–6.
111. Aguayo S, Schuh CMAP, Vicente B, Aguayo LG. Association between Alzheimer's Disease and Oral and Gut Microbiota: Are Pore Forming Proteins the Missing Link? *J Alzheimers Dis*. **2018**; 65(1):29–46.
112. Orr ME, Reveles KR, Yeh C, Young EH, Han X. Can oral health and oral-derived biospecimens predict progression of dementia? *Oral Dis*. **2020**; 26(2):249–58.
113. Sureda A, Daglia M, Argüelles Castilla S, Sanadgol N, Fazel Nabavi S, Khan H, et al. Oral microbiota and Alzheimer's disease: Do all roads lead to Rome? *Pharmacol Res*. **2019**; 104582.
114. Aragón F, Zea-Sevilla MA, Montero J, Sancho P, Corral R, Tejedor C, et al. Oral health in Alzheimer's disease: a multicenter case-control study. *Clin Oral Investig*. **2018**; 22(9):3061–70.
115. Socransky S s., Haffajee A d., Cugini M a., Smith C, Kent Jr. RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. **1998**; 25(2):134–44.
116. Peres MA, Macpherson LMD, Weyant RJ, Daly B, Venturelli R, Mathur MR, et al. Oral diseases: a global public health challenge. *The Lancet*. **2019**; 394(10194):249–60.
117. Hajishengallis G, Chavakis T, Lambris JD. Current understanding of periodontal disease pathogenesis and targets for host-modulation therapy. *Periodontol 2000*. **2020**; 84(1):14–34.
118. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primer*. **2017**; 3:17038.
119. Carrizales-Sepúlveda EF, Ordaz-Farías A, Vera-Pineda R, Flores-Ramírez R. Periodontal Disease, Systemic Inflammation and the Risk of Cardiovascular Disease. *Heart Lung Circ*. **2018**; 27(11):1327–34.
120. Hashioka S, Inoue K, Miyaoka T, Hayashida M, Wake R, Oh-Nishi A, et al. The Possible Causal Link of Periodontitis to Neuropsychiatric Disorders: More Than Psychosocial Mechanisms. *Int J Mol Sci*. **2019**; 20(15):3723.
121. Sedghi LM, Bacino M, Kapila YL. Periodontal Disease: The Good, The Bad, and The Unknown. *Front Cell Infect Microbiol*. **2021**; 11:766944.
122. Nędzi-Góra M, Kowalski J, Górska R. The Immune Response in Periodontal Tissues. *Arch Immunol Ther Exp*. **2017**; 65(5):421–9.
123. Scannapieco FA, Cantos A. Oral inflammation and infection, and chronic medical diseases: implications for the elderly. *Periodontol 2000*. **2016**; 72(1):153–75.
124. Wu DT, Cho YW, Spalti MD, Bishara M, Nguyen TT. The link between periodontitis and Alzheimer's disease – emerging clinical evidence. *Dent Rev*. **2023**; 3(1):100062.
125. Gaur S, Agnihotri R. Alzheimer's disease and chronic periodontitis: is there an association? *Geriatr Gerontol Int*. **2015**; 15(4):391–404.

126. Cichońska D, Mazuś M, Kusiak A. Recent Aspects of Periodontitis and Alzheimer's Disease—A Narrative Review. *Int J Mol Sci.* **2024**; 25(5):2612.
127. Chen CK, Wu YT, Chang YC. Association between chronic periodontitis and the risk of Alzheimer's disease: a retrospective, population-based, matched-cohort study. *Alzheimers Res Ther.* **2017**; 9:56.
128. Demmer RT, Norby FL, Lakshminarayan K, Walker KA, Pankow JS, Folsom AR, et al. Periodontal disease and incident dementia: The Atherosclerosis Risk in Communities Study (ARIC). *Neurology.* **2020**; 95(12):e1660–71.
129. Tang Z, Cheng X, Su X, Wu L, Cai Q, Wu H. *Treponema denticola* Induces Alzheimer-Like Tau Hyperphosphorylation by Activating Hippocampal Neuroinflammation in Mice. *J Dent Res.* **2022**; 101(8):992–1001.
130. Wu L, Su X, Tang Z, Jian L, Zhu H, Cheng X, et al. *Treponema denticola* Induces Neuronal Apoptosis by Promoting Amyloid- β Accumulation in Mice. *Pathog Basel Switz.* **2022**; 11(10):1150.
131. Ilievski V, Zuchowska PK, Green SJ, Toth PT, Ragozzino ME, Le K, et al. Chronic oral application of a periodontal pathogen results in brain inflammation, neurodegeneration and amyloid beta production in wild type mice. *PloS One.* **2018**; 13(10):e0204941.
132. Wu Z, Ni J, Liu Y, Teeling JL, Takayama F, Collicutt A, et al. Cathepsin B plays a critical role in inducing Alzheimer's disease-like phenotypes following chronic systemic exposure to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in mice. *Brain Behav Immun.* **2017**; 65:350–61.
133. Dominy SS, Lynch C, Ermini F, Benedyk M, Marczyk A, Konradi A, et al. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv.* **2019**; 5(1):eaau3333.
134. Yamada C, Akkaoui J, Ho A, Duarte C, Deth R, Kawai T, et al. Potential Role of Phosphoglycerol Dihydroceramide Produced by Periodontal Pathogen *Porphyromonas gingivalis* in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Front Immunol.* **2020**; 11:591571.
135. Cryan JF, Mazmanian SK. Microbiota-brain axis: Context and causality. *Science.* **2022**; 376(6596):938–9.
136. Itzhaki RF, Golde TE, Heneka MT, Readhead B. Do infections have a role in the pathogenesis of Alzheimer disease? *Nat Rev Neurol.* **2020**; 16(4):193–7.
137. Schwahn C, Frenzel S, Holtfreter B, Van der Auwera S, Pink C, Bülow R, et al. Effect of periodontal treatment on preclinical Alzheimer's disease-Results of a trial emulation approach. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc.* **2022**; 18(1):127–41.
138. Shojaei S, Basso J, Amereh M, Alizadeh J, Dehesh T, Rosa SDS, et al. A multi-omics analysis of glioma chemoresistance using a hybrid microphysiological model of glioblastoma. *bioRxiv*; **2022**; 2022.10.29.514383.
139. SDHA Human qPCR Primer Pair (NM_004168) – HP207523 | OriGene. [dostęp: https://www.origene.com/catalog/gene-expression/qpcr-primer-pairs/hp207523/sdha-human-qpcr-primer-pair-nm_004168].

140. Zhou T, Sang YH, Cai S, Xu C, Shi M hua. The requirement of mitochondrial RNA polymerase for non-small cell lung cancer cell growth. *Cell Death Dis.* **2021**;12(8):751.
141. Bhardwaj M, Lee JJ, Versace AM, Harper SL, Goldman AR, Crissey MAS, et al. Lysosomal lipid peroxidation regulates tumor immunity. *J Clin Invest.* **2023**;133(8).
142. Moynihan BJ, Tolloczko B, Bassam SE, Ferraro P, Michoud MC, Martin JG, et al. IFN- γ , IL-4 and IL-13 modulate responsiveness of human airway smooth muscle cells to IL-13. *Respir Res.* **2008**; 9(1):84.
143. Fourouclas N, Li J, Gilby DC, Campbell PJ, Beer PA, Boyd EM, et al. Methylation of the suppressor of cytokine signaling 3 gene (SOCS3) in myeloproliferative disorders. *Haematologica.* **2008**; 93(11):1635–44.
144. García-Vílchez R, Añazco-Guenkova AM, Dietmann S, López J, Morón-Calvente V, D'Ambrosi S, et al. METTL1 promotes tumorigenesis through tRNA-derived fragment biogenesis in prostate cancer. *Mol Cancer.* **2023**;22:119.
145. Tarighi S, Montazeri M, Rohollah F. New Perspective on the Action Mechanism of Doxorubicin in Breast Cancer- Overexpressions of miR-874-3p and miR-337-3p and Downregulation of STAT3 Gene. *Hum Genet Genomics.* **2023**;7(1):0–0.
146. Liu MQ, Zhou DJ, Wang X, Zhou W, Ye L, Li JL, et al. IFN- λ 3 Inhibits HIV Infection of Macrophages through the JAK-STAT Pathway. *PLoS ONE.* **2012**; 7(4):e35902.
147. Li H, Zhou T, Zhang Y, Jiang H, Zhang J, Hua Z. RuvBL1 Maintains Resistance to TRAIL-Induced Apoptosis by Suppressing c-Jun/AP-1 Activity in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Oncol.* **2021**; 11:679243.
148. He S, Zhang W, Li X, Wang J, Chen X, Chen Y, et al. Oral squamous cell carcinoma (OSCC)-derived exosomal MiR-221 targets and regulates phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1 (PIK3R1) to promote human umbilical vein endothelial cells migration and tube formation. *Bioengineered.* **2021**; 12(1):2164–74.
149. Grassi MA, Rao VR, Chen S, Cao D, Gao X, Cleary PA, et al. Lymphoblastoid Cell Lines as a Tool to Study Inter-Individual Differences in the Response to Glucose. *PloS One.* **2016**;11(8):e0160504.
150. Ramakrishnan MA. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol.* **2016**; 5(2):85–6.
151. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif.* **2001**; 25(4):402–8.
152. Fukuda K, Ogawa M, Taniguchi H, Saito M. Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. *J UOEH.* **2016**; 38(3):223–32.
153. Żebrowska-Różańska P. Rozprawa doktorska: Analiza mikrobioty jelitowej u dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu. Wrocław 2023.
154. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **2013**; 41(Database issue):D590–6.

155. Sakia RM. The Box-Cox Transformation Technique: A Review. *J R Stat Soc Ser Stat.* **1992**; 41(2):169–78.
156. Shannon CE. A Mathematical Theory of Communication. *Bell Syst Tech J.* **1948**; 27(3):379–423.
157. MacArthur R. Fluctuations of Animal Populations and a Measure of Community Stability. *Ecology.* **1955**; 36(3):533–6.
158. Pielou EC. The measurement of diversity in different types of biological collections. *J Theor Biol.* **1966**; 13:131–44.
159. Faith DP. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biol Conserv.* **1992**; 61(1):1–10.
160. Chao A. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scand J Stat.* **1984**; 11(4):265–70.
161. Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* **2005**; 71(12):8228–35.
162. Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* **2007**; 73(5):1576–85.
163. Dzwonko Z, Kozłowski W. Analiza głównych współrzędnych i jej zastosowanie w synekologii. **1980**.
164. Prajzner A. Wybrane wskaźniki wielkości efektu w badaniach psychologicznych. *Ann Univ Mariae Curie-Skłodowska Sect J – Paedagog-Psychol.* **2023**; 35(4):139–57.
165. Fritz CO, Morris PE, Richler JJ. Effect size estimates: current use, calculations, and interpretation. *J Exp Psychol Gen.* **2012**; 141(1):2–18.
166. Maher JM, Markey JC, Ebert-May D. The other half of the story: effect size analysis in quantitative research. *CBE Life Sci Educ.* **2013**; 12(3):345–51.
167. Ellis PD. The Essential Guide to Effect Sizes: Statistical Power, Meta-Analysis, and the Interpretation of Research Results. *Cambridge: Cambridge University Press*; **2010**.
168. Sawilowsky S. New Effect Size Rules of Thumb. *Theor Behav Found Educ Fac Publ.* **2009**
169. Tredoux C, Durrheim K. Numbers, hypotheses & conclusions: a course in statistics for the social sciences. 2nd ed. Lansdowne, Cape Town: *UCT Press*; **2013**, str. 534.
170. MORADI G, MOHAMADI BOLBANABAD A, MOINAFSHAR A, ADABI H, SHARAFI M, ZAREIE B. Evaluation of Oral Health Status Based on the Decayed, Missing and Filled Teeth (DMFT) Index. *Iran J Public Health.* **2019**; 48(11):2050–7.
171. Phillips MC. Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. *IUBMB Life.* **2014**; 66(9):616–23.
172. Hatters DM, Peters-Libeu CA, Weisgraber KH. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem Sci.* **2006**; 31(8):445–54.

173. Verghese PB, Castellano JM, Holtzman DM. Roles of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease and Other Neurological Disorders. *Lancet Neurol*. **2011**; 10(3):241–52.
174. Chen F, Ke Q, Wei W, Cui L, Wang Y. Apolipoprotein E and viral infection: Risks and Mechanisms. *Mol Ther Nucleic Acids*. **2023**; 33:529–42.
175. Harris SA, Harris EA. Molecular Mechanisms for Herpes Simplex Virus Type 1 Pathogenesis in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*. **2018**; 10:48.
176. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA*. **1997**; 278(16):1349–56.
177. Myers L, Sirois MJ. Spearman Correlation Coefficients, Differences between. *Encyclopedia of Statistical Sciences*. John Wiley & Sons. **2004**.
178. Douros A, Santella C, Dell'Aniello S, Azoulay L, Renoux C, Suissa S, et al. Infectious Disease Burden and the Risk of Alzheimer's Disease: A Population-Based Study. *J Alzheimers Dis JAD*. **2021**; 81(1):329–38.
179. Wang J, Gu BJ, Masters CL, Wang YJ. A systemic view of Alzheimer disease — insights from amyloid- β metabolism beyond the brain. *Nat Rev Neurol*. **2017**; 13(10):612–23.
180. Zhao M, Wang Y, Shen Y, Wei C, Zhang G, Sun L. A review of the roles of pathogens in Alzheimer's disease. *Front Neurosci*. **2024**; 18.
181. Huang Q, Dong X. Prevalence of periodontal disease in middle-aged and elderly patients and its influencing factors. *Am J Transl Res*. **2022**; 14(8):5677–84.
182. Park JC, Han SH, Mook-Jung I. Peripheral inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease: a brief review. *BMB Rep*. **2020**; 53(1):10–9.
183. Nadim R, Tang J, Dilmohamed A, Yuan S, Wu C, Bakre AT, et al. Influence of periodontal disease on risk of dementia: a systematic literature review and a meta-analysis. *Eur J Epidemiol*. **2020**; 35(9):821–33.
184. Leira Y, Domínguez C, Seoane J, Seoane-Romero J, Pías-Peleteiro JM, Takkouche B, et al. Is Periodontal Disease Associated with Alzheimer's Disease? A Systematic Review with Meta-Analysis. *Neuroepidemiology*. **2017**; 48(1–2):21–31.
185. Hu X, Zhang J, Qiu Y, Liu Z. Periodontal disease and the risk of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a systematic review and meta-analysis. *Psychogeriatr Off J Jpn Psychogeriatr Soc*. **2021**; 21(5):813–25.
186. Larvin H, Gao C, Kang J, Aggarwal VR, Pavitt S, Wu J. The impact of study factors in the association of periodontal disease and cognitive disorders: systematic review and meta-analysis. *Age Ageing*. **2023**; 52(2):afad015.
187. Kaliamoorthy S, Nagarajan M, Sethuraman V, Jayavel K, Lakshmanan V, Palla S. Association of Alzheimer's disease and periodontitis - a systematic review and meta-analysis of evidence from observational studies. *Med Pharm Rep*. **2022**; 95(2):144–51.

188. Gil-Montoya JA, Sanchez-Lara I, Carnero-Pardo C, Fornieles F, Montes J, Vilchez R, et al. Is periodontitis a risk factor for cognitive impairment and dementia? A case-control study. *J Periodontol*. **2015**; 86(2):244–53.
189. Kamer AR, Pirraglia E, Tsui W, Rusinek H, Vallabhajosula S, Mosconi L, et al. Periodontal disease associates with higher brain amyloid load in normal elderly. *Neurobiol Aging*. **2015**; 36(2):627–33.
190. Ide M, Harris M, Stevens A, Sussams R, Hopkins V, Culliford D, et al. Periodontitis and Cognitive Decline in Alzheimer’s Disease. *PloS One*. **2016**; 11(3):e0151081.
191. Lundergan W, Parthasarathy K, Knight N. Periodontitis and Alzheimer’s Disease: Is There a Connection? *Oral*. **2024**; 4(1):61–73.
192. Richartz-Salzbürger E, Batra A, Stransky E, Laske C, Köhler N, Bartels M, et al. Altered lymphocyte distribution in Alzheimer’s disease. *J Psychiatr Res*. **2007**; 41(1):174–8.
193. Chen SH, Bu XL, Jin WS, Shen LL, Wang J, Zhuang ZQ, et al. Altered peripheral profile of blood cells in Alzheimer disease: A hospital-based case-control study. *Medicine (Baltimore)*. **2017**; 96(21):e6843.
194. Pluta R, Ułamek-Kozioł M, Januszewski S, Czuczwar SJ. Platelets, lymphocytes and erythrocytes from Alzheimer’s disease patients: the quest for blood cell-based biomarkers. *Folia Neuropathol*. **2018**; 56(1):14–20.
195. Luo J, Thomassen JQ, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Frikke-Schmidt R. Blood Leukocyte Counts in Alzheimer Disease. *JAMA Netw Open*. **2022**; 5(10):e2235648.
196. Chen SH, Tian DY, Shen YY, Cheng Y, Fan DY, Sun HL, et al. Amyloid-beta uptake by blood monocytes is reduced with ageing and Alzheimer’s disease. *Transl Psychiatry*. **2020**; 10(1):423.
197. Thome AD, Faridar A, Beers DR, Thonhoff JR, Zhao W, Wen S, et al. Functional alterations of myeloid cells during the course of Alzheimer’s disease. *Mol Neurodegener*. **2018**; 13(1):61.
198. Minogue AM. Role of infiltrating monocytes/macrophages in acute and chronic neuroinflammation: Effects on cognition, learning and affective behaviour. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. **2017**; 79:15–8.
199. Canobbio I, Abubaker AA, Visconte C, Torti M, Pula G. Role of amyloid peptides in vascular dysfunction and platelet dysregulation in Alzheimer’s disease. *Front Cell Neurosci*. **2015**; 9.
200. Winchester LM, Powell J, Lovestone S, Nevado-Holgado AJ. Red blood cell indices and anaemia as causative factors for cognitive function deficits and for Alzheimer’s disease. *Genome Med*. **2018**; 10(1):51.
201. Arosio B, D’Addario C, Gussago C, Casati M, Tedone E, Ferri E, et al. Peripheral blood mononuclear cells as a laboratory to study dementia in the elderly. *BioMed Res Int*. **2014**; 2014:169203.

202. Esteras N, Alquézar C, de la Encarnación A, Martín-Requero Á. Lymphocytes in Alzheimer's disease pathology: Altered signaling pathways. *Curr Alzheimer Res.* **2016**; 13(4):439–49.
203. Chen Z, Balachandran YL, Chong WP, Chan KKY. Roles of Cytokines in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* **2024**; 25(11):5803.
204. Sochocka M, Sobczyński M, Sender-Janeczek A, Zwolińska K, Błachowicz O, Tomczyk T, et al. Association between Periodontal Health Status and Cognitive Abilities. The Role of Cytokine Profile and Systemic Inflammation. *Curr Alzheimer Res.* **2017**; 14(9):978–90.
205. Netea MG, Deuren M van, Kullberg BJ, Cavaillon JM, Meer JWMV der. Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? *Trends Immunol.* **2002**; 23(3):135–9.
206. Ogawa T, Asai Y, Hashimoto M, Takeuchi O, Kurita T, Yoshikai Y, et al. Cell activation by *Porphyromonas gingivalis* lipid A molecule through Toll-like receptor 4- and myeloid differentiation factor 88-dependent signaling pathway. *Int Immunol.* **2002**; 14(11):1325–32.
207. Schuster A, Nieboga E, Kantorowicz M, Lipska W, Kaczmarzyk T, Potempa J, et al. Gingival fibroblast activation by *Porphyromonas gingivalis* is driven by TLR2 and is independent of the LPS-TLR4 axis. *Eur J Immunol.* **2024**; 54(3):2350776.
208. Alizadehgharib S, Östberg A, Dahlstrand Rudin A, Dahlgren U, Christenson K. Immunological response of human leucocytes after exposure to lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis*. *Clin Exp Dent Res.* **2020**; 7(4):531–8.
209. Cohen N, Morisset J, Emilie D. Induction of Tolerance by *Porphyromonas gingivalis* on APCs: a Mechanism Implicated in Periodontal Infection. *J Dent Res.* **2004**; 83(5):429–33.
210. Gardiner CM, Mills KHG. The cells that mediate innate immune memory and their functional significance in inflammatory and infectious diseases. *Semin Immunol.* **2016**; 28(4):343–50.
211. Berker E, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Blocking proinflammatory cytokine release modulates peripheral blood mononuclear cell response to *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol.* **2013**; 84(9):1337–45.
212. Sun Z, Andersson R. NF-κB Activation and Inhibition: A Review. *Shock.* **2002**; 18(2):99.
213. Meng Q, Xia Y. c-Jun, at the crossroad of the signaling network. *Protein Cell.* **2011**; 2(11):889–98.
214. Sato M, Taniguchi T, Tanaka N. The interferon system and interferon regulatory factor transcription factors – studies from gene knockout mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2001**; 12(2):133–42.
215. Qi QR, Yang ZM. Regulation and function of signal transducer and activator of transcription 3. *World J Biol Chem.* **2014**; 5(2):231–9.
216. Claria J. Cyclooxygenase-2 Biology. *Curr Pharm Des.* **2003**; 9(27):2177–90.

217. Bainbridge BW, Darveau RP. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide: an unusual pattern recognition receptor ligand for the innate host defense system. *Acta Odontol Scand.* **2001**; 59(3):131–8.
218. Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava, Ukraine, Yelins'ka AM, Akimov OYe, Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava, Ukraine;, Kostenko VO, Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava, Ukraine; Role of AP-1 transcriptional factor in development of oxidative and nitrosative stress in periodontal tissues during systemic inflammatory response. *Ukr Biochem J.* **2019**; 91(1):80–5.
219. Zhao Q, Wen J, Ouyang X, Liu J, Liu W, Zhang S, et al. Whole-transcriptome analysis of periodontal tissue and construction of immune-related competitive endogenous RNA network. *BMC Oral Health.* **2022**; 22(1):370.
220. Zhu LF, Li L, Wang XQ, Pan L, Mei YM, Fu YW, et al. M1 macrophages regulate TLR4/AP1 via paracrine to promote alveolar bone destruction in periodontitis. *Oral Dis.* **2019**; 25(8):1972–82.
221. Liu X, Yin S, Chen Y, Wu Y, Zheng W, Dong H, et al. LPS-induced proinflammatory cytokine expression in human airway epithelial cells and macrophages via NF- κ B, STAT3 or AP-1 activation. *Mol Med Rep.* **2018**; 17(4):5484–91.
222. Orzechowska B, Antoszków Z, Błach-Olszewska Z. Individual differentiation of innate antiviral immunity in humans; the role of endogenous interferons and tumor necrosis factor in the immunity of leukocytes. *Arch Immunol Ther Exp.* **2003**; 51(1):51–60.
223. Paradowska E, Błach-Olszewska Z, Sender J, Jarosz W. Antiviral nonspecific immunity of human placenta at term: possible role of endogenous tumor necrosis factors and interferons. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res.* **1996**; 16(11):941–8.
224. Sochocka M, Ochnik M, Sobczyński M, Siemieniec I, Orzechowska B, Naporowski P, et al. New therapeutic targeting of Alzheimer's disease with the potential use of proline-rich polypeptide complex to modulate an innate immune response - preliminary study. *J Neuroinflammation.* **2019**; 16(1):137.
225. Tomczyk T, Wróbel G, Chaber R, Siemieniec I, Piasecki E, Krzystek-Korpacka M, et al. Immune Consequences of in vitro Infection of Human Peripheral Blood Leukocytes with Vesicular Stomatitis Virus. *J Innate Immun.* **2018**; 10(2):131–44.
226. Dopico J, Botelho J, Ouro A, Domínguez C, Machado V, Aramburu-Nuñez M, et al. Association between periodontitis and peripheral markers of innate immunity activation and inflammation. *J Periodontol.* **2023**; 94(1):11–9.
227. Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RR. Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* **2013**; 13(12):875–87.
228. Ennerfelt HE, Lukens JR. The Role of Innate Immunity in Alzheimer's Disease. *Immunol Rev.* **2020**; 297(1):225–46.
229. Tamburini B, Badami GD, La Manna MP, Shekarkar Azgomi M, Caccamo N, Dieli F. Emerging Roles of Cells and Molecules of Innate Immunity in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* **2023**; 24(15):11922.

230. Dickerson BC, Brickhouse M, McGinnis S, Wolk DA. Alzheimer's disease: The influence of age on clinical heterogeneity through the human brain connectome. *Alzheimers Dement Diagn Assess Dis Monit.* **2017**; 6:122–35.
231. Giau VV, Bagyinszky E, Yang YS, Youn YC, An SSA, Kim SY. Genetic analyses of early-onset Alzheimer's disease using next generation sequencing. *Sci Rep.* **2019**; 9(1):8368.
232. Johns P. Chapter 12 - Dementia. Johns P, editor. Clinical Neuroscience. *Churchill Livingstone.* **2014**; str. 145–62.
233. Anania JC, Chenoweth AM, Wines BD, Hogarth PM. The Human FcγRII (CD32) Family of Leukocyte FcR in Health and Disease. *Front Immunol.* **2019**; 10:464.
234. López-Martínez R, Albaiceta GM, Amado-Rodríguez L, Cuesta-Llavona E, Gómez J, García-Clemente M, et al. The FCGR2A rs1801274 polymorphism was associated with the risk of death among COVID-19 patients. *Clin Immunol Orlando Fla.* **2022**; 236:108954.
235. Forthal DN, Landucci G, Bream J, Jacobson LP, Phan TB, Montoya B. FcγRIIa Genotype Predicts Progression of HIV Infection1. *J Immunol.* **2007**; 179(11):7916–23.
236. Sanders LA, Feldman RG, Voorhorst-Ogink MM, de Haas M, Rijkers GT, Capel PJ, et al. Human immunoglobulin G (IgG) Fc receptor IIA (CD32) polymorphism and IgG2-mediated bacterial phagocytosis by neutrophils. *Infect Immun.* **1995**; 63(1):73–81.
237. Wang Z, Geng PL. CD32a polymorphism rs1801274 affects the risk of Kawasaki disease. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol.* **2020**; 48(1):620–6.
238. Asano K, Matsushita T, Umeno J, Hosono N, Takahashi A, Kawaguchi T, et al. A genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for ulcerative colitis in the Japanese population. *Nat Genet.* **2009**; 41(12):1325–9.
239. Zhu XW, Wang Y, Wei YH, Zhao PP, Wang XB, Rong JJ, et al. Comprehensive Assessment of the Association between FCGRs polymorphisms and the risk of systemic lupus erythematosus: Evidence from a Meta-Analysis. *Sci Rep.* **2016**; 6(1):31617.
240. Zhang C, Wang W, Zhang H, Wei L, Guo S. Association of FCGR2A rs1801274 polymorphism with susceptibility to autoimmune diseases: A meta-analysis. *Oncotarget.* **2016**; 7(26):39436–43.
241. Márquez Pete N, Maldonado Montoro M del M, Pérez Ramírez C, Martínez Martínez F, Martínez de la Plata JE, Daddaoua A, et al. Influence of the FCGR2A rs1801274 and FCGR3A rs396991 Polymorphisms on Response to Abatacept in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Pers Med.* **2021**; 11(6):573.
242. Kozicky LK, Menzies SC, Zhao ZY, Vira T, Harnden K, Safari K, et al. IVIg and LPS Co-stimulation Induces IL-10 Production by Human Monocytes, Which Is Compromised by an FcγRIIA Disease-Associated Gene Variant. *Front Immunol.* **2018**; 9:2676.
243. Kust SA, Ustiuzhanina MO, Streltsova MA, Shelyakin PV, Kryukov MA, Lutsenko GV, et al. HLA-DR Expression in Natural Killer Cells Marks Distinct Functional States, Depending on Cell Differentiation Stage. *Int J Mol Sci.* **2024**; 25(9):4609.

244. Raychaudhuri S, Sandor C, Stahl EA, Freudenberg J, Lee HS, Jia X, et al. Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* **2012**; 44(3):291–6.
245. Ayele FT, Adeyemo A, Finan C, Hailu E, Sinnott P, Burlinson ND, et al. HLA Class II Locus and Susceptibility to Podoconiosis. *N Engl J Med.* **2012**; 366(13):1200–8.
246. Lu RC, Yang W, Tan L, Sun FR, Tan MS, Zhang W, et al. Association of HLA-DRB1 polymorphism with Alzheimer's disease: a replication and meta-analysis. *Oncotarget.* **2017**; 8(54):93219–26.
247. Shigemizu D, Fukunaga K, Yamakawa A, Suganuma M, Fujita K, Kimura T, et al. The HLA-DRB1*09:01-DQB1*03:03 haplotype is associated with the risk for late-onset Alzheimer's disease in APOE ϵ 4-negative Japanese adults. *Npj Aging.* **2024**; 10(1):1–7.
248. Takashiba S, Ohyama H, Oyaizu K, Kogoe-Kato N, Murayama Y. HLA genetics for diagnosis of susceptibility to early-onset periodontitis. *J Periodontal Res.* **1999**; 34(7):374–8.
249. Branciamore S, Gogoshin G, Rodin AS, Myers AJ. Changes in expression of VGF, SPECC1L, HLA-DRA and RANBP3L act with APOE E4 to alter risk for late onset Alzheimer's disease. *Sci Rep.* **2024**; 14(1):14954.
250. Jones L, Holmans PA, Hamshere ML, Harold D, Moskvina V, Ivanov D, et al. Genetic Evidence Implicates the Immune System and Cholesterol Metabolism in the Aetiology of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE.* **2010**; 5(11):e13950.
251. Asadifard E, Hokmabadi M, Hashemi M, Bereimipour A. Linking gut microbiota dysbiosis to molecular pathways in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **2024**; 1845:149242.
252. Ning M, An L, Dong L, Zhu R, Hao J, Liu X, et al. Causal Associations Between Gut Microbiota, Gut Microbiota-Derived Metabolites, and Alzheimer's Disease: A Multivariable Mendelian Randomization Study. *J Alzheimers Dis.* **2024**;(Preprint):1–9.
253. Masago A, Maruyama H, Nambu T, Mashimo C, Takahashi K. Influence of tongue brushing on oral microbiome diversity. *J Osaka Dent Univ.* **2020**; 54(2):205–12.
254. Bertelsen RJ, Barrionuevo AMP, Shigdel R, Lie SA, Lin H, Real FG, et al. Association of oral bacteria with oral hygiene habits and self-reported gingival bleeding. *J Clin Periodontol.* **2022**; 49(8):768–81.
255. Ge X, Rodriguez R, Trinh M, Gunsolley J, Xu P. Oral Microbiome of Deep and Shallow Dental Pockets In Chronic Periodontitis. *PLoS ONE.* **2013**; 8(6):e65520.
256. Mandal S, Van Treuren W, White RA, Eggesbø M, Knight R, Peddada SD. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microb Ecol Health Dis.* **2015**; 26:10.3402/mehd.v26.27663.
257. Zhang Y, Wang X, Li H, Ni C, Du Z, Yan F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomed Pharmacother.* **2018**; 99:883–93.
258. Houston S, Taylor JS, Cameron CE. Spirochaetes. *eLS.* **2014**.

259. Połowniak-Pracka H. Diagnostyka bakteriologiczna (ed. Eligia M. Szewczyk). *Nowotw J Oncol.* **2006**; 56(1):111–111.
260. Wu YF, Lee WF, Salamanca E, Yao WL, Su JN, Wang SY, et al. Oral Microbiota Changes in Elderly Patients, an Indicator of Alzheimer’s Disease. *Int J Environ Res Public Health.* **2021**; 18(8):4211.
261. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães V, Sokol H, Doré J, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.* **2009**; 9(1):123.
262. Wasén C, Beauchamp LC, Vincentini J, Li S, LeServe DS, Gauthier C, et al. Bacteroidota inhibit microglia clearance of amyloid-beta and promote plaque deposition in Alzheimer’s disease mouse models. *Nat Commun.* **2024**; 15(1):3872.
263. Lukiw WJ. Bacteroides fragilis Lipopolysaccharide and Inflammatory Signaling in Alzheimer’s Disease. *Front Microbiol.* **2016**; 7:1544.
264. Antonyuk SV, Siemińska K, Śmiga M, Strange RW, Wagner M, Barnett KJ, et al. Bacteroides fragilis expresses three proteins similar to Porphyromonas gingivalis HmuY: Hemophore-like proteins differentially evolved to participate in heme acquisition in oral and gut microbiomes. *FASEB J.* **2023**; 37(7):e22981.
265. Troci A, Philippen S, Rausch P, Rave J, Weyland G, Niemann K, et al. Disease- and stage-specific alterations of the oral and fecal microbiota in Alzheimer’s disease. *PNAS Nexus.* **2024**; 1;3(1):pgad427.
266. Franciotti R, Pignatelli P, Carrarini C, Romei FM, Mastrippolito M, Gentile A, et al. Exploring the Connection between Porphyromonas gingivalis and Neurodegenerative Diseases: A Pilot Quantitative Study on the Bacterium Abundance in Oral Cavity and the Amount of Antibodies in Serum. *Biomolecules.* **2021**; 6;11(6):845.

SPIS RYSUNKÓW

Rys. 1. Etapy w przebiegu choroby Alzheimera	17
Rys. 2. Modyfikowalne czynniki wpływające na rozwój choroby Alzheimera	19
Rys. 3. Ostry i przewlekły stan zapalny oraz potencjalne mechanizmy biologiczne leżące u podstaw związku między stanem zapalnym a chorobą Alzheimera	26
Rys. 4. Model błędnego koła obrazujący udział obwodowego układu odpornościowego w patogenezie choroby Alzheimera	29
Rys. 5. Możliwy wpływ stanu zapalnego przyzębia (paradontoza) na mózg	39
Rys. 6. Rozkład wskaźników periodontologicznych ze względu na stopień zaawansowania AD	74
Rys. 7. Analiza regresji liniowej zmiennej zależnej MMSE.....	76
Rys. 8. Analiza regresji liniowej zmiennej zależnej MoCA	78
Rys. 9. Ocena odpowiedzi odpornościowej PBLs – efekt stymulacji LPS-PG	80
Rys. 10. Analiza regresji liniowej dla $\ln(C_{IL-10})$	82
Rys. 11. Analiza regresji liniowej dla $\ln(C_{IL-6})$	83
Rys. 12. Mapa korelacji rang Spearmana względnej ekspresji genów związanych z aktywacją i regulacją stanu zapalnego oraz zmiennych periodontologicznych dla dwóch grup	86
Rys. 13. Korelacja wskaźników periodontologicznych z poziomem odpowiedzi nieswoistej (wyrażonej jako odporność PBLs na zakażenie VSV)	88
Rys. 14. Wpływ zakażenia VSV na wytwarzanie cytokin przez PBLs ex vivo w grupie AD i ZDR..	90
Rys. 15. Efekt stymulacji VSV dla wszystkich przebadanych cytokin.....	91
Rys. 16. Analiza regresji liniowej dla $\ln(C_{IL-10})$	93
Rys. 17. Częstość genotypów oraz alleli APOE $\epsilon 4$ w grupie ZDR i AD	96
Rys. 18. Rozkład zmiennych periodontologicznych dla poszczególnych genotypów FCGR2A (rs1801274).....	98
Rys. 19. Rozkład zmiennych periodontologicznych dla poszczególnych genotypów HLA-DRB1 (rs9270856).....	99
Rys. 20. Rozkład zmiennych periodontologicznych dla poszczególnych genotypów HLA-DRA (rs3135344).....	100
Rys. 21. Rozkład stężeń cytokin dla poszczególnych genotypów rs1801274	101
Rys. 22. Rozkład stężeń cytokin dla poszczególnych genotypów rs9270856	103
Rys. 23. Rozkład stężeń cytokin dla poszczególnych genotypów rs3135344	105
Rys. 24. Wskaźniki różnorodności alfa dla osób z AD i ZDR	107
Rys. 25. Korelacja rang Spearmana dla wskaźników różnorodności alfa i zmiennych periodontologicznych	108
Rys. 26. Wartość prawdopodobieństwa testowego dla testu Fishera z korektą Bejamini-Hochberga dla wskaźników różnorodności alfa i zmiennych periodontologicznych	109
Rys. 27. Analiza głównych współrzędnych (PCoA).....	110
Rys. 28. Porównanie struktury taksonów mikrobioty grupy ZDR i AD na poziomie typu (phylum)	111
Rys. 29. Względna obfitość taksonów na poziomie typu (phylum) dla pięciu najliczniej reprezentowanych taksonów.....	112
Rys. 30. Względna obfitość rodziny <i>Porphyromonadaceae</i>	113
Rys. 31. Względna obfitość taksonów <i>Tannerella</i> spp., <i>Porphyromonas</i> spp. oraz <i>Treponema</i> spp.....	114
Rys. 32. Mapa korelacji rang Spearmana dla wskaźników różnorodności alfa i stężeń cytokin	115

Rys. 33. Wartość prawdopodobieństwa testowego dla testu Fishera z korektą Bejamini-Hochberga	116
---	------------

SPIS TABEL

Tab. 1. Startery wykorzystane w analizie ekspresji genów metodą real-time PCR.....	48
Tab. 2. Sondy TaqMan® wykorzystane w genotypowaniu SNP	49
Tab. 3. Możliwe allele genu APOE.....	49
Tab. 4. Skład mieszaniny DNazy I	56
Tab. 5. Mieszanina reakcyjna do odwrotnej transkrypcji	56
Tab. 6. Warunki reakcji odwrotnej transkrypcji	57
Tab. 7. Warunki reakcji real-time PCR.....	57
Tab. 8. Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do genotypowania SNP	59
Tab. 9. Warunki reakcji genotypowania SNP.....	59
Tab. 10. Dyskryminacja alleli na podstawie odczytu fluorescencji	59
Tab. 11. Mieszanina reakcyjna dla amplifikacji regionów zmiennych V3V4 i V7V9	61
Tab. 12. Warunki reakcji amplifikacji regionów zmiennych V3V4 i V7V9	61
Tab. 13. Warunki reakcji przyłączania indeksów.....	62
Tab. 14. Wskaźniki wielkości efektu wraz z interpretacją	68
Tab. 15. Podstawowe statystyki opisowe charakteryzujące wiek, płeć, MMSE, MoCA, stopień zaawansowania AD (DSM-5) oraz zmienne periodontologiczne w obu grupach	70
Tab. 16. Status socjodemograficzny i nawyki higienizacyjne zębów osób z grupy badanej oraz kontrolnej	71
Tab. 17. Podstawowe statystyki opisowe elementów morfotycznych krwi	72
Tab. 18. Wyniki analizy regresji liniowej. Zmienne związane ze stanem zaawansowania AD określonym na podstawie testu MMSE	75
Tab. 19. Analiza regresji liniowej. Zmienne związane ze stanem zaawansowania AD określonym na podstawie testu MoCA.....	77
Tab. 20. Analiza regresji liniowej dla $\ln(C_{IL-10})$	81
Tab. 21. Analiza regresji liniowej dla $\ln(C_{IL-6})$	83
Tab. 22. Porównanie względnej ekspresji genów związanych z aktywacją i regulacją stanu zapalnego wraz z testem t Welcha dla różnic między grupami	84
Tab. 23. Porównanie poziomu cytokin wytwarzanych przez PBLs niezakażonych i zakażonych VSV wraz z testem t Welcha dla różnic między grupami.....	89
Tab. 24. Analiza regresji liniowej dla $\ln(C_{IL-10})$	92
Tab. 25. Testowanie prawa Hard'yego-Weinberga metodą chi-kwadrat Pearsona z poprawką Yatesa na ciągłość wraz z licznością genotypów	95

DODATEK

Tab. D1. Wyniki regresji liniowej dla MMSE i CAL

Zmienna	β	SE	CI95%		t	p
(stała)	22,467	4,521	13,269	31,665	4,969	<0,001
$\sqrt{CAL}$	1,891	1,121	-0,389	4,172	1,67	0,051
wiek	-0,099	0,065	-0,231	0,032	-1,536	0,067

Tab. D2. Wyniki regresji liniowej dla MMSE i PD

Zmienna	β	SE	CI95%		t	p
(stała)	27,402	8,940	9,213	45,591	3,065	0,002
$\sqrt{PD}$	-2,411	4,898	-12,375	7,554	-0,492	0,313
wiek	-0,096	0,067	-0,233	0,041	-1,428	0,081

Tab. D3. Wyniki regresji liniowej dla MoCA i CAL

Zmienna	β	SE	CI95%		t	p
(stała)	23,101	4,382	14,185	32,016	5,272	<0,001
$\sqrt{CAL}$	1,344	1,086	-0,866	3,555	1,237	0,112
wiek	-0,148	0,063	-0,276	-0,021	-2,365	0,012

Tab. D4. Wyniki regresji liniowej dla MoCA i PD

Zmienna	β	SE	CI95%		t	p
(stała)	26,572	8,519	9,239	43,904	3,119	0,002
$\sqrt{PD}$	-1,690	4,667	-11,185	7,805	-0,362	0,360
wiek	-0,146	0,064	-0,276	-0,015	-2,275	0,015

Tab. D5. Wyniki testu Dunna dla zmiennej API oraz genotypu rs1801274

Test Dunna	AA.0	AA.1	GA.0	GA.1	GG.0
AA.1	-2,38 0,033				
GA.0	0,01 0,992	2,39 0,036			
GA.1	-3,66 0,002	-0,94 0,473	-3,67 0,004		
GG.0	-0,36 0,769	1,57 0,195	-0,37 0,821	2,45 0,036	
GG.1	-3,50 0,002	-1,38 0,251	-3,51 0,002	-0,69 0,612	-2,63 0,026

Dla każdej porównywanej grupy zamieszczono wartość statystyki testowej a pod nią wartość p .

Tab. D6. Wyniki testu Dunna dla zmiennej API oraz genotypu rs9270856

Test Dunna	GA*.0	GA*.1	GG.0
GA*.1	-4,69 <0,001		
GG.0	-1,53 0,076	3,36 <0,001	
GG.1	-4,03 <0,001	0,60 0,276	-2,68 0,005

Tab. D7. Wyniki testu Dunna dla zmiennej API oraz genotypu rs3135344

Test Dunna	GA*.0	GA*.1	GG.0
GA*.1	-4,72 <0,001		
GG.0	-1,54 0,074	3,12 0,002	
GG.1	-4,28 <0,001	0,94 0,174	-2,50 0,009

Tab. D8. Skrócone wyniki obejmujące czynnik interakcyjny dla testu PERMANOVA dla wskaźnika Jaccarda

zmienna	SS	R²	pseudo-F	p-wartość
BOPxT×alzheimer	0,237	0,044	0,964	0,579
API×alzheimer	0,227	0,042	0,918	0,743
PD×alzheimer	0,238	0,043	0,962	0,609
CAL×alzheimer	0,250	0,046	1,021	0,427

Liczba grup: 2, $N = 23$, liczba permutacji: 999. SS – suma kwadratów (ang. sum of squares).

Tab. D9. Skrócone wyniki obejmujące czynnik interakcyjny dla testu PERMANOVA dla wskaźnika Bray-Curtisa

zmienna	SS	R²	pseudo-F	p-wartość
BOPxT×alzheimer	0,167	0,031	0,668	0,956
API×alzheimer	0,126	0,023	0,498	0,998
PD×alzheimer	0,177	0,033	0,705	0,929
CAL×alzheimer	0,329	0,061	1,335	0,100

Liczba grup: 2, $N = 23$, liczba permutacji: 999. SS – suma kwadratów (ang. sum of squares).

Tab. D10. Skrócone wyniki obejmujące czynnik interakcyjny dla testu PERMANOVA dla Unweighted UniFrac

zmienna	SS	R²	pseudo-F	p-wartość
BOPxT×alzheimer	0,094	0,045	0,993	0,484
API×alzheimer	0,087	0,041	0,903	0,684
PD×alzheimer	0,090	0,043	0,944	0,598
CAL×alzheimer	0,106	0,050	1,127	0,257

Liczba grup: 2, $N = 23$, liczba permutacji: 999. SS – suma kwadratów (ang. sum of squares).

Tab. D11. Skrócone wyniki obejmujące czynnik interakcyjny dla testu PERMANOVA dla Weighted UniFrac

zmienna	SS	R²	pseudo-F	p-wartość
BOPxT×alzheimer	0,194	0,019	0,406	0,922
API×alzheimer	0,259	0,025	0,548	0,816
PD×alzheimer	0,254	0,024	0,522	0,822
CAL×alzheimer	0,442	0,042	0,943	0,437

Liczba grup: 2, $N = 23$, liczba permutacji: 999. SS – suma kwadratów (ang. sum of squares).