

UNIwersYTET RZESZOWSKI

Collegium Medicum

Wydział Medyczny



mgr Agata Hańko

**Analiza zaburzeń ekspresji wybranych mikroRNA
w chorobie Alzheimera**

**Rozprawa na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu,
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor:

Prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik

Promotor pomocniczy:

Dr n. med. Natalia Potocka

Rzeszów 2026

*Składam serdeczne podziękowania Pani Promotor
Profesor dr hab. n. med. Izabeli Zawlik
za obdarzenie mnie zaufaniem, bez którego realizacja
niniejszej rozprawy doktorskiej nie byłaby możliwa.
Jestem ogromnie wdzięczna za nieustanne wsparcie,
ciągle motywowanie do działania oraz cenne wskazówki
udzielane podczas pisanie niniejszej rozprawy.*

*Serdeczne podziękowania składam
Promotorowi pomocniczemu
Pani dr n. med. Natalii Potockiej
za ogromne zaangażowanie, wsparcie oraz nieocenioną
pomoc merytoryczną w trakcie pisanie rozprawy.*

*Pragnę podziękować całemu zespołowi Laboratorium Biologii Molekularnej
Przyrodniczo–Medycznego Centrum Badań Innowacyjnych
za pomoc w realizacji pracy doktorskiej,
szczególnie dr n. med. Marzenie Skrzypa oraz dr n. o zdr. Sylwii Paszek.*

*Serdeczne podziękowania składam
Pani Profesor dr hab. n. med. Halinie Bartosik-Psujek
za udostępnienie materiału biologicznego i danych klinicznych
pochodzących od pacjentów z chorobą Alzheimera.*

*Dziękuję również Panu lek.inż. Aleksandrowi Rycerz
za przygotowanie analiz statystycznych oraz cenne wskazówki
dzięki, którym rozprawa ta mogła powstać.*

*Serdeczne podziękowania składam również
mojej Mamie oraz Rodzeństwu
za ich cierpliwość i wsparcie okazywane mi każdego dnia.*

Pracę dedykuję mojej Mamie, dziękując za Jej wiarę we mnie, nieustające wsparcie oraz motywowanie do działania i sięgania coraz wyżej.

SPIS TREŚCI

WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ UŻYWANYCH SKRÓTÓW	7
1. WSTĘP	11
1.1. Etiologia i patogeneza choroby Alzheimera	11
1.1.1. Rodzinna postać AD o wczesnym początku EOAD	19
1.1.2. Sporadyczna postać AD o późnym początku LOAD	20
1.1.3. Sposoby diagnozowania i leczenia AD	23
1.2. MikroRNA i ich rola w ekspresji genów	33
1.2.1. Biogeneza mikroRNA	33
1.2.2. Mechanizmy regulacji genów za pomocą miRNA	36
1.2.3. miRNA zaangażowane w patogenezę choroby Alzheimera	37
1.2.4. Terapia AD z wykorzystaniem miRNA	39
1.3. Przegląd wybranych miRNA pretendujących do roli biomarkerów diagnostycznych AD	40
1.3.1. MiRNA-200a-3p	40
1.3.2. MiRNA-146a-5p	42
1.3.3. MiRNA-132-3p	43
2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	45
3. MATERIAŁY I METODY	46
3.1. Charakterystyka grupy badanej	46
3.2. Kryteria doboru grupy badanej	50
3.3. Materiał biologiczny	51
3.4. Metody	52
3.4.1. Oznaczenie poziomu białek w PMR metodą ELISA	52
3.4.2. Oznaczenie polimorfizmu w genie <i>ACE</i> metodą PCR	53
3.4.3. Oznaczenie polimorfizmu w genie <i>APOE</i> metodą PCR- RFLP	54
3.4.4. Izolacja miRNA z surowicy	55
3.4.5. Analiza ekspresji wybranych miRNA	56
3.4.5.1. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy PCR	57
3.4.5.2. Synteza cDNA metodą RT-PCR	60
3.4.5.3. Kontrola jakości miRNA — miRCURY LNA® miRNA QC PCR Panel ...	61
3.4.5.4. Ilościowe oznaczenie ekspresji miRNA metodą real-time PCR	62
3.5. Analiza statystyczna	66
4. WYNIKI	67
4.1. Analiza grupy badanej i kontrolnej pod względem płci i wieku	67

4.2.	Analiza grupy badanej i kontrolnej pod względem cech klinicznych	69
4.3.	Analiza stężenia białek β - amyloid w zależności od stopnia zaawansowania choroby	74
4.4.	Analiza stężenia białek Tau w zależności od stopnia zaawansowania choroby	76
4.5.	Analiza charakterystycznych wskaźników w zależności od stopnia zaawansowania choroby	77
4.6.	Analiza polimorfizmu typu SNP w dwóch punktach rs429358 i rs7412 w genie <i>APOE</i> w zależności od stadium otępienia.....	79
4.7.	Analiza polimorfizmu insercyjno/delecyjnego (I/D) w genie <i>ACE</i> rs1799752 w zależności od stadium otępienia.....	80
4.8.	Analiza ekspresji wyselekcjonowanych miRNA w zależności od stopnia zaawansowania choroby.....	81
4.9.	Analiza ekspresji wybranych miRNA w zależności od wieku oraz płci	83
4.10.	Analiza korelacji ekspresji poszczególnych miRNA z poziomem parametrów biochemicznych	84
4.11.	Analiza korelacji ekspresji poszczególnych miRNA z wskaźnikami diagnostycznymi	86
4.12.	Analiza związku ekspresji wybranych miRNA z polimorfizmem genu <i>APOE</i>	87
4.13.	Analiza związku ekspresji wybranych miRNA z polimorfizmem genu <i>ACE</i>	88
4.14.	Modele predykcyjne zaburzeń otępiennych	92
5.	DYSKUSJA.....	97
5.1.	Czynniki ryzyka choroby Alzheimera	97
5.2.	Choroby współistniejące wśród pacjentów z otępieniem	101
5.3.	Ryzyka i szanse związane z polimorfizmem w genie <i>APOE</i>	104
5.4.	Ryzyka i szanse związane z polimorfizmem w genie <i>ACE</i>	108
5.5.	Zmiany poziomu ekspresji miRNA-146a-5p związane ze stopniem rozwoju otępienia	111
5.6.	Zmiany poziomu ekspresji miRNA-200a-3p związane ze stopniem rozwoju otępienia	115
5.7.	Zmiany poziomu ekspresji miRNA-132-3p związane ze stopniem rozwoju otępienia	119
5.8.	Uwagi końcowe	123
6.	WNIOSKI.....	127
7.	STRESZCZENIE	129
7.1.	Wstęp.....	129
7.2.	Cel pracy.....	129
7.3.	Grupa badana	129

7.4.	Materiały i metody.....	130
7.5.	Wyniki i wnioski	130
8.	SUMMARY	131
8.1.	Entry	131
8.2.	Aim of the study	131
8.3.	Study Group.....	131
8.4.	Materials and Methods	132
8.5.	Results and Conclusions	132
9.	SPIS RYCIN.....	133
10.	SPIS TABEL.....	134
11.	SPIS WYKRESÓW	135
12.	PIŚMIENNICTWO	137

WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

15-LOX	enzym lipooksygenazy 15	ang. <i>15-lipoxygenase enzyme</i>
3xTg	potrójnie transgeniczna mysz AD	ang. <i>AD triple transgenic mice</i>
5xFAD	mysi model choroby Alzheimera	ang. <i>Mice model Familial Alzheimer Disease</i>
ACE	gen konwertazy angiotensyny	ang. <i>Angiotensin-converting</i>
AD	choroba Alzheimera	ang. <i>Alzheimer's disease</i>
AGO	białko Argonaute	ang. <i>Argonaute</i>
APOE	gen apolipoproteiny E	ang. <i>Apolipoprotein gene</i>
Apo-E	białko apolipoproteina E; formy	ang. <i>Apolipoprotein E</i>
APP	białko prekursora amyloidu	ang. <i>amyloid precursor protein</i>
APP	gen prekursora amyloidu	ang. <i>amyloid precursor protein</i>
Aβ	peptyd amyloid β	ang. <i>amyloid β peptides</i>
BACE1	sekretaza- β	ang. <i>β-secretase</i>
BDNF	neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (abrineuryna)	ang. <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BSA	surowicza albumina wołowa	ang. <i>bovine serum albumin</i>
CAM	cząsteczki adhezji komórkowej	ang. <i>cell adhesion molecules</i>
CCR4-NOT	wielobiałkowy kompleks uczestniczący w ekspresji genów	ang. <i>Carbon catabolite repression 4-negative on TATA-less</i>
CPEB1	białko wiążące cytoplazmatyczny element poliadenylacji 1	ang. <i>Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1</i>
CREB	białko wiążące element odpowiedzi na cykliczny AMP	ang. <i>cyclic AMP responsive element binding protein</i>
DCP2	enzym dekapujący mRNA	ang. <i>decapping MRNA 2 enzyme</i>
DGCR8	podjednostka mikroprocesowa-krytyczny region 8 zespołu Di George'a	ang. <i>DiGeorge syndrome critical region 8</i>
DMSO	dimetylosulfotlenek	ang. <i>dimethyl sulfoxide</i>
dNTPs	trifosforany deoksynukleotydów	ang. <i>deoxyribonucleotide</i>
ECM	macierz zewnątrzkomórkowa	ang. <i>extracellular matrix</i>
EDTA	kwas wersenowy	ang. <i>ethylenediaminetetraacetic</i>
ELISA	test immunoenzymatyczny	ang. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EOAD	choroba Alzheimera o wczesnym początku	ang. <i>early-onset Alzheimer's disease</i>
ERK1	kinaza białkowa aktywowana mitogenem 1	ang. <i>Extracellular signal-regulated kinase 1</i>
FAD	rodzinna postać choroby Alzheimera	ang. <i>Familial Alzheimer's disease</i>

FXR1	białko związane z zespołem łamliwego chromosomu X 1	ang. <i>Fragile-X-mental retardation related protein 1</i>
GSDMD	Gasdermina D	ang. <i>gasdermin D</i>
GSK-3β	glikogenowa kinaza syntazy-3β	ang. <i>glikogen synthase kinase 3 β</i>
HDAC4	deacetylaza histonowa 4	ang. <i>histone deacetylase 4</i>
HDL	lipoproteiny o wysokiej gęstości	ang. <i>high-density lipoprotein</i>
NNRNPU	heterogeniczne jądrowe rybonukleoproteiny U	ang. <i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U</i>
hTau/tTau	całkowite białko Tau	ang. <i>total Tau protein</i>
IDE	enzym degradujący insulinę	ang. <i>insulin-degrading enzyme</i>
IL-1β	interleukina 1β	ang. <i>interleukin-1β</i>
Jun D	czynnik transkrypcyjny Jun D	ang. <i>transcription factor Jun D</i>
LDL	lipoproteiny o niskiej gęstości	ang. <i>low-density lipoprotein</i>
LOAD	choroba Alzheimera o późnym początku	ang. <i>late-onset Alzheimer's disease</i>
LRP2	gen kodujący białko związane z receptorem lipoprotein o niskiej gęstości LDL	ang. <i>low-density lipoprotein receptor-related protein-2</i>
Lrp2	białko związane z receptorem lipoprotein o niskiej gęstości	ang. <i>low-density lipoprotein receptor-related protein- 2</i>
MAPK1	kinaza białkowa aktywowana mitogenem 1	ang. <i>Mitogen-Activated Protein Kinase 1</i>
MAPs	rodzina białek związane z mikrotubulami	ang. <i>microtubule associated proteins</i>
MCI	umiarkowane zaburzenia poznawcze	ang. <i>Mild Cognitive Impairment</i>
MMSE	krótka skala oceny stanu psychicznego potocznie nazywana „mini-mental test”	ang. <i>Mini Mental State Examination</i>
MRE	element odpowiedzi miRNA	ang. <i>microRNA response element</i>
MRI	rezonans magnetyczny	ang. <i>magnetic resonance imaging</i>
NF-Kb	czynnik jądrowy kappa- łańcuch lekki- wzmacniacz aktywowanych komórek B	ang. <i>nuclear factor kappa B</i>
NfL	lekki łańcuch neurofilamentów	ang. <i>neurofilament light polypeptide</i>
NFT	splątki neurofibrylarne	ang. <i>neurofibrillary tangles</i>
NPD1	neuroprotektyna D1	ang. <i>D1 neuroprotectin</i>
NTC	kontrola negatywna	ang. <i>non-template control</i>
Optn	receptor optineuryny	ang. <i>Optineurin receptor</i>
p27kip1	kompleks kinazy cyklozależnej	ang. <i>cyclin dependent kinase inhibitor 1B</i>

PABPC	białko wiążące poli(A) cytoplazmatyczne 1	ang. <i>polyadenylate-binding protein cytoplasmic 1</i>
PAN2-PAN3	kompleks deadenylacji PAN2-PAN3 podjednostka PAN3	ang. <i>deadenylation complex subunit PAN3</i>
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy	ang. <i>polymerase chain reaction</i>
PCR-RFLP	metoda określania polimorfizmu SNP na podstawie długości fragmentów restrykcyjnych po reakcji PCR	ang. <i>PCR-restriction fragment length polymorphism</i>
PET	pozytonowa tomografia emisyjna	ang. <i>positron emission tomography</i>
PHF	sploty sparowanych helis	ang. <i>paired helical filaments</i>
PMM	predykcyjne dopasowanie średniej	ang. <i>Predictive Mean Matching</i>
PPM1F	fosfataza białkowa 1F zależna od Mg ²⁺ /Mn ²⁺	ang. <i>Protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependent 1F</i>
post mortem	po śmierci	łac.
PRKACB	podjednostka katalityczna kinazy białkowej zależnej od CAMP β	ang. <i>protein kinase CAMP-activated catalytic subunit β</i>
PSEN1	gen preseniliny 1	ang. <i>Presenilin 1</i>
PSEN2	gen preseniliny 2	ang. <i>Presenilin 2</i>
pTau	ufosforylowane białko Tau	ang. <i>phospho-Tau</i>
PTPN1	fosfataza tyrozynowa białkowa typu 1, niebędąca receptorem	ang. <i>non-receptor type protein phosphatase 1</i>
pz/bp	pary zasad	ang. <i>base par</i>
REST	czynn timeranskrypcyjny wyciszający RE1	ang. <i>silencing transcription factor R1</i>
RISC	kompleks wyciszający indukowany RNA	ang. <i>RNA-induced silencing complex</i>
ROCK1	kinaza białkowa związana z rho zawierająca zwoje 1	ang. <i>Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1</i>
RQ	kwantyfikacja względna	ang. <i>relative quantification</i>
RT-qPCR	reakcja łańcuchowa polimerazy odwrotnej transkrypcji	ang. <i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SAD	sporadyczna postać choroby Alzheimera	ang. <i>sporadic Alzheimer's disease</i>
SH-SY5Y	linie komórkowe ludzkiej neuroblastomy	ang. <i>human neuroblastoma cell line</i>
SNORD 48	mały jądrowy RNA, pole C/D 48	ang. <i>small nucleolar RNA, C/D</i>
snRNA	mały jądrowy RNA	ang. <i>small nuclear RNA</i>
snoRNA	mały jądrowy RNA	ang. <i>small nucleolar RNA</i>
SphK1	kinaza sfingozynowa 1	ang. <i>sphingosine kinase 1</i>

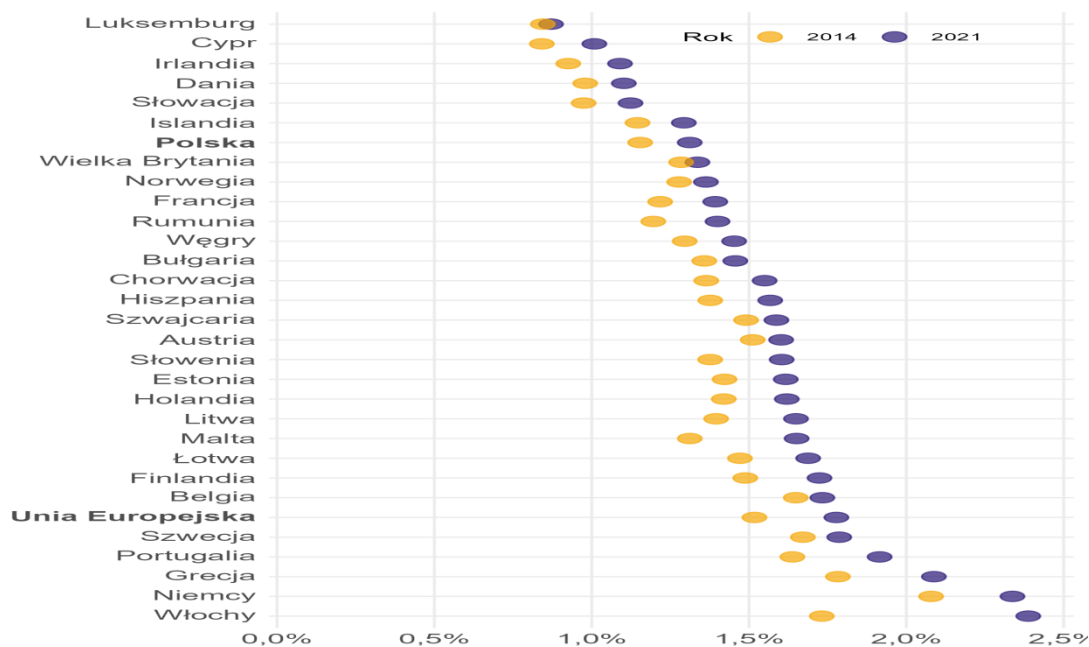
Sqstm1	receptor sekwestosom 1	ang. <i>Sequestosome 1 receptor</i>
TNF-α	czynn timer martwiczyn nowotworów α	ang. <i>tumor necrosis factor alpha</i>
TRBP	białko wiążące RNA w odpowiedzi na transaktywację	ang. <i>transactivation response RNA-binding protein</i>
TREM2	receptor wyzwalający wyrażany na komórkach mieloidalnych-2	ang. <i>triggering receptor expressed on myeloid cells-2</i>
UsnRNA	mały jądrowy RNA bogaty w U (urydynę)	ang. <i>uridine-rich snRNA (non coding small nuclear RNA)</i>
XRN1	enzym egzorybonukleaza 1	ang. <i>5'-3' exoribonuclease 1</i>

1. WSTĘP

1.1. Etiologia i patogeneza choroby Alzheimera

Choroba Alzheimera ang. Alzheimer's disease (AD) początkowo zdefiniowana jako jednostka kliniczno-patologiczna, jest postępującą i nieodwracalną chorobą neurodegeneracyjną, której objawy pojawiają się zwykle w średnim lub późnym wieku [1, 2]. Odpowiada za ok. 70% przypadków demencji wśród pacjentów w starzejącej się populacji na całym świecie [1, 3, 4]. Szacuje się, iż globalnie częstość występowania AD sięga nawet 24 mln osób, a liczba ta wzrośnie dwukrotnie do 2040 roku [5].

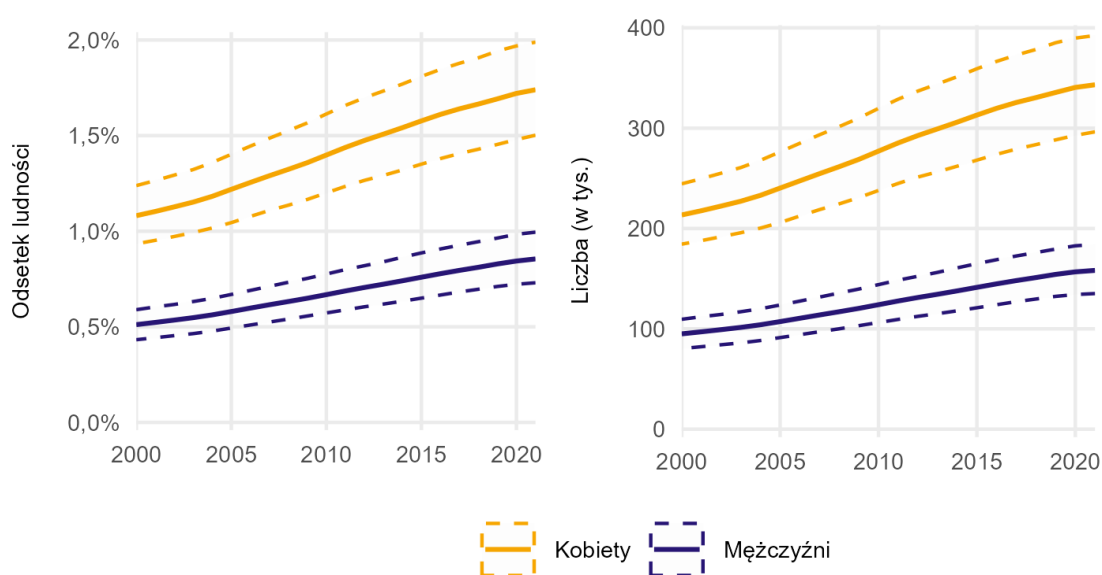
Według opracowań statystycznych prowadzonych przez Narodowy Fundusz Zdrowia na podstawie danych Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), w krajach europejskich częstotliwość zachorowania na chorobę Alzheimera między 2014 a 2021 rokiem wzrosła o 0,1% (m.in. w Polsce, Słowacji, Szwajcarii, Szwecji, Austrii, Belgii, Chorwacji) do nawet 0,7% (Włochy). Wykres nr 1 przedstawia tendencję wzrostową szacowanego odsetka chorych na AD oraz choroby pokrewne na przełomie lat 2014-2021 w Europie i Unii Europejskiej [6].



Wykres 1 . Szacowany odsetek chorych na chorobę Alzheimera i choroby pokrewne w wybranych krajach europejskich w latach 2014 i 2021

Źródło: Raport Narodowego Funduszu Zdrowia 2024; <https://ezdrowie.gov.pl/portal/home/badania-i-dane/zdrowe-dane/raporty/nfz-o-zdrowiu-choroba-alzheimera-i-choroby-pokrewne> (06.11.2025).

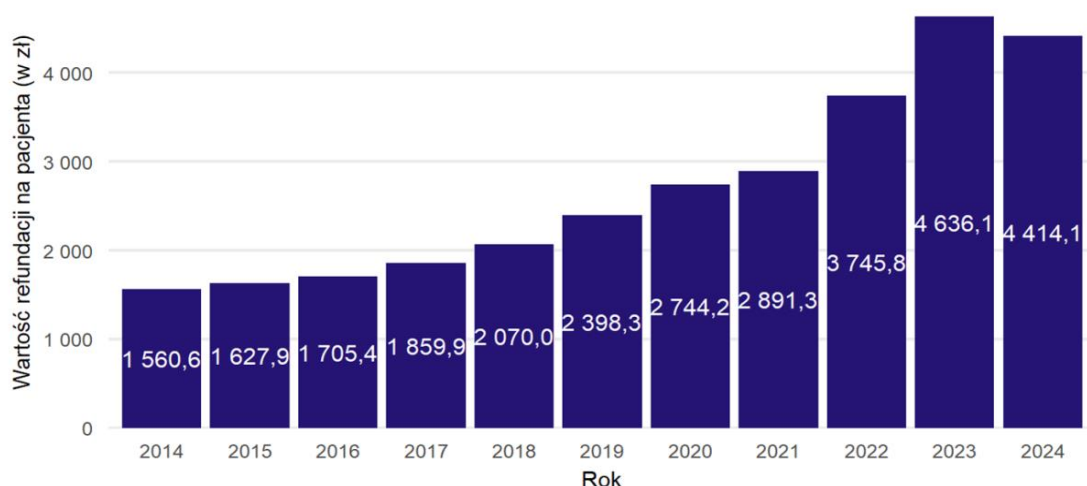
Zgodnie z danymi Narodowego Funduszu Zdrowia liczba osób chorujących na chorobę Alzheimera i choroby pokrewne w Polsce w 2024 roku wynosiła 383 tys. osób, w tym 272 tys. kobiet oraz 111 tys. mężczyzn. Wykres nr 2 przedstawia utrzymującą się tendencję wzrostową liczby pacjentów chorych na AD w Polsce na przełomie lat 2000-2020 oraz zależność zapadalności na chorobę od płci. Liczba kobiet ze stwierdzoną chorobą jest wyższa o ok. 100 tys. od mężczyzn [6].



Wykres 2. Szacowana liczba osób chorych na chorobę Alzheimera i choroby pokrewne w Polsce (2000–2021) jako odsetek ludności (lewy wykres) i w wartościach bezwzględnych (prawy wykres)—oszacowanie (linią ciągłą) i 95%

Źródło: Raport Narodowego Funduszu Zdrowia. 2024; <https://ezdrowie.gov.pl/portal/home/badania-i-dane/zdrowe-dane/raporty/nfz-o-zdrowiu-choroba-alzheimera-i-choroby-pokrewne> (06.11.2025)

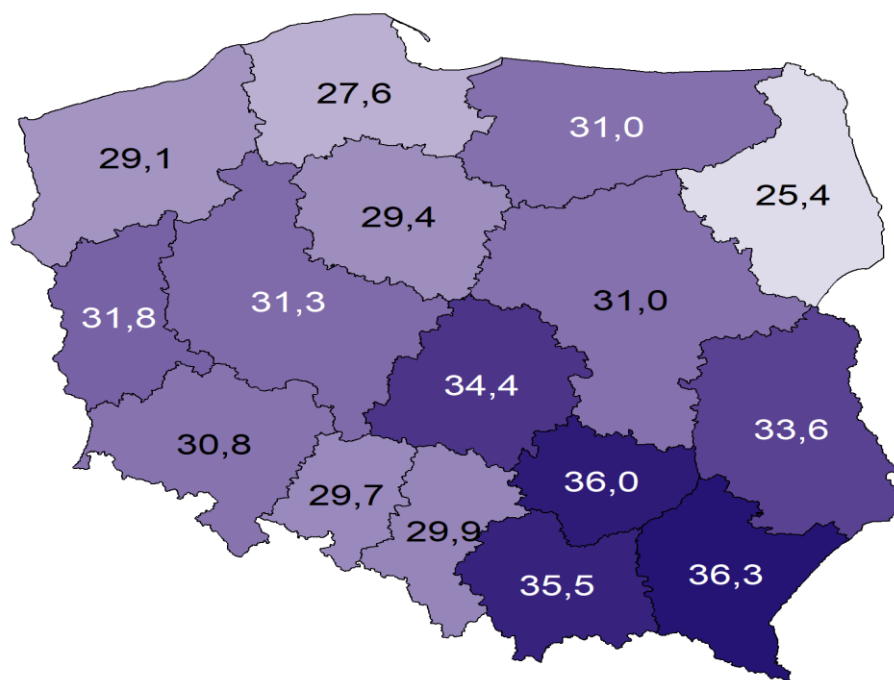
Obciążenie społeczno-ekonomiczne chorobą Alzheimera jest ogromne. W większości krajów w 2020 r. średni roczny koszt leczenia tej choroby wynosił około 1,09% produktu krajowego brutto (PKB) [7], nie wspominając o stresie emocjonalnym, zmęczeniu i negatywnym wpływie na długoterminowe zdrowie członków rodzin pacjentów oraz ich opiekunów [8]. Według danych statystycznych NFZ wartość refundacji kosztów leczenia oraz diagnostyki jednego pacjenta w Polsce na przełomie lat 2014-2023 wzrosła o ok. 3 tys. zł [6]. Dokładne dane dotyczące wzrostu kosztów leczenia pacjentów z AD na przełomie 10 lat przedstawia wykres nr 3.



Wykres 3. Średnia wartość refundacji świadczeń udzielonych z rozpoznaniem głównym choroby Alzheimera lub chorób pokrewnych w wieku 55 lat i więcej w przeliczeniu na pacjenta (2014–2024)

Źródło: Raport Narodowego Funduszu Zdrowia. 2024; <https://ezdrowie.gov.pl/portal/home/badania-i-dane/zdrowe-dane/raporty/nfz-o-zdrowiu-choroba-alzheimera-i-choroby-pokrewne> (06.11.2025)

Niepokojące są również dane przedstawione na rycinie nr 1, dotyczące rozkładu współczynnika chorowalności rejestrowanej na AD w poszczególnych województwach w Polsce, wg których południowa część Polski (województwo podkarpackie, małopolskie, świętokrzyskie) wyraźnie przoduje w liczbie osób ze zdiagnozowaną chorobą. Ponieważ dane te są standaryzowane ogólnopolską strukturą wieku i płci, wysokie współczynniki nie wynikają ze struktury demograficznej tego regionu Polski. Można przypuszczać, iż powodem tego zjawiska jest korzystanie przez pacjentów w tych regionach kraju głównie ze świadczeń zdrowotnych w ramach NFZ, które są rejestrowane. W zamożniejszych regionach Polski oraz w większych miastach, pacjenci coraz częściej korzystają z prywatnych świadczeń zdrowotnych, które często nie są rejestrowane i uwzględniane w statystykach.



Rycina 1. Standaryzowany ogólnopolską strukturą wieku i płci współczynnik chorobowości choroby Alzheimera oraz chorób pokrewnych wg województwa zamieszkania pacjenta (2024 r.)

Źródło: Raport Narodowego Funduszu Zdrowia. 2024; <https://ezdrowie.gov.pl/portal/home/badania-i-dane/zdrowe-dane/raporty/nfz-o-zdrowiu-choroba-alzheimera-i-choroby-pokrewne> (06.11.2025)

Rozróżnienie między zmianami o charakterze neuropatologicznym a klinicznymi symptomami choroby jest trudne do zdiagnozowania. Dlatego termin „choroba Alzheimera” jest często używany do opisu dwóch różniących się jednostek chorobowych: modelowych zespołów klinicznych przebiegających bez neuropatologii oraz zmian neuropatologicznych typowych dla AD. Aby lepiej zrozumieć chorobę od strony klinicznej, pomocna wydaje się biologiczna definicja, według której demencja nie jest chorobą ale zespołem objawów spowodowanych innymi chorobami. Diagnoza nie opiera się więc tylko na klinicznych objawach, ale koncentruje się w dużej mierze na diagnostyce za pomocą biomarkerów u osób żyjących. Biomarkery są pogrupowane w te dotyczące odkładania się amyloidu β , patologicznego białka Tau i neurodegeneracji [9].

Choroba Alzheimera charakteryzuje się głębokim zaburzeniem funkcji poznawczych oraz szeregiem zaburzeń behawioralnych, psychologicznych, motorycznych oraz zaburzeń nastroju. Demencja od stanu łagodnego przechodzi do ciężkiej postaci choroby, w której osoba staje się całkowicie zależna od innych w zakresie podstawowych czynności życiowych. U chorych obserwuje się zmiany

w zachowaniu, zaburzenia widzenia, zaburzenia percepcyjne i wzrokowo-przestrzenne, jak również postępujące upośledzenie ostatnich wspomnień, równocześnie zachowując wspomnienia starsze. Badania wykazują, że zmiany w mózgu gromadzą się przez dziesiątki lat przed pojawianiem się pierwszych problemów poznawczych, na które obecnie nie ma skutecznej terapii [10-13].

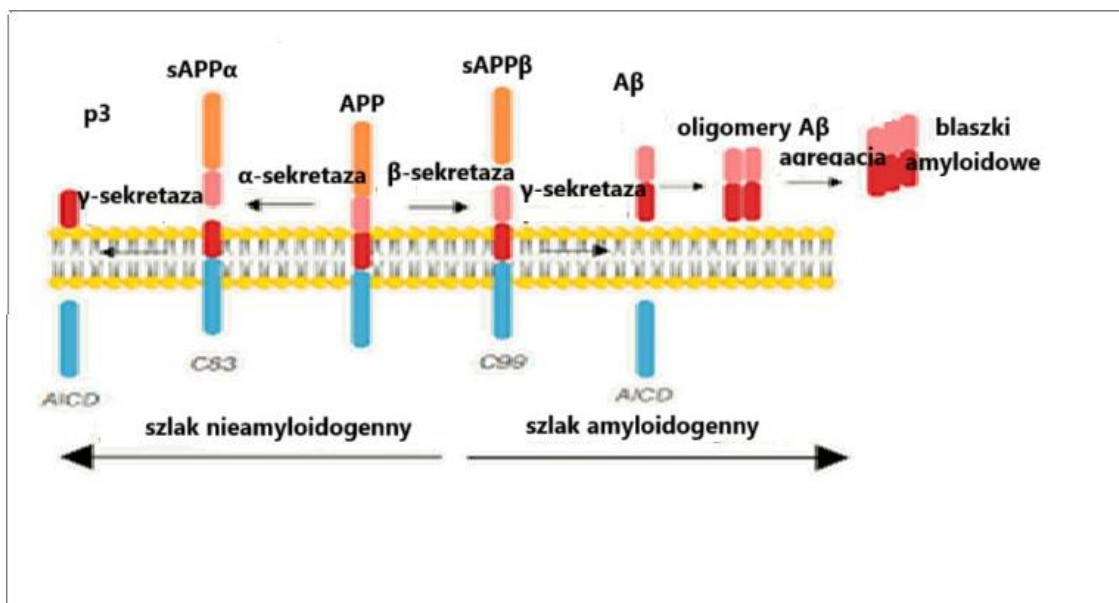
Patogeneza choroby Alzheimera polega na akumulacji nierozpuszczalnych, zewnątrzkomórkowych blaszek neurotycznych (amyloidowych) z nagromadzonych peptydów β -amyloidowych ($A\beta$) oraz wewnątrzkomórkowych splątków neurofibrilarnych ang. neurofibrillary tangles (NFT) w mózgu, zawierających głównie wysoce ufosforylowane białko Tau [1, 4, 14]. Nadmierna i nieprawidłowa fosforylacja białka Tau oraz nadmierne odkładanie się $A\beta$ są ważnymi induktorami i biomarkerami. Wymienione związki powodują stan zapalny układu nerwowego, który wpływa na nieprawidłowy stan funkcjonalny autofagii w tkankach hipokampu. Prowadzi to do zmniejszenia ilości połączeń synaptycznych między komórkami nerwowymi, czego konsekwencją jest obumieranie neuronów [7].

Do genetycznych i środowiskowych czynników ryzyka otępienia typu alzheimerowskiego, zalicza się również stan zapalny, stres oksydacyjny, nieprawidłowy cykl komórkowy, apoptozę [15], a także deficyt kwasu foliowego lub podwyższony poziom homocysteiny, co jest związane ze starzeniem się organizmu [11]. Jednak patogeneza AD wciąż nie jest do końca jasna. Ostatnie badania wykazały, że neurozapalenie odgrywa istotną rolę w rozwoju choroby Alzheimera, stając się nowym kierunkiem badań i leczenia [16].

Hipoteza kaskady amyloidu- β

Hipoteza kaskady amyloidu sugeruje, że brak równowagi między wytwarzaniem a usuwaniem $A\beta$ jest kluczowym czynnikiem prowadzącym do AD. Pozakomórkowy $A\beta$ stanowi główny składnik włókienek amyloidowych występujących w blaszkach neurotycznych oraz złogach naczyniowych pacjentów. Wiele badań wskazuje, na ważną rolę $A\beta$ w regulowaniu aktywności neuronalnej i synaptycznej [17, 18]. Solidne dowody naukowe wskazują, że oligomeryczne formy $A\beta$, a nie same blaszki amyloidowe, przyczyniają się do zaburzeń synaptycznych i korelują z utratą połączeń synaptyczną [1, 19].

Peptyd A β pochodzi z enzymatycznej proteolizy białka prekursorowego amyloidu ang. amyloid-beta precursor protein (APP), które fizjologicznie odgrywa ważną rolę w homeostazie mózgu. Pierwszym szlakiem zaangażowanym w przetwarzanie APP jest szlak nieamyloidogenny, w którym pośredniczy α -sekreতা. Rozszczepienie APP przez α -sekreতę generuje powstanie rozpuszczalnego peptydu sAPP α , który prawdopodobnie pełni funkcję neuroprotekcijną. Stwierdzono, że peptyd ten odgrywa ważną rolę w plastyczności i przeżyciu neuronów oraz w ochronie przed cytotoksycznością. U osób zdrowych proces degradacji APP przebiega głównie przez szlak nieamyloidogenny. Natomiast u osób z chorobą Alzheimera dominuje szlak amyloidogenny, w którym udział biorą β -sekreতা (BACE1) oraz γ -sekreতা (kompleks zawierający presenilinę 1- PSEN 1 i presenilinę 2 - PSEN 2) [17, 18, 20]. Szlak nieamyloidogenny oraz amyloidogenny przedstawia rycina nr 2. BACE1 jest aspartylową proteazą, enzymem rozszczepiającym APP zarówno w miejscach Asp1, jak i Glu11, przyczyniając się do produkcji blaszek β -amyloidu [21], co czyni go głównym celem w walce z AD. Badania wskazują, iż przesunięcie miejsca rozszczepienia APP na Asp1 przyczyniają się do zwiększonej produkcji A β i tworzenie blaszek neurotycznych [22]. A β jest produktem dwuetapowej proteolizy APP. Proces ten rozpoczyna BACE1, a kończy γ -sekreতা [21]. Gamma-sekreতা to kompleks wielobiałkowy składający się z PSEN1 (PS1) lub jego homologu PSEN2 (PS2), odpowiadający za proteolityczne rozszczepienie APP i białek receptora NOTCH aktywnych w szlaku sygnałowym Notch. Analizy immunochemiczne wykazały, że PS1 i PS2 są podobne pod względem wielkości i lokalizacji wewnątrzkomórkowej – zlokalizowane są głównie w siateczce śródplazmatycznej oraz kompleksie Golgiego. Największą immunoreaktywność PS1 zaobserwowano w błonie plazmatycznej w regionach kontaktu komórka-komórka, co wskazuje, że PS1 jest cząsteczką adhezji komórkowej [23]. Li i in. (1997) wykazali, że dziki typ PS1 oraz PS2 są zlokalizowane w błonie jądrowej i wiążą się z kinetochorami interfazowymi i centrosomami, co może świadczyć o ważnej roli jaką odgrywają w organizacji i segregacji chromosomów [24]. Mutacja genów *PSEN1* i *PSEN2* jest najczęstszą przyczyną rodzinnej choroby Alzheimera, gdyż poprzez zmianę aktywności γ -sekreたy, zwiększa produkcję wysoce amyloidogennej izoformy A β -42. *PSEN1* pośredniczy w większości zdarzeń proteolitycznych, o czym świadczy fakt, iż delecja *PSEN1* u myszy znacznie zmniejsza aktywność γ -sekreたy [25].



Rycina 2. Przetwarzanie białka prekursorowego amyloidu (APP) w szlaku nieamyloidogennym oraz amyloidogennym [26]. Modyfikacja własna.

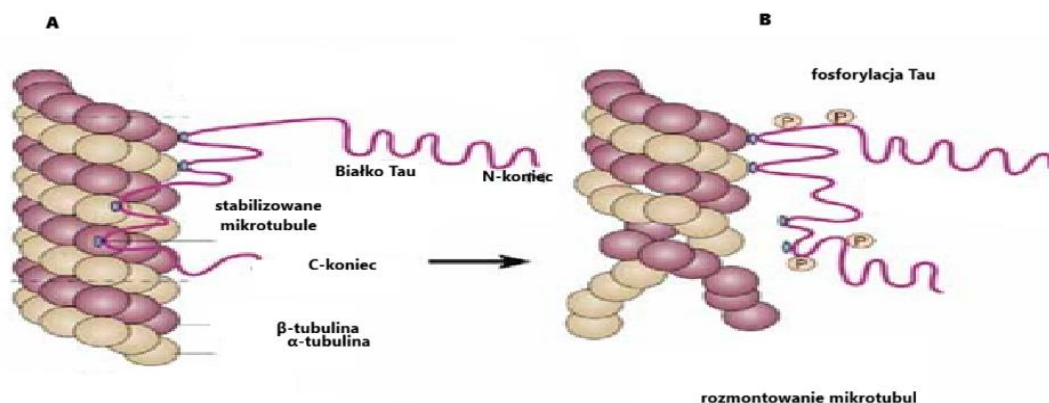
Hipoteza białka Tau

W drugiej hipotezie dotyczącej patogenezy choroby Alzheimera, kluczową rolę odgrywa białko Tau występujące głównie w neuronach, należące do rodziny białek zasocjowanych z mikrotubulami ang. microtubule associated proteins (MAPs). Białko Tau w największych ilościach występuje w aksonach neuronów, gdzie stabilizuje mikrotubule i wspomaga ich polimeryzację poprzez wiązanie z tubuliną. Neve i in. (1986) dokonali identyfikacji ekspresji białka Tau wykorzystując do tego celu bibliotekę cDNA ludzkiego mózgu płodowego. Potwierdzili, iż transkrypty białka Tau wykazują różnice wielkości zgodnie z rozwojem i obecne są tylko w ludzkim mózgu, w pozostałych tkankach ludzkich nie występują [27]. Ich główną funkcją jest inicjacja polimeryzacji mikrotubul poprzez wiązanie się do tubuliny. Proces fosforylacji jest podstawową formą potranslacyjnej modyfikacji, zaangażowaną w ich regulację. W białkach Tau opisano co najmniej 30 miejsc fosforylacji [28, 29]. U pacjentów z chorobą Alzheimera transkrypt białka Tau znaleziono w prawidłowych ilościach w korze czołowej [30].

W mózgu dorosłego człowieka białko Tau występuje w 6 izoformach, wytwarzanych przez alternatywny splicing mRNA. Białka te składają się z 352 do 441 aminokwasów, a izoformy różnią się obecnością lub brakiem insertów zlokalizowanych w N-końcu zawierających 29 lub 58 aminokwasów. Dodatkowo w C-końcu

zlokalizowane jest 31-aminokwasowe powtórzenie, kodowane przez 10. ekson genu kodującego białko Tau - *MTBT1*, dający początek trzem izoformom białka Tau z 4 powtórzeniami każda. Pozostałe 3 izoformy mają po 3 powtórzenia. Powtórzenia i niektóre sąsiadujące sekwencje stanowią domeny wiążące mikrotubule. Prawidłowa kora mózgowa zawiera izoformy 3-powtórzeniowe i 4-powtórzeniowe na podobnym poziomie [24, 31].

Badania nad białkiem Tau związanym z mikrotubulami w chorobie Alzheimera wykazały, że neuronalny cytoszkielet jest zaburzany i stopniowo zastępowany przez sploty sparowanych helis ang. paired helical filaments (PHF) [32]. Sparowane helisy hiperfosforylowanych białek Tau powoli zastępują neuronalny cytoszkielet w dotkniętych obszarach mózgu chorych na różne tautopatologii [33]. W wyniku hiperfosorylacji i aberracyjnego rozszczepiania dochodzi do powstania zwyrodnień włóknkowych w neuronach (NFT). W neuronach mikrotubule są niezbędne do utrzymania prawidłowej struktury neuronalnej, transportu impulsów nerwowych przez aksony i plastyczności neuronalnej. W warunkach fizjologicznych poprawne funkcjonowanie białka Tau zapewnia równowaga między fosorylacją a defosforylacją. W patogenezie AD nadmierna fosforylacja białka Tau prowadzi do powstania NFT, co skutkuje destabilizacją i śmiercią neuronów [17]. Prawidłowe białko Tau wiąże się z hiperfosforylowanym p-Tau, tworząc duże agregaty włóknkowe (ryc.3). Co ciekawe, defosforylacja p-Tau za pomocą fosfatazy alkalicznej, znosi jego zdolność do tworzenia agregatów in vitro [32]. Delacourte i in. (2002) posługując się analizą rozkładu przestrzenno-czasowego złogów A β oraz patologii białka Tau w sporadycznym AD ang. sporadic Alzheimer's disease (SAD), promują tezę współdziałania efektu agregacji amyloidu w rozprzestrzenianiu się patologii Tau [34].



Rycina 3. Prawidłowe białko Tau zapewniające spójność mikrotubul cytoszkieletu neuronów (A) oraz fosforylowane białko Tau destabilizujące strukturę mikrotubul [35]. Modyfikacja własna.

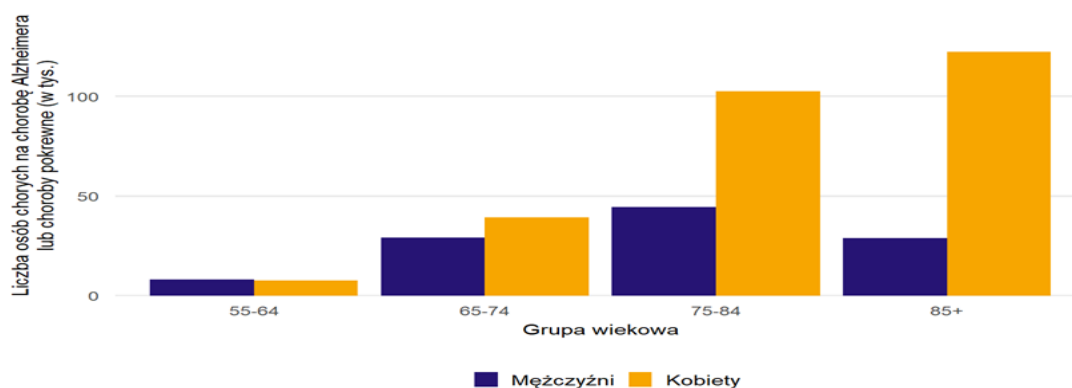
1.1.1. Rodzinna postać AD o wczesnym początku EOAD

Rodzinna postać choroby Alzheimera (ang. familial Alzheimer's disease- FAD) stanowi około 1-5 % wszystkich przypadków. Pierwsze symptomy choroby mogą pojawiać się jeszcze przed 60. rokiem życia, dlatego nazywana jest też AD o wczesnym początku ang. early-onset Alzheimer's disease (EOAD) [36]. Rodzinna postać tej choroby ma podłoże genetyczne i dziedziczona jest autosomalnie dominująco. Za jej rozwój odpowiada mutacja w jednym z następujących genów sprawczych: genie kodującym prekursor $A\beta_{42}$ tj. białko prekursorowe amyloidu APP, mutacje w genach *PSEN1* i *PSEN2* kodujących presenilinę PS1 i presenilinę PS2 oraz katalityczne składniki kompleksu γ -sekreazy. Skutki tych mutacji nie ograniczają się do zmian w ilości wytworzonego $A\beta_{42}$, ale odpowiadają za utratę funkcji fizjologicznej i uzyskanie funkcji toksycznej, związanej ze zmienionym przetwarzaniem APP do $A\beta_{42}$ oraz mechanizmami niezależnymi od APP takimi jak wadliwa autofagia [11]. Niektóre badania wskazują, że poziom autofagii w tkankach hipokampu osób z AD jest znacznie obniżony. Potwierdzono również, że podczas procesu starzenia może występować zwiększony poziom autofagii, która jest indukowana przez zwiększoną ilość upośledzonych organelli i białek w organizmie oraz tworzenie niefunkcjonalnych pęcherzyków autofagicznych. U zdrowych osób szybkość produkcji i usuwania $A\beta$

wynosi odpowiednio 7,6% i 8,3% na godzinę, a nadmierna akumulacja A β w AD może być ściśle związana ze zmniejszoną szybkością jego usuwania [6]. Około dwie trzecie pacjentów z AD to kobiety, co częściowo tłumaczone jest dłuższą długością życia, ale również większym ryzykiem genetycznym [8]. Moradifard i in. tłumaczy tę różnicę zaburzeniami mitochondrialnymi i endokrynologicznymi, w przypadku których związki estrogenowe i terapia hormonalna odgrywają rolę ochronną przed toksycznością beta-amyloidu. W swojej metaanalizie zidentyfikował ponad sto genów, które ulegają specyficznej ekspresji u mężczyzn i kobiet. Może być to związane z różnymi szlakami kontrolowanymi przez geny specyficzne dla kobiet, odgrywające ważną rolę w chorobie Alzheimera [14].

1.1.2. Sporadyczna postać AD o późnym początku LOAD

Sporadyczna postać AD ang. sporadic Alzheimer's disease (SAD) stanowi około 95% wszystkich przypadków, a objawy pojawiają się po 65. roku życia, dlatego nazywana jest AD o późnym początku ang. late-onset Alzheimer's disease (LOAD). Współczynnik zapadalności na AD wzrasta wraz z wiekiem, a wyraźny, nawet 15-krotny wzrost częstości występowania obserwujemy między 60. a 85. rokiem życia [37, 38]. Widoczna tendencja wzrostowa w przedziale wiekowym 75-84 oraz przewaga zapadalności kobiet nad mężczyznami przedstawiona na wykresie nr 4, jest doskonałym potwierdzeniem badań zależności zachorowania na AD od wieku i płci.



Wykres 4. Liczba osób chorych na chorobę Alzheimera lub choroby pokrewne wg płci i wieku (2024r.)

Źródło: Raport Narodowego Funduszu Zdrowia.2024; <https://ezdrowie.gov.pl/portal/home/badania-i-dane/zdrowe-dane/raporty/nfz-o-zdrowiu-choroba-alzheimera-i-choroby-pokrewne> (06.11.2025)

SAD wiąże się z polimorfizmem w genie *APOE* kodującym apolipoproteinę E (Apo-E). Dwa polimorfizmy nukleotydowe SNP w rs429358 i rs7412 warunkują istnienie trzech alleli genu *APOE*, zlokalizowane na chromosomie 19q13.2: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ lub $\epsilon 4$ [38]. Trzy formy alleli ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) genu *APOE* kodują izoformy białka Apo-E2, Apo-E3 i Apo-E4. Jedna z nich, Apo-E4, jest silnie związana ze zwiększonym ryzykiem AD zarówno u homozygot, jak i heterozygot. Natomiast Apo-E3 jest najczęściej występującą izoformą tej lipoproteiny w mózgu. Apolipoproteina E, odgrywa ważną rolę w metabolizmie lipoprotein i homeostazie cholesterolu w mózgu. Niektóre izoformy ApoE mają działanie neurotoksyczne, gdyż odpowiadają za nieprawidłowy metabolizm cholesterolu, przyczyniając się do upośledzonej redystrybucji lipidów i cholesterolu, co może wpływać na plastyczność neuronalną [11, 39-42]. W szczególności Apo-E4 promuje odkładanie się β -amyloidu, poprzez ułatwianie przekształcania białka APP do formy włóknistej oraz poprzez hamowanie usuwania $A\beta$ [40]. Allel $\epsilon 4$ genu *APOE*, kodując białko bezpośrednio włączone w regulację i modulację rozkładu cholesterolu w neuronach, odpowiada za predyspozycję do AD, czego potwierdzeniem jest obecność białka Apo-E zarówno w blaszkach starczych, jak i wewnątrzkomórkowych splątkach neurofibrylarnych (NFT) [41]. Pojedynczy allel $\epsilon 4$ genu *APOE* wśród pacjentów z SAD zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia choroby prawie czterokrotnie a związek ten jest wyraźniejszy u kobiet. Dodatkowo zaobserwowano wcześniejsze objawy chorobowe wśród nosicieli przynajmniej jednego allelu $\epsilon 4$. Homozygotyczność allelu $\epsilon 4$ zwiększa

ryzyko prawie 13-krotnie w porównaniu z osobami bez tej wersji allelu. Należy pamiętać również, że wpływ allelu $\epsilon 4$ jest najsilniejszy między 65. a 79. rokiem życia, a następnie słabnie z wiekiem [43-45].

Badania kohortowe przeprowadzone na amerykańskich pacjentach z potwierdzoną chorobą AD oraz w grupie kontrolnej wskazują, że homozygotyczność *APOE* $\epsilon 2$ jest związana ze znacznie niższym ryzykiem rozwoju choroby Alzheimera niż homozygotyczność *APOE* $\epsilon 3$ i genotypem $\epsilon 2/\epsilon 3$. Homozygotyczność *APOE* $\epsilon 2$ wiązała się, również ze znacznie łagodniejszymi objawami AD [46]. Okazuje się, że rasa ma także istotny wpływ na ryzyko AD związane z *APOE*. Nosiciele *APOE* $\epsilon 4$ pochodzenia afroamerykańskiego i latynoskiego mają niższe ryzyko choroby AD niż biali nosiciele *APOE* $\epsilon 4$, a nosiciele azjatyccy (tj. japońscy) mają najwyższy iloraz szans zachorowania. To wskazuje, że zmienność genetyczna specyficzna dla populacji w obrębie genu *APOE* może mieć większy wpływ niż ogólna zmienność genetyczna w genomie [47]. W zdrowym mózgu głównym źródłem ApoE są astrocyty, natomiast w czasie choroby wokół blaszek β -amyloidowych tworzą się reaktywne formy astrocytów, które są pozbawione ApoE. Bogatym źródłem ApoE w czasie choroby jest natomiast mikroglej występujący wokół blaszek [46]. Warto podkreślić, że sam fenotyp ApoE4 nie jest wystarczający do wywołania choroby. Pomimo pewnych dodatkowych genów ryzyka zidentyfikowanych w badaniach asocjacyjnych całego genomu, same czynniki genetyczne nie mogą wyjaśnić późnego wystąpienia AD [11, 42].

Obecnie coraz częściej z chorobą Alzheimera kojarzony jest również gen enzymu konwertującego angiotensynę ang. angiotensin-converting enzyme gene (*ACE*), który odpowiada za konwersję angiotensyny I (Ang I) w aktywny fizjologicznie peptyd angiotensynę II (Ang II) zwężający naczynia krwionośne. Odgrywa on istotną rolę w utrzymaniu odpowiedniego ciśnienia krwi oraz homeostazy sodowej w krwi i płynach ustrojowych, rozwoju patologii naczyniowej i wrodzonej odporności. Jest centralnym składnikiem układu renina-angiotensyna. Angiotensyna II wchodzi w szerokie interakcje z innymi układami odpowiedzialnymi za kontrolę ciśnienia krwi, m.in. układem współczulnym [48, 49]. Gen *ACE* zlokalizowany jest na chromosomie 17q23.3 i składa się z 26 eksonów i 25 intronów. Badania asocjacji genetycznej (GWAS) przeprowadzone przez Kehoe i in., potwierdziły znaczenie

zmienności w obrębie genu *ACE* w degradacji peptydu A β w mózgu. Metaanaliza polimorfizmu insercyjno-delecyjnego (indel) typu Alu w obrębie genu *ACE* wykazała istotną zależność allelu insercyjnego (I) na częstość występowania AD [50]. Obecność lub brak fragmentu liczącego 267 pz w DNA genu *ACE* wpływa na polimorfizm indel, który jest ściśle związany z poziomem i aktywnością ACE w AD [51]. Allel I oraz genotyp I/D są związane ze zwiększonym ryzykiem choroby, natomiast genotyp D/D ze zmniejszonym jej ryzykiem. Możliwość stosowania inhibitorów ACE celem opóźnienia zmian funkcji poznawczych, jest zależne w dużej mierze od genotypu genu *ACE* wśród pacjentów [51, 52]. Gen *ACE* został więc uznany za kandydata na gen podatności na AD, gdyż ma możliwość degradacji A β ₁₋₄₂. Osoby ze zdiagnozowanym otępieniem alzheimerowskim mogą wykazywać niższą aktywność ACE w płynie mózgowo-rdzeniowym w porównaniu z grupą osób zdrowych dobranych pod względem płci i wieku [51, 53, 54]. Inne badania wskazują, na zwiększoną aktywność ACE w kilku obszarach mózgu pacjentów umierających na chorobę Alzheimera. Aktywność enzymu była podwyższona w hipokampie przyśrodkowym i zakręcie parahipokampowym, w korze czołowej i jądrze ogoniastym [55].

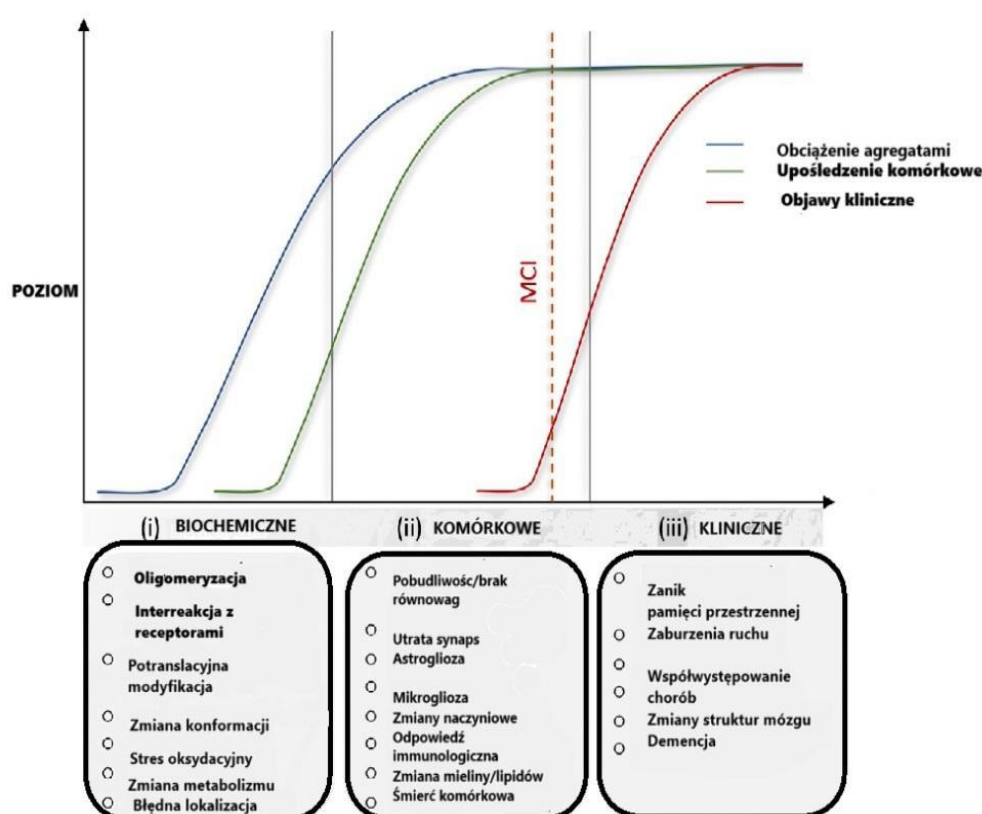
1.1.3. Sposoby diagnozowania i leczenia AD

Ostatnie badania wskazują, że patogeneza AD wyprzedza wystąpienie otępienia, a nawet niewielkich deficytów poznawczych o 10 do 20 lat. Podstawowe procesy, które wpływają na neurodegenerację rozwijają się powoli, od stadium „niemego” klinicznie, przechodząc do stadium prodromalnego z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi ang. mild cognitive impairment (MCI), do demencji. Uważa się, że znaczna część uszkodzeń jest nieodwracalna w momencie wystąpienia otępienia, co ogranicza potencjalny wpływ terapii [56]. Identyfikacja pacjentów z MCI, u których może dojść do rozwoju AD (MCI-AD) ma dziś kluczowe znaczenie. W niektórych przypadkach (od 12% do 20% rocznie) u pacjentów z MCI rozwija się zespół otępienny, podczas gdy w innych przypadkach pacjenci pozostają stabilni przez wiele lat lub nawet objawy łagodnych zaburzeń poznawczych cofają się [57]. W związku z tym, ogromny nacisk kładzie się na wdrożenie terapii we wcześniejszych stadiach choroby, dających lepszą szansę na skuteczne leczenie i zachowanie funkcji poznawczych. Identyfikacja osób w prodromalnych stadiach AD pozostaje głównym wyzwaniem, ponieważ obecne

metody diagnostyczne albo nie są w stanie dokładnie odróżnić wczesnych stadiów choroby od deficytów poznawczych związanych z wiekiem, albo są niepraktyczne w powszechnym zastosowaniu [56].

W ostatnich latach opracowano specyficzne kryteria w celu określenia stanu MCI, u podstaw których leży patologiczna amyloidoza mózgu. Pacjentów z MCI, u których istnieje duże prawdopodobieństwo rozwoju choroby, należy uznać za osoby w stanie przed demencją, zakładając, że z czasem przejdą do w pełni rozwiniętej formy AD [58].

Podczas rozwoju otępienia alzheimerowskiego dochodzi do szeregu postępujących zmian na poziomie komórkowym, biochemicznym i klinicznym co zostało przedstawione schematycznie na rycinie nr 5.



Rycina 4. Schemat hipotetycznych postępujących zmian na poziomie biochemicznym, komórkowym i klinicznym [58]. Modyfikacja własna

Postęp choroby od fazy biochemicznej (linia niebieska), przez komórkową (linia zieloną) do fazy klinicznej (linia czerwona). Wszystkie fazy najbardziej widoczne po przekroczeniu punktu granicznego (szara linia) tj. łagodnego upośledzenia funkcji poznawczych MCI.

Obecnie rozpoznanie AD opiera się głównie na ocenie neuropsychologicznej, obrazowaniu płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR) lub obrazowaniu pozytonowej tomografii emisyjnej ang. positron emission tomography (PET) w celu określenia patologicznych markerów amyloidu β lub białka Tau [13]. W ocenie neuropsychologicznej bardzo pomocny i najczęściej stosowany jest test przesiewowy Krótka Skala Zaburzeń Poznawczych ang. Mini Mental State Examination (MMSE), który pozwala skutecznie odróżnić pacjentów z upośledzeniem funkcji poznawczych od zdrowych osób. Wielokrotne powtarzanie testu MMSE pozwala zmierzyć poziom zmian w stanie poznawczym. Narzędzie to opiera się w dużej mierze na odpowiedziach werbalnych, czytaniu oraz pisaniu, dlatego ma liczne ograniczenia i nie może być podstawą diagnozowania upośledzenia funkcji poznawczych [59]. Maksymalny wynik, jaki można uzyskać w teście to 30 punktów.

- 27-30 to wynik prawidłowy
- 24-26 wskazuje na zaburzenia poznawcze bez otępienia
- 19-23 wskazuje otępienie lekkiego stopnia
- 11-18 określa otępienie średniego stopnia
- 0-10 pozwala zdiagnozować otępienie głębokie

W celu pełnej diagnostyki należy wykonać badania biochemiczne płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR), surowicy oraz badania neuroobrazowe: tomografię komputerową ang. computed tomography (CT), rezonans magnetyczny ang. magnetic resonance imaging (MRI) oraz pozytonową tomografię emisyjną (PET). Biomarkery PMR– amyloid β ($A\beta$), całkowite białko Tau (t-tau) i fosforylowane białko Tau (p-Tau) oraz obrazowanie PET mogą wskazywać na dysfunkcję synaptyczną w mózgu. Zyskały one na znaczeniu, jednak badania PMR i PET są dalekie od standardowych testów. Wysoki koszt, inwazyjność lub niewystarczająca dostępność mogą ograniczać ich zastosowania [60]. Dlatego naukowcy od wielu lat badają możliwości wykorzystywania biomarkerów krwi.

Biomarkery krwi wykorzystywane w diagnostyce choroby Alzheimera można podzielić na trzy kategorie:

- związane z patologią amyloidu w mózgu ($A\beta_{1-40}$ i $A\beta_{1-42}$),
- określające stopień neurodegeneracji tj. całkowite białko Tau (h-Tau) i lekki łańcuch neurofilamentów ang. neurofilament light polypeptide (NfL)
- wskazujące na patologię białka tau (p-Tau 181, p-Tau 231 i p-Tau 217).

Stężenia tych biomarkerów w osoczu różnią się w zależności od stadium choroby. Podczas rozwoju choroby poziom biomarkerów $A\beta_{1-42}$ i stosunek $A\beta_{1-42/40}$ w osoczu spada. Niższy poziom amyloidu β wskazuje na wysoki stopień obciążenia blaszkami starczymi, co potwierdzają skany PET oraz na znaczny spadek funkcji poznawczych [61]. Białko NfL można wykryć we krwi i wykorzystać do śledzenia uszkodzeń neuronów w chorobach neurologicznych na początku objawów, czyli około 10 lat po wykryciu nieprawidłowości w odkładaniu się amyloidu za pomocą PET lub obniżonego poziomu $A\beta_{1-42/40}$ w płynie mózgowo-rdzeniowym [62].

Modelowanie zmian poziomu biomarkerów w osoczu podczas całego spektrum choroby Alzheimera, wykazuje znaczący wzrost p-Tau 217, nieco wolniejszy wzrost p-Tau 181 oraz spadek $A\beta_{1-42}$ i $A\beta_{1-42/40}$ [61]. Badanie przeprowadzono na trzech grupach klinicznych: osoby bez podejrzenia AD, pacjenci z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi (MCI) i pacjenci z AD. Wyniki zostały potwierdzone testami markerów PMR i obrazowaniem neuropatologicznym przy użyciu PET. Moscoso i in. przez trzy lata badali zmiany poziomu p-Tau 181 w osoczu przy użyciu monoklonalnego przeciwciała myszy AT270. Przeciwciało to jest specyficzne dla fosforylowanej treoniny 181 i wychwytuje białko p-Tau 181. Wyniki badań PET wykazały, że poziom białka p-Tau 181 w osoczu wiąże się z obecnością rozległej patologii amyloidu- β i agregacją typowego dla AD białka h-Tau. Związek między poziomem p-Tau 181 w osoczu, a odkładaniem się β -amyloidu w mózgu jest silniejszy w MCI niż w AD [63]. Ponadto osoby z patologią β -amyloidu, które były nosicielami allelu *APOE4*, wykazywały wyższy poziom p-Tau 181 oraz p-Tau 217 w osoczu, natomiast stężenie $A\beta_{1-42/40}$, h-Tau i NfL nie wykazywały różnic. Stężenie p-Tau 217 w osoczu jest najwyższe wśród markerów diagnostycznych, co czyni go bardziej czułym markerem niż p-Tau 181, co potwierdzają testy PET [64]. Białka obecne w mózgu oraz płynie mózgowo-rdzeniowym przenikają przez barierę krew-mózg i przechodzą do krwi, gdzie ulegają rozcieńczeniu z innymi białkami. We krwi można wykryć białka związane z OUN. Problemem są ich małe ilości oraz zmiany i ekspresja obwodowa, które

utrudniają pomiar tych markerów z krwi. Niektóre p-Tau 181 pozwalają wyróżnić z dużą dokładnością pacjentów AD od pozostałych tautopatologii. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy osoczym h-Tau a krążącym w płynie mózgowo-rdzeniowym, natomiast stwierdzono ją w przypadku p-Tau. Dynamika zmian p-Tau 217 jest większa niż p-Tau 181. Wynik p-tau ulega zmianie pod wpływem agregacji białka Tau i pokazują nieprawidłowości w metabolizmie, który związany jest z patologia A β w mózgu [62]. Dokładny podział biomarkerów z krwi stosowany do diagnostyki AD przedstawia tabela nr 1.

Tabela 1. Biomarkery diagnostyczne w chorobie Alzheimera z krwi

Biomarker		Znaczenie w AD	Zmiana w krwi pacjenta z AD
Patologia amyloidu	A β ₁₋₄₂	Rozróżnienie między AD, łagodnymi zaburzeniami poznawczymi(MCI), przedklinicznym AD oraz kontrolą. Rozróżnienie choroby AD od innych chorób neurodegeneracyjnych	Konsekwentnie zmniejsza się zarówno we krwi, jak i w płynie mózgowo-rdzeniowym. Zmniejszenie poziomu A β ₁₋₄₂ i stosunku A β _{1-42/40} sugeruje wysoki stopień obciążenia blaszkami starczymi, co potwierdzają skany PET, i znaczny spadek funkcji poznawczych [61, 65].
	A β ₁₋₄₀	Niejednoznaczne wyniki dla samego A β ₁₋₄₀ , stosunek A β _{1-42/40} może być lepszym biomarkerem niż sam A β ₁₋₄₂ .	
Stopień neurodegeneracji	Całkowite białko Tau (hTau)	Rozróżnienie między AD, łagodnych zaburzeń poznawczych (MCI) oraz kontrolą.	Podwyższone stężenie hTau w osoczu pacjentów z AD w porównaniu z pacjentami grupy kontrolnej i pacjentami z MCI. Brak różnicy między pacjentami z MCI z rozwiniętą chorobą AD, a pacjentami ze stabilnymi łagodnymi zaburzeniami poznawczymi (MCI) [65].

	Łańcuchy lekkie neurofilament-tów NfL	Rozróżnienie pomiędzy AD a kontrolą; brak rozróżnienia AD od innych chorób neurodegeneracyjnych Przydatne w ocenie uszkodzonych neuronów.	Białka łańcucha lekkiego neurofilamentów (NfL) śledzą poziom uszkodzeń neuronów, można je wykryć we krwi dopiero po wystąpieniu objawów choroby Alzheimera, co następuje 10 lat po wykryciu nieprawidłowości w odkładaniu się amyloidu za pomocą PET lub obniżonego poziomu Aβ _{42/40} w płynie mózgowo-rdzeniowym [62].
Patologia białka Tau	p-Tau 181 p-Tau 217 p-Tau 231	Rozróżnienie pomiędzy AD a kontrolą. p-Tau 181 i p-Tau 231 odróżnia AD od innych chorób neurodegeneracyjnych	Zmiany w poziomach biomarkerów w surowicy u pacjentów z chorobą AD. Znaczący wzrost poziomu p-Tau 217, nieco wolniejszy wzrost p-Tau 181 przy jednoczesnym spadku Aβ ₁₋₄₂ i stosunku Aβ _{1-42/40} [61]. Osoby z patologią β-amyloidu, będące nosicielami allelu <i>APOE4</i> , wykazują wyższe poziomy p-Tau181 i p-Tau217 w osoczu, ale podobne stężenia Aβ _{42/40} , hTau i NfL [64]. Korelacja między poziomem pTau 181 w osoczu a obecnością rozległej patologii amyloidu-β, a także agregacją białka hTau typową dla AD w badaniu PET, jest oczywista. Związek między poziomami p-Tau 181 w osoczu a odkładaniem się β-amyloidu w mózgu jest silniejszy w MCI niż w AD [63]. Poziomy p-Tau-231 wzrastają bardziej specyficznie w chorobie AD niż w innych chorobach neurodegeneracyjnych [65].

Skróty: AD-Alzheimer disease; MCI- Mild Cognitive Impairment; Aβ₁₋₄₂ - amyloid β (1-42); Aβ₁₋₄₀ - amyloid β (1-40); h-Tau- całkowite białko Tau; p-Tau (181, 231,217)- fosforylowane białko Tau; NfL- łańcuchy lekkie neurofilamentów

Badania markerów krwi dają obiecujące wyniki w diagnozowaniu AD, jednak problem wczesnej diagnozy nadal istnieje. Ważne jest, aby zauważyć, że podwyższone poziomy p-Tau181, p-Tau217 lub p-Tau231 są skorelowane z patologiami amyloidowymi i powstawaniem NFT w mózgu. Najbardziej użyteczne biomarkery to te, które uczestniczą w wielu procesach regulacyjnych w mózgu oraz sygnalizacji neuropatologicznej. Mogą one wskazywać na chorobę Alzheimera jeszcze przed wystąpieniem jakichkolwiek zmian neuropatologicznych [12].

Obecnie najbardziej powszechną i najczęściej stosowaną skalą diagnostyczną wykorzystującą parametry biomarkerów z płynu mózgowo-rdzeniowego, jest skala Erlangen zaproponowana przez P. Lewczuk. Jest to prosty algorytm pozwalający na jednoczesną interpretację wszystkich ocenianych biomarkerów w PMR. Umożliwia kategoryzację wyników na podstawie różnych stopni i wzorców wyników patologicznych. Punktacja Erlangen opiera się na 5 stopniach od 0 do 4, gdzie 0 to brak zmian patologicznych, a 4 określa prawdopodobieństwo choroby AD. Tabela nr 2 przedstawia algorytm Erlangen pozwalający na prostą i szybką interpretację wyników oraz ocenę ryzyka rozwoju demencji w przebiegu Alzheimera [66].

Tabela 2. Skala Erlangen diagnozująca chorobę Alzheimera. Zmodyfikowano na podstawie [67]

	Aβ w normie (0)	Aβ w strefie granicznej (+1)	Aβ poziom patologiczny (+2)
Tau/pTau w normie (0)	0	1	2
Tau/pTau w strefie granicznej (+1)	1	2	3
Tau/pTau poziom patologiczny (+2)	2	3	4

Skróty: Tau-białko Tau; pTau- fosforylowane biako Tau; Aβ-amyloid β

Algorytm skali Erlangen poza wartościami patologicznymi podstawowych biomarkerów (spadek biomarkerów Aβ₁₋₄₂ lub Aβ₁₋₄₂ / Aβ₁₋₄₀, wzrost poziomu h-Tau i/lub p-Tau), bierze pod uwagę ich graniczne stężenie w tzw. szarej strefie stanowiącej 10%

wartości patologicznego biomarkera. Dokładna interpretacja skali Erlangen wg. P. Lewczuk [67] opisana została w tabeli nr 3.

Tabela 3. Interpretacja skali Erlangen. Zmodyfikowano na podstawie [67]

Klasa	Interpretacja	Wartości biomarkerów
0	Brak neurochemicznych dowodów AD	Stężenie wszystkich biomarkerów w zakresie normy
1	Mało prawdopodobna choroba AD	Stężenie jednego z biomarkerów grupy amyloidów lub białek tau mieści się w zakresie szarej strefy ↓ stężenie $A\beta_{1-42}$, ↓ wartość $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ lub ↑ stężenie p-Tau lub ↑ t-Tau ₁₈₁ .
2	Możliwa choroba AD	Stężenie jednego z biomarkerów grupy amyloidów lub białek tau wykracza poza punkt cut-off wskazujący na wartość patologiczną.
		Stężenie jednego z biomarkerów grupy amyloidów oraz białek tau mieści się w zakresie szarej strefy ↓ stężenie $A\beta_{1-42}$, ↓ wartość $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ lub ↑ stężenie h-Tau lub ↑ p-Tau ₁₈₁ .
3	Możliwa choroba AD	Stężenie jednego z biomarkerów w zakresie wartości patologicznych oraz stężenie drugiego mieści się w zakresie szarej strefy.
4	Prawdopodobna choroba AD	Stężenie markerów z obu grup tj. białek amyloidu oraz tau wykracza poza punkt cut-off wskazujący na wartość patologiczną.

Skróty: $A\beta_{1-42}$ - amyloid β (1-42); $A\beta_{1-40}$ - amyloid β (1-40); h-Tau- całkowite białko Tau; p-Tau₁₈₁- fosforylowane białko Tau

MikroRNA (miRNA, miR) to potencjalne biomarkery, które mogą odzwierciedlać zmiany homeostazy komórkowej i wskazywać na obecność wielu patologii [68]. Badania wykazały, że poziomy poszczególnych miRNA zmieniają się podczas rozwoju i różnicowania neuronów w mózgu człowieka oraz podczas starzenia się ośrodkowego układu nerwowego (OUN), przy czym zmiany te są bardziej widoczne w pełnoobjawowej chorobie Alzheimera niż w łagodnych zaburzeniach poznawczych [12, 69]. W swojej metaanalizie Moradifard zbadał i przeanalizował miRNA zaangażowane w AD, ich geny docelowe, interakcje mRNA-miRNA między nimi i szlaki sygnałowe. Porównał zbiór danych mikromacierzy z profilami ekspresji miRNA z różnych obszarów mózgu. Wykazał, że w AD liczne miRNA wykazują zróżnicowaną ekspresję, obniżoną albo podwyższoną. Ponadto zidentyfikował on powiązania między poszczególnymi genami i szlakami związanymi z AD, w tym interakcje ze szlakiem receptora macierzy zewnątrzkomórkowej ang. extracellular matrix (ECM) i cząsteczkami adhezji komórkowej ang. cell adhesion molecules (CAM). Szlaki te są kluczowe dla rozwoju neuronów, aktywności synaptycznej, tworzenia połączeń synaptycznych i integralności bariery krew-mózg [14]. Poziomy miRNA mogą się różnić u pacjentów na różnych etapach choroby Alzheimera. Dlatego miRNA mają duży potencjał jako biomarkery diagnostyczne i prognostyczne. Co istotne, miRNA można izolować z krwi lub innych płynów ustrojowych, co czyni ich wykorzystanie mniej inwazyjnym i mniej kosztownym w porównaniu do biomarkerów wymagających pobrania płynu mózgowo-rdzeniowego. Dzięki temu miRNA mogą stanowić przełom w ultra wczesnej diagnostyce choroby Alzheimera.

Na chwilę obecną nie ma skutecznych leków odwracających patologiczny proces AD. W Europie stosuje się leki, które pozwalają łagodzić objawy związane z zanikiem pamięci, myślenia i zachowania, jednak nie spowalniają procesów otepiennych. Do obecnie zatwierdzonych i dostępnych i metod leczenia objawów związanych z łagodną i umiarkowaną postacią choroby Alzheimera zaliczamy:

- Inhibitory cholinesterazy tj. donepezyl, rywastygmina i galantamina, które w wyniku wiązania z enzymem acetylocholinesterazy, nasilają przekazywanie sygnałów między komórkami mózgowymi. Ta metoda leczenia przyczynia się do złagodzenia objawów związanych z pamięcią w AD.

- Antagoniści receptora NMDA tj. memantyna, która zmniejsza nieprawidłową aktywność komórek mózgowych poprzez blokowanie przepływu prądu przez receptory NMDA na ich powierzchni. Leki z tej grupy łagodzą objawy behawioralne i poznawcze w AD [70].

Trwają liczne badania kliniczne nad lekami na chorobę Alzheimera oraz innymi demencjami. Większość badań klinicznych skupiła się na modulacji powstawania amyloidu- β ($A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$) w AD, w tym na lekach terapeutycznych ukierunkowanych na zmniejszenie gromadzenia się peptydu $A\beta_{1-42}$, hamowanie enzymów (β -sekretaza i γ -sekretaza) nieprawidłowo rozszczepiających białko APP. Liczne badania skupiają się również nad przeciwciałami monoklonalnymi anti- $A\beta$, które są skierowane przeciw toksycznemu amyloidowi. Niestety w większości badań klinicznych leki te nie osiągnęły oczekiwanych wyników. Dlatego istnieje pilna potrzeba opracowania prostszej, tańszej i specyficznej metody badawczej [71].

Obecnie ciekawym obszarem badań nad nowymi metodami leczenia choroby Alzheimera jest immunoterapia, której celem jest redukcja patologicznych uszkodzeń, spowolnienie oraz odwrócenie powstałych zmian w sferze poznawczej. Pacjent poddany immunoterapii przyjmuje fragmenty peptydu $A\beta$ skoniugowane z adiuwantem stymulującym odpowiedź immunologiczną organizmu. Działanie takie ma na celu pobudzenie produkcji przeciwciał anti- $A\beta$, które byłyby w stanie usunąć płytki $A\beta$. Niestety zarówno aktywna, jak i bierna immunoterapia są jeszcze w toku badań klinicznych. Jedną z badanych szczepionek-szczepionka ACI-24 jest liposomową szczepionką, która ma na celu wywołanie odpowiedzi przeciwciał przeciwko zagregowanym amyloidom $A\beta$ bez angażowania prozapalnych komórek T. Szczepionka ACI-24 jest w badaniach klinicznych II fazy [70, 72]. Bardzo obiecującą jest szczepionka CAD106, która pobudza odpowiedź immunologiczną nosicieli homozygoty Apo-E4 w wieku pomiędzy 60. a 75. rż., z prawidłowymi funkcjami poznawczymi [73]. Prowadzone są również badania nad bierną formą immunoterapii z użyciem przeciwciał skierowanych na różne formy amyloidu- β . Przykładem może być humanizowane przeciwciało monoklonalne BAN2401 zwane również Lecanemab, będące w III fazie badań klinicznych, które atakuje rozpuszczalne protofibryle $A\beta$, wykazujące najwyższą neurotoksyczność [70, 74]. W III fazie badań klinicznych jest również gantenerumab, w pełni ludzkie przeciwciało monoklonalne podawane

podskórnice, które wykazuje wysoką powinowatość do sfałdowanych w fibryle form A β , zarówno w regionie N-końcowym, jak i środkowym [75]. Natomiast badane w III fazie solanezumab skierowany przeciwko A β oraz krenezumab nie wykazały efektu modyfikującego przebiegu choroby [76, 77]. Prowadzone są również badania nad bierną immunoterapią wczesnego stadium choroby Alzheimerza przy wykorzystaniu przeciwciała monoklonalnego GSK4527226 zwanego również AL101, które jest w II fazie badań klinicznych. Poprzez oddziaływanie z receptorem sortiliną reguluje poziom progranuliny, czyli białka zaangażowanego w prawidłowy rozwój i funkcjonowanie komórek mózgowych i redukcję neurozapalenia w chorobie Alzheimerza [70, 78].

Innym kierunkiem badań są leki przeciwhistaminowe tj. Latrepirdyna, która ma wpływ na budowę i funkcję mitochondriów oraz chroni przed apoptozą indukowaną przez A β [79].

Postęp w badaniach nad biomarkerami i terapiami choroby Alzheimerza jest widoczny, jednak nadal brakuje skutecznej i dostępnej metody wczesnego wykrywania oraz leczenia. MiRNA i nowoczesne immunoterapie stanowią kierunki o ogromnym potencjale. W połączeniu z oceną biomarkerów osoczowych (p-Tau, A β , NfL) mogą stanowić podstawę spersonalizowanej diagnostyki i terapii AD w przyszłości.

1.2. MikroRNA i ich rola w ekspresji genów

1.2.1. Biogeneza mikroRNA

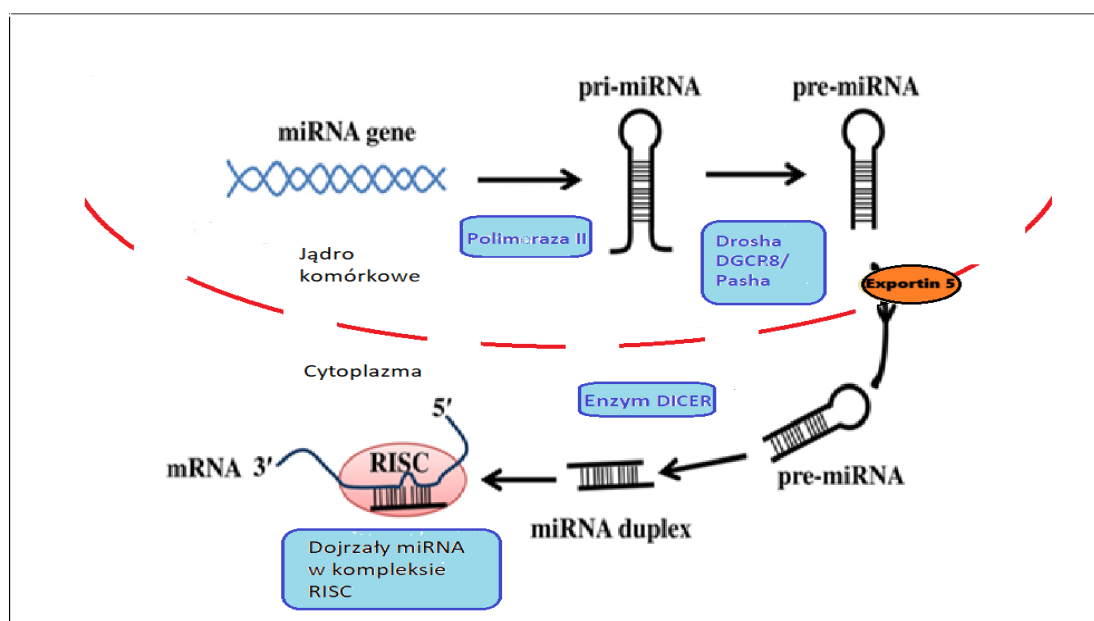
Pierwszą zidentyfikowaną cząsteczką mikroRNA (miRNA), która zrewolucjonizowała dziedzinę biologii molekularnej, był lin-4, odkryty w 1993 r. u *Caenorhabditis elegans* przez grupę Ambros i Ruvkun. Kilka lat wcześniej badacze z laboratorium Horvitz'a stwierdzili, iż lin-4 jest genem regulującym wzrost i rozwój larw *C. elegans*. Ambros i Ruvkun, po opuszczeniu grupy Horvitz'a, kontynuowali swoje badania nad lin-4 i lin-14 odkrywając, że lin-4 nie koduje białka, lecz jest małym, niekodującym RNA. Ponadto region niekodujący 3'UTR genu lin-14 jest komplementarny do lin-4, który bierze udział w potranskrypcyjnej regulacji lin-14 [80].

MiRNA to małe niekodujące cząsteczki RNA o długości około 22 nukleotydów, które biorą udział w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów u eukariotów. Geny kodujące miRNA dzięki analizom molekularnym zidentyfikowano u roślin oraz zwierząt [81]. Ponad połowa zidentyfikowanych miRNA jest wewnątrzgenowa i przetwarzana z intronów oraz niewielkiej liczby eksonów genów kodujących białka. Pozostałe geny miRNA są międzygenowe lub antysensowne i posiadają własne promotory [82]. Wykazano, że geny miRNA znajdujące się w intronach pre-mRNA mają taką samą orientację. Sugeruje się, że profil ekspresji miRNA specyficzny dla danej tkanki odpowiada profilowi ekspresji mRNA tej tkanki [83]. Te jednoniciowe kwasy nukleinowe są transkrybowane przez polimerazę RNA II lub III (RNA Pol II, RNA Pol III). MiRNA pochodzą z długich transkryptów o częściowo dwuniciowej strukturze, zwanych pierwotnym miRNA (pri-miRNA). Transkrypty pri-miRNA tworzą specyficzne struktury drugorzędowe w kształcie spinki do włosów, które w wyniku licznych procesów formują dojrzały, 22-nukleotydowy miRNA. Pri-miRNA są transkrybowane przez polimerazę RNA II, do której mają szczególne powinowactwo. W jądrze komórkowym pri-miRNA jest rozpoznawane przez białko Pasha, partnera RNAazy typu III [20, 84]. Pri-miRNA przechodzi przez dwa etapy modyfikacji endonukleazą, zanim stanie się dojrzałym i aktywnym miRNA. Pierwszy etap przeprowadza enzym Drosha, którego aktywność zależy od obecności białka wiążącego RNA ang. DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGCR8) [85]. Drosha rozszczepia strukturę w kształcie spinki do włosów w miejscach blisko podstawy pętli trzonu, formując pre-miRNA, zawierający 60-70 nukleotydów oraz fosforan 5' i 2-nukleotydowy wystający koniec 3'. Ta specyficzność działania enzymu Drosha w procesie rozszczepienia RNA, determinuje dojrzałą sekwencję miRNA i dostarcza substratu dla późniejszych etapów przetwarzania [86]. Następnie pre-miRNA jest eksportowane z jądra komórkowego do cytoplazmy przez enzym Exportin 5 w sposób zależny od białka Ran związanego z GTP (Ran-GTP). W cytoplazmie działa druga endonukleaza RNaza III (Dicer), której domena PAZ Dicer rozpoznaje i rozszczepia dwunukleotydowy wystający koniec 3' u podstawy pętli pre-miRNA. Dicer jest powiązany z białkiem wiążącym RNA ang. transactivation response RNA-binding protein (TRBP), aby wytworzyć dojrzałe miRNA. Po rozszczepieniu jeden łańcuch cząsteczki miRNA jest włączany do kompleksu wyciszającego indukowanego przez

RNA ang. RNA-induced silencing complex (RISC), podczas gdy drugi łańcuch jest degradowany [87, 88].

Dojrzałe miRNA występujące w kompleksach RISC, wiążą się z 3'UTR mRNA genu docelowego. Skład tego kompleksu białkowego nie jest jeszcze w pełni poznany. Zawiera on kluczowe białko Argonaute (AGO), które wiąże dojrzałe miRNA i wyszukuje docelowe mRNA, powodując tłumienie translacji. To z kolei prowadzi do spadku ekspresji genu kodowanego przez to mRNA [17, 85, 89]. Etapy procesu dojrzewania miRNA zostały schematycznie przedstawione na rycinie nr 5.

MiRNA reguluje ekspresję genów poprzez parowanie zasad z niekodującym regionem 3'(3'-UTR). Stopień komplementarności w obrębie kompleksu wyciszającego indukowanego przez RNA (RISC) decyduje o zahamowaniu translacji docelowego mRNA lub jego degradacji. Dlatego nadmierna ekspresja miRNA u ssaków działa głównie w celu zmniejszenia poziomu docelowego mRNA, a niska ekspresja miRNA w celu zwiększenia ekspresji mRNA [90-92].



Rycina 5. Etapy dojrzewania miRNA [93]. Modyfikacja własna.

1.2.2. Mechanizmy regulacji genów za pomocą miRNA

Od czasu zidentyfikowania pierwszego miRNA w 1993 r. liczba odkrywanych genów kodujących miRNA stale się powiększa. Obecnie według bazy danych miRBase szacuje się ok. 2000 genów miRNA [94]. Każde miRNA jest w stanie regulować do 200 mRNA. Jeden miRNA może oddziaływać na wiele genów, a jeden gen może być regulowany przez wiele miRNA [95, 96]. Badania nad miRNA wykazały, że wiążą się one ze specyficzną sekwencją na 3' UTR docelowego mRNA, wywołując zahamowanie translacji oraz deadenylację i usuwanie czapeczki w mRNA. Inne regiony mRNA, w tym 5' UTR, sekwencje kodujące oraz sekwencje promotorowe również mogą być miejscem wiązania miRNA. Wiązanie miRNA z 5' UTR i regionami kodującymi najczęściej skutkuje wyciszeniem ekspresji genów, podczas gdy interakcja miRNA z sekwencją promotorową może prowadzić do aktywacji transkrypcji [97]. Kompleks wyciszający miRNA (RISC) składa się z nici przewodniej i AGO. Komplementarność miRISC z sekwencjami docelowego mRNA zwanymi elementami odpowiedzi miRNA ang. microRNA response element (MRE) odpowiada za jego cięcie lub zahamowanie translacji i rozpad. Proces cięcia i degradacji komplementarnego miRNA, prowadzony jest przez AGO2, którego aktywność zależy od komplementarności miRNA:MRE. Należy zaznaczyć, iż większość interakcji miRNA:MRE nie jest w pełni komplementarna, dlatego białko AGO2 jest nieaktywne. Wiązanie miRNA:MRE z regionem 5' oraz dodatkowo z końcem 3' wzmacnia interakcję. Podstawą kompleksu wyciszającego miRISC jest rodzina białek GW182, które podczas interakcji miRNA:MRE, wpływają na przyłączanie do kompleksu innych białek efektorowych tj. poli(A)-deadenylazy PAN2-PAN3 ang. deadenylation complex subunit PAN3 i CCR4-NOT ang. carbon catabolite repression 4—negative on TATA-less. Białka PAN2/3 rozpoczynają proces poli(A)-deadenylacji docelowego mRNA, natomiast kompleks CCR4-NOT kończy proces i prowadzi do usunięcia czapeczki w docelowym mRNA przy współudziale białka odkapsułkowującego ang. decapping mRNA 2 (DCP2). Pozbawiony czapeczki mRNA może ulec degradacji w kierunku 5'–3' prowadzonej przez egzorybonukleazę 1 ang. 5'-3' egzoribonukleaza 1 (XRN1). Mimo, że większość badań koncentruje się na hamującej roli miRNA w ekspresji genów, należy pamiętać, że mogą one również zwiększać ekspresję. W przypadku aktywacji translacji, miRNA łączą się nie z białkiem GW182, lecz z białkami AGO2

oraz FXR1 (ang. Fragile-x-mental retardation related protein 1), które wiąże się na końcu 3' UTR aktywując translację. Niektóre miRNA, w tym let-7, wiążą się z AGO2 i FXR1 aktywując translację podczas zatrzymania cyklu komórkowego. W komórkach proliferujących ten sam kompleks może mieć hamujący wpływ na translację. Białko AGO2 przemieszcza się między jądrem a cytoplazmą poprzez Importin-8 lub Exportin-1. W jądrze komórkowym kompleks miRISC reguluje szybkość transkrypcji i poziom mRNA po transkrypcji, a także wiąże się z euchromatyną aktywnie transkrybowanych genów. Integracja miRISC z mRNA w jądrze może prowadzić do jego degradacji [82, 98].

MiRNA stanowi potencjalne narzędzie do badań nad chorobami wieloczynnikowymi, takimi jak choroby neurodegeneracyjne, w tym choroby Alzheimera [20]. Cząsteczki te biorą udział w różnych procesach biologicznych, w tym wzroście, różnicowaniu, regulacji cyklu komórkowego i cyklach metabolicznych na poziomie komórkowym. W układzie nerwowym mikroRNA regulują proliferację, różnicowanie i apoptozę komórek nerwowych na różnych etapach rozwoju, a także odgrywają kluczową rolę w kształtowaniu pamięci [99]. MikroRNA znajdujące się w neuronach są powiązane z poliribosomami, które wpływają na ekspresję białka, co sugeruje, że odgrywają istotną rolę w funkcjonowaniu tkanki nerwowej oraz w rozwoju i plastyczności mózgu. Wyniki te wskazują, że dysregulacja ekspresji miRNA może mieć związek z różnymi procesami neurodegeneracyjnymi [100].

1.2.3. miRNA zaangażowane w patogenezę choroby Alzheimera

MiRNA odgrywają istotną rolę w regulacji ekspresji genów związanych z rozwojem AD. Trwają badania nad wieloma miRNA, które regulują ekspresję genów, takich jak *APP*, *BACE1*, *PSEN 1*, *PSEN 2*, *ROCK1* (ang. Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1), *PTPNI* (ang. non-receptor type protein phosphatase 1) i innych, które są odpowiedzialne za procesy neurodegeneracyjne, takie jak gromadzenie się amyloidu- β w mózgu, nadmierna fosforylacja białka tau, indukcja stanu zapalnego lub apoptozy. Prowadzone są również badania nad miRNA, które regulują geny zaangażowane w funkcję synaps, np. *CPEB1* (ang. cytoplasmic

polyadenylation element binding protein 1) i *BDNF* (ang. brain-derived neurotrophic factor). Część miRNA uczestniczy w tzw. szlaku amyloidogennym, który prowadzi do tworzenia szkodliwych form nierozpuszczalnego amyloidu beta ($A\beta$). Wiele miRNA ma na celu region 3' (3'UTR) mRNA *APP*. Nadmierna ekspresja *APP* stymuluje produkcję i gromadzenie się $A\beta$, co powoduje upośledzoną aktywność neuronalną, zaburzenia synaptyczne i ostatecznie demencję [17]. Patel i in. (2006) wykazali, że nadmierna ekspresja miR-106a i miR-520c hamuje ekspresję genu *APP* [101]. Z kolei miRNA-101a-3p, którego poziom jest obniżony u chorych z AD, reguluje autofagię poprzez oddziaływanie z szlakiem MAPK1 (ang. extracellular signal-regulated kinase 2). Transfekcja komórek HEK-293 T za pomocą miRNA-101a-3p wpływa na przebieg patogenezy AD, co czyni ten miRNA potencjalnym celem terapeutycznym [102]. Hébert i in. (2009) potwierdzili, że nadmierna ekspresja miRNA-106, miRNA-20a i miRNA-17-5a hamuje ekspresję *APP*, co jest zgodne z wynikami podobnych badań [103]. Liu i in. (2014) wykazali nadmierną ekspresję miRNA-200b, miRNA-135a i miRNA-429 w swoich badaniach na myszach transgenicznym *APP/PSEN122*. Przeprowadzono dodatkowy eksperyment na pierwotnych neuronach hipokampu i komórkach SH-SY5Y, aby potwierdzić wpływ miRNA na ekspresję *APP* i *BACE1*. Badanie potwierdziło, że ekspresja *APP* została zahamowana w komórkach transfekowanych miRNA-200b i miRNA-429, podczas gdy ekspresja *BACE1* została stłumiona przez nadmierną ekspresję miRNA-135a [104]. *BACE1* bierze udział w tworzeniu $A\beta$, a jego ekspresja jest regulowana przez kilka miRNA. Wśród nich nadmierna ekspresja miRNA-29 prowadzi do obniżonych poziomów *BACE1* [105]. Podobnie miRNA-135b i miRNA-195a wykazały negatywną korelację z poziomami *BACE1*, co skutkowało niższymi poziomami $A\beta$. Zhang i in. przeprowadzili badanie, w którym dokonali transfekcji komórek hipokampu myszy inhibitorami miRNA-135b i mimetykami miRNA-135b. Badanie wykazało, że nadmierna ekspresja miRNA-135b poprawiała uczenie się w teście labiryntu, potwierdzając jego ochronną rolę [106]. Neurony szczurów zostały poddane transfekcji mimetykiem miRNA-195 w celu zbadania jego wpływu na ekspresję *APP* i *BACE1*. Badania potwierdziły, że miRNA-195 skutecznie zahamowało ekspresję *APP* i *BACE1* o prawie 60% w porównaniu z grupą kontrolną [107]. MiRNA-34a bierze udział w oczyszczaniu $A\beta$, który gromadzi się w mózgu i prowadzi do powstawania blaszek amyloidowych. Badania wykazały, że miRNA-34a ulega nadmiernej ekspresji w komórkach

mikroglejowych osób ze sporadyczną chorobą Alzheimera. Ten miRNA skierowany jest na receptor amyloidowy TREM2 (ang. triggering receptor expressed on myeloid cells-2) na powierzchni komórek mikroglejowych, który odpowiada za fagocytozę A β w ośrodkowym układzie nerwowym. Znaczące niedobory TREM2 odnotowano w zapalnej neurodegeneracji AD [108].

Proces fosforylacji i defosforylacji białka Tau jest regulowany przez miRNA. W badaniu Wang i in. (2015) stwierdzono, że miRNA-138 ulega nadekspresji w chorobie Alzheimera i promuje fosforylację białka Tau w modelu linii komórkowej myszy. Gen *RARA* jest bezpośrednim celem miRNA-138. Zmniejszenie ekspresji miRNA-138 zwiększa ekspresję *RARA* i osłabia aktywność glikogenowej syntazy-3 β kinazy GSK-3 β , tym samym hamując fosforylację białka Tau [109]. Z kolei miRNA-146a wpływa na fosforylację Tau poprzez represję posttranskrypcyjną *ROCK1*. Hamowanie ekspresji mikroRNA-146a przy użyciu antagomiru odwraca fosforylację kluczowych składników szlaku sygnałowego (ROCK1-PTEN-Tau) w mózgu [110].

Liczne badania wykazały, że miRNA występują zarówno w aksonach neuronalnych, jak i dendrytach, co wskazuje na ich potencjalną rolę w funkcjach synaptycznych. Synaptyczne miRNA odgrywają ważną rolę w różnych aspektach aktywności synaptycznej, w tym w rozwoju synaptycznym. Do synaptycznych miRNA zaangażowanych w plastyczność synaptyczną, synaptogenezę, morfologię i pobudliwość synaps należą m.in.: miRNA-134, miRNA-214, miRNA-188-5p, miRNA-138, miRNA-153, miRNA-124, miRNA-9-3p, miRNA-34, miRNA-125b i miRNA-132 [17, 20, 111].

1.2.4. Terapia AD z wykorzystaniem miRNA

MiRNA są bardzo interesującymi potencjalnymi biomarkerami. Zmiany ekspresji miRNA mogą odzwierciedlać złożone zmiany w homeostazie komórkowej i wskazywać na obecność wielu patologii [68]. Wykazano, że poziomy poszczególnych miRNA różnią się podczas rozwoju neuronów i różnicowania ludzkiego mózgu oraz w starzejącym się centralnym układzie nerwowym [12], a zmiany te są bardziej widoczne w AD niż w MCI [69]. Rodzina miRNA zaangażowana w patogenezę AD

wpływa na regulację genów i procesy epigenetyczne związane z tą chorobą. Mają one duży potencjał ze względu na swoją stabilność w środowiskach pozakomórkowych, odporność na degradację oraz łatwość kwantyfikacji przy użyciu technik takich jak ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-qPCR). MiRNA są także odporne na kilkukrotne cykle rozmrażania i zamrażania, co czyni je idealnymi do wykorzystania w badaniach biomarkerów [56]. Charakterystyczne profile ekspresji miRNA w poszczególnych jednostkach chorobowych wykazują duży potencjał diagnostyczny i prognostyczny — mogą umożliwiać nie tylko wczesne wykrywanie schorzeń, takich jak choroby neurodegeneracyjne czy nowotwory, ale również przewidywać odpowiedź na leczenie i indywidualną wrażliwość pacjenta na konkretne terapie [85].

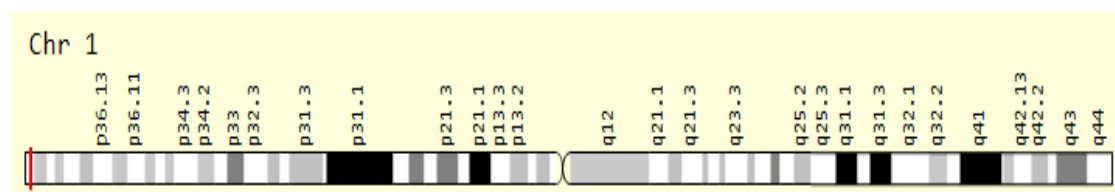
W przypadku, gdy dana choroba wiąże się z obniżonym poziomem konkretnego miRNA, możliwe jest jego uzupełnienie poprzez podanie pacjentowi jego syntetycznego odpowiednika, tzw. mimikry miRNA. Z kolei jeśli dany miRNA jest nadmiernie aktywny, można zastosować inhibitory oligonukleotydowe, które wiążą się z tym miRNA i blokują jego oddziaływanie z docelowymi mRNA [85]. Pomimo obiecujących wyników badań, identyfikacja zestawu miRNA, które mogłyby odzwierciedlać stan funkcji poznawczych, umożliwiać wczesne wykrywanie ryzyka zaburzeń neurodegeneracyjnych oraz stanowić cel terapeutyczny, pozostaje wyzwaniem dla współczesnej medycyny i biologii molekularnej [112].

1.3. Przegląd wybranych miRNA pretendujących do roli biomarkerów AD

1.3.1. MiRNA-200a-3p

MIR200a (miRNA-200a) to gen kodujący niekodujący RNA, powiązany z klasą miRNA. Choroby związane z MIR200a obejmują opaniaka i raka jajnika. Gen ten jest powiązany z ncRNA, które są zaangażowane w sygnalizację STAT3 w raku wątrobowo-komórkowym, z miRNA w macierzy pozakomórkowej ang. extracellular matrix (ECM) i receptorach błonowych. MiRNA-200a należy do rodziny prekursorów Mir-8/mir-141/mir-200. Homologiem rodziny miRNA-200 jest miRNA-8 u *Drosophila melanogaster*. Dlatego w badaniach nad odkryciem funkcji biologicznej rodziny miRNA-200 wykorzystywana właśnie ten gatunek. W rodzinie miRNA 141/200

wyróżniamy: gen kodujący miRNA-141 (hsa-miR-141), występujący na ramieniu krótkim chromosomu 12 w pozycji 12p13.31, miRNA-200a (hsa-miR-200a) na krótkim ramieniu chromosomu 1 w pozycji 1p36.33 (ryc.6), miRNA-200b (hsa-miR-200b) na chromosomie 1 w pozycji 1p36.33, miRNA 200c (hsa-miR-200c), na chromosomie 12 w miejscu 12p13.31 oraz miRNA-429 (hsa-miR-429) na chromosomie 1p36.33 [113].



Rycina 6. Lokalizacja genu kodującego miR-200a na chromosomie .

Za:<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR200A&keywords=miRNA200a#localization-ptm>

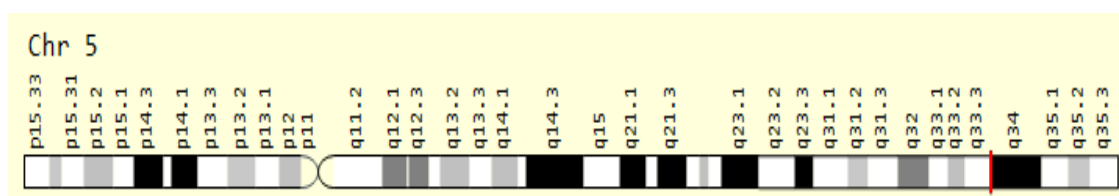
MiRNA-200a-3p, członek rodziny miRNA-200, odgrywa znaczącą rolę w nowotworach u ludzi. Ostatnie badania sugerują, że może on mieć również wpływ na patologię choroby Alzheimera. W modelu myszy transgenicznym (APP/PS1) wykazano, że poziom ekspresji miRNA-200a-3p obniża się podczas choroby Alzheimera. Podobnie, znacznie niższe poziomy miRNA-200a-3p zaobserwowano w osoczu pacjentów z AD w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej. Eksperymenty *in vitro* z użyciem komórek transfekowanych mutacją APP_{swe} wykazały, że nadekspresja miRNA-200a-3p hamuje produkcję A β ₁₋₄₂, podczas gdy jego obniżona ekspresja prowadzi do nadprodukcji toksycznej formy A β . Ujemną korelację można zauważyć również z mRNA *BACE1*, który jest głównym celem miRNA-200a-3p. Ponadto, miRNA-200a-3p reguluje ekspresję genu *PRKACB* (ang. Protein Kinase CAMP-Activated Catalytic Subunit Beta), kodującego jedną z podjednostek katalitycznych rodziny kinazy białkowej (ang. protein kinase A-PKA), która zwiększa poziom fosforylowanego białka Tau. Badania potwierdziły, że mimetyki miRNA-200a-3p znacząco zmniejszają ekspresję zarówno mRNA, jak i białka PRKACB [114].

Inna grupa badawcza wykazała, że miRNA-200a-3p jest zaangażowany w apoptozę neuronów indukowaną przez β -amyloid (A β). W badaniach

przeprowadzonych na komórkach hipokampu myszy APPswe/PS zaobserwowano jego nadekspresję oraz obniżony poziom sirtuiny 1 ang. sirtuin1 (SIRT1). SIRT1 jest białkiem antyapoptycznym, które hamuje apoptozę neuronów. Analiza sekwencji wykazała obecność miejsc wiązania miRNA-200a-3p w regionie 3'-UTR mRNA *SIRT1*, co potwierdzono w teście genu reporterowego. Tłumienie miRNA-200a-3p prowadziło do zwiększenia poziomu SIRT1 i zmniejszenia apoptozy neuronów indukowanej A β . Wyniki te wskazują, że miR-200a-3p może być potencjalnym celem terapeutycznym w leczeniu choroby Alzheimerera [115].

1.3.2. MiRNA-146a-5p

MIR146A (MiRNA 146a) to gen kodujący mikroRNA należące do klasy miRNA-146, występujących u ssaków, w tym u ludzi. MiR-146 jest przede wszystkim zaangażowany w regulację stanu zapalnego i innych procesów wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Utrata funkcjonalnego miRNA-146 może przyczynić się do wystąpienia zespołu delecji chromosomu 5q. Mechanizmy regulacji ekspresji miRNA-146 można zauważyć również w chrzastce zwyrodnieniowej stawów, co wskazuje na jego potencjalną rolę w jej patogenezie. Ponadto, jego ekspresja wykazuje działanie ochronne w potrójnie ujemnym raku piersi. W rodzinie miRNA-146 wyróżniamy: miRNA-146a (hsa-mir-146a), zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 5 w pozycji 5q33.3 (ryc. 7) oraz mikroRNA 146b (hsa-mir-146b) zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 10 w pozycji 10q24.32 [113].



Rycina 7. Lokalizacja genu kodującego miR-146a na chromosomie 5

Za: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR200A&keywords=miRNA200a#localization-ptm>

Zwiększoną ekspresję miRNA-146a wykazano w obszarach mózgu najbardziej dotkniętych patologią białka tau, w szczególności w hipokampie i korze skroniowej.

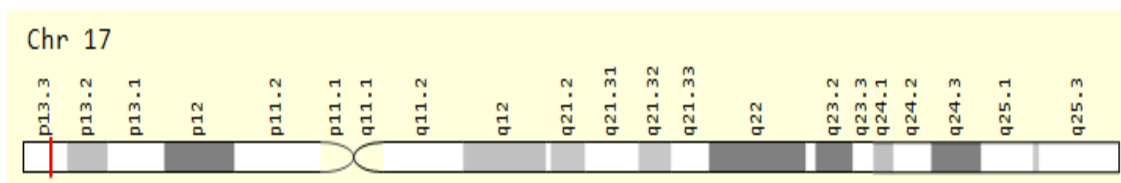
U pacjentów z AD miRNA-146a jest zaangażowany w hiperfosforylację białka Tau i ogólną patogenezę choroby. W komórkach nerwowych miRNA-146a reguluje ekspresję mRNA *ROCK1*, genu kodującego kinazę ROCK1. Zahamowanie ROCK1 może przyczyniać się do niskiego poziomu fosforylacji fosfatazy PTEN i indukować nieprawidłową fosforylację białka Tau. Co więcej, w transgenicznym mysim modelu AD zwanym 5xFAD, zawierającym trzy mutacje (dwie w genie *PSEN1* i jedna mutacja w genie *APP*), hamowanie ekspresji miRNA-146a prowadziło do zwiększenia poziomu białka ROCK1 oraz tłumienia hiperfosforylacji białka Tau, co częściowo przywracało funkcje poznawcze. Z kolei nadekspresja miRNA-146a w linii komórkowej ludzkiego neuroblastoma SH-SY5Y znacząco zwiększa fosforylację białka Tau i hamuje translację białka ROCK1, co prowadziło do zaburzeń cytoszkieletu neuronów i destabilizacji mikrotubul. Wiadomo, że fosfataza PTEN defosforyluje białko Tau, a utrata funkcji PTEN jest związana z neurodegeneracją, w której pośredniczy hiperfosforylacja Tau i tworzenie się splotków neurofibrilarnych [110].

Huang i in. (2021) wykryli istotnie wyższy poziom miRNA-146a we krwi obwodowej pacjentów z AD w porównaniu do osób zdrowych. Stwierdzono ujemną korelację pomiędzy poziomem miRNA-146a a stężeniem A β 1-42 oraz wynikami testu MMSE u pacjentów z AD. Dodatkowo, poziom białka tau był dodatnio skorelowany z miRNA-146a [116]. Natomiast Maffioletti i in. (2019) w swoich badaniach porównawczych nie stwierdzili istotnych różnic poziomu miRNA-146a w osoczu między pacjentami z chorobą Alzheimera a grupą kontrolną. Badania te wykazały jednak, że wzrost poziomu miRNA-146a wraz z wiekiem oraz jego zależność od płci – niższe poziomy odnotowano u kobiet [117].

1.3.3. MiRNA-132-3p

MIR132 (MiRNA 132) to gen kodujący mikroRNA, należące do rodziny miRNA-212/132, powiązanej z różnymi szlakami biologicznymi. Rodzina ta reguluje zarówno przerost mięśnia sercowego, jak i autofagię kardiomiocytów. Choroby związane ze zmienioną ekspresją miRNA-132 obejmują chorobę Huntingtona i reumatoidalne zapalenie stawów. Do szlaków biologicznych regulowanych przez miRNA-132 należą m.in. procesy związane z chorobą Alzheimera oraz mechanizmy

działania miRNA na poziomie transkrypcyjnym i translacyjnym. Rodzina miRNA132/212 obejmuje: miRNA-132 (hsa-mir-132) leżący na krótkim ramieniu chromosomu 17 w pozycji 17p13.3 (ryc. 8) oraz miRNA-212 (hsa-mir-212) leżący również na chromosomie 17 w pozycji 17p13.3 [113].



Rycina 8. Lokalizacja genu kodującego miR- 132 na chromosomie 17

Za: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR200A&keywords=miRNA200a#localization-ptm>.

Hernandez-Rappi i in. (2016) wykazali, że niedobór miRNA-132 i miRNA-212 u myszy sprzyja patologii A β . Zarówno miRNA-132, jak i miRNA-212 odgrywają ważną rolę w procesie pamięci poprzez wpływ na plastyczność synaptyczną oraz wzrost neuronów. Badanie wykazało, że poziomy miRNA-132 i miRNA-212 są obniżone u osób z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi, jak i u pacjentów z chorobą Alzheimera, co korelowało z upośledzeniem pamięci. Wykorzystując w swoich badaniach myszy z zastosowanym nokautem miRNA-132/21, grupa badawcza potwierdziła wpływ delecji miRNA-132/212 na zwiększoną fosforylację i akumulację białka tau, a także produkcję i usuwanie A β . Dodatkowo, badając transgeniczny model myszy (3xTg-AD), udowodniono, że miRNA-132 celuje w *SIRT1*, *MAPK1/ERK2* i *MAPT*, których poziomy były podwyższone, co skutkowało zwiększoną patologią białka Tau i deficytami pamięci. Pobudzenie ekspresji miRNA-132 i miRNA-212 może częściowo zatrzymać ten proces [118].

Ponadto Deng i in. (2020) przeprowadzili badania na szczurach i stwierdzili, że miRNA-132 hamuje ekspresję genu *MAPK1*, kodującego kinazę białkową aktywowaną mitogenem 1 ang. Mitogen-Activated Protein Kinase 1 (ERK1). Szlak kinazy serynowo-treoninowej (MAPK) jest zaangażowany w szlak sygnałowy p38, który nasila stan zapalny i apoptozę podczas stresu oksydacyjnego. Dlatego obniżona ekspresja miRNA-132 w AD prowadzi do zwiększonej aktywności MAPK1, nasilając procesy zapalne i śmierć neuronów [119].

2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Celem pracy doktorskiej było zbadanie zmian ekspresji wybranych miRNA, w zależności od stopnia zaawansowania choroby Alzheimera oraz zależności pomiędzy ekspresją miRNA a polimorfizmem w genach *APOE* oraz *ACE*.

Do realizacji postawionego celu posłużono się:

1. Określeniem zaburzeń ekspresji wybranych miRNA u pacjentów w różnej fazie otępienia (MCI, AD I, AD II, AD III).
2. Analizą korelacji pomiędzy ekspresją badanych miRNA a stężeniem białek amyloid- β .
3. Analizą korelacji pomiędzy ekspresją badanych miRNA a stężeniem białek Tau.
4. Analizą korelacji pomiędzy ekspresją badanych miRNA a wartością współczynników diagnostycznych AD.
5. Określeniem związku pomiędzy klinicznymi cechami przebiegu AD a poziomem ekspresji miRNA.
6. Określeniem związku polimorfizmu SNP w genie *APOE* z poziomem ekspresji miRNA.
7. Określeniem związku polimorfizmu inercyjno-delecyjnego w genie *ACE* z poziomem ekspresji miRNA .

Zaplanowane badania miały na celu weryfikację następujących **hipotez badawczych**:

1. Profil ekspresji krążących miRNA (miRNA-200a-3p, miRNA-146a-5p, miRNA-132-3p) różni się u pacjentów w zależności od stopnia zaawansowania choroby Alzheimera.
2. Obecność allelu $\epsilon 4$ w genie *APOE* wpływa na ekspresję krążących miRNA.
3. Obecność allelu insercyjnego (I) w genie *ACE* wpływa na ekspresję krążących miRNA.

3. MATERIAŁY I METODY

Praca ma charakter retrospektywny. Na przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej badania, została udzielona zgoda Komisji Bioetycznej przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Rzeszowie, 35-030 Rzeszów, ul. Dekerta 2 na mocy Uchwały Nr 59/B/2015 oraz Aneksu K/B/8/D/2025. Badania prowadzono w ramach współpracy z Kliniknym Szpitalem Wojewódzkim Nr 2 im. Św. Jadwigi Królowej w Rzeszowie z Kliniką Neurologii z Pododdziałem Leczenia Udaru Mózgu, którego Kierownikiem jest Pani profesor dr hab. n. med. Halina Bartosik-Psujek. Materiał od chorych pobierano w latach 2015-2020 w trakcie badań diagnostycznych. Pacjenci i ich opiekunowie zostali poinformowani o wykorzystaniu materiału do dalszych badań molekularnych i wyrazili na to zgodę. Wszystkie badania kliniczne pacjentów, wywiady z pacjentami i ich wiarygodnymi opiekunami oraz diagnostyka laboratoryjna przeprowadzono w Kliniknym Szpitalu Wojewódzkim Nr 2 im. Św. Jadwigi Królowej w Rzeszowie. Badania molekularne do niniejszej rozprawy doktorskiej zostały zrealizowane w Laboratorium Biologii Molekularnej Przyrodniczo-Medycznego Centrum Badań Innowacyjnych Uniwersytetu Rzeszowskiego.

3.1. Charakterystyka grupy badanej

Grupę badaną stanowili pacjenci z Kliniknego Szpitala Wojewódzkiego Nr 2 w Rzeszowie. Analizie molekularnej poddano 70 pacjentów (35 kobiet oraz 35 mężczyzn) między 59 a 92 rokiem życia z rozpoznaną chorobą otępienną od stadium łagodnego zaburzenia poznawczego MCI, poprzez trzy fazy choroby Alzheimer: łagodne otępienie (AD I), umiarkowane otępienie (AD II) oraz głębokie otępienie AD (III). Klasyfikacji klinicznej dokonali specjaliści z Kliniki Neurologii z Pododdziałem Leczenia Udaru Mózgu. Diagnozę przeprowadzono na podstawie wywiadu lekarskiego, testu MMSE (n=45) oraz testów diagnostycznych ELISA z PMR do określenia parametrów białkowych charakterystycznych w chorobie Alzheimer (białko Tau, białko amyloid- β). W badaniu uczestniczyło również 27 osób zdrowych, nie wykazujących żadnych objawów otępiennych, stanowiących grupę kontrolną. Grupa kontrolna składała się z 11 kobiet oraz 16 mężczyzn w wieku 45-84 lata. Grupa

pacjentów z MCI (19 osób) stanowiła 19,59% wszystkich badanych pacjentów. Pacjenci z AD I (20 przypadków) stanowili 20,62% grupy badanej. Najliczniejszą przebadaną grupą byli pacjenci z AD II (22 osoby) stanowiące 22,68 %. Pacjenci z AD III (9 osób) tworzyli najmniej liczną grupę badaną, stanowiącą 9,28% wszystkich badanych. Porównawcza grupa kontrolna stanowiła 27,84% grupy poddanej badaniom. Średnia wieku osób z wszystkich grup w momencie prowadzonych badań wynosiła 72 lata. Pełnej diagnostyce z uwzględnieniem testów przesiewowych MMSE zostało poddanych 45 pacjentów (64%). Charakterystyka grupy badanej została przedstawiona w tabeli nr 4.

Tabela 4. Charakterystyka grupy badanej

Zmienna	Wszyscy (100%; n=97)	MCI (19,59%; n=19)	ADI (20,62%; n=20)	AD II (22,68%; n=22)	AD III (9,28%; n=9)	Kontrola (27,84%; n=27)
Płeć (n)	51	11	10	8	6	16
(% płci męskiej)	(52,58%)	(57,89%)	(50,00%)	(36,36%)	(66,67%)	(59,26%)
(% płci żeńskiej)	46 (47,42%)	8 (42,11%)	10 (50,00%)	14 (63,64%)	3 (33,33%)	11 (40,74%)
Śr. wieku (min-max)	71,75 (45-92)	74,75 (64-85)	72,70 (59-85)	73,12 (59-92)	71,54 (59-90)	72,57 (45-84)
Komponenty psychologiczne						
Objawy otępienne (%)	72,16	100	100	100	100	0
Śr. wynik testu MMSE (średnia ilość pkt.)	18,74	26,45	22,15	17,67	4,78	28
Objawy depresji (%)	12,37	11,11	22,22	9,09	11,11	11,11
Komponenty kliniczne						
Śr. poziom wit.B₁₂ (pg/ml)	335,79	400,53	305,94	309,64	214,56	470
Pacjenci z niedoborem B₁₂ (%)	13,4	0	25	13,64	33,33	18,18

Miażdżyca (%)	22,68	15,79	20	18,18	33,33	29,63
Astma (%)	1,03	5,26	0	0	0	0
Niedoczynność tarczycy (%)	4,12	0	10	0	0	7,41
Choroba niedokrwienna serca MIC (%)	13,40	15,79	20,00	9,09	11,11	11,11
Cukrzyca (%)	24,74	16,67	25,00	31,82	33,33	23,08
Nadciśnienie (%)	59,79	42,11	60,00	59,09	77,78	66,67
Hiperlipidemia (%)	41,24	78,95	25,00	27,27	62,50	33,33
Cholesterol całkowity(śr.) Pacjenci z podwyższonym cholesterolem (%)	200,13 50,52	212,23 70,59	197,79 52,63	196,5 50,00	213,13 62,50	190,85 55,00
Cholesterol LDL (śr.) Pacjenci z podwyższonym LDL (%)	126,43 34,02	138,53 73,33	122,38 38,46	113 50,00	138,29 57,14	129,4 40,00
Cholesterol HDL (śr.) Pacjenci z obniżonym HDL (%)	52,94 12,37	57,47 13,33	46,77 23,08	54,17 16,67	45,14 42,86	57,40 10,00
Trójglicerydy (śr.) Pacjenci z podwyższonym poziomem TG (%)	138,00 18,56	153,33 20,00	124,54 15,38	135,67 38,89	144,71 42,86	132,00 30,00
Choroby towarzyszące (%)	75,26	61,11	84,21	80,00	88,89	81,48
Komponenty biochemiczne (śr.)						
Stężenie pTau (pg/mL)	72,21	52,44	87,08	83,70	54,00	69,88
Stężenie hTau (pg/mL)	569,78	312,03	753,79	676,13	518,95	437,23

Stężenie Aβ1-42 (pg/mL)	493,15	457,85	620,23	517,90	265,021	411,13
Stężenie Aβ1-40 (pg/mL)	10088,83	10985,73	10653,75	10300,412	7590,11	7939,25
Współczynnik Aβ1-42/Aβ1-40 (pg/mL)	0,05	0,045	0,059	0,053	0,032	0,052
Współczynnik pTau/Aβ1-42 (pg/mL)	0,20	0,139	0,170	0,194	0,39	0,202
Współczynnik hTau/ Aβ1-42 (pg/mL)	1,61	0,842	1,260	1,640	4,16	1,34
Komponenty genetyczne						
Polimorfizm w genie <i>APOE</i> (%)						
APOE 2/2	4,12	10,53	0	0	0	7,41
APOE 3/3	57,73	63,16	50	50	33,33	74,07
APOE 4/4	4,12	0	10	0	11,11	3,71
APOE 2/3	3,09	0	5	9,10	0	0
APOE 2/4	2,06	5,26	0	4,54	0	0
APOE 3/4	28,87	21,05	35	36,36	55,56	14,81
Polimorfizm w genie <i>ACE</i> (%)						
ACE II	27,83	26,31	50	31,82	22,22	11,11
ACE ID	47,42	52,63	30	54,54	55,55	48,15
ACE DD	24,74	21,05	20	13,64	22,22	40,74

śr.- wartości średnie; %-procent; n-liczebność

Charakterystyka grupy badanej pod względem płci, wieku, parametrów psychologicznych (wyniki testu MMSE), biochemicznych (biomarkery MRI wykorzystywane do diagnostyki AD), klinicznych (choroby towarzyszące) oraz genetycznych (polimorfizmy genów związanych z chorobami neurodegeneracyjnymi) uwzględniając stadium choroby AD (MCI, AD I, AD II, AD III) oraz grupę kontrolną.

3.2. Kryteria doboru grupy badanej

A) Grupa badana

Kryteria kwalifikacji chorych włączonych do badań obejmowały:

- stwierdzone otępienie na podstawie wyników przesiewowych testów oceny funkcji poznawczych (MMSE oraz test rysowania zegara),
- brak innych chorób neurodegeneracyjnych.

Kryteria wykluczenia pacjentów do badań obejmowały m. in:

- stwierdzone inne choroby neurologiczne tj. stwardnienie rozsiane (SM), stwardnienie zanikowe boczne (SLA), otępienie z ciałami Lewy'ego (DLB), otępienie zwyrodnieniowe płatów czołowo-skroniowych (FTLD), chorobę Creutzfeldta-Jakoba (CJD).

B) Grupa kontrolna:

Kryteria włączenia do grupy kontrolnej obejmowały:

- brak zaburzeń poznawczych stwierdzonych na podstawie wywiadu oraz testów przesiewowych (MMSE, test rysowania zegara),
- brak objawów klinicznych, prawidłowe wyniki badań obrazowych oraz biochemicznych,
- wiek powyżej 45 lat.

Kryteria wyłączenia do grupy kontrolnej obejmowały:

- nieprawidłowe wyniki badań biochemicznych oraz badań obrazowych mózgu,
- stwierdzone nieprawidłowe objawy neurologiczne,
- wiek poniżej 45 lat.

Pacjenci włączeni do badania podlegali ocenie klinicznej przez zespół specjalistyczny z Kliniki Neurologii z Pododdziałem Leczenia Udaru Mózgu Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego Nr 2 w Rzeszowie. W niniejszej pracy poddano analizie następujące elementy diagnozy i przebiegu choroby: wynik testu przesiewowego MMSE, stan psychiczny pacjentów (objawy depresyjne), stan kliniczny uwzględniający występowanie chorób towarzyszących wśród badanej grupy tj. choroba miażdżycowa, cukrzyca, niedoczynność tarczycy, nadciśnienie tętnicze, choroba niedokrwienna serca MIC, hipercholesterolemia, astma, inne choroby

współtowarzyszące. Oceniono również poziom parametrów biochemicznych z krwi w postaci poziomu witaminy B₁₂, cholesterolu całkowitego oraz jego frakcji (HDL, LDL, TG). Ocenie poddano również wyniki parametrów biochemicznych z płynu mózgowo-rdzeniowego tj. białka amyloidowe (Aβ₁₋₄₂, Aβ₁₋₄₀), współczynnik Aβ₁₋₄₂/Aβ₁₋₄₀, białka Tau (p-Tau, h-Tau), współczynnik pTau/Aβ₁₋₄₂ oraz hTau/Aβ₁₋₄₂. Dodatkowo dokonano oceny ryzyka zachorowania na AD powiązanego z polimorfizmami w genach *APOE* oraz *ACE*, na podstawie udostępnionych danych z badań molekularnych. Wszystkie analizy dla w/w parametrów biochemicznych oraz badania molekularne obejmujące określenie polimorfizmu genów *APOE* i *ACE* zostały wykonane w Laboratorium Biologii Molekularnej Przyrodniczo-Medycznego Centrum Badań Innowacyjnych Uniwersytetu Rzeszowskiego.

W ramach niniejszej pracy badawczej zbadano poziom ekspresji trzech wybranych miRNA: miRNA-132-3p, miRNA-146a-5p oraz miRNA-200a-3p w całej grupie badanej. Pacjentów podzielono na 4 podgrupy: MCI, AD I, AD II oraz AD III. W celach porównawczych posłużono się również grupą kontrolną K obejmującą tylko osoby zdrowe.

3.3. Materiał biologiczny

Materiałem biologicznym była krew pełna pobrana na EDTA, surowica pobrana bez koagulantów do badań genetycznych i molekularnych (polimorfizmy *APOE*, *ACE*, ekspresja miRNA) oraz płyn mózgowo-rdzeniowy do testów ELISA (Aβ₁₋₄₂, Aβ₁₋₄₀, pTau, hTau). Materiał do badań molekularnych biobankowano i przechowywano w temperaturze -80 °C. Biobankowanie jako proces gromadzenia i przechowywania próbek materiału biologicznego, zwykle ludzkiego pozwala na uzyskanie wartościowych próbek do badań genetycznych i molekularnych z zachowaną integralnością białek oraz kwasów nukleinowych.

3.4. Metody

3.4.1. Oznaczenie poziomu białek w PMR metodą ELISA

Do określenia poziomu białek w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) będącymi biochemicznymi markerami choroby Alzheimera, posłużono się testem immunoenzymatycznym typu ELISA. Jest to prosta, czuła, szybka i niezawodna technika do oznaczania antygenów i przeciwciał. Testy ELISA opracowano w wielu konfiguracjach ale zasada jest taka sama. W fazie stałej jeden z immunoreagentów (przeciwciało lub antygen) jest unieruchomiony na płytce przez adsorpcję, wykorzystując oddziaływania niekowalencyjne. Unieruchomione przeciwciało jest następnie inkubowane z roztworem testowym zawierającym interesujący analit i płukane. Związany antygen wykrywany jest poprzez dodanie przeciwciała sprzężonego z enzymem, wiążącego się z pozostałymi miejscami w antygenie [120].

W celu zdiagnozowania AD oprócz badania PET oraz testu przesiewowego MMSA zastosowano badanie PMR w kierunku obecności białek: β -amyloid₁₋₄₀, β -amyloid₁₋₄₂, ufosforylowanego białka Tau (pTau – formy 181P) i całkowitego białka Tau –hTau. Testy ELISA wykonano w PMR pobranym zgodnie z protokołami firmy dołączonymi do zestawów w grupie liczącej (n=97) osób. Do tego celu wykorzystano testy immunoenzymatyczne firmy Fujirebio (Japonia). Absorbancję wszystkich próbek odczytano na czytniku Tekan Infinite 200 Pro (Szwajcaria) korzystając z oprogramowania iControl. Analizy uzyskanych wyników dokonano przy pomocy programu dostępnego on-line: MyAssays Four Parameter Logistic Regression, który kreśląc krzywe wzorcowe, automatycznie odczytuje stężenie badanych białek. Uzyskane wyniki stężeń białek: β -amyloid₁₋₄₀, β -amyloid₁₋₄₂, ufosforylowanego białka Tau (pTau), całkowitego białka Tau (hTau) oraz współczynników $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$; hTau/ $A\beta_{1-42}$ i pTau/ $A\beta_{1-42}$ poddano analizie statystycznej. Umożliwiło to zakwalifikowanie pacjentów do danego stadium otępienia oraz znalezienia zależności z innymi badanymi parametrami m. in. polimorfizmami w wybranych genach oraz poziomem ekspresji wybranych miRNA. Badania stężenia białek metodą ELISA zostały przeprowadzone w Laboratorium Biologii Molekularnej Przyrodniczo-Medycznego Centrum Badań Innowacyjnych Uniwersytetu Rzeszowskiego.

3.4.2. Oznaczenie polimorfizmu w genie *ACE* metodą PCR

Polimorfizm insercyjno/delecyjny rs1799752 występujący w intronie 16 genu *ACE*, coraz częściej kojarzony jest z chorobą Alzheimera. Polimorfizm insercyjny (I) polega na obecności dodatkowego fragmentu transpozonowego tzw. Alu liczącego 287 nukleotydów. W przypadku braku tego fragmentu w intronie 16. występuje polimorfizm delecyjny określany jako typ dziki (D).

W celu określenia polimorfizmu w genie *ACE* użyto następujących starterów: F:5' CTG GAG AGC CAC TCC CAT CCT TTC 3' oraz starter R: 5' GAC GTC GCC ATC ACA TTC GTC AGA T 3' [121]. Przy każdej reakcji stosowano kontrole negatywne prowadząc w ten sposób stały monitoring czystości mieszaniny reakcyjnej. Reakcję PCR prowadzono przy użyciu termocyklera firmy BIO-RAD (USA) wg profilu termicznego: I etap (denaturacja wstępna) 95°C, 10 min; II etap powtórzono 29 razy (denaturacja 95°C, 1 min; przyłączenie starterów 64°C, 1 min; elongacja 72°C, 1 min), etap końcowy (elongacja końcowa 72°C, 2 min). Potwierdzenie obecności i jakości otrzymanych produktów amplifikacji uzyskano poprzez rozdział elektroforetyczny w 2,5% żelu agarozowym. Poszczególne genotypy wraz z wielkością produktów opisane zostały w tabeli nr 5.

Tabela 5. Genotypy ACE dla polimorfizmu rs1799752 w zależności od wielkości uzyskanych produktów PCR

Genotypy <i>ACE</i>	Wielkość prążków (pz) produktu PCR na żelu agarozowym
DD	193 pz
ID	193 pz I 480 pz
II	480 pz

pz-par zasad

3.4.3. Oznaczenie polimorfizmu w genie *APOE* metodą PCR- RFLP

Gen *APOE* odpowiada głównie za regulację metabolizmu lipidów w organizmie oraz transport cholesterolu i regenerację neuronów w mózgu. Jego polimorfizmy, zwłaszcza obecność allelu $\epsilon 4$, są istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju choroby Alzheimera. Gen ten wykazuje polimorfizm punktowy ang. single nucleotide polymorphism (SNP). SNP jest to zmiana w określonej pozycji w DNA polegająca na zamianie jednego nukleotydu na inny w obrębie genomu. Występuje u znacznej części populacji, co najmniej 1 %. W celu określenia genotypu genu *APOE* dla dwóch polimorfizmów rs429358 i rs7412 wykorzystano metodę PCR polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych ang. PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Do amplifikacji genu *APOE* wykorzystano następujące startery: F: 5' TCC AAG GAG CTG CAG GCG GCG CA 3' i starter R: 5' GCC CCG GCC TGG TAC ACT GCC A 3' uzyskując fragment DNA o długości 218 pz, obejmujący dwa punkty polimorficzne *APOE* [122].

Aby uzyskać wiarygodne wyniki badań prowadzono stały monitoring czystości mieszaniny reakcyjnej, poprzez stosowanie kontroli negatywnych. Reakcje PCR prowadzono wg profilu termicznego: I etap (denaturacja wstępna) 95° C, 5 min; II etap powtórzono 35 razy (denaturacja 95° C, 30 s; przyłączenie starterów 65° C, 30 s; elongacja 72° C, 30 s) etap końcowy (elongacja końcowa 72° C, 15 min). W celu oceny jakości otrzymanych produktów PCR przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 2% żelu agarozowym. Analizę restrykcyjną przeprowadzono przy użyciu dwóch enzymów restrykcyjnych – AflIII oraz HaeII (New England BioLabs, USA), które specyficznie rozpoznają sekwencje nukleotydowe odpowiadające wariantom allelicznym w kodonach 112 i 158 genu *APOE*, nie przecinając przy tym dodatkowych, nieswoistych miejsc. Wzory prążków uzyskane podczas elektroforezy w 3% żelu agarozowym posłużyły do identyfikacji genotypów w badanych polimorfizmach SNP. Wizualizację produktów przeprowadzono za pomocą systemu do dokumentacji żeli G:BOX (Syngene, Wielka Brytania) oraz oprogramowania GeneSys. Wielkości fragmentów odpowiadające poszczególnym genotypom przedstawiono w tabeli nr 6.

Tabela 6. Genotypy APOE określone na podstawie analizy restrykcyjnej

Genotypy <i>APOE</i>	Wielkość prążków (pz) produktu PCR na żelu agarozowym	
	Afl III	Hae II
$\epsilon 2/\epsilon 2$	168 pz, 50 pz	218 pz,
$\epsilon 2/\epsilon 3$	168 pz, 50 pz	218 pz, 195 pz, 23 pz
$\epsilon 2/\epsilon 4$	218 pz, 168 pz, 50 pz	218 pz, 195 pz, 23 pz
$\epsilon 3/\epsilon 3$	168 pz, 50 pz,	195 pz, 23 pz
$\epsilon 3/\epsilon 4$	218 pz, 168 pz, 50 pz	195 pz, 23 pz
$\epsilon 4/\epsilon 4$	218 pz	195 pz, 23 pz

pz-par zasad

3.4.4. Izolacja miRNA z surowicy

MiRNA do analizy wyizolowano z biobankowanej surowicy przy użyciu zestawu miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (QIAGEN, Niemcy), zgodnie z protokołem producenta. Zestaw ten umożliwia izolację całkowitego RNA, w tym frakcji miRNA, z niewielkiej objętości materiału wyjściowego (≥ 200 μ l surowicy), z wykorzystaniem technologii kolumn wirowych RNeasy UCP MinElute. Do probówek o pojemności 2 ml przeniesiono 200 μ l surowicy, do której dodano 60 μ l buforu RPL. Mieszaninę homogenizowano i inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej (15-25 °C). Celem oceny jakościowej izolowanego miRNA w trakcie procesu izolacji, do części próbek dodawano 1 μ l kontroli wewnętrznej. W skład kontroli wewnętrznej wchodziły trzy różne rodzaje tzw. „spike-in” UniSp2, UniSp4 oraz UniSp5, które oceniają jakość oraz wydajność wyizolowanego miRNA. Następnie do każdej próbki dodano 20 μ l buforu RPP i intensywnie mieszano przez 20 sekund, co umożliwiło dokładne oddzielenie faz w trakcie kolejnej, 3-minutowej inkubacji. W kolejnym etapie całość zwirowano (13500 rpm, 3 min, temp. pokojowa), po czym klarowny, bezbarwny supernatant (ok. 230 μ l) przeniesiono do nowej probówki i dodano 1 objętość izopropanolu, po czym dokładnie wymieszano. Tak przygotowaną próbkę przeniesiono na kolumnę elucyjną RNeasy UCP MinElute i zwirowano (10000 rpm, 30 s, temp.

pokojowa). Następnie przeprowadzono kolejne etapy oczyszczania: kolumnę przemyto buforem RWT w objętości 700 µl, a następnie dwukrotnie buforem RPE objętość 500 µl, po każdym etapie wirowano (10 000 rpm, 30 s). W kolejnym kroku naniesiono 500 µl 80% etanolu, wirowano przez 2 minuty, a kolumny przeniesiono do nowych probówek zbiorczych i poddano wirowaniu z maksymalną prędkością przez 5 min przy otwartych kolumnach, w celu całkowitego usunięcia pozostałości etanolu. W ostatnim etapie przeniesiono kolumny RNeasy UCP Min Elute do nowych 1,5 µl probówek zbiorczych i dodano 20 µl wody wolnej od RNasy bezpośrednio do centrum kolumny i inkubowano 1 min, po czym zamknięto i wirowano z maksymalną prędkością przez 1 min. Wyizolowane i oczyszczone próbki RNA przechowywano w -20°C do dalszej analizy.

3.4.5. Analiza ekspresji wybranych miRNA

Ocenę ekspresji następujących: miRNA-200a-3p, miRNA-146a-5p, miRNA-132-3 w surowicy pacjentów przeprowadzono z wykorzystaniem reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR), z zastosowaniem zestawów firmy Qiagen (Niemcy). W pierwszym etapie wykonano reakcję odwrotnej transkrypcji (RT), w której miRNA zostało przepisane na cDNA przy użyciu enzymu odwrotnej transkryptazy. Reakcję przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta, z wykorzystaniem zestawu miRCURY® LNA® RT Kit.

Na podstawie uzyskanego cDNA przeprowadzono kontrolę jakości dla wybranych próbek z użyciem zestawu miRCURY® LNA® miRNA QC PCR Panel. Etap ten pozwolił na weryfikację jakości i powtarzalności izolacji oraz efektywności odwrotnej transkrypcji przed analizą docelowych miRNA.

Analizę ekspresji miRNA przeprowadzono przy użyciu metody qPCR. Do amplifikacji wykorzystano zestaw miRCURY® LNA® SYBR® Green PCR Kit oraz specyficzne startery z zestawu miRCURY® LNA® miRNA PCR Assays, zgodnie z zaleceniami producenta.

3.4.5.1. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy PCR

Odkryta w połowie lat 80. przez Kary'ego B. Mullis'a technika PCR, przyczyniła się do wielkiego przełomu w inżynierii genetycznej oraz rozwoju całej biologii molekularnej. Za wynalezienie metody PCR Mullis otrzymał Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii w 1993 roku. Ta nieskomplikowana technika pozwala na wielokrotne powielanie, czyli amplifikację krótkiego segmentu cząsteczki DNA. Reakcja ta zachodzi *in vitro* i nie wymaga wykorzystywania żywych komórek. Aby przeprowadzić reakcję PCR, matrycowy DNA miesza się z polimerazą Taq, parą starterów oligonukleotydowych oraz mieszaniną nukleotydów. Z racji wysokiej czułości techniki PCR, ilość matrycowego DNA może być bardzo mała. Dwa oligonukleotydowe startery wiążą się do komplementarnych sekwencji oskrzydlających docelowy region matrycowego DNA i są wydłużane przez polimerazę w dwóch przeciwnych kierunkach. Na wielkość powstałego produktu składają się startery i region pomiędzy nimi. Pewnym ograniczeniem metody PCR jest więc konieczność znajomości sekwencji sąsiadujących z docelowym fragmentem DNA, który chcemy powielić. Standardowo amplifikowane są fragmenty o długości 100–1000 pz, jednak w odpowiednich warunkach możliwe jest powielenie fragmentów nawet do 10 kbp. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodzi matryca DNA, polimeraza Taq, startery, dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), $MgCl_2$ oraz bufor.

Reakcję syntezy przeprowadza zależna od matrycy polimeraza Taq, która została wyizolowana z termofilnych bakterii *Thermus aquaticus* pochodzących z Parku Narodowego Yellowstone (Brock i Freeze, 1969). Polimeraza Taq jest termostabilnym enzymem, który zachowuje aktywność mimo wielokrotnych cykli denaturacji w temperaturze 94–95°C. Ponieważ nie posiada ona właściwości naprawczej egzonukleazy 3'→5' podczas kopiowania może wprowadzać błędy (1 błąd na 250 polimerowanych nukleotydów) [123].

Przy wyborze matrycy do PCR, ważną rolę odgrywa jej ilość (1ng–1μg). Mimo, iż krótkie produkty PCR są powielane z większą wydajnością niż dłuższe, produkt PCR powinien mieć co najmniej 75 pz, aby łatwo odróżnić go od wszelkich dimerów starterów, które mogą potencjalnie powstawać. Należy również unikać regionów z drugorzędową strukturą oraz z długimi (>4) powtórzeniami pojedynczych zasad.

Zawartość GC powinna wynosić 50-60%. Ważną rolę odgrywa również stopień degradacji, obecność zanieczyszczeń oraz metoda izolacji DNA.

Startery wykorzystywane w reakcji PCR powinny mieć długość ok. 18-30 nukleotydów i wykazywać podobną zawartość G+C. Startery wybierane na podstawie sekwencji wiążącej, dostępne są w bazach danych, w literaturze, można je również projektować samemu. Należy pamiętać o sprawdzaniu specyficzności starterów w tym celu należy unikać regionów homologicznych. Właściwości starterów określamy na podstawie temperatury łączenia starterów T_m (annealing), która powinna wynosić od 50 °C do 65 °C. Zawartość GC powinna mieścić się w granicy 50-60%, rozłożone równomiernie w sekwencji starterów. Należy unikać powtórzeń G i C dłuższych niż 3 zasady, można umieścić nukleotydy G i C na końcach starterów.

Odpowiednie warunki reakcji zapewnia bufor reakcyjny, który zawiera Tris-HCl w stężeniu 10 – 50 mM oraz jony potasu w postaci KCl w stężeniu 50 mM oraz tzw. „wzmacniacze reakcji” w postaci Tween 20, betaina, żelatyna, BSA, DMSO. Celem poprawy wydajności reakcji zwiększa się stężenie soli potasu oraz dodaje „wzmacniacze”.

Reakcja PCR nie przebiega zwykle ze 100% wydajnością. W celu zwiększenia wydajności reakcji należy przeprowadzić tzw. optymalizację metody, która polega na modyfikacji warunków reakcji. Zmianie poddaje się zwykle temperaturę przyłączania starterów i stężenie Mg^{2+} . Optymalizacja temperatury przyłączania starterów w teście PCR jest jednym z najbardziej krytycznych parametrów dla specyficzności reakcji. Ustawienie zbyt niskiej temperatury może prowadzić do amplifikacji niespecyficznych produktów PCR. Ustawienie zbyt wysokiej temperatury może zmniejszyć wydajność pożądanego produktu PCR. Nawet po obliczeniu T_m primera, może być konieczne empiryczne określenie temperatury polegające na powtarzaniu reakcji w wielu różnych temperaturach. Podobne czasochłonne testy mogą być również wymagane w celu optymalizacji temperatury denaturacji.

Drugim ważnym czynnikiem wpływającym na optymalizację reakcji jest stężenie jonów Mg^{2+} , które będąc kofaktorami enzymu polimerazy wpływają na jej aktywność. Optymalne stężenie jonów Mg^{2+} wynosi 1,5-2,0 mM. Należy pamiętać, że zbyt niskie stężenie Mg^{2+} może obniżyć wydajność reakcji, natomiast zbyt wysokie może

przyczynić się do powstania dodatkowych prążków, świadczących o niespecyficznym produkcie. Konieczna jest optymalizacja stężenia Mg^{2+} w zakresie 0,5-4 mM.

Kolejnym składnikiem decydującym o efektach PCR jest mieszanina trifosforanów deoksynukleotydów dNTPs. Typowe stężenie dNTPs wynosi 200 μ M. Obniżając do 50-100 μ M podnosimy wierność reakcji ale obniżamy jej wydajność. Wysokie stężenie dNTPs podnoszą wydajność np. dla dużych fragmentów ale mogą obniżyć czułość reakcji.

W celu optymalizacji procesu PCR czasami należy modyfikować protokół PCR w zakresie skrócenia czasu pracy. Aby przyspieszyć amplifikację fragmentów <250 pz należy wybrać startery o wyższych temperaturach startu (takich jak 65–70°C). Można zastosować enzym polimerazy „Hot Start”, który wymaga minimalnego czasu aktywacji. Polimeraza uaktywniona wysoką temperaturą podczas wstępnej denaturacji, zwiększa specyficzność reakcji. Zastosowanie polimerazy typu „Hot Start” umożliwia swobodne przygotowanie reakcji w temperaturze pokojowej, bez zmniejszenia aktywności enzymu. Polimerazy „Hot Start” otrzymuje się poprzez zablokowanie centrum aktywnego np. związkami chemicznymi lub przeciwciałami. Aktywacja polimerazy odbywa się przez poddanie jej działaniu temperatury 95°C przez 3 – 15 minut.

Reakcja PCR składa się z trzech etapów:

- I. Denaturacja wstępna – podgrzanie mieszaniny do temp. 92°C – 95°C przez 3-15 min w celu denaturacji genomowego DNA. Czas ten jest też niezbędny do aktywacji polimeraz typu „Hot Start”.
- II. Etap drugi powtarza się wielokrotnie i składa się z trzech kroków:
 - denaturacja w temp. 92°C – 95°C prowadząca do rozerwania wiązań wodorowych utrzymujących ze sobą dwa polinukleotydy podwójnej nici DNA. Matrycowy DNA zostaje zdenaturowany do dwóch cząsteczek jednoniciowych. Czas trwania tego etapu jest zależny od matrycy i może wynosić od kilku do kilkudziesięciu sekund.
 - annealing (temp. 40°C – 72°C) przyłączanie starterów w odpowiednich miejscach komplementarnych sekwencji na 3' końcu jednoniciowego DNA. Ten etap wpływa na specyficzność oraz wydajność reakcji PCR.

Optymalizacja temperatury na tym etapie jest kluczowe i zależy od składu nukleotydowego starterów. Zbyt niska temperatura na tym etapie prowadzi do łączenia starterów w niespecyficznych miejscach na zasadzie niepełnej komplementarności i powstania wielu artefaktów. Natomiast zbyt wysoka temperatura może uniemożliwić przyłączenie starterów do matrycy w wyniku czego produkt nie powstanie.

- elongacja prowadzona w temp. 68°C – 72°C, optymalnej dla polimerazy Taq. Na tym etapie zachodzi synteza nowych nici DNA z każdego matrycowego DNA. Czas trwania zależy od długości powielanego fragmentu. Ilość cykli zależy od rodzaju powielanego fragmentu i zazwyczaj mieści się w przedziale 20 – 40. Zbyt mała liczba cykli spowoduje słabą wydajność reakcji, nadmierna liczba cykli zmniejsza specyficzność otrzymywanego produktu.

- III. Elongacja końcowa – to etap syntezy końcowej niekompletnych produktów z poprzednich etapów. Przebiega on w temperaturze 68°C do 72°C przez 5 – 15 minut.

3.4.5.2. Synteza cDNA metodą RT-PCR

W pierwszym etapie badań przepisano RNA na cDNA dzięki odwrotnej transkrypcji. W tym celu wykorzystano metodę reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkryptazą ang. reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) dzięki, której zsyntetyzowano DNA komplementarne do mikroRNA (cDNA). Reakcję odwrotnej transkrypcji (RT) przeprowadzono na RNA wyizolowanym z próbek surowicy, wykorzystując zestaw miRCURY LNA® RT Kit (Qiagen, Niemcy), zgodnie z protokołem producenta. RNA izolowane z surowicy nie było rozcieńczane przed zastosowaniem w reakcji RT, co jest zgodne z zaleceniami producenta dla tego typu materiału biologicznego.

Do każdej reakcji RT użyto 2 µl wyizolowanego RNA. Całkowita objętość reakcji wynosiła 10 µl. Skład mieszaniny reakcyjnej został podany w tabeli nr 7.

Tabela 7. Skład mieszaniny reakcyjnej do RT-PCR przepisującego miRNA na cDNA

Składniki reakcji	Ilość w próbie badanej [μl]
5x miRCURY SYBR® Green RT Reaction Buffer	2
RNase-free water	4,5
10xmiRCURY RTEnzyme Mix	1
Synthetic spike-in mix	0,5
Template total RNA	2
Całkowita objętość	10

Zastosowany bufor 5x miRCURY SYBR® Green RT Reaction Buffer jest buforem optymalizującym polimerazę końca poli(A) oraz odwrotną transkrypcję, zawierający uniwersalny starter do odwrotnej transkrypcji oparty na SYBR® Green, jony Mg^{2+} oraz mieszaninę trifosforanów deoksynukleotydów dNTPs. Mieszanina 10x miRCURY RT Enzyme Mix zawiera dwa enzymy: zmodyfikowaną postać odwrotnej transkryptazy HotStart RT-Script Reverse Transcriptase oraz polimerazę poli(A) wyizolowaną z E. coli -Poly(A)Polymerase. W syntetycznej mieszaninie Spike-in Mix występuje transkrypt monitorujący efekty odwrotnej transkrypcji w postaci UniSp6. Reakcję RT-PCR przeprowadzono w następujących warunkach termicznych: inkubacja przez 60 minut w 42°C, inkubacja przez 5 minut w 95°C celem inaktywacji odwrotnej transkryptazy natychmiastowe ochłodzenie do 4°C. Próbkę cDNA przechowywano w temperaturze -20°C przez 2-5 tygodni celem wykorzystania do badań real-time PCR.

3.4.5.3. Kontrola jakości miRNA — miRCURY LNA® miRNA QC PCR Panel

Przed przystąpieniem do analizy ekspresji miRNA, przeprowadzono kontrolę jakości próbek RNA wyizolowanych z surowicy, wykorzystując zestaw miRCURY LNA® miRNA QC PCR Panel (Qiagen, Niemcy). Analiza ta miała na celu ocenę

integralności, czystości oraz efektywności reakcji odwrotnej transkrypcji (RT), a także wykrycie ewentualnych inhibitorów reakcji PCR.

Podczas izolacji RNA z surowicy dodano syntetyczne spike-in RNA (UniSp2, UniSp4, UniSp5 oraz cel-miR-39-3p), co umożliwiło monitorowanie efektywności izolacji oraz identyfikację ewentualnych inhibitorów reakcji PCR. Syntezę cDNA wykonano zgodnie z protokołem zestawu miRCURY LNA RT Kit (Qiagen, Niemcy), stosując te same warunki, co w przypadku próbek do analizy ekspresji miRNA.

Panel kontrolny zawiera zestaw specyficznych starterów i sond LNA, które umożliwiają ocenę:

- jakości i wydajności izolacji RNA — za pomocą syntetycznych RNA dodanych jako spike-in: UniSp2, UniSp4, UniSp5,
- efektywności reakcji odwrotnej transkrypcji (RT) — monitorowanej przez obecność transkryptów UniSp6 oraz cel-miR-39-3p,
- efektywności reakcji PCR — kontrolowanej przez UniSp3 jako interplate calibrator,
- obecności hemolizy — za pomocą stosunku miRNA miR-451 (marker hemolizy) do miR-23a (kontrola wewnętrzna hemolizy),
- kontroli endogennych markerów miRNA obecnych w surowicy, takich jak: miR-103, miR-191, miR-30c (marker nerek), miR-124 (marker płynu mózgowo-rdzeniowego).

Analizę ekspresji genów kontrolnych wykonano metodą qPCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem systemu miRCURY LNA® SYBR® Green PCR Kit (Qiagen), zgodnie z zaleceniami producenta. Reakcję przeprowadzono w systemie Cobas 480z (Roche, Szwajcaria). Ocena jakości była oparta na analizie wartości Ct (ang. threshold cycle) oraz profilu amplifikacji dla poszczególnych kontroli spike-in i endogennych markerów miRNA. Próbkę, które nie spełniały kryteriów jakościowych, były wykluczane z dalszych analiz.

3.4.5.4. Ilościowe oznaczenie ekspresji miRNA metodą real-time PCR

Powstały cDNA amplifikowano podczas ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy DNA w czasie rzeczywistym ang. real-time PCR według protokołu

producenta miRCURY® LNA® SYBR® Green PCR Kit (Qiagen). cDNA rozcieńczono 1:10 dodając wodę wolną od RNazy. Reakcję przeprowadzono w objętości końcowej 10 µl. Wysoką specyficzność oraz czułość reakcji real-time PCR osiągnięto dzięki zastosowaniu procedury hot-start polimerazy, która ogranicza ryzyko formowania dimerów starterów używanych do amplifikacji. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli nr 8.

Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej Real-Time PCR do amplifikacji cDNA

Składniki reakcji	Ilość w próbie badanej [µl]	Ilość w NTC [µl]
2x miRCURY SYBR® Green Master Mix	5	5
RNase-free water	1	4,0
PCR Primer Mix	1	1
Matryca cDNA (1:10)	3	0
Całkowita objętość	10	10

Mieszanina 2x miRCURY SYBR Green składa się z trzech składników:

- 1) QuantiNovaDNA Polymerase zmodyfikowana forma „hot-start” polimerazy DNA wyizolowanej z *Thermus aquaticus*, nieaktywna w temperaturze pokojowej aktywowana przy podgrzaniu do 95°C przez 2 minuty.
- 2) miRCURY SYBR® Green PCR Buffer- zawierający Tris HCl, KCl, NH₄SO₄, MgCl₂ oraz wzmacniacz Q-Band®.
- 3) Mieszanina dNTPs zawierająca dATP, dGTP, dCTP, dTTP wysokiej czystości.

Reakcję real-time PCR przeprowadzono w następujących warunkach termicznych: aktywacja polimerazy/denaturacja 2 min, amplifikacja 45 cykli (95°C, 10s; 56°C, 60s). Dodatkowo weryfikację specyficzności i tożsamości produktów PCR przeprowadzono na podstawie analizy krzywej topnienia ang. melting curve analysis wykorzystując program LightCycler® 480 SW Version 1.5.1.62 SP2 – UDF v2.0.0 oraz panel Gene Scanning do analizy.

Do oznaczenia ekspresji trzech wybranych miRNA użyto mieszaniny starterów komplementarnych do ich sekwencji. W tym celu użyto zestawu mmiRCURY® LNA® miRNA PCR Assays. W celu przeprowadzenia kontroli i normalizacji reakcji real-time PCR badanych miRNA, równolegle oznaczono ekspresję genów referencyjnych: U6snRNA oraz SNORD 48.

1) U6snRNA jest to mały jądrowy niekodujący RNA ang. non coding small nuclear RNA (snRNA) tworzący potrójną helisę, wchodzący w skład małej jądrowej nukleoproteiny ang. small nuclear ribonucleoprotein (U6snRNP). Wraz z pre-mRNA i różnymi białkami tworzy spliceosom, który jest dużym kompleksem cząstkowego RNA i białka katalizującego główny proces potranskrypcyjnej modyfikacji mRNA w jądrze eukariotów tj. splicing. RNA U6 jest najbardziej zachowawczą i niezmienną ewolucyjnie sekwencją spośród wszystkich pięciu zaangażowanych w splicing wśród gatunków [124]. W genomach kręgowców występuje wiele kopii genu snRNA *U6* lub pseudogenów pochodzących od genu *U6*. Gen snRNA *U6* został wyizolowany w różnych organizmach modelowych m.in. *Caenorhabditis elegans* oraz *Saccharomyces cerevisiae* [125].

2) SNORD 48 jest to mały jąderkowy RNA ang. small nucleolar RNA (snoRNA), który pełni funkcję normalizatora względnej ekspresji w próbkach tkanek, surowicy i moczu. SnoRNA to grupa nieprzetłumaczonych RNA o zmiennej długości (80-1000 nt) wymaganych do dojrzewania rRNA. Wszystkie eukariotyczne genomy posiadają szereg genów snoRNA z niezależnymi promotorami. SnoRNA można podzielić na dwie klasy posiadające ewolucyjnie konserwowane sekwencje [126]. SNORD48 jest stosowany również jako kontrola wewnętrzna wraz z starterem Cel-miR-39a. Posiada on identyfikator testu w diagnostyce drobnokomórkowego raka płuc, gdyż stwierdzono zmniejszenie jego frakcji w trakcie choroby. SNORD48 obok SNORD24 i RNU62 jest najstabilniejszym endogennym genem referencyjnym, niezawodnym w normalizacji danych qPCR z tkanek [127].

Ekspresja miRNA wyrażana jest jako wartość $2^{-\Delta Cq}$, gdzie ΔCq wyraża różnicę pomiędzy progiem granicznym reakcji PCR (Cq , ang. cycle threshold) miRNA kontrolnego a Cq miRNA badanego. Według wzoru Livaka $2^{-\Delta\Delta Cq}$, gdzie:

$$\Delta Cq = Cq \text{ gen badany} - Cq \text{ gen referencyjny}$$

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq \text{ próba badana} - \Delta Cq \text{ próba referencyjna}$$

$2^{-\Delta\Delta Cq}$ = krotność zmiany ekspresji w grupie badanej względem kontroli (ang. fold change).

We wszystkich przeprowadzonych analizach ekspresji miRNA, bazowano na względnym poziomie ekspresji badanych genów. W tym celu zastosowano skorygowaną formułę Pfaffla, która wykorzystuje względną analizę ilościową (Relative Quantitation). Opiera się ona na założeniu, że podczas PCR, każdy produkt ulega podwojeniu w każdym cyklu. Jeśli, więc dwie próbki mają wartość Cq różną o 1, to różnica w ilości materiału startowego wynosi 2^1 = dwa razy. W zastosowanej metodzie ilość genu badanego jest normalizowana dla każdej próbki względem wewnętrznej kontroli, genu referencyjnego – $\Delta\Delta Cq$. Wzór na obliczenie względnego poziomu ekspresji jest następujący:

$$RQ = E^{-\Delta\Delta Cq}$$

Różnice względnej analizy ilościowej wynikają z różnicy poziomu ekspresji, różnicy w ilości materiału wyjściowego oraz różnic w przebiegu reakcji.

3.5. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano przy użyciu programu RStudio 4.4.1. Jako próg istotności statystycznej przyjęto $\alpha = 0.05$. Hipotezę o normalności rozkładu badanych zmiennych testowano przy użyciu testu Shapiro-Wilka. Żadna z badanych zmiennych nie miała rozkładu zbliżonego do normalnego. Z tego powodu do dalszych analiz użyto testów nieparametrycznych a wyniki raportowano przy użyciu mediany (Me) oraz kwartyli Q1 i Q3. Różnice pomiędzy grupą z otępieniem i bez otępienia analizowano za pomocą testu U Manna-Whitneya-Wilcoxona dla par niezależnych. Analizę wariancji wykonano przy użyciu testu ANOVA Kruskala-Wallisa. Istotnie różne podgrupy testowano przy użyciu testu post-hoc Dunn'a. Za wartości odstające traktowane były wartości odbiegające od Q1/ Q3 o wartość półtrakrotności rozstępu kwartylowego. Zmienne nominalne przedstawiano jako liczebności i procenty. Porównania zmiennych nominalnych wykonano w oparciu o test χ^2 (χ^2) z zastosowaniem odpowiednich poprawek w zależności od liczebności w podgrupach. Do analizy zmiennych ciągłych użyto korelacji rang Spearmana (ρ Spearman). W celu predykcji zaburzeń otępiennych wykonano modele predykcyjne przy użyciu: regresji logistycznej z krokową postępującą optymalizacją hiperparametrów, regresji LASSO oraz drzewa decyzyjnego. Zbiór danych podzielono w stosunku 7:3 na grupę treningową i uczącą ze zbalansowaniem każdego z nich według zmiennej zależnej. Modele były trenowane z użyciem 7-mio krotnej walidacji krzyżowej. Następnie oceniano je na obu grupach obliczając dokładność, czułość, swoistość, wartość predykcyjną dodatnią i ujemną.

4. WYNIKI

4.1. Analiza grupy badanej i kontrolnej pod względem płci i wieku

W pierwszym etapie badań grupę pacjentów o różnym poziomie zaawansowania choroby oraz grupę kontrolną poddano analizie, pod względem płci i wieku w dniu pobrania materiału do badań. Rozkład pacjentów wg płci z uwzględnieniem stopnia otępienia oraz osób stanowiących kontrolę przedstawia tabela nr 9.

Tabela 9. Podział grupy badanej ze względu na płeć

Płeć	K n (%)	MCI n (%)	AD I n (%)	AD II n (%)	AD III n (%)	Istotność statystyczna (test χ^2) p-value
Kobiety	11 (40,74)	8 (42,11)	10 (50)	14 (63,64)	3 (33,33)	0,43
Mężczyźni	16 (59,26)	11 (57,89)	10 (50)	8 (36,36)	6 (66,67)	

test χ^2 -test Chi kwadrat

p-value- poziom istotności statystycznej

Aby określić częstość występowania poszczególnych etapów otępienia u kobiet i mężczyzn, wykonano analizę statystyczną w oparciu o test chi-kwadrat Pearsona (χ^2). Analizie poddano 97 osób w tym 70 pacjentów oraz 27 osób z grupy kontrolnej. Pacjenci zostali podzieleni na 4 podgrupy w zależności od stopnia otępienia (MCI, AD I, AD II, AD III). Z uzyskanych wyników można stwierdzić, iż udział procentowy kobiet i mężczyzn w każdej podgrupie jest zbliżony. Największe różnice występują w grupie AD II i AD III. W grupie AD II przeważają kobiety, natomiast w AD III mężczyźni. Wyniki te nie są jednak istotne statystycznie ($p > 0,05$).

W kolejnym etapie dokonano analizy pod względem wieku w dniu pobrania materiału do badań. Analizie poddano osoby bez otępienia oraz grupę pacjentów z otępieniem, z uwzględnieniem stadium otępienia. Statystyki opisowe zestawiono w tabeli nr 10.

Tabela 10. Wiek pacjenta a stadium otępienia

Wiek w dniu pobrania	K n=27	MCI n=19	AD I n= 20	AD II n=22	AD III n=9
Mediana (Me)	72,00	64,00	72,50	76,00	76,00
Kwartył 1 (Q1)	65,00	60,50	67,00	70,50	75,00
Kwartył 3 (Q3)	79,00	70,50	88,00	80,75	82,00
Minimum	45	45	50	59	71
Maximum	92	83	88	85	83

Me-mediana wieku; Q1-kwartył 1; Q3-kwartył 3

Ze względu na brak rozkładu normalnego, różnice w rozkładzie wieku w poszczególnych podgrupach oceniono na podstawie testu nieparametrycznego Kruskala-Wallisa. Wyniki testu przedstawiono w tabeli nr 11.

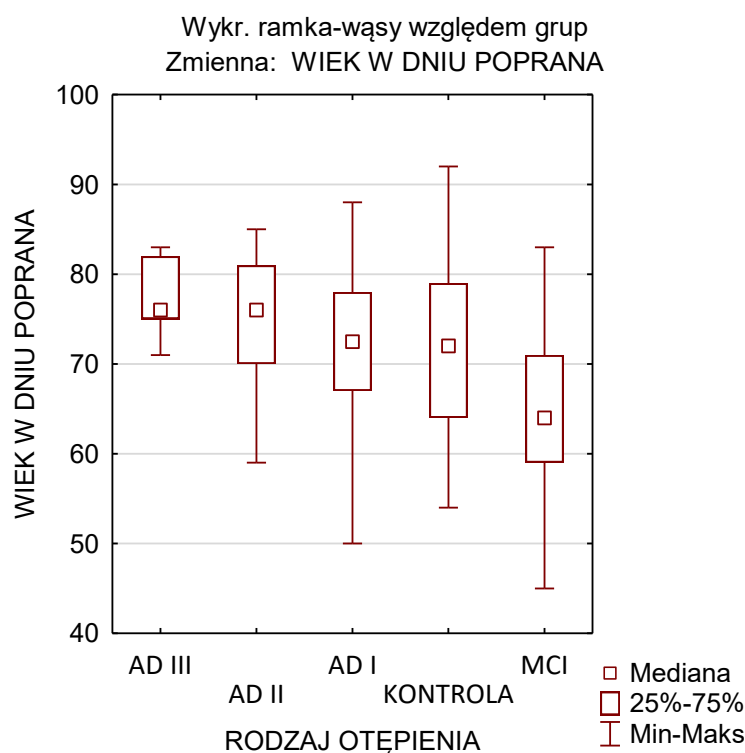
Tabela 11. Różnica rozkładu wieku pacjentów w poszczególnych podgrupach w zależności od stadium otępienia

Stadium otępienia	K	MCI	AD I	AD II	AD III	Istotność statystyczna na p-value
K		0,2838	1,0000	1,0000	0,5468	0,0030
MCI	0,2838		0,3286	0,0108	0,0056	
AD I	1,0000	0,3286		1,0000	0,7593	
AD II	1,0000	0,0108	1,0000		1,0000	
AD III	0,5468	0,0056	0,7593	1,0000		

*Czcionką pogrubioną przedstawiono wyniki istotne statystycznie na poziomie $p < 0,05$.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że wiek jest ważnym czynnikiem różnicującym pacjentów pod względem stopnia otępienia. Analiza post hoc przy wykorzystaniu testu Dunn'a wykazała istotną statystycznie różnicę wieku pacjentów podczas diagnostyki pomiędzy podgrupą z MCI a AD II oraz AD III. Wyniki uzyskano przy poziomie istotności 0,0030. Mediana wieku pacjentów w dniu pobrania

wynosiła odpowiednio: w podgrupie MCI- 64 lata, natomiast AD II oraz AD III- 76 lat. Wyniki te pokazują, iż u osób młodszych częściej diagnozuje się łagodne zaburzenia poznawcze, natomiast otępienie alzheimerowskie w stadium zaawansowanym rozpoznawane jest u pacjentów nawet ok. 10 lat później. Różnice wieku diagnozowania choroby w zależności od stadium otępienia przedstawiono w formie wykresu nr 5.



Wykres 5. Wiek pacjentów podczas diagnostyki a stadium otępienia

4.2. Analiza grupy badanej i kontrolnej pod względem cech klinicznych

Kolejnym krokiem była analiza cech klinicznych pacjentów o różnym poziomie zaawansowania choroby w porównaniu z grupą kontrolną. W analizie statystycznej uwzględniono wyniki testu diagnostycznego MMSE oraz badań diagnostycznych z krwi obwodowej w kierunku: stężenie cholesterolu całkowitego oraz jego frakcji (LDL, HDL, TG), stężenie witaminy B₁₂, chorób współtowarzyszących tj. miażdżyca, cukrzyca, astma, niedoczynność tarczycy, choroba niedokrwienna serca, depresja, nadciśnienie oraz hipercholesterolemia. Dane statystyczne zestawiono w tabeli nr 12.

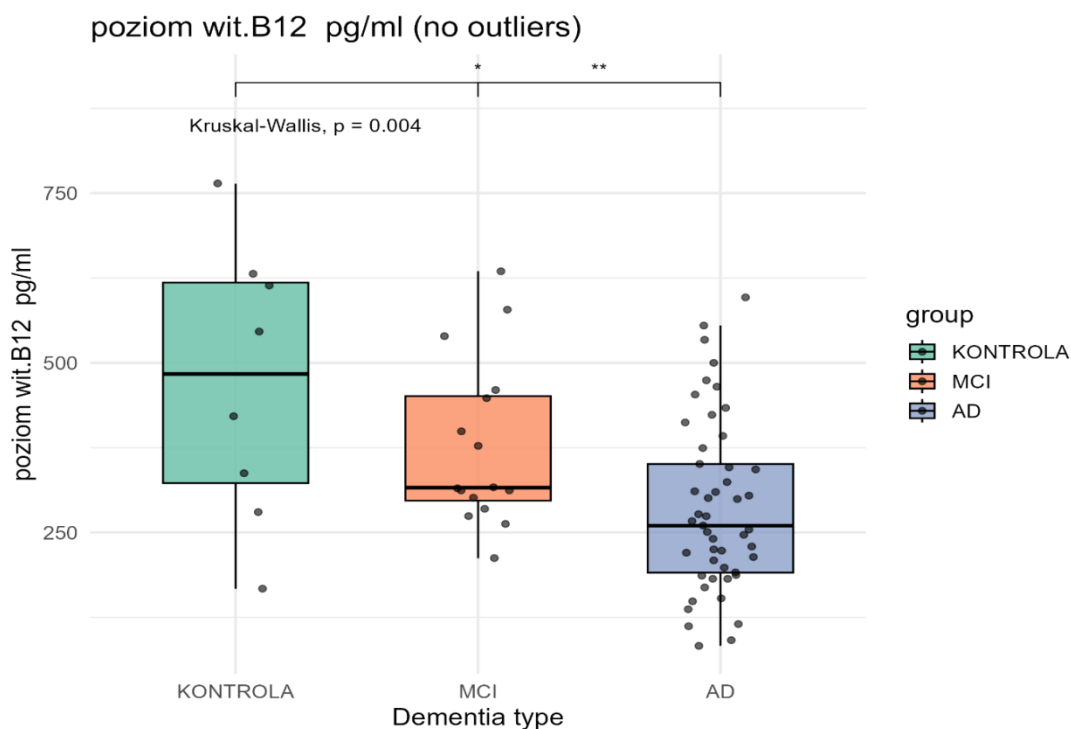
Tabela 12. Zestawienie cech klinicznych przebiegu choroby AD z uwzględnieniem podziału na grupy MCI, AD I, AD II, AD III oraz grupę kontrolną K

Zmienne		Me	Q1	Q3	Min.	Max.
MCI n=19	MMSE test [pkt]	26	26	27	24	29
	Wit.B₁₂ [pg/ml]	317	301	460	212	781
	TC [mg/dl]	214	170	237	137	317
	LDL[mg/dl]	134	113,5	159,5	52	235
	HDL [mg/dl]	56	51	66	35	78
	TGL [mg/dl]	122	87,5	135,5	58	524
Zmienne		Me	Q1	Q3	Min.	Max.
AD I n=20	MMSE test [pkt]	22	21	23	20	26
	Wit.B₁₂ [pg/ml]	307	186,75	441,75	83	1800
	TC [mg/dl]	194	169	216	145	275
	LDL[mg/dl]	105	102	143	93	188
	HDL [mg/dl]	47	41	53	28	66
	TGL [mg/dl]	118	94	137	77	219
Zmienne		Me	Q1	Q3	Min.	Max.
AD II n=22	MMSE test [pkt]	17,5	17	18	12	25
	Wit.B₁₂ [pg/ml]	272	229	402,5	115	555
	TC [mg/dl]	190	175	234,5	121	290
	LDL[mg/dl]	110	93,5	128	49	172
	HDL [mg/dl]	52,5	47,25	61,75	32	83
	TGL [mg/dl]	134,5	77	158,75	55	283
Zmienne		Me	Q1	Q3	Min.	Max.
AD III n=9	MMSE test [pkt]	5	3	7	0	9
	Wit.B₁₂ [pg/ml]	214	153	251	112	324
	TC [mg/dl]	212,5	167,25	236,25	131	313

	LDL [mg/dl]	141	91	173,5	64	234
	HDL [mg/dl]	43	37	54	32	59
	TGL [mg/dl]	148	118,5	170,5	62	225
Zmienne		Me	Q1	Q3	Min.	Max.
K n=27	MMSE test [pkt]	28	28	28	28	28
	Wit.B₁₂ [pg/ml]	580	358	730,75	167	2000
	TC [mg/dl]	190,5	156,5	214	118	360
	LDL [mg/dl]	110,5	98,25	133	95	255
	HDL [mg/dl]	54	50,5	61,75	34	94
	TGL [mg/dl]	101,5	96,75	148,25	57	292

Me-mediana; **Q1**-kwartył 1; **Q3**- kwartył 3; **Min.**-wartość minimalna; **Max.**-wartość maksymalna; **MMSE**-wynik testu Mini Mental State Examination zakres 0-30, liczba pkt. maleje wraz z rozwojem choroby ; **TC**-(ang. Total Cholesterol) cholesterol całkowity, norma <190 mg/dl; **HDL** (ang. High Density Lipoprotein) lipoproteina wysokiej gęstości, norma HDL >40mg/dl; **LDL** (ang. Low Density Lipoprotein)- lipoproteina o niskiej gęstości, norma LDL <115mg/dl;**TGL** –trójglicerydy, norma TGL <150 mg/dl; witamina B₁₂, norma 187 - 883 pg/ml

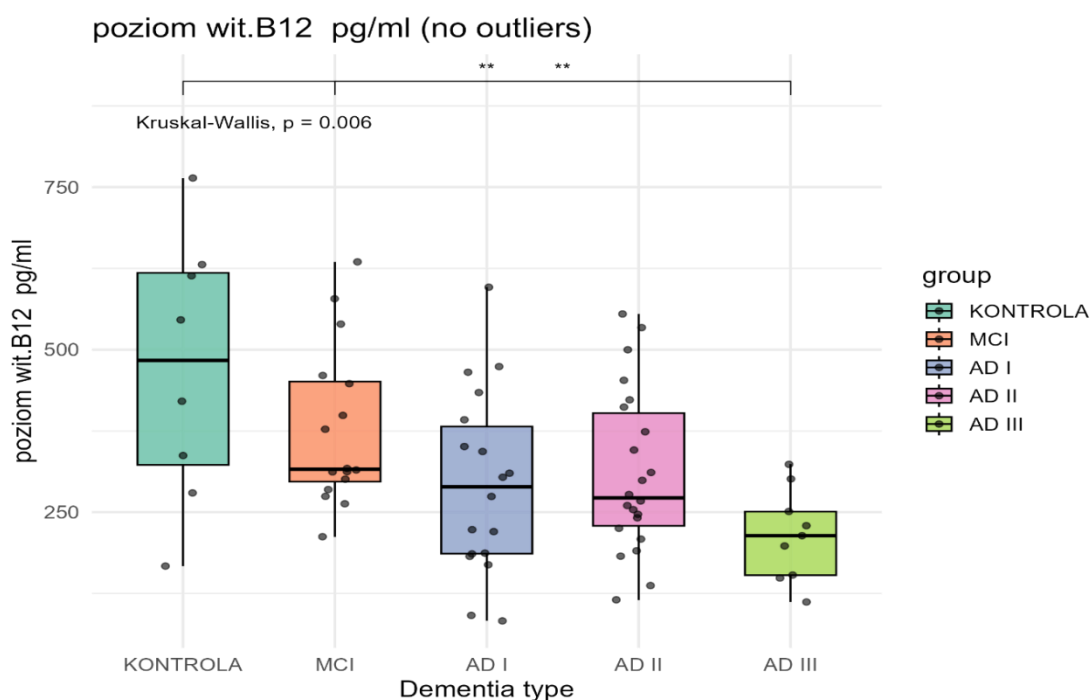
Aby sprawdzić różnice poziomu parametrów biochemicznych tj. LDL, HDL, TG oraz cholesterolu całkowitego pomiędzy badanymi grupami, przeprowadzono test Kruskala-Wallisa. Nie zaobserwowano jednak istotnej różnicy w lipidogramie wśród osób bez objawów otępiennych oraz na różnym etapie choroby. Z badanych parametrów jedynie poziom witaminy B₁₂ różnił się istotnie statystycznie pomiędzy grupami. Początkowo analizie statystycznej poddano poziom witaminy B₁₂ w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z MCI oraz ze stwierdzoną AD, jednak bez podziału na fazy otępienne. Uzyskane wyniki przedstawiono na wykresie nr 6.



Wykres 6. Poziom witaminy B₁₂ w grupie kontrolnej, pacjentów z MCI oraz AD (bez wartości odstających)

Stężenie wit. B₁₂ wyrażono w pg/ml. Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach p i oznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Z uzyskanych na poziomie istotności $p = 0,004$ wyników, zaobserwowano spadek wartości witaminy B₁₂ wraz z postępem otępienia wśród pacjentów. Istotne różnice zaobserwowano między grupą MCI a AD przy poziomie istotności $p < 0,01$ oraz pomiędzy K i AD przy poziomie istotności $p < 0,05$. Wyższy poziom witaminy B₁₂ wykazano w grupie kontrolnej (Me=580; Q1=358; Q3=731), obniżony w MCI (Me=317; Q1=301; Q3=460) a najniższy w grupie pacjentów ze stwierdzoną chorobą otępienną AD (Me=194; Q1=190; Q3=365). W celu dokładnego określenia różnic poziomu witaminy B₁₂ w zależności od stopnia zaawansowania AD, usunięto wartości odstające a następnie dokonano dodatkowej analizy z podziałem na grupy AD I, AD II oraz AD III, które pokazuje wykres nr 7.



Wykres 7. Poziom witaminy B₁₂ z podziałem na grupy w zależności od stopnia zaawansowania choroby oraz w grupie kontrolnej (bez wartości odstających)
 Stężenie wit. B₁₂ wyrażono w pg/ml. Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach p i oznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Uzyskane wyniki wskazują, iż u pacjentów z grupy AD III poziom witaminy B₁₂ jest istotnie niższy (Me=214, Q1=153; Q3=251) w porównaniu z pacjentami z grupy o łagodnych zaburzeniach poznawczych MCI (Me=317; Q1=301; Q3=460) oraz pacjentami z grupy kontrolnej K (Me=580; Q1=358; Q3=731) przy poziomie istotności $p = 0,006$. Analiza nie wykazała istotnych różnic poziomu witaminy B₁₂ w zależności od fazy otępienia alzheimerowskiego (AD I, AD II, AD III). Uzyskane wyniki przedstawione w formie wykresu, wskazują na postępujące niedobory witaminy B₁₂ wraz z postępem choroby.

Badaną grupę z uwzględnieniem podziału na stopień otępienia, przeanalizowano pod kątem chorób współtowarzyszących przy zastosowaniu testu chi kwadrat. Na podstawie uzyskanych wyników nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy grupami pacjentów a częstością występowania chorób współtowarzyszących. Powodem uzyskania statystycznie nieistotnych wyników mogą być nie pełne dane chorób towarzyszących wśród badanych pacjentów oraz osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną oraz różnica w liczności podgrup.

4.3. Analiza stężenia białek β - amyloid w zależności od zaawansowania choroby

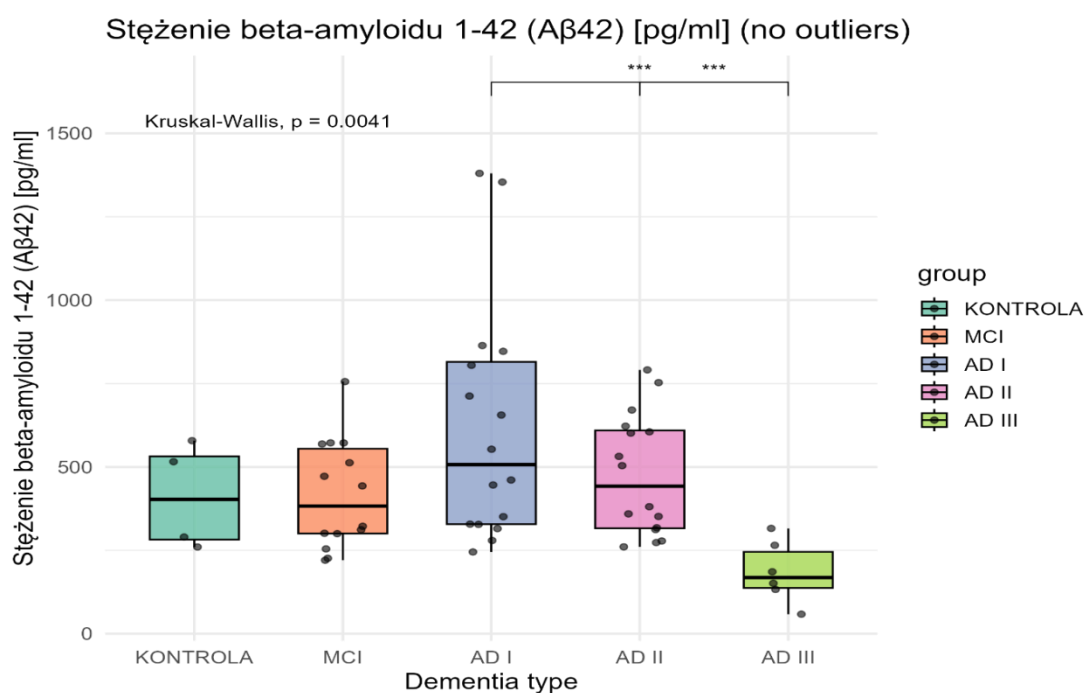
Wraz z postępowaniem choroby, poziom amyloidu- β w mózgu wzrasta, co jest związane z odkładaniem się w formie blaszek starczych, natomiast w płynie mózgowo-rdzeniowym maleje. W swojej pracy przeanalizowałam udostępnione wyniki badań stężenia białek amyloidowych $A\beta_{1-42}$ oraz $A\beta_{1-40}$ w PMR. Wyniki badania poziomu białek amyloidowych zostały zestawione w tabeli nr 13.

Tabela 13. Stężenie białek β - amyloid w poszczególnych grupach badanych

Grupy badane		Me	Q1	Q3	Min.	Max.
Stężenie białka $A\beta_{1-42}$ [pg/ml]	K	402,85	282,35	531,62	260,00	578,80
	MCI	443,00	300,60	570,40	220,30	1036,00
	AD I	506,85	328,3	815,175	245,00	1380,00
	AD II	503,80	317,5	622,2	260,53	1193,00
	AD III	185,70	141,88	290,45	58,47	746,80
Stężenie białka $A\beta_{1-40}$ [pg/ml]	K	8227,50	6379,5	9787,25	4782,00	10520,00
	MCI	10520,00	9386,00	12655,00	4943,00	17430,00
	AD I	11010,00	6203,75	12422,5	4610,00	22720,00
	AD II	10060,00	8590,00	11800,00	4940,00	17430,00
	AD III	7044,00	4406,00	10720,29	2924,21	12910,00

Me-mediana; Q1-kwartył 1; Q3- kwartył 3; Min.-wartość minimalna; Max.-wartość maksymalna

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej pod kątem ich różnic w zależności od stopnia zaawansowania choroby. W tym celu zastosowano nieparametryczny test Kruskala-Wallis'a wraz z analiza post hoc przy użyciu testu Dunn'a. Wyniki obu testu przedstawia wykres nr 8.



Wykres 8. Stężenie beta amyloidu 1-42 (Aβ42) z podziałem na grupy w zależności od stopnia zaawansowania choroby oraz w grupie kontrolnej. Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach p i oznaczono gwiazdkami (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Analiza poziomu białka Aβ₁₋₄₂ w grupie badanych pacjentów oraz wśród osób zdrowych z grupy kontrolnej, po wyeliminowaniu wartości odstających, wykazała statystycznie istotną różnicę jedynie pomiędzy pacjentami z grupy AD I a AD III (p<0,001) oraz pacjentami z grupy AD II a AD III (p<0,001). Na podstawie uzyskanych wyników, można zauważyć, że wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania choroby otępiennej, poziom amyloidu Aβ₁₋₄₂ w PMR wyraźnie się obniża. Wśród pacjentów z podgrupy AD III zaobserwowano najniższy poziom amyloidu Aβ₁₋₄₂ (Me=185,7; Q1=141,88; Q3=290,45) w porównaniu z pacjentami z grupy AD II (Me=503,80; Q1=317,5; Q3=290,45) oraz AD I (Me=506,85; Q1=328,3; Q3=815,175).

Ocenie poddano również poziom stężenia białka amyloidowego Aβ₁₋₄₀ u wszystkich pacjentów z otępieniem oraz w grupie kontrolnej. Jednak analiza nie wykazała statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami. Brak istotnych różnic może być spowodowany różną liczebnością podgrup. Podgrupa pacjentów z AD III jest prawie dwa razy mniej liczna (n=9) od pozostałych podgrup. Dodatkowo należy zauważyć, iż testy ELISA wykrywające białka charakterystyczne w przebiegu choroby otępiennej tj.

białka amyloidowe A β ₁₋₄₂, A β ₁₋₄₀, białka h-Tau oraz p-Tau były mierzone tylko u kilku osób z grupy kontrolnej u których pobrano PMR do badań. Nie jest to wynik reprezentatywny dla całej podgrupy osób zdrowych.

4.4. Analiza stężenia białek Tau w zależności od zaawansowania choroby

Wraz z postępem otępienia alzheimerowskiego dochodzi do przerwania bariery krew-mózg oraz rozpadu neuronów, co prowadzi do wzrostu poziomu całkowitego białka Tau (hTau) oraz jego ufosorylowanej postaci (pTau) w PMR. W tym celu poddano analizie statystycznej wyniki badań stężenia białek Tau z PMR, udostępnione do niniejszej rozprawy. Statystyki opisowe poziomu białka hTau oraz pTau dla każdej z analizowanych podgrup zostały przedstawione w tabeli nr 14.

Tabela 14. Stężenie białek Tau w poszczególnych stadiach choroby

Grupy badane		Me	Q1	Q3	Min.	Max.
Stężenie białka hTau [pg/ml]	K	307,15	233,85	510,53	132,60	1002,00
	MCI	215,50	148,05	393,4	104,60	691,50
	AD I	485,85	344,85	728,75	153,20	3523,00
	AD II	478,10	350,80	756,20	177,67	2276,00
	AD III	499,80	393,30	658,35	133,90	895,66
Stężenie białka pTau [pg/ml]	K	57,82	45,28	82,41	38,97	124,90
	MCI	41,21	36,23	67,18	26,25	91,65
	AD I	79,64	54,78	106,22	33,89	168,90
	AD II	70,83	58,85	93,20	23,82	199,10
	AD III	51,30	42,08	69,19	28,45	75,92

Me-mediana; Q1-kwartyl 1; Q3- kwartyl 3; Min.-wartość minimalna; Max.-wartość maksymalna

Analiza poziomu białka Tau całkowitego (hTau) oraz białka Tau fosforowanego (pTau) w grupie badanej nie wykazała statystycznie istotnych różnic w zależności od stadium choroby AD ($p>0,05$). Nie wykazano również różnicy w stężeniu białek Tau pomiędzy osobami zdrowymi z grupy kontrolnej, a pacjentami w ostrej fazie otępienia ($p>0,05$). Powodem tego może być zbyt mała grupa badana, podgrupy różniące się liczebnością oraz brak danych dotyczących poziomu stężenia białek Tau wśród osób z grupy

kontrolnej, u których płyn PMR z oczywistych względów, nie był pobierany do rutynowych badań.

4.5. Analiza charakterystycznych wskaźników w zależności od zaawansowania choroby

W kolejnym etapie pracy dokonano analizy charakterystycznych wskaźników diagnostycznych, wyliczanych na podstawie stosunku dwóch form amyloidu ($A\beta_{1-40}/A\beta_{1-42}$) oraz stosunku dwóch form białek Tau do amyloidu $A\beta_{1-42}$ ($hTau/A\beta_{1-42}$ oraz $pTau/A\beta_{1-42}$) we wszystkich podgrupach objętych badaniem. Wskaźniki te są obecnie wykorzystywane w rutynowej diagnostyce do oceny stopnia zaawansowania choroby oraz odróżnienie AD od innych form otępienia. Są one stosowane w skali Erlangen, o której pisano w rozdziale 1.2. Wartości tych wskaźników przedstawiono w tabeli nr 15.

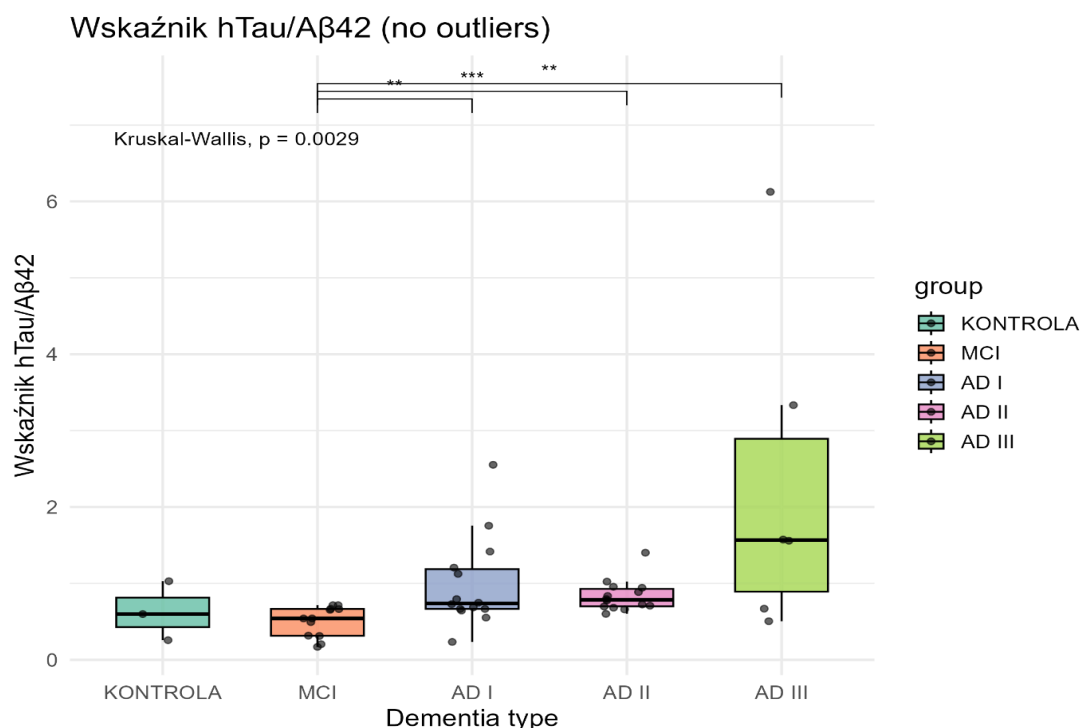
Tabela 15. Wartości charakterystycznych wskaźników diagnostycznych w zależności od stopnia zaawansowania AD

Grupy badane		Me	Q1	Q3	Min.	Max.
Wskaźnik $A\beta_{42}/A\beta_{40}$	K	0,05	0,05	0,06	0,04	0,06
	MCI	0,05	0,03	0,06	0,02	0,08
	AD I	0,05	0,04	0,06	0,04	0,12
	AD II	0,06	0,03	0,07	0,02	0,09
	AD III	0,02	0,02	0,06	0,01	0,07
Wskaźnik $pTau/A\beta_{42}$	K	0,15	0,11	0,24	0,08	0,43
	MCI	0,12	0,08	0,15	0,04	0,36
	AD I	0,12	0,12	0,21	0,05	0,42
	AD II	0,12	0,12	0,14	0,06	0,71
	AD III	0,28	0,12	0,41	0,09	1,30
Wskaźnik $hTau/A\beta_{42}$	K	0,81	0,51	1,64	0,26	3,46
	MCI	0,65	0,40	0,71	0,17	2,81
	AD I	0,77	0,67	1,50	0,23	3,32
	AD II	0,84	0,71	1,02	0,60	8,33
	AD III	1,57	1,11	4,73	0,51	15,32

Me-mediana; Q1-kwartył 1; Q3- kwartył 3; Min.-wartość minimalna; Max.-wartość maksymalna

Do porównania poziomu wskaźników diagnostycznych choroby Alzheimer'a $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$, $pTau/A\beta_{1-42}$ oraz $hTau/A\beta_{1-42}$ w poszczególnych podgrupach badanych,

zastosowano nieparametryczny test statystyczny Kruskala-Wallis'a wraz z analiz post-hoc przy użyciu testu Dunn'a. Po usunięciu wartości odstających stwierdzono, iż tylko współczynnik $h\text{Tau}/A\beta_{1-42}$ w grupie badanej wykazał istotne statystycznie różnice. Wyniki te zostały przedstawione na wykresie nr 9.

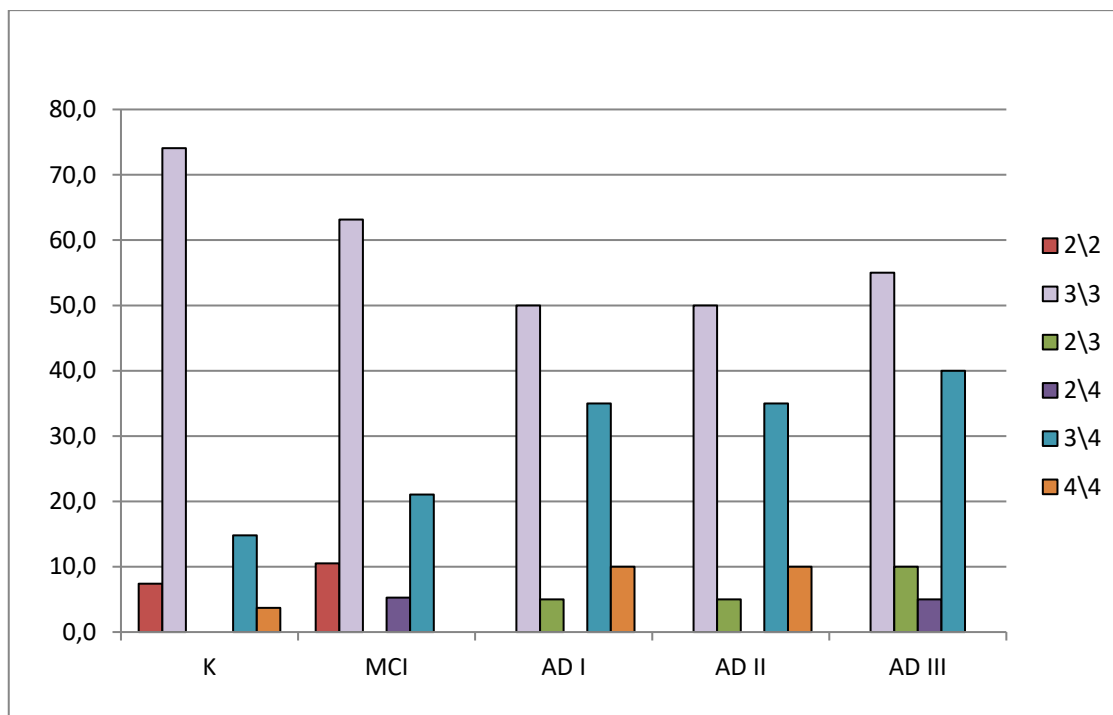


Wykres 9. Poziom współczynnika $h\text{Tau}/A\beta_{1-42}$ z podziałem na grupy w zależności od stopnia zaawansowania choroby oraz w grupie kontrolnej. Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach p i oznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Najniższy poziom współczynnika $h\text{Tau}/A\beta_{1-42}$ zaobserwowano w grupie pacjentów z łagodnym zaburzeniem poznawczym MCI ($Me=0,65$; $Q1=0,40$; $Q3=0,71$) w porównaniu z pacjentami ze stwierdzonym otępieniem alzheimerowskim na każdym etapie jego zaawansowania tj. AD I ($Me=0,77$; $Q1=0,67$; $Q3=1,50$), AD II ($Me=0,84$; $Q1=0,71$; $Q3=1,02$) oraz AD III ($Me=1,57$; $Q1=1,11$; $Q3=4,73$) (odpowiednio $p < 0,01$; $p < 0,01$; $p < 0,01$). Natomiast nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie współczynnika $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ oraz współczynnika $p\text{Tau}/A\beta_{1-42}$ w zależności od stopnia zaawansowania choroby ($p > 0,05$).

4.6. Analiza polimorfizmu typu SNP w dwóch punktach rs429358 i rs7412 w genie *APOE* w zależności od stadium otępienia

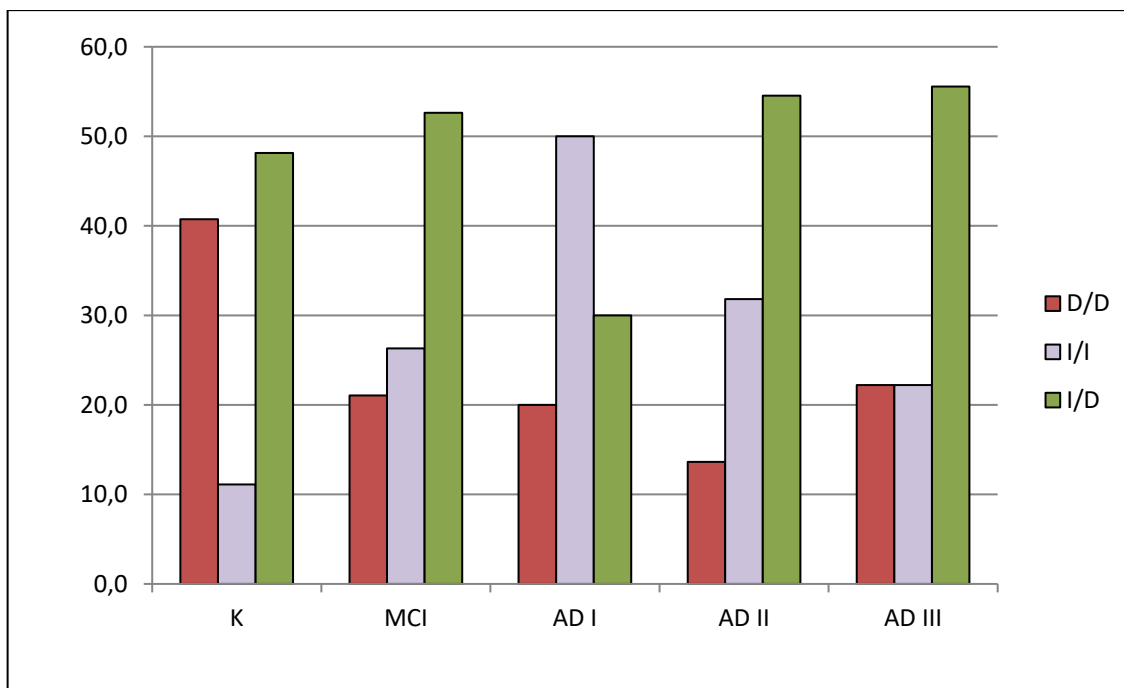
Analiza częstości występowania poszczególnych polimorfizmów rs429358 i rs7412 w genie *APOE* w badanej grupie wykazała, iż najczęstszym genotypem występującym wśród wszystkich badanych osób, zarówno ze stwierdzonym otępieniem, jak też u osób zdrowych, jest genotyp $\epsilon 3/\epsilon 3$ (57,73% całej grupy badanej). Wyniki te przedstawione na wykresie nr 10 wskazują, iż Apo-E3 jest najczęściej występującą izoformą białka apolipoproteiny-E w grupie badanej. Kolejnym często występującym genotypem jest heterozygota $\epsilon 3/\epsilon 4$ (28,86% całej grupy badanej). Genotyp $\epsilon 3/\epsilon 4$ może zwiększać prawdopodobieństwo zachorowania na AD, gdyż zawiera allel wysokiego ryzyka w postaci $\epsilon 4$. Izoforma Apo-E2, która wg. danych literaturowych może pełnić funkcję protekcyjną w AD, występuje tylko w grupie kontrolnej oraz MCI w postaci genotypu homozygotycznego $\epsilon 2/\epsilon 2$ (4,12% całej grupy badanej). W grupach ze stwierdzonym AD różniących się stopniem zaawansowania nie wykazano obecności tego polimorfizmu. Genotyp $\epsilon 4/\epsilon 4$ (4,12% całej grupy badanej) kodujący izoformę Apo-E4, zwiększającą predyspozycje zachorowania, występuje w dwóch grupach przebadanych pacjentów tj. w grupie pacjentów o łagodnym oraz średnim stadium otępienia (AD I, AD II). Polimorfizm ten można również zauważyć w grupie kontrolnej osób zdrowych. Genotyp $\epsilon 2/\epsilon 3$ (3,09%) występuje wśród pacjentów w każdej fazie otępienia tj. AD I, AD II, AD III. Nie występuje natomiast u pacjentów z łagodnym zaburzeniem poznawczym oraz wśród osób zdrowych.



Wykres 10. Rozkład procentowy występowania poszczególnych genotypów w rs429358 i rs7412 w genie APOE z podziałem na stadium otępienia

4.7. Analiza polimorfizmu insercyjno/delecyjnego (I/D) w genie *ACE* rs1799752 w zależności od stadium otępienia

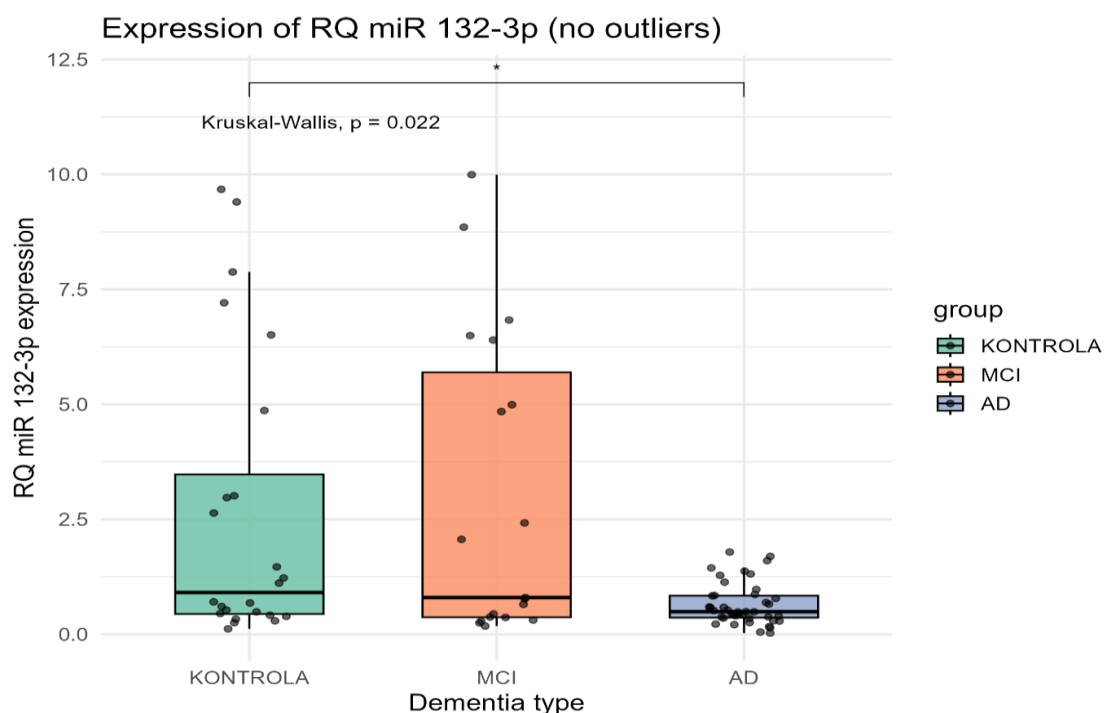
Analiza polimorfizmu rs1799752 w genie *ACE* przedstawiona na wykresie nr 11 wykazała, że najczęściej występującym genotypem jest heterozygota I/D (47,42% całej grupy badanej), zarówno w grupie osób zdrowych jak też pacjentów z MCI, AD II oraz AD III. Tylko w grupie pacjentów z otępieniem łagodnym (AD I) najczęściej występującym genotypem była homozygota insercyjna I/I (27,84% całej grupy badanej). Natomiast homozygota delecyjna D/D (24,74% całej grupy badanej) była najrzadziej występującym genotypem *ACE* wśród pacjentów z łagodnym otępieniem poznawczym oraz otępieniem typu alzheimerowskiego w każdym stopniu zaawansowania tej choroby. W grupie kontrolnej najczęściej występował genotyp I/D, drugim w kolejności był allel delecyjny (D) w postaci homozygoty D/D. Natomiast najrzadziej występującym polimorfizmem genu *ACE* w grupie kontrolnej był allel insercyjny (I) w postaci homozygoty I/I.



Wykres 11. Rozkład procentowy występowania poszczególnych genotypów w rs1799752 genu ACE z podziałem na stadium otępienia

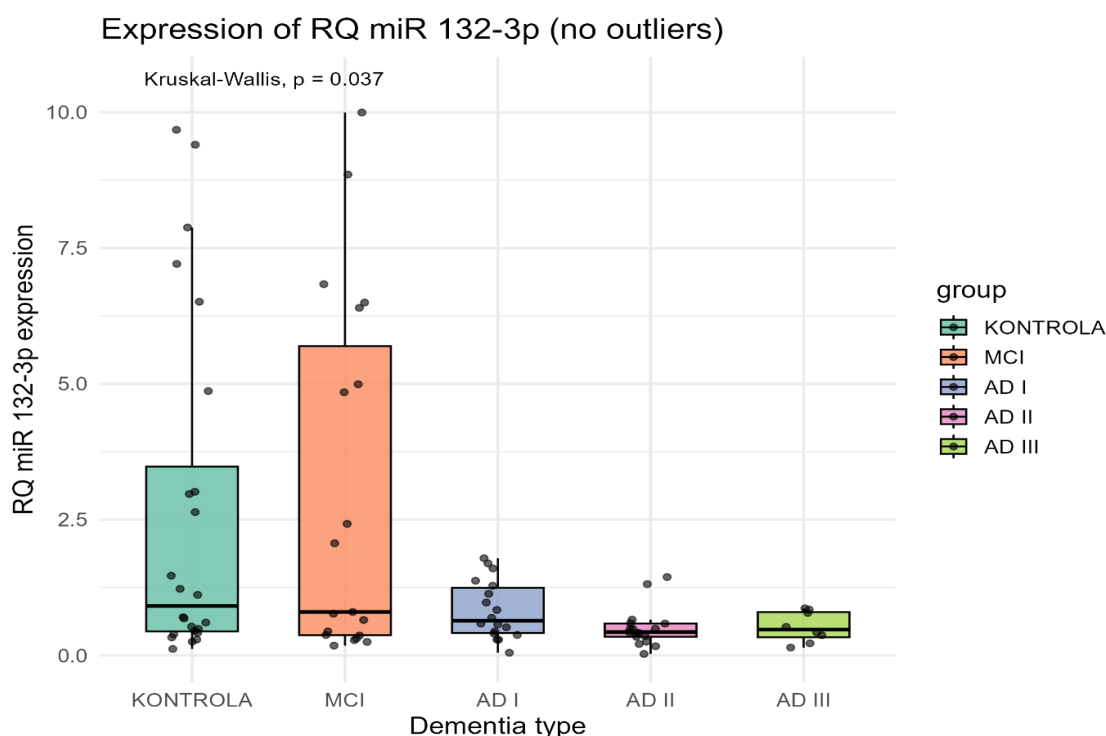
4.8. Analiza ekspresji wyselekcjonowanych miRNA w zależności od zaawansowania choroby

Na podstawie analizy bioinformatycznej oraz przeglądu literatury, wyselekcjonowano trzy miRNA: miRNA-200a-3p, miRNA-146a-5p oraz miRNA-132-3p, które zostały zidentyfikowane jako potencjalne regulatory genów *APOE* i *ACE*, działające bezpośrednio lub pośrednio poprzez modulację szlaków sygnałowych związanych z ekspresją tych genów. Po wyizolowaniu z surowicy pacjentów oraz osób z grupy kontrolnej krążących miRNA, w pierwszym etapie przeprowadzono analizę poziomu ich ekspresji w trzech grupach: pacjentów z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi (MCI), pacjentów chorych na chorobę Alzheimera (AD) oraz osób zdrowych z grupy kontrolnej (K), bez uwzględnienia stopnia zaawansowania choroby. Spośród analizowanych cząsteczek miRNA, jedynie miRNA-132-3p, po usunięciu wartości odstających, wykazał istotne różnice w poziomie ekspresji pomiędzy badanymi grupami. Wykres nr 12 przedstawia wyniki analizy statystycznej.



Wykres 12. Różnica ekspresji miR-132-3p w grupie MCI, AD , K (bez wartości odstających). Wyniki przedstawiono jako RQ (ang. relative quantification). Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach p i oznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

W grupie pacjentów ze stwierdzonym otępieniem bez podziału na stopień zaawansowania, poziom ekspresji miRNA-132-3p jest istotnie niższy niż w grupie osób zdrowych w porównaniu z grupą AD ($p < 0,05$). Nie wykazano natomiast istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupą pacjentów z MCI a pacjentami z otępieniem alzheimerowskim oraz pomiędzy grupą MCI a grupą kontrolną ($p > 0,05$). W celu dokładnego określenia różnicy ekspresji miRNA-132-3p w zależności od stopnia zaawansowania choroby, dokonano analizy poziomu ekspresji wybranego miRNA w grupach z podziałem na AD I, AD II oraz AD III. Uzyskane wyniki przy poziomie istotności $p = 0,037$ wykazały spadek poziomu ekspresji miRNA-132-3p wraz z pogłębieniem stopnia otępienia. Nie wykazano natomiast istotnych różnic pomiędzy analizowanymi grupami w analizie post hoc. Wyniki przedstawia wykres nr 13.



Wykres 13. Różnica ekspresji miR-132-3p w grupie MCI, AD I, AD II, AD III, K (bez wartości odstających).

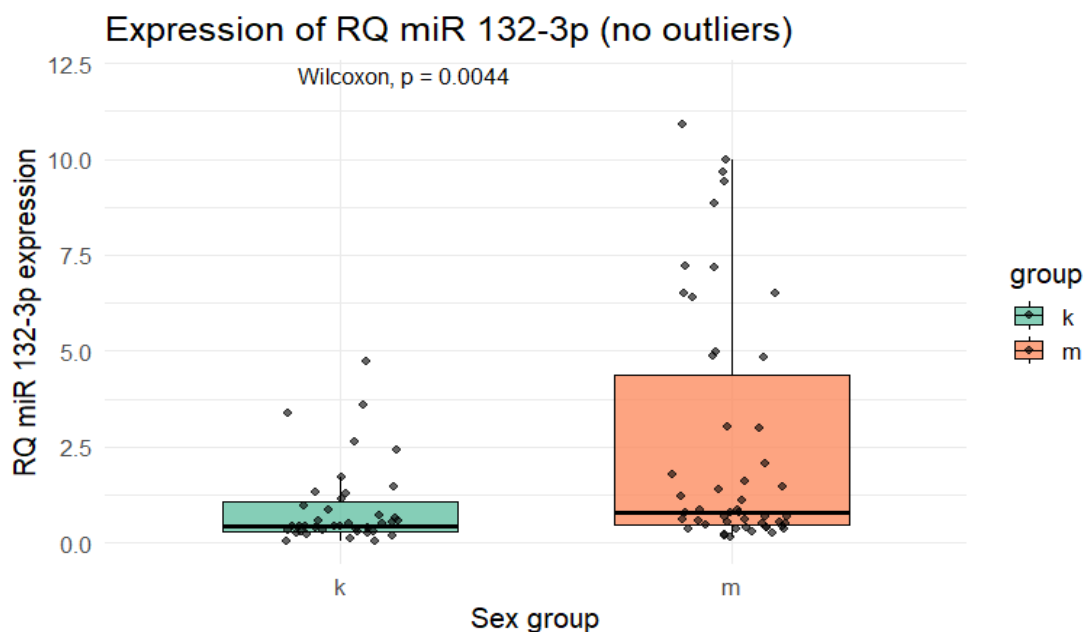
Wyniki przedstawiono jako RQ (ang. relative quantification). Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach p i oznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Analizie poddano również ekspresję miRNA-146a-5p oraz miRNA-200a-3p wśród osób z łagodnym zaburzeniem poznawczym, stwierdzonym otępieniem alzheimerowskim oraz osób z grupy kontrolnej. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic poziomu ich ekspresji. W związku z tym odstąpiono od porównania ekspresji tych dwóch miRNA w zależności od stopnia zaawansowania choroby AD.

4.9. Analiza ekspresji wybranych miRNA w zależności od wieku oraz płci

W celu zbadania zmian poziomu ekspresji wybranych miRNA (miRNA-200a-3p, 146a-5p oraz 132-3p) w zależności od wieku, grupa badana została podzielona na 2 podgrupy: osoby przed 65 r. ż. oraz po 65 r. ż. Przeprowadzone analizy nie wykazały istotnych różnic w ekspresji badanych miRNA pomiędzy grupami wiekowymi ($p > 0,05$). Dodatkowym czynnikiem mogącym mieć wpływ na ekspresję miRNA była płeć badanych osób. Różnice pomiędzy grupą z otępieniem i bez otępienia analizowano za

pomocą testu U Manna-Whitneya-Wilcoxona dla par niezależnych. Przeprowadzony test wykazał istotną różnicę tylko w przypadku jednej cząsteczki miRNA: miRNA-132-3p ($p=0,0044$). Wynik badania przedstawiono za pomocą wykresu (wykres nr 14).



Wykres 14. Poziom ekspresji miRNA 132-3p w zależności od płci
Wyniki przedstawiono jako RQ (ang. relative quantification). Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach p i oznaczono gwiazdkami (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

Na podstawie wykresu można stwierdzić, że mężczyźni wykazywali wyższy poziom ekspresji miRNA-132-3p w porównaniu z kobietami ($p=0,0044$). Nie wykazano różnic istotnych statystycznie w przypadku pozostałych analizowanych miRNA (miRNA-200a-3p, miRNA-146a-5p).

4.10. Analiza korelacji ekspresji poszczególnych miRNA z poziomem parametrów biochemicznych

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej dokonano oceny związku ekspresji wybranych miRNA z poziomem cholesterolu całkowitego, jego frakcji HDL, trójglicerydów oraz z poziomem witaminy B₁₂. W tym celu obliczono współczynnik korelacji rang Spearmana (R). Korelację określono dla wszystkich pacjentów z MCI

oraz ze stwierdzonym otępieniem alzheimerowskim lecz bez podziału na stopień jego zaawansowania. Następnie uzyskane wyniki porównano z współczynnikiem korelacji rang Spearmana (R) obliczonego dla grupy kontrolnej. Wyniki korelacji dla grupy osób z otępieniem przedstawia tabela nr 16. Natomiast dla grupy kontrolnej wyniki zostały zebrane w tabeli nr 17.

Tabela 16. Współczynnik korelacji R Spearmana ekspresji miRNA z parametrami biochemicznymi w grupie osób z otępieniem

ZMIENNE NIEZALEŻNE		Cholesterol całkowity (TC)	Fracja cholesterolu HDL	Trójglicerydy TG	Witamina B12
ZMIENNE ZALEŻNE					
miRNA	miRNA-132-3p R p	0,1538	0,2226	-0,0510	-0,0410
		0,2175	0,1091	0,7399	0,7399
	miRNA-146a-5p R p	0,0627	0,2335	0,0906	-0,0308
		0,6167	0,0924	0,5189	0,8030
	miRNA-200a-3p R p	0,1430	-0,0350	0,0606	0,0044
		0,2799	0,8151	0,6858	0,9731

R-współczynnik korelacji R Spearmana, p- poziom istotności statystycznej

Na podstawie obliczonych współczynników korelacji rangowych możemy zaobserwować, że w grupie osób z otępieniem, nie zachodzą żadne istotne zależności między ekspresją miRNA-132-3p, miRNA-146a-5p i miRNA-200a-3p a poziomem cholesterolu, jego frakcjami (HDL, TG) oraz stężeniem witaminy B₁₂.

Tabela 17. Współczynnik korelacji R Spearmana ekspresji miRNA z parametrami biochemicznymi w grupie kontrolnej

ZMIENNE NIEZALEŻNE		Cholesterol całkowity (TC)	Frakcja cholesterolu HDL	Trójglicerydy TG	Witamina B12
ZMIENNE ZALEŻNE					
miRNA	miRNA-132-3p R p	-0,1430 0,5475	-0,1846 0,6097	0,69055 0,0270	0,8312 0,0029
	miRNA-146a-5p R p	-0,0958 0,6878	-0,0285 0,9377	0,1640 0,6507	-0,1627 0,6423
	miRNA-200a-3p R p	-0,1175 0,7424	-0,0335 0,9373	0,9584 0,0002	0,5828 0,0996

R-współczynnik korelacji R Spearmana, p- poziom istotności statystycznej

Czcionką pogrubioną przedstawiono wyniki istotne statystycznie na poziomie $p < 0,05$.

W grupie kontrolnej uzyskaliśmy korelację dodatnią $R=0,69$, na poziomie istotności $p=0,0270$ pomiędzy ekspresją miRNA-132-3p a stężeniem trójglicerydów. Ekspresja miRNA-132-3p wykazała również istotną, silną, dodatnią korelację $R=0,83$ ($p=0,0029$) z poziomem witaminy B₁₂. Kolejną cząsteczką miRNA, która wykazała korelację z parametrem biochemicznym jest miRNA-200a-3p. Wynik analizy statystycznej wskazuje na silny związek ($R=0,96$) pomiędzy stężeniem trójglicerydów a poziomem ekspresji tego miRNA, przy poziomie istotności $p=0,0002$. Nie wykazano natomiast żadnych istotnych statystycznie korelacji pomiędzy ekspresją miRNA-146a-5p a jakimkolwiek parametrem biochemicznym.

4.11. Analiza korelacji ekspresji poszczególnych miRNA z wskaźnikami diagnostycznymi

W celu zbadania zależności poziomu ekspresji wybranych miRNA od poziomu charakterystycznych wskaźników diagnostycznych ($A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$, $hTau/A\beta_{1-42}$, $pTau/A\beta_{1-42}$), dokonano analizy statystycznej w zakresie korelacji rang R Spearmana. Analizy te zostały wykonane tylko wśród pacjentów z otępieniem. W grupie kontrolnej nie wykonano badań białek Tau oraz amyloidów- β , dlatego nie można odnieść się do

wyników porównawczych wśród osób zdrowych. Uzyskane wyniki przedstawia tabela nr 18.

Tabela 18. Współczynnik korelacji R Spearmana ekspresji miRNA z poziomem wskaźników diagnostycznych w grupie osób z otępieniem

ZMIENNE NIEZALEŻNE		Wskaźnik Aβ ₄₂ /Aβ ₄₀	Wskaźnik pTau/Aβ ₄₂	Wskaźnik hTau/Aβ ₄₂
ZMIENNE ZALEŻNE				
miRNA	miRNA-132-3p R p	-0,1155	0,2361	0,2280
		0,4001	0,0826	0,0941
	miRNA-146a-5p R p	0,0832	0,3480	0,3373
		0,5458	0,0092	0,0118
	miRNA-200a-3p R p	0,0015	0,0279	0,0013
		0,9915	0,8492	0,9928

R-współczynnik korelacji R Spearmana ; p- poziom istotności statystycznej

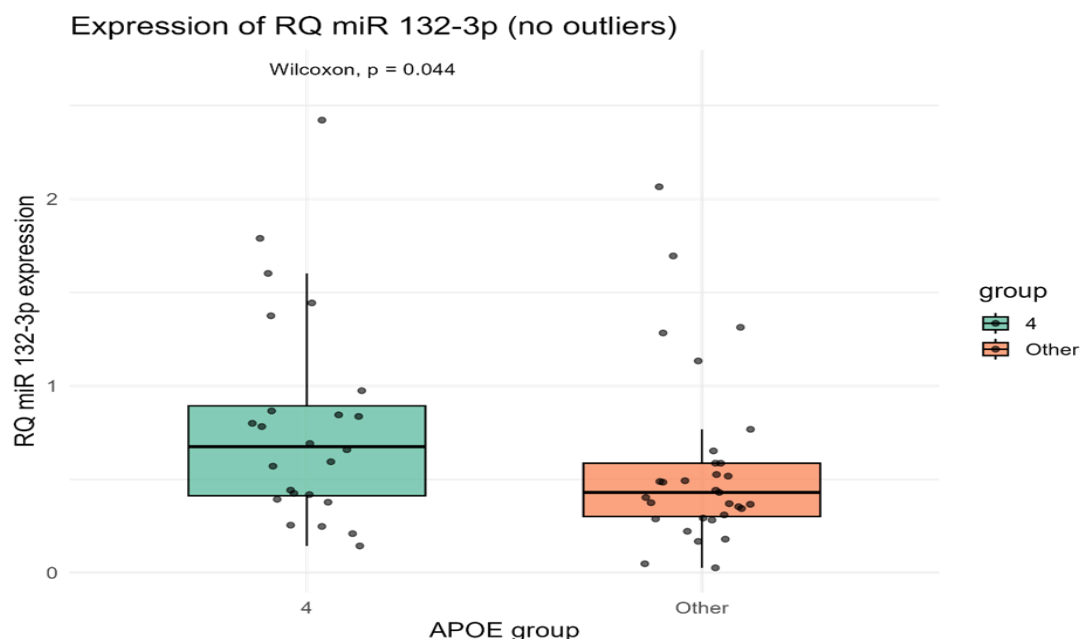
Czcionką pogrubioną przedstawiono wyniki istotne statystycznie na poziomie $p < 0,05$.

W grupie badanej wykazano słabą korelację $R=0,35$ przy poziomie istotności $p=0,0092$ pomiędzy wskaźnikiem $pTau/A\beta_{42}$, a ekspresją miRNA-146a-5p. Ta sama cząsteczka miRNA (miRNA-146a-5p) wykazała również słabą zależność ekspresji ($R=0,34$) od wskaźnika $pTau/A\beta_{42}$ przy $p=0,0118$. Pozostałe analizowane cząsteczki miRNA nie wykazały żadnych istotnych korelacji z obliczonymi wskaźnikami diagnostycznymi AD.

4.12. Analiza związku ekspresji wybranych miRNA z polimorfizmem genu *APOE*

W kolejnym etapie pracy dokonano analizy związku pomiędzy obecnością allelu $\epsilon 4$ genu *APOE* a poziomem ekspresji wybranych mikroRNA. Celem tej analizy było określenie potencjalnego wpływu polimorfizmu *APOE* na regulację miRNA mogących uczestniczyć w patogenezie choroby Alzheimer'a. Grupę badaną pacjentów z MCI oraz AD o różnym stopniu zaawansowania z wyłączeniem grupy osób zdrowych, podzielono na 2 podgrupy na podstawie obecności lub braku allelu $\epsilon 4$ w genie *APOE*. Przeprowadzone analizy za pomocą testu Wilcoxon'a po usunięciu wartości odstających

wykazały istotną statystycznie różnicę ($p < 0,05$) poziomu miRNA-132-3p pomiędzy dwoma porównywanymi grupami. Wyniki przedstawia wykres nr 15.



Wykres 15. Różnica ekspresji miR-132-3p w poszczególnych izoformach genu *APOE*. Wyniki przedstawiono jako RQ (ang. relative quantification). Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach p i oznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

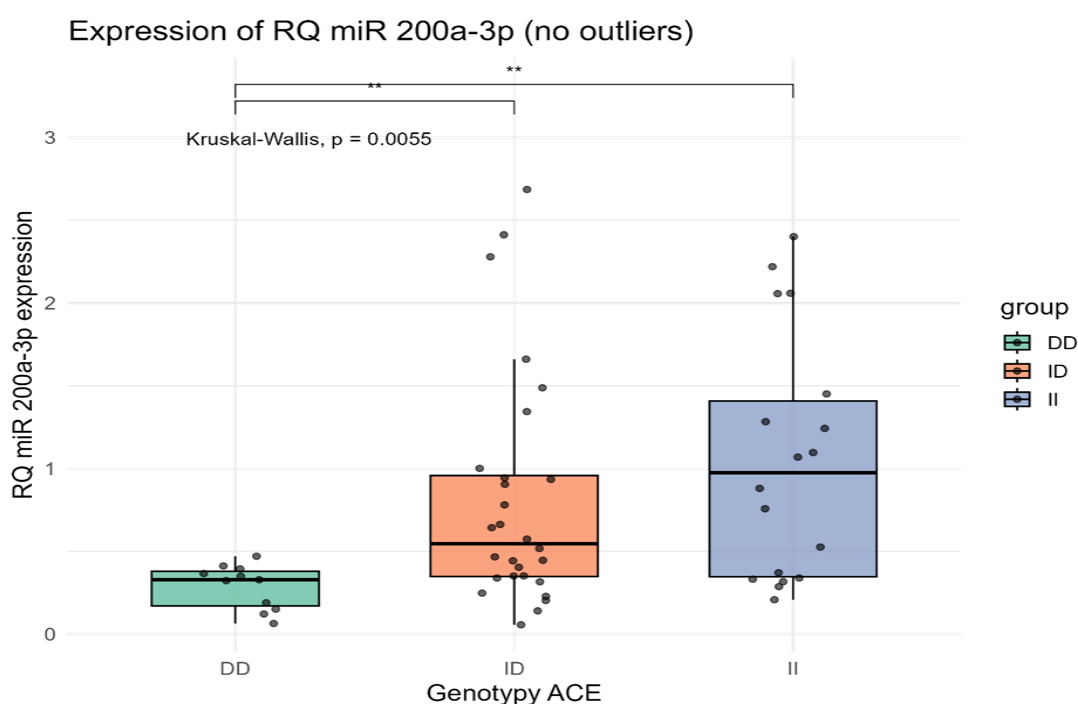
Przedstawione wyniki pokazują, iż obecność przynajmniej jednego allelu $\epsilon 4$ w genie *APOE* podnosi poziom ekspresji miRNA-132-3p. Nie wykazano natomiast istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$) w poziomie ekspresji pozostałych miRNA tj. miRNA-200a-3p oraz miRNA 146a-5p pomiędzy osobami posiadającymi przynajmniej jeden allel $\epsilon 4$ w genotypie a osobami bez tego allelu.

4.13. Analiza związku ekspresji wybranych miRNA z polimorfizmem genu *ACE*

W celu określenia różnicy ekspresji wybranych miRNA w zależności od polimorfizmu w genie *ACE*, wykonano analizę statystyczną z podziałem pacjentów na trzy podgrupy, wykluczając grupę kontrolną. Podstawą klasyfikacji był rodzaj genotypu *ACE* wśród pacjentów: homozygota I/I, homozygota D/D lub heterozygota I/D. Do porównania grup zastosowano nieparametryczny test statystyczny Kruskalla-Wallis'a wraz z analiz post-hoc przy użyciu testu Dunn'a. Po usunięciu wartości odstających

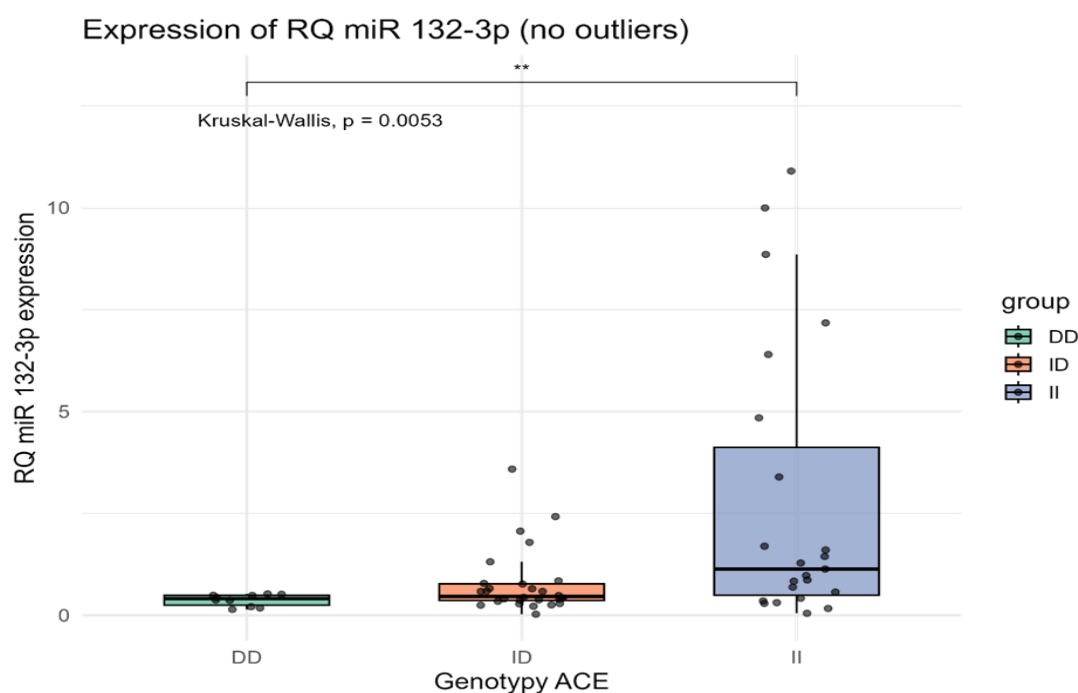
stwierdzono, iż poziom ekspresji wszystkich badanych miRNA tj. miRNA-200a-3p, miRNA-132-3p oraz miRNA-146a-5p wykazał istotną statystycznie różnicę w zależności od polimorfizmu *ACE*.

Test ten wykazał, iż najwyższy poziom ekspresji miRNA-200a-3p występował u homozygot insercyjnych I/I w porównaniu z genotypem D/D przy poziomie istotności $p < 0,01$. Natomiast heterozygoty I/D, wykazały wyższy poziom ekspresji badanego miRNA-200a-3p w porównaniu z homozygotami D/D ($p < 0,01$). Nie wykazano natomiast istotnej różnicy w poziomie ekspresji między grupą o genotypie homozygotycznym I/I oraz heterozygotami I/D ($p > 0,05$). Analiza pokazują, że obecność przynajmniej jednego allelu insercyjnego (I) wpływa na podwyższenie ekspresji miRNA-200a-3p. Wyniki przedstawiono na wykresie nr 16.



Wykres 16. Różnica ekspresji miR-200a-3p w poszczególnych genotypach genu *ACE*
Wyniki przedstawiono jako RQ (ang. relative quantification). Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach p i oznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

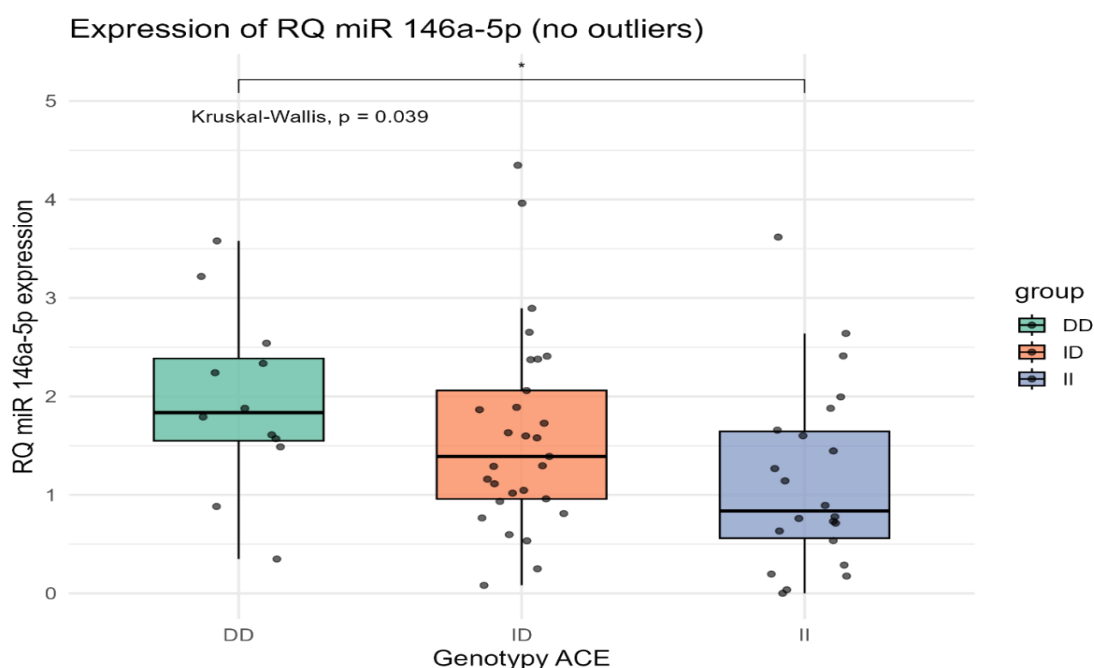
Istotne statystycznie różnice ($p < 0,05$) uzyskano również analizując różnice ekspresji miRNA-132-3p w zależności od poszczególnych genotypów *ACE*, co przedstawiono na wykresie nr 17.



Wykres 17. Różnica ekspresji miR-132-3p w poszczególnych genotypach genu *ACE*
 Wyniki przedstawiono jako RQ (ang. relative quantification). Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach p i oznaczono gwiazdkami (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Analiza poziomu ekspresji miRNA-132-3p wykazała istotną statystycznie różnicę pomiędzy grupą homozygot insercyjnych I/I a grupą homozygot delecyjnych D/D przy poziomie istotności odpowiednio p<0,01. Obecność allelu insercyjnego wyraźnie wpływa na ekspresję miRNA-132-3p. Ekspresja miRNA-132-3p jest najwyższa wśród osób homozygotycznych I/I posiadających dwa allele insercyjne (I) w stosunku do homozygot D/D, jak też heterozygot I/D.

Wykres nr 18 przedstawia wyniki analizy statystycznej poziomu ekspresji miRNA-146a-5p w zależności od genotypu *ACE*.



Wykres 18. Różnica ekspresji miR-146a-5p w poszczególnych genotypach genu *ACE*
Wyniki przedstawiono jako RQ (ang. relative quantification). Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach p i oznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Analiza ekspresji miRNA-146a-5p wykazała istotną statystycznie różnicę ($p < 0,05$), podobnie jak wcześniejsze miRNA, pomiędzy grupą homozygot insercyjnych I/I a grupą homozygot delecyjnych D/D. W tym przypadku obecność allelu insercyjnego wpływa na obniżenie ekspresję miRNA-146a-5p. Poziom miRNA-146a-5p jest najwyższy wśród osób homozygotycznych D/D, zaś posiadanie przynajmniej jednego allelu insercyjnego powoduje spadek ekspresji tego miRNA.

4.14. Modele predykcyjne zaburzeń otępiennych

W celu predykcji zaburzeń otępiennych zastosowano modele predykcyjne wykorzystujące predykcyjne dopasowanie średniej (ang. Predictive Mean Matching- PMM). Metoda PMM pozwala na imputację brakujących danych, wykorzystując model regresji dopasowania modelu, przewidywania wartości zmiennej, prognozy oraz przypisania wartości brakujących.

W ramach modelu predykcyjnego zbiór danych podzielono na grupę treningową $n=69$ oraz uczącą się $n=29$ (odpowiednio 70% i 30%). Do predykcji wykorzystano regresję logistyczną z krokową postępującą optymalizacją hiperparametrów, regresję LASSO oraz drzewo decyzyjne.

Z powodu licznych braków danych dokonano imputacji danych. Tabele nr 19 oraz tabela nr 20 przedstawiają zakres imputowanych parametrów.

Tabela 19. Imputacja danych testowanych w ramach PMM cz. I

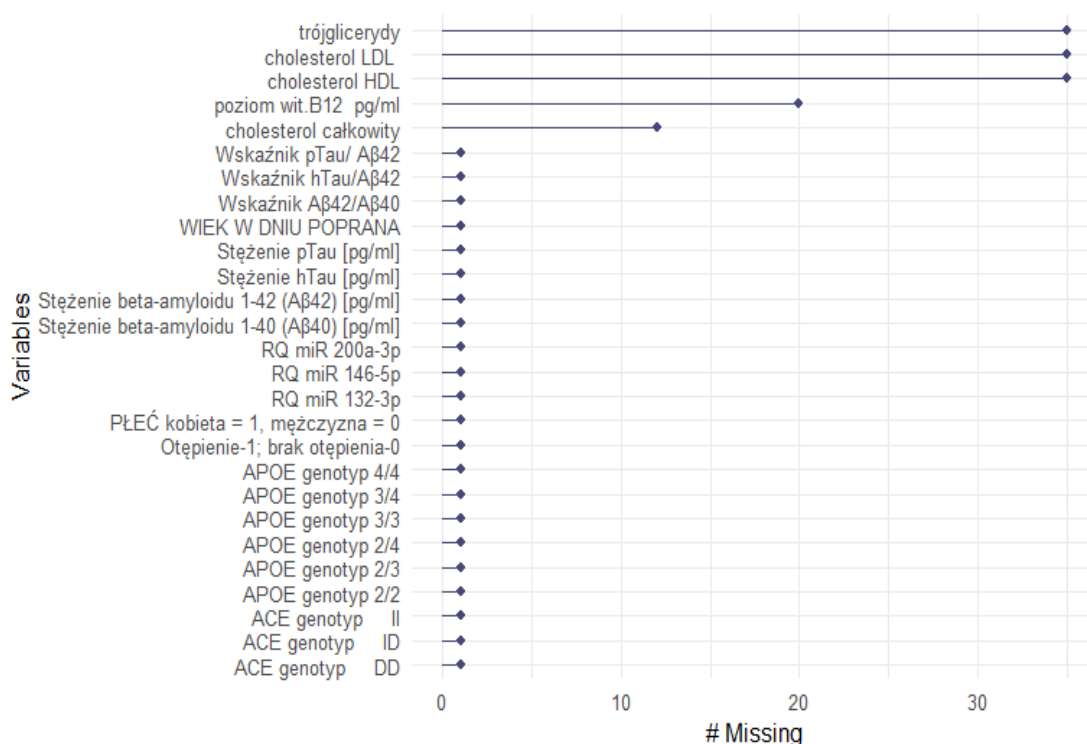
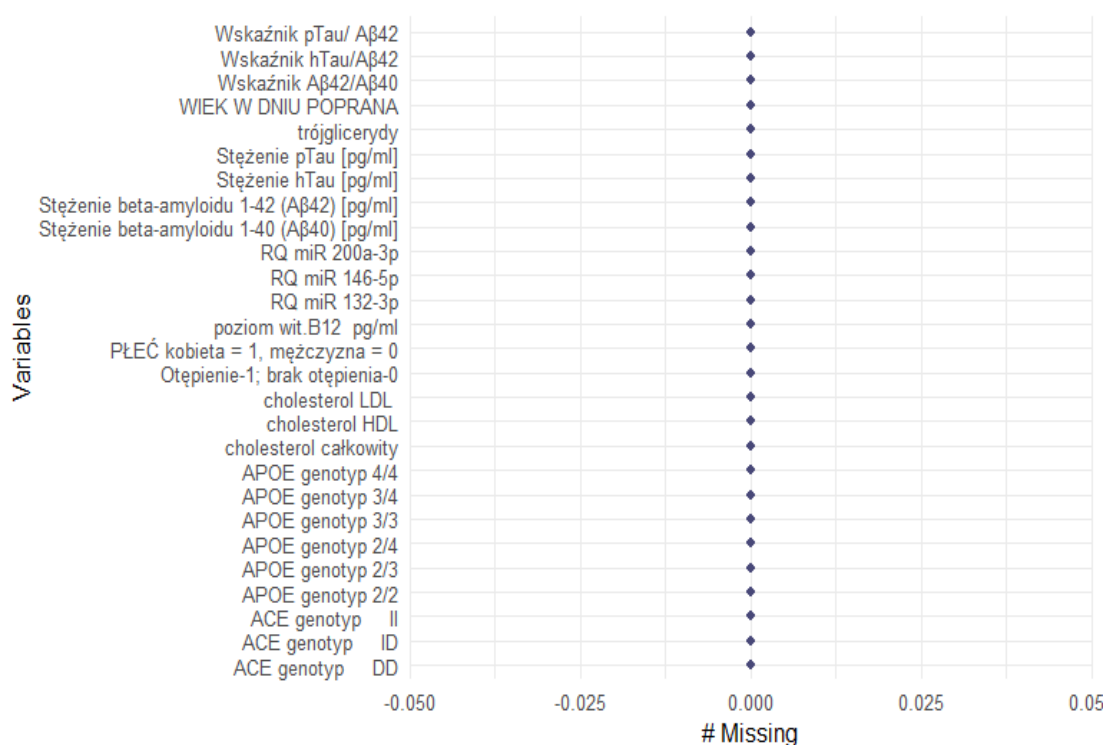


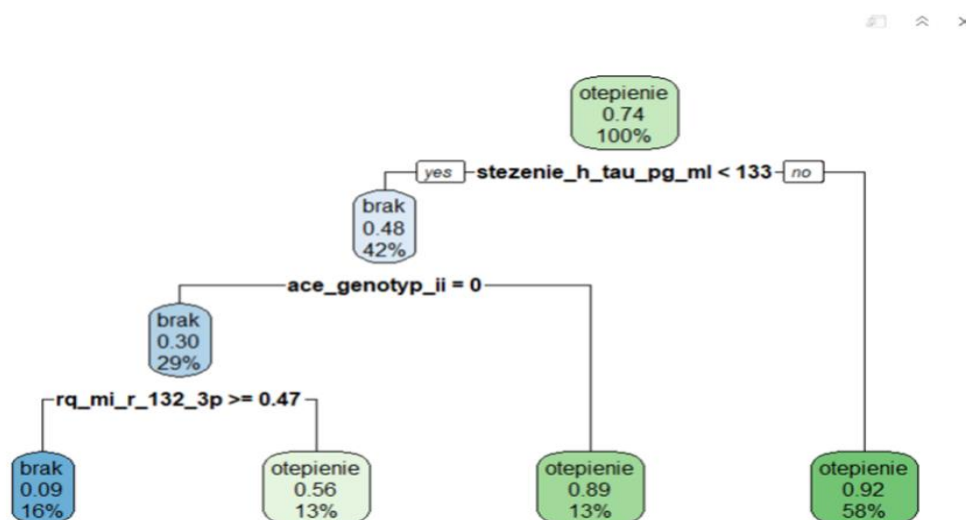
Tabela 20. Imputacja danych testowanych w ramach PMM cz.II



W ramach regresji logistycznej, wybrano następujące parametry do przetestowania możliwości predykcyjnych: poziom witaminy B₁₂, stężenie amyloidu Aβ₁₋₄₀, genotyp *APOE* ε3/3 oraz stężenie trójglicerydów. Model oceniono na podstawie czułości, specyficzności, wartości predykcyjnej dodatniej oraz wartości predykcyjnej ujemnej. Uzyskane wyniki w grupie testowej oraz treningowej wykazały znaczne różnice, które wykluczyły możliwości predykcyjne otępienia na podstawie tego modelu.

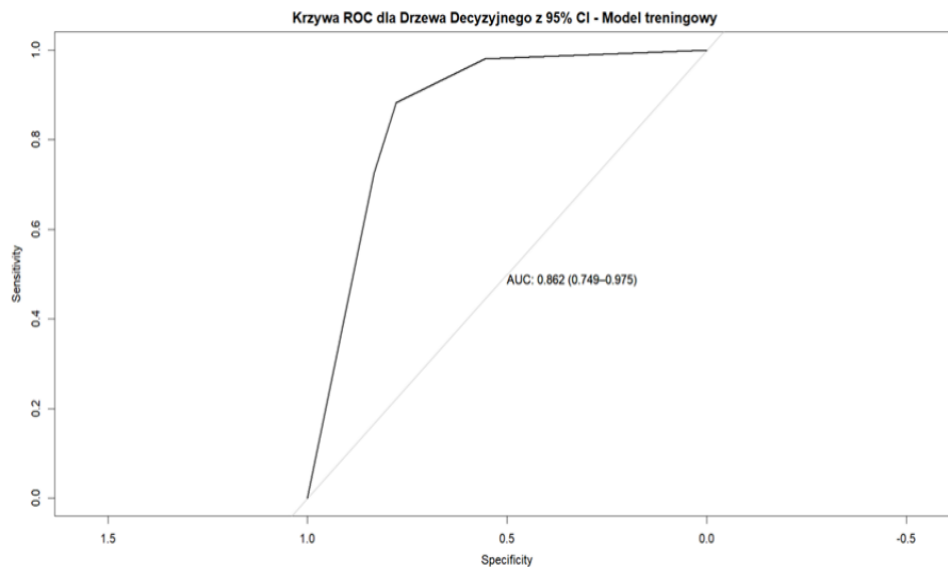
Podobnie przy zastosowaniu regresji LASSO metoda krokowa do testowania wybrała następujące parametry: genotyp *APOE* ε3/4, genotyp *ACE* w postaci homozygoty D/D oraz I/I, stężenia pTau, stężenia amyloidu Aβ₁₋₄₀, stosunku Aβ₁₋₄₂/ Aβ₁₋₄₀, poziomu witaminy B₁₂ oraz miRNA-146a-5p. Jednakże uzyskane wyniki wykluczyły ten model do przewidywania otępienia. Mimo, iż zarówno w modelu treningowym, jak też testowym uzyskano wysoką czułość na poziomie: odpowiednio 96 % oraz 100 %, pozostałe parametry tj. specyficzność (17% i 10%), PPV (76% i 68%) oraz NPV (60% oraz 100%), znacznie różnią się w grupie treningowej oraz testowej, co świadczy o prawdopodobnym przeuczeniu modelu i uniemożliwia wykorzystanie modelu regresji LASSO do predykcji otępienia.

Model drzewa decyzyjnego wykazał najlepsze możliwości predykcji otępienia na podstawie analizy zestawu cech. W ramach tego modelu do przetestowania wybrano następujące parametry: stężenie całkowitego białka Tau w zakresie $hTau < 133$ pg/ml, genotyp *ACE* w formie homozygoty insercyjnej I/I oraz ekspresję miRNA-132-3p na poziomie $RQ > 0,47$. Schemat modelu decyzyjnego przedstawia rycina nr 9.



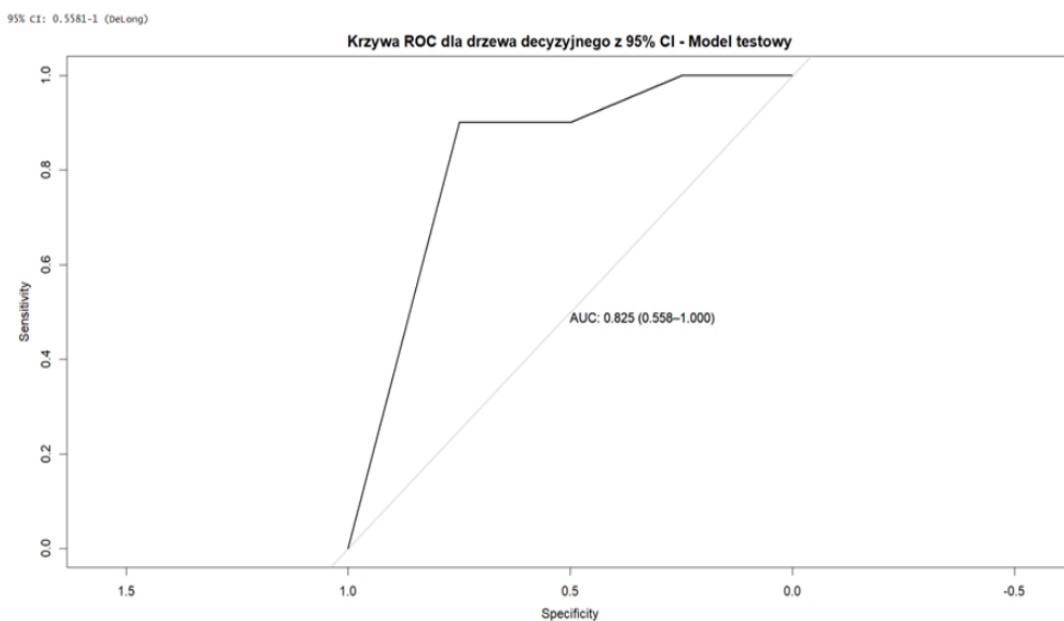
Rycina 9. Schemat drzewa decyzyjnego

W modelu treningowym uzyskano następujące wartości: czułość 78%, specyficzność 88%, PPV 70% oraz NPV 92%. Wartość pola pod krzywą ROC w modelu treningowym wyniosła $AUC = 0,86$ (95% CI: 0,75-0,97). Wykres nr 19 przedstawia krzywą ROC dla klasyfikatora otępienia w grupie treningowej.



Wykres 19. Krzywa ROC dla klasyfikatora otępienia w grupie treningowej

W modelu testowym uzyskano wartości: czułość na poziomie 75%, specyficzność 90%, PPV 75% oraz NPV 90%. Wartość pola pod krzywą w modelu testowym wynosi AUC= 0,82 (95% CI: 0,56-1,00), co przedstawia wykres nr 20.



Wykres 20. Krzywa ROC dla klasyfikatora otępienia w grupie testowej

Uzyskane wyniki zarówno w grupie treningowej i testowej są na podobnym poziomie, co czyni drzewo decyzyjne przydatnym modelem predykcyjnym choroby otępiennej. Według tego modelu, stężenie całkowitego białka Tau $hTau < 133$ pg/ml, brak obecności genotypu I/I w genie *ACE* oraz ekspresja *miRNA-132a-3p* $> 0,47$ RQ może wykluczyć otępienie u pacjentów.

5. DYSKUSJA

5.1. Czynniki ryzyka choroby Alzheimera

Choroba Alzheimera zależna jest od wielu czynników, które w znaczący sposób wpływają na poziom ryzyka zachorowania. Zmiana struktury wiekowej populacji na świecie, związana m.in. z rozwojem cywilizacyjnym, rozwojem medycyny oraz poprawą jakości życia powoduje, iż stajemy się społeczeństwem starzejącym. Niesie to za sobą negatywne konsekwencje związane z chorobami otępiennymi pojawiającymi się głównie w starszym wieku. Choroba Alzheimera, która stanowi 70% przypadków demencji na całym świecie, jest bardzo poważnym problemem wśród społeczeństw głównie w krajach wysoko rozwiniętych [5, 16].

Szczególnie istotnym i najczęściej opisywanym w literaturze czynnikiem ryzyka choroby Alzheimera jest wiek. Częstość zapadalności na AD jest najwyższa po 65 r.ż. Ta postać choroby nazywana jest sporadyczną postacią Alzheimera SAD lub o późnym początku LOAD. Obok wieku, czynnikiem wpływającym na ryzyko SAD jest polimorfizm w genie *APOE* oraz w genie *ACE* [128]. Niemniej jednak to wiek w głównej mierze wpływa na proces zwyrodnienia mózgu, gromadzenia się mutacji czy zmian epigenetycznych.

W prezentowanych w ramach niniejszej rozprawy badaniach, wiek różnicował grupę pacjentów ze względu na stopień zaawansowania choroby. Zgodnie z przewidywaniami, pacjenci z bardziej zaawansowanym otępieniem (AD II i III) byli najstarsi w badanej grupie. Analiza statystyczna wykazała istotną różnicę wieku pomiędzy pacjentami z MCI a pacjentami z chorobą Alzheimera w fazie średniej (AD II) oraz głębokiej (AD III). Wyniki były istotne statystycznie ($p=0,003$). Mediana wieku pacjentów w dniu pobrania wynosiła odpowiednio: w podgrupie MCI - 64 lata, natomiast AD II oraz AD III - 76 lat. Wyniki te pokazują, iż u osób młodszych częściej diagnozuje się łagodne zaburzenia poznawcze, natomiast otępienie alzheimerowskie w stadium zaawansowanym rozpoznawane jest u pacjentów w starszym wieku ok. 70 r.ż. Proces pogłębiania się zaburzeń poznawczych, zmian zwyrodnieniowych mózgu, odkładania amyloidu- β i zaniku połączeń synaptycznych ma charakter stopniowy i długotrwały. Okres między pojawieniem się pierwszych objawów otępiennych, zmian

klinicznych i zdiagnozowania choroby MCI, a wejściem w fazę otępienia głębokiego AD III, trwa najczęściej ponad 10 lat.

Liczni badacze zaobserwowali podobny rozkład wieku w swoich projektach. Zarówno w grupie Arabów Saudyjskich [129], jak i wśród społeczeństwa europejskiego, wykazano pozytywny związek zapadalności na AD z wiekiem [130]. Wyniki metaanalizy Gao i in. wskazują, że wzrost wskaźników zapadalności zarówno na AD i inne formy otępienia spowalnia wraz z wiekiem, chociaż same wskaźniki zapadalności nie ulegają zmniejszeniu. Zapadalność na demencję i chorobę Alzheimera zwiększa się trzykrotnie co 5 lat, aż do ukończenia 64. roku życia. Następnie podwajają się do 75. roku życia a po 85. roku życia tempo wzrostu maleje 1,5 krotnie [128].

Należy również pamiętać, iż AD jest chorobą wielogenową i może być wywołana dominującymi, autosomalnymi mutacjami w genach ściśle związanych z AD tj. *APP*, *PSEN1* i *PSEN2* odpowiedzialnych za rozwój rodzinnych przypadków AD (ang. familiar Alzheimer's disease-FAD) stanowiących ok. 5% wszystkich przypadków choroby. W tej formie choroba może pojawić się w młodym wieku, przed 60 r. ż. Badania retrospektywne prowadzone na uniwersyteckiej kohorcie 32 pacjentów z FAD związanym z genem *PSEN1* oraz 81 pacjentów z chorobą AD o wczesnych początkach EOAD, nie posiadających mutacji w genie *PSEN1*, wykazały, że pacjenci z FAD mieli wcześniejszy wiek zachorowania oraz dłuższy czas jej trwania w porównaniu z pacjentami z EOAD [131].

Podsumowując należy wyraźnie zaznaczyć, że zarówno demencja, jak i choroba Alzheimera są związane z wiekiem, ale to nie wiek jest przyczyną choroby. Źródła choroby należy dopatrywać się w samym procesie starzenia i zmianami biologicznymi jakie on niesie ze sobą. Jedną z ważnych i niebezpiecznych zmian w starszym wieku jest choroba naczyniowo-mózgowa, która może przyczynić się do rozwoju demencji [128]. Dodatkowo w procesie starzenia można zauważyć podwyższony proces autofagii w organizmie, na skutek zwiększania ilości upośledzonych organelli i białek [11]. Do licznych zjawisk patofizjologicznych towarzyszących procesowi starzenia należy wymienić również starzenie się neuronów, spadek całkowitej masy mózgowia, szczególnie istoty białej, zubożenie drzewa dendrytycznego i połączeń synaptycznych, redukcję liczby receptorów cholinergicznych, spadek aktywności acetylotransferazy cholinowej.

W starszym wieku dochodzą również choroby metaboliczne jak insulinooporność, czy hiperinsulinemia, prowadzące do stanów zapalnych w organizmie [132-135]. Choroby otępienne są więc niejako ceną za długowieczność, jaką społeczeństwo musi płacić w związku ze specyfiką procesu starzenia się organizmu. Źródeł choroby należy więc szukać w czynnikach biologicznych, związanych z procesem starzenia komórek oraz czynnikach psychospołecznych. Jedne i drugie wynikają z podeszłego wieku, zaprogramowanej śmierci komórek, wycofania społecznego, izolacji, lęku przed samotnością oraz niekiedy złymi nawykami odżywiania.

Podobnie jak wiek, płeć żeńska wymieniana jest jako ważny czynnik ryzyka rozwoju AD. Jest to ściśle powiązane z wiekiem, bo średni przewidywany okres przeżycia dla kobiet jest dłuższy niż dla mężczyzn. Związek między płcią a chorobą Alzheimera badano wielokrotnie, jednak wyniki tych badań są niespójne. W wielu badaniach wykazano, że kobiety mają wyższy wskaźnik zachorowania na AD niż mężczyźni, jednak istotne różnice między płciami zauważa się dopiero w najstarszych kategoriach wiekowych. Jest to związane z ogólnie przyjętym wyższym wskaźnikiem długości życia kobiet [128].

W niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano, że kobiety i mężczyźni stanowili zbliżoną, pod względem liczebności grupę badanych osób. Mężczyźni stanowili 53% badanych pacjentów, zaś kobiety 47%. Podobnie w grupie kontrolnej przewagę stanowią pacjenci płci męskiej. Dlatego mężczyźni dominowali liczebnie we wszystkich grupach, oprócz AD II. Należy przy tym podkreślić, że wszystkie podgrupy istotnie różniły się między sobą liczebnością. Na podstawie uzyskanych wyników, nie można potwierdzić hipotezy wskazującej wyższy wskaźnik choroby AD wśród płci żeńskiej. Z uwagi na fakt, iż liczne doniesienia naukowe wskazują płeć jako czynnik ryzyka AD, w swojej rozprawie odniosłam się do niektórych z nich, celem wyjaśnienia tej tezy.

Szacuję się, że dwie trzecie pacjentów z AD to kobiety, różnice te tłumaczy się przede wszystkim zaburzeniami hormonalnymi u kobiet w okresie menopauzy. Przed menopauzą poziom estrogenu staje się bardzo zmienny, te wahania przyczyniają się do zmian w szlakach metabolicznych, zapalnych i molekularnych [136]. Utrata hormonów jajnikowych w okresie perimenopauzy, przyczynia się do większego ryzyka zachorowania na AD. Również hormony gonadalne: hormon luteinizujący (LH)

i hormon folikulotropowy (FSH) mogą wpływać na produkcję androgenów/estrogenów i często są regulowane w tym samym kierunku. Wykazano, że FSH przyczynia się do patologicznych zmian prowadzących do choroby Alzheimera i upośledzenia funkcji poznawczych [136, 137]. Estrogen może obniżać poziom A β poprzez pobudzenie wytwarzania pęcherzyków zawierających prekursorowe białko amyloidu (APP) z sieci aparatu Golgiego, dostarczając w ten sposób APP do powierzchni komórek. W badaniach prowadzonych na modelach gryzoni estradiol zmniejszał hiperfosforylację białka Tau i zwiększał defosforylowane Tau [138].

Należy wziąć pod uwagę, iż w procesie starzenia występują różnice metaboliczne wynikające również z płci. Zaburzony metabolizm energetyczny, poprzedza upośledzenie funkcji poznawczych [139]. Różnice płciowe w funkcjonowaniu mitochondriów są regulowane przez estrogeny, które inicjują biogenezę mitochondriów, zwiększając oddychanie mitochondrialne w neuronach i komórkach glejowych. Dysfunkcja mitochondriów może być więc czynnikiem choroby [140]. Wyższy metabolizm w mózgu kobiet zapewnia wczesną oporność na chorobę AD [141]. Prowadzone są również liczne badania genetyczne nad szlakami związanymi z genami specyficznymi tylko dla kobiet, które mogłyby odgrywać ważną rolę w przebiegu AD. W submetaanalizie badającej geny specyficzne, mające wpływ na rozwój AD u kobiet i mężczyzn, Moradifard i in. wykazał, iż 1210 genów jest specyficznych tylko dla mężczyzn, natomiast 1640 tylko dla kobiet. Geny specyficzne dla kobiet są związane z chorobami neurodegeneracyjnymi, takimi jak choroba Alzheimera, choroba Huntingtona oraz choroba Parkinsona [14]. Ostatnie badania wskazują, iż *APOE- ϵ 4* będąc czynnikiem ryzyka w AD, jest związany z płcią. Białko ApoE odpowiada za redystrybucję lipidów między komórkami mózgu, modulując tym samym homeostazę cholesterolu, który jest głównym źródłem lipidów w mózgu. Szacuje się, że w mózgu występuje do 25% całkowitego cholesterolu w organizmie [142]. Gen *APOE* jest regulowany estrogenem, progesteronem i testosteronem. Estrogen zwiększając ekspresję i syntezę ApoE w mózgu, jest podstawą różnic płciowych w neurodegeneracji. *APOE* wzmacnia więc neuroprotekcyjne działanie estrogenów i androgenów. Estradiol powodując wzrost poziomu ApoE przyczynia się do rozwoju wypustek nerwowych oraz dojrzewanie neuronów i synaptogenezę w hodowanych neuronach kory mózgowej myszy [143].

5.2. Choroby współistniejące wśród pacjentów z otępieniem

Choroba otępienna typu alzheimerowskiego najczęściej związana z podeszłym wiekiem, nie stanowi jedynego problemu zdrowotnego osób starszych. Wiele badań naukowych poświęcono analizie zależności choroby Alzheimera od chorób współistniejących. W niniejszej rozprawie, uzyskane podczas rutynowej diagnostyki wyniki badań klinicznych, zostały poddane analizie statystycznej. Celem analizy było określenie związku pomiędzy stopniem zaawansowania AD a chorobami somatycznymi tj. cukrzyca, miażdżyca, choroba niedokrwienna serca, astma, niedoczynność tarczycy i hiperlipidemia oraz depresja. Przeanalizowano również parametry biochemiczne z krwi obwodowej, które mogłyby wpływać na przebieg choroby otępiennej. Parametrami biochemicznymi, które zostały poddane analizie statystycznej są: cholesterol całkowity oraz jego frakcje: HDL, LDL, trójglicerydy oraz poziom witaminy B₁₂. Wykonane analizy statystyczne nie wykazały różnic w częstotliwości występowania chorób współistniejących pomiędzy pacjentami z różnym stopniem zaawansowania choroby otępiennej. Jedynym parametrem biochemicznym, którego poziom istotnie różnił się między grupą pacjentów z otępieniem a grupą kontrolną, był poziom witaminy B₁₂. Analiza wykazała, iż pacjenci w zaawansowanym stadium choroby, często wykazują niedobór witaminy B₁₂. W grupie pacjentów z AD III, wykazano najniższy poziom witaminy B₁₂ w porównaniu z pacjentami o łagodnych zaburzeniach poznawczych MCI ($p=0,006$) oraz pacjentami z grupy kontrolnej K ($p=0,006$). Uzyskane w niniejszej pracy wyniki są spójne z wieloma badaniami naukowymi. Liczne prace naukowe wykazały bowiem obniżone stężenie witaminy B₁₂ u pacjentów z AD. Niskie stężenie witaminy korelowało z większym ryzykiem rozwoju AD.

Witamina B₁₂ jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania neuronów i hematopoezy, wykazuje też działanie antyoksydacyjne. Kliniczny niedobór witaminy B₁₂ prowadzi do mielinopatii, niedokrwistości megaloblastycznej oraz stanów zapalnych wywołujących stres oksydacyjny [144]. Obecnie wiadomo, że neurozapalenie odgrywa istotną rolę w rozwoju AD. Wzrost produkcji interleukiny-6 (IL-6) indukuje hiperfosforylację białka Tau. Natomiast nadmiar TNF- α zwiększa produkcję i aktywność β -sekreazy i γ -sekreazy, prowadząc do nadprodukcji

β -amyloidu [142]. Niedobór witaminy B₁₂ występuje rzadko w krajach rozwiniętych, jest ściśle związany z wiekiem. Może występować u 10-15% osób po 60. r.ż. oraz 25-30% osób po 80. r.ż [144]. Badania prowadzone na myszach transgenicznym potwierdziły wpływ diety ubogiej w witaminę B₁₂ na zwiększenie odkładanie się β -amyloidu w hipokampie oraz korze mózgowej [145]. Alam i in., za pomocą testu fluorescencji, wykazali, że witamina B₁₂ hamuje agregację A β ₄₂. Ponadto witamina ta zmniejszała hydrofobowość włókienek A β , a także wielkość agregatów [146]. Liczne badania randomizowane na grupie pacjentów z otępieniem, wykazują skuteczność suplementacji witaminy B₁₂ w zapobieganiu pogorszeniu funkcji poznawczych u osób z MCI oraz AD [147-150]. Oprócz badań nad rolą witaminy B₁₂ u pacjentów z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi, liczne badania kliniczne wykazały, że pacjenci z chorobą Alzheimera mają niższe poziomy witaminy B₁₂ w osoczu niż osoby zdrowe. W tym przypadku dodatkowym czynnikiem związanym z obniżonym poziomem witaminy B₁₂ był wiek pacjentów [151].

Mimo, że w niniejszej rozprawie doktorskiej wpływ pozostałych parametrów biochemicznych na AD nie został wykazany, to liczne badania naukowe potwierdzają silny związek poziomu cholesterolu z rozwojem otępienia. Jest to mocno powiązane z białkiem lipoproteiny (ApoE). Pochodzący z gleju ApoE jest podstawowym transporterem cholesterolu w mózgu. ApoE usuwa cholesterol z komórek nerwowych i generuje cząsteczki lipoprotein o dużej gęstości (HDL), oraz reguluje usuwanie A β z mózgu. Izoforma ApoE4 jest jednak najmniej skutecznym spośród wszystkich apolipoprotein w wychwytywaniu cząstek lipoprotein i prawidłowym transporcie białek błonowych. Zatem allel ϵ 4 genu *APOE* ściśle związany z hipercholesterolemią, jest istotnym czynnikiem ryzyka choroby Alzheimera w późnym wieku. Zarówno badania pośmiertne mózgów osób z AD oraz badania na hodowli komórkowej wykazują wpływ cholesterolu na produkcję oraz odkładanie się A β w mózgu. Duże stężenie cholesterolu w surowicy u osób starszych, zwiększa ryzyko choroby AD [152-154]. Biorąc pod uwagę fakt, iż allel ϵ 4 genu *APOE* wpływa na metabolizm cholesterolu, powodując zmiany zwyrodnieniowe mózgu poprzez odkładanie A β , hipercholesterolemia również jest ważnym czynnikiem ryzyka AD.

Wymieniając choroby współistniejące związane z chorobą otępienną typu alzheimerowskiego, nie sposób pominąć jedną z najważniejszych chorób

metabolicznych XXI wieku, jaką jest cukrzyca. Analizy wykonane w ramach tej pracy nie wykazały istotnych statystycznie zależności AD od cukrzycy, co może być związane z różnicami w liczebności badanych podgrup oraz braku badań w tym kierunku u części osób. Aby rozszerzyć wnioski z badania na całą populację, należałoby zwiększyć liczebność przebadanej grupy oraz wykonać badania w tym kierunku u wszystkich osób.

Niemniej jednak, liczne doniesienia naukowe wskazują cukrzycę jako ważny czynnik ryzyka choroby otępiennej. Cukrzyca jest najczęstszą chorobą metaboliczną, związaną z wadliwym działaniem insuliny lub niewystarczającym jej wydzielaniu. Niektóre przypadki kliniczne sugerują, że łagodne upośledzenia funkcji poznawczych związane ze zmianami w mózgu osób chorujących na cukrzycę, w przyszłości mogą prowadzić do choroby Alzheimera [155]. Mechanistycznie cukrzyca jest związana z AD, gdyż wytworzenie blaszek A β z prekursorowego białka amyloidu (APP), wymaga udziału β -sekreazy, która reguluje również rozszczepienie receptora insuliny. Dodatkowo związek cukrzycy z AD jest silniejszy poprzez rozpuszczalny (s)APP β , który jest produktem β -sekreazy i równocześnie głównym czynnikiem determinującym insulinooporność. Toksyczne działanie glukozy prowadzi do uszkodzenia struktury i funkcji neuronów oraz nadmierną akumulacją złogów β -amyloidu. Są to potencjalne czynniki ryzyka demencji związanej z cukrzycą [156]. Insulinooporność w mózgu często nazywana jest cukrzycą typu 3. Naukowcy definiują ją jako zespół metaboliczny, który prowadzi do insulinooporności w mózgu, czego konsekwencją jest upośledzenie funkcji insuliny, gromadzenie neurotoksyn, stres oksydacyjny, stany zapalne, powodujące upośledzenie funkcji poznawczych z neurodegeneracją mózgu łącznie [156, 157].

Farris i in. prowadząc badania na modelu szczurzym wykazał, że enzym degradujący insulinę (ang. insulin-degrading enzyme- IDE) reguluje poziom białka A β i białka prekursorowego amyloidu (APP). Dlatego mutacja w genie kodującym ten enzym prowadzi do hiperinsulinemii i insulinooporności w mózgu. W przypadku insulinooporności mózgu insulina nie stymuluje usuwania A β , czego konsekwencją jest gromadzenie się A β wewnątrz neuronów, powodując neurodegenerację lub utratę neuronów [158]. Kilka grup naukowców skupiło się na badaniu i wyjaśnianiu związku między cukrzycą i AD. Na podstawie anatomii mózgu szczurów cukrzycowych,

wykazano podobieństwa jego patologii, do mózgow z zmianami w AD. Głównie dotyczyło to parametrów tj. zwiększony poziom blaszek A β w hipokampie i korze czołowej, zmniejszona objętość hipokampu i obniżona gęstość kolców dendrytycznych u zwierząt cukrzycowych. Długoterminowe badania Ronemma i in. wykazały związek między wydzielaniem insuliny w średnim wieku, metabolizmem glukozy i późniejszym rozwojem demencji. Badanie to przeprowadzono w Uppsala Longitudinal Study of Adult Men na 2322 uczestnikach w wieku 50 lat. Początkowo przy użyciu testu tolerancji glukozy dożylniej i wskaźnika oporności na insulinę, określano ostrą odpowiedź insulinową i tolerancję glukozy. Obserwacja trwająca 32 lata wykazała rozwój choroby Alzheimera u 102 uczestników badania, otępienie naczyniowe u 57 pacjentów, natomiast u 394 inne otępienia. Badania te pozwalają stwierdzić, iż upośledzona odporność insulinowa zwiększa ryzyko zachorowania na AD nawet o 35 lat, co może być związkiem przyczynowo- skutkowym pomiędzy metabolizmem insuliny a patogenezą AD [159].

Aby móc wnioskować o populacji generalnej na podstawie próby badanej, należałoby wykonać badania długofalowe na tych samych osobach. Pozwoliłyby one zrozumieć w jaki sposób poziom poszczególnych parametrów oraz pojawienie się i rozwój pewnych chorób współistniejących wpływa na rozwój choroby otępiennej. Dodatkowo ważny jest dokładny wywiad związany z dietą, aktywnością, sposobem życia oraz stosowanymi lekami i używkami. Są to bardzo ważne czynniki, które mogą potęgować lub redukować ryzyko tych wszystkich chorób.

5.3. Ryzyka i szanse związane z polimorfizmem w genie *APOE*

Hipoteza według, której choroba Alzheimera a zwłaszcza jej sporadyczna postać (SAD), uzależniona jest od metabolizmu cholesterolu, wiąże polimorfizm w genie *APOE* z genetyczną predyspozycją do choroby. Polimorfizm ten wpływa na produkcję i agregację amyloidu, a w konsekwencji uszkodzenie naczyń. Gen *APOE*, zlokalizowany na 19. chromosomie, charakteryzuje się polimorficznością i koduje białko apolipoproteiny E (ApoE). Białko to odpowiada za prawidłowy katabolizm składników lipoprotein bogatych w trójglicerydy. Mutacje w tym genie powodują

rodzinną dysbetalipoproteinemię lub hiperlipoproteinemię. Badania wykazały, że genotypowanie *APOE* pozwala na bardziej precyzyjną diagnozę AD dzięki zwiększonej swoistości klinicznej. Istnieją 3 wspólne allele (ϵ 2, ϵ 3 i ϵ 4), które tworzą 6 genotypów (ϵ 2/2, ϵ 2/3, ϵ 2/4, ϵ 3/3, ϵ 3/4 i ϵ 4/4). Badania epidemiologiczne jednoznacznie wskazują, że allel ϵ 3 genu *APOE* występuje najczęściej i stanowi 70–80% puli genów a genotyp homozygotyczny ϵ 3/3 występuje u 50-70% populacji. Rzadziej występują allele ϵ 2 i ϵ 4 odpowiednio 5–10% i 10–15% [160-163].

Analiza statystyczna przeprowadzona w ramach niniejszej pracy, również wykazała, że allel ϵ 3 jest najczęściej występującą formą polimorficzną genu *APOE* w badanej grupie. Wśród wszystkich badanych osób, zarówno ze stwierdzonym otępieniem, jak też u osób zdrowych, homozygota ϵ 3/ ϵ 3 jest najczęściej występującym genotypem. Kolejnym często występującym genotypem wśród osób z otępieniem, jest heterozygota ϵ 3/ ϵ 4. Genotyp ϵ 3/ ϵ 4 może zwiększać prawdopodobieństwo zachorowania na AD, gdyż zawiera allel wysokiego ryzyka w postaci ϵ 4, dlatego jest częstym allelem wśród grup pacjentów z otępieniem. Genotyp ϵ 2/ ϵ 3 również występuje we wszystkich grupach pacjentów z otępieniem tj. AD I, AD II, AD III. Wyniki te wskazują, iż Apo-E3 jest najczęściej występującą izoformą białka apolipoproteiny-E w grupie badanej. Izoforma Apo-E2, która wg danych literaturowych może pełnić funkcję protekcyjną w AD, występuje tylko w grupie kontrolnej osób bez otępienia oraz MCI w postaci genotypu homozygotycznego ϵ 2/ ϵ 2. W grupach ze stwierdzonym otępieniem typu alzheimerowskiego w różnych stadiach nie wykazano obecności tego typu polimorfizmu. Genotyp ϵ 4/ ϵ 4, kodujący izoformę Apo-E4 zwiększa predyspozycje zachorowania, co potwierdziły uzyskane wyniki analizy w niniejszej pracy. Występuje on najliczniej w grupach osób ze stwierdzonym otępieniem typu alzheimerowskiego (AD I oraz AD II). Polimorfizm ten można również zauważyć w grupie kontrolnej osób zdrowych, lecz w niewielkim odsetku. Należy podkreślić, że obecność allelu *APOE4* sama w sobie nie przesądza o wystąpieniu choroby, a jedynie zwiększa predyspozycje do jej rozwoju.

Częstość występowania poszczególnych alleli w genie *APOE* wśród populacji nie jest taka sama, różni się u osób rasy białej oraz czarnej. Zmiany występują również na poziomie etnicznym. Metaanaliza Ward i in. wykazała, że wśród osób rasy białej allel ϵ 4 w formie heterozygoty występuje z częstotliwością OR=48,7 (95% CI: 46,5–51,0),

natomiast homozygoty $\epsilon 4/4$ z częstotliwością $OR=9,6$ (95% CI: 8,4–10,8.). W ramach niniejszej metaanalizy wykazano również, że w populacji Europy Północnej częstotliwość ta jest najwyższa i wynosi $OR=61,3$ (95% CI: 55,9–66,7) dla heterozygot $\epsilon 4$, natomiast dla homozygoty $\epsilon 4/4$ wynosi $OR=14,1$ (95% CI: 12,2–16,0). Populacje zamieszkujące region śródziemnomorski (Francja i Włochy) oraz Azję wykazują niższą częstotliwość allelu $\epsilon 4$ oraz większą heterogeniczność genotypów [164].

Farrer i in. badając wpływ polimorfizmu *APOE* na ryzyko choroby Alzheimera wśród osób rasy białej wykazał, że osoby z przynajmniej jednym allelem $\epsilon 4$ wykazują wyższe ryzyko AD. Związek ten u osób o genotypach $\epsilon 2/4$ wynosił $OR=2,6$ (95% CI=1,6–4,0), w przypadku genotypu $\epsilon 3/4$ ryzyko zwiększa się i wynosi $OR=3,2$ (95% CI=2,8–3,8). Największe ryzyko związane jest z homozygotą $\epsilon 4/4$ i wynosi $OR=14,9$ (95% CI= 10,8–20,6) [165]. Podobne wyniki uzyskał Pontifex i in. badając rolę predykcyjną allelu $\epsilon 4$ wykazał, że osoby o genotypie $\epsilon 3/4$ mają 3-4 krotnie większe ryzyko zachorowania, natomiast homozygoty $\epsilon 4/4$ prawie 12 krotnie [166]. Według analizy Farrer i in., osoby o genotypach $\epsilon 2/2$ wykazywały najniższy iloraz szans $OR=0,6$ (95% CI=0,2–2,0), podobnie jak heterozygoty $\epsilon 2/3$ $OR=0,6$ (95% CI=0,5–0,8). Wykazał on również, że związek *APOE4* z zapadalnością na AD był słabszy wśród Afroamerykanów i Latynosów, w porównaniu z rasą białą. W swoich badaniach, wskazał też na znaczną heterogeniczność wśród genotypów, gdzie homozygoty występowały u nich znacznie rzadziej niż u pacjentów rasy białej [165]. Podobne wyniki w swojej metaanalizie z 2021 r. uzyskał Qin i in., wykazując, że allel $\epsilon 4$ genu *APOE* był znacznie słabszym czynnikiem ryzyka AD u osób czarnoskórych w porównaniu z pacjentami rasy białej [167].

Zupełnie inaczej wyglądał rozkład związku *APOE4* z ryzykiem choroby, wśród mieszkańców pochodzenia japońskiego. Tam wpływ allelu $\epsilon 4$ był silniejszy nawet od rasy białej i wynosił: dla genotypu $\epsilon 3/4$ $OR=5,6$ (95% CI=3,9-8,0), dla $\epsilon 4/4$ $OR=33,1$ (95% CI=13,6-80,5). Natomiast genotyp $\epsilon 2/2$ w tej populacji wykazywał wpływ ochronny. Ponadto odkryli oni, że efekt *APOE4* widoczny jest w wieku od 40 do 90 lat, ale po 70. roku życia zmniejsza się, a ryzyko wystąpienia choroby Alzheimera związane z danym genotypem różni się również w zależności od płci [165].

Allel $\epsilon 4$ jest czynnikiem ryzyka AD także wśród populacji indyjskiej, w której genotypy *APOE* $\epsilon 2/4$, $\epsilon 3/4$ i $\epsilon 4/4$ występują z częstotliwością OR = 3,93 (95% CI: 1,60–9,68); OR = 4,18 (95% CI: 2,54–6,87); OR = 4,81 (95% CI: 1,95–11,86) odpowiednio. Natomiast pojedynczy allel $\epsilon 4$ bez podziału na konkretne genotypy, wykazywał ryzyko szans na poziomie OR = 5,90 (95% CI: 3,44–10,13). Genotypy *APOE* $\epsilon 2/3$, $\epsilon 3/3$ (OR = 0,52, 95% CI: 0,32–0,83; OR = 0,28, 95% CI: 0,19–0,42) okazały się mało istotnymi czynnikami predykcyjnymi dla choroby Alzheimera. Genotypy *APOE* $\epsilon 2/2$ i posiadający pojedynczy allel $\epsilon 2$ nie różniły się między pacjentami AD oraz osobami zdrowymi bez objawów otępiennych. Wyniki te sugerują, że wszystkie genotypy z allelem *APOE* $\epsilon 4$, tj. $\epsilon 2/4$, $\epsilon 3/4$ i $\epsilon 4/4$, są powiązane ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia choroby Alzheimera, podczas gdy genotypy *APOE* $\epsilon 2/2$, $\epsilon 2/3$ i $\epsilon 3/3$ działają ochronnie przed chorobą lub nie mają na nią wpływu [168].

Genotyp *APOE4* jest również związany z innymi procesami w organizmie. Nowe badania naukowe wskazują na związek tego genotypu z zaburzeniami w mikrobiomie. Okazało się, że utrata bakterii produkujących maślan i krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe u nosicieli *APOE4* może wpływać na neuropatologię [169]. Ponadto długowieczność została również powiązana z obecnością allelu $\epsilon 4$ w genie *APOE*. Odpowiada on za zwiększone ryzyko śmierci i ogranicza szanse na długowieczność. Badania wykazały, że nosiciele genotypu $\epsilon 2/2$ lub $\epsilon 2/3$, mogą cieszyć się większym prawdopodobieństwem osiągnięcia długowieczności, przy jednoczesnym zmniejszonym ryzyku zgonu. Najpopularniejszy genotyp $\epsilon 3/3$ nie wykazuje żadnego wpływu na długowieczność [170].

Przeprowadzona analiza statystyczna grupy badanej oraz liczne opublikowane badania naukowe wyraźnie wskazują, iż obecność konkretnego allelu *APOE* determinuje rozwój choroby lub działa protekcyjnie. Obecność przynajmniej jednego allelu $\epsilon 4$ w genie *APOE* może zwiększyć ryzyko zachorowania na chorobę otępienną, podczas gdy allel $\epsilon 2$ chroni przed neurodegeneracją.

5.4. Ryzyka i szanse związane z polimorfizmem w genie *ACE*

Wiele badań naukowych potwierdza hipotezę, według której cynkowa metaloproteaza ACE odgrywa ważną rolę w patogenezie choroby Alzheimera. Enzym konwertujący angiotensynę (*ACE*) jest ważnym składnikiem układu renina-angiotensyna (RAS), który promuje przekształcenie angiotensyny I (Ang I) w angiotensynę II (Ang II). Ponadto ACE promuje odkładanie się A β w mózgu oraz apoptozę neuronów. Poziom i aktywność ACE zależą od polimorfizmu insercyjno/delecyjnego w genie *ACE* [171]. Najczęstszym polimorfizmem *ACE* jest rs1799752, wariant insercyjno/delecyjny złożony z 287 pz w intronie 16. Około 50% przypadków zmiany poziomu ACE w osoczu zależą właśnie od tego polimorfizmu [172].

Ze względu na znaczącą rolę polimorfizmu insercyjno/delecyjnego genu *ACE*, w niniejszej pracy oceniono częstość występowania poszczególnych genotypów. Analizę wykonano zarówno wśród osób zdrowych z grupy kontrolnej (n= 27) oraz wśród pacjentów (n=70) ze stwierdzonym otępieniem na różnych etapach zaawansowania. Analiza polimorfizmu wykazała, że najczęściej występującym genotypem *ACE* jest heterozygota I/D zarówno w grupie osób zdrowych, jak też pacjentów z otępieniem. Obecność przynajmniej jednego allelu I stwierdzono najliczniej w grupie pacjentów z MCI oraz AD. Homozygota insercyjna I/I najczęściej występowała w grupie pacjentów z AD I. Wyniki te potwierdzają liczne doniesienia naukowe o wpływie polimorfizmu insercyjnego I w genie *ACE* na rozwój choroby AD. Homozygota delecyjna D/D, która zmniejsza ryzyko AD była najrzadziej występującym genotypem w analizowanej w ramach tej rozprawy grupie pacjentów z MCI oraz AD. Często zaś występowała w grupie osób zdrowych. Jednak to heterozygota I/D była najczęściej występującym genotypem w grupie kontrolnej, oraz wśród pacjentów z otępieniem. Podobne wyniki uzyskano w modelu predykcyjnym, wg którego genotyp I/I w genie *ACE* stanowi czynnik obciążający podczas diagnostyki pacjentów.

Wyniki te pokrywają się z badaniami zawartymi w metaanalizie Xin i in. badającymi związek polimorfizmem rs1799752 *ACE* z ryzykiem wystąpienia AD. W tym celu zastosowano model addytywny (II vs. ID , II vs. DD, II vs. ID + DD). Analiza wykazała, że obecność przynajmniej jednego allelu insercyjnego I wiązała się

ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia AD w porównaniu z allelem D, ze współczynnikiem szans $OR=1,15$ (95% CI = 1,028–1,295, $p = 0,015$, FDR = 0,020). Natomiast porównując genotypy homozygotyczne, to homozygota I/I wykazywała większą podatność na rozwój AD niż homozygota D/D $OR = 1,308$ (95% CI = 1,120–1,528, $p = 0,001$, FDR = 0,003) [173]. Z kolei badania prowadzone na japońskiej grupie pacjentów z AD wykazały, że częstotliwość występowania polimorfizmu insercyjnego w genie *ACE* w postaci homozygoty I/I była 1,4 razy wyższa wśród chorych niż w grupie kontrolnej. Częstość genotypu D/D była tylko 0,4 razy wyższa [54, 174].

Metaanaliza Lehmann'a i in. (2005) nie wykazała wpływu homozygoty I/I na ryzyko AD. Została ona przeprowadzona na 6037 pacjentach ze zdiagnozowaną chorobą Alzheimera i 12099 osobach zdrowych, kontrolnych. Celem badań było określenie interakcji z płcią, wiekiem, grupą etniczną i obecnością ApoE4. Na podstawie badań wykazano, że homozygoty D/D miały najniższy współczynnik szans choroby Alzheimera $OR = 0,81$ (95% CI= 0,72-0,90; $p = 0,0004$). Natomiast zwiększone ryzyko zachorowania na AD wykazywały heterozygoty I/D. Homozygoty I/I nie wykazały związku z chorobą. Pomimo istotnych różnic etnicznych między badanymi grupami (północni Europejczycy, południowi Kaukazi i Azjaci wschodni), homozygoty D/D były czynnikiem zmniejszającym ryzyko choroby niezależnie od grupy etnicznej [52].

Elkins i in. w swoich badaniach również wykazał, iż allel I w *ACE* zwiększa ryzyko późnego występowania AD (SAD), w porównaniu z grupą homozygot D/D. Współczynnik szans AD u osób z allelem I w porównaniu z osobami o genotypie D/D wynosił $OR=1,27$ (95% CI, 1,10 - 1,47; $p < 0,001$). Dodatkowo wykazali, że Azjaci posiadający allel insercyjny mają wyższe ryzyko wystąpienia choroby Alzheimera w porównaniu z rasą białą ($OR=2,44$; 95% CI= 1,68-3,53 v $OR= 1,18$; 95% CI=1,02 - 1,37). Wykazali oni również, że obok allelu I w *ACE*, dodatkowym czynnikiem zwiększającym ryzyko AD jest wiek. Iloraz szans dla młodszych pacjentów (65-74 lata) wynosił $OR=1,54$ (95% CI, 1,23-1,93) natomiast dla starszych $OR= 1,13$ (95% CI, 0,95 - 1,35) ($p = 0,03$) [175]. Analiza genotypów i rozkładu alleli w *ACE* przeprowadzona na grupie włoskich pacjentów ze sporadyczną chorobą Alzheimera (SAD), rodzinną postacią AD (FAD) oraz grupą kontrolną, nie wykazała istotnych różnic w genotypach oraz częstości poszczególnych alleli w genie *ACE* w badanych grupach. We wszystkich

grupach najczęściej występującym allelem był allel delecyjny D. W badaniu tym wykazano więc, że wariant alleliczny w *ACE* nie jest czynnikiem podatności na SAD ani FAD. W swoich badaniach dokonali również analizy korelacji genotypu *ACE* z allelem $\epsilon 4$ w genie *APOE*. Wykazali, że allel delecyjny D w genie *ACE* nie łagodził wpływu *APOE4*, który jest potwierdzonym czynnikiem ryzyka AD [176].

Odmienne wyniki uzyskano badając grupę pacjentów z Tajwanu, gdzie genotypem predysponującym do AD jest homozygota D/D. Współczynnik szans dla D/D oraz I/D wynosił $OR = 4,29$ (95% CI; 1,96-10,23) oraz $OR=1,90$ (1,35-2,70), odpowiednio [51, 177].

Dodatkowych informacji o wpływie polimorfizmu *ACE* dostarczyły badania *post mortem* mózgów pacjentów z chorobą Alzheimera. Wykazały one, że genotyp I/I wpływa na zmniejszenie objętości hipokampu i ciała migdałowatego oraz zwiększa tendencję do odkładania się $A\beta_{42}$, w porównaniu z genotypem D/D. Częstość występowania genotypu *ACE* zwiększającego ryzyko AD maleje wraz z wiekiem [178]. Badania *in vitro* wykazały, że *ACE* ma zdolność degradacji syntetycznego $A\beta_{1-40}$ między wiązaniem Asp 7 -Ser 8, wynikiem czego jest skrócony peptyd, złożony z 33 reszt, który wykazuje zmniejszoną agregację i obniżony potencjał cytotoksyczny [54].

Ciekawe wyniki przedstawiono w badaniach nad lekiem kaptopril, który hamuje aktywność ACE. Inhibitor ten przyczynia się do zwiększenia gromadzenia komórkowego $A\beta$, blokując aktywność enzymu konwertującego angiotensynę. Komórki leczone kaptoprilem mogą gromadzić prawie 2-krotnie więcej $A\beta$ niż komórki nieleczone, nawet najniższa testowana dawka kaptoprilu $0,1 \mu m$, podwyższyła 1,5-krotnie stężenie $A\beta$ w komórkach [179].

Częstość występowania poszczególnych genotypów w grupie badanej w ramach rozprawy, jest zgodna z wynikami licznych badań naukowych. Najczęściej występującym genotypem wśród przebadanej grupy pacjentów jest forma heterozygotyczna. Wiele badań naukowych dotyczących wpływu polimorfizmu insercyjno/delecyjnego w genie *ACE* na AD, udowadnia, że obecność insercji w genie *ACE* zwiększa ryzyko rozwoju choroby Alzheimera. U osób z pełnoobjawową, zaawansowaną fazą AD, najczęściej występują genotypy posiadające przynajmniej jeden allel insercyjnej I, który zwiększa ryzyko choroby.

5.5. Zmiany poziomu ekspresji miRNA-146a-5p związane ze stopniem rozwoju otępienia

Kolejnym etapem badań w ramach niniejszej pracy była analiza poziomu miRNA-146a-5p w surowicy pacjentów z otępieniem oraz grupy kontrolnej bez otępienia. Analiza została przeprowadzona w trzech podgrupach tj. osoby z łagodnym upośledzeniem poznawczym MCI, pacjenci z otępieniem alzheimerowskim oraz trzecia grupa kontrolna składająca się z osób zdrowych. Poziom ekspresji badanego miRNA w surowicy pacjentów przedstawiono jako wartości RQ (ang. relative quantification) przeprowadzonych reakcji qPCR. Wykonane analizy nie wykazały istotnych statystycznie różnic pomiędzy ekspresją miRNA w badanych podgrupach. Należy pamiętać, iż na ekspresję miRNA mogą wpływać inne choroby współwystępujące z chorobą otępienną. Ponadto, jeden gen związany z AD np. *APP*, *BACE*, *PSEN1* czy *PSEN2* może być regulowany nie tylko przez miRNA-146a-5p, ale też przez wiele innych miRNA. Należałoby więc zbadać ekspresję wszystkich miRNA modulujących aktywność konkretnego genu związanego z AD. Dodatkowym problemem, z którym należałoby się zmierzyć, jest brak danych dotyczących poziomu miRNA-146a-5p u danego pacjenta na długo przed pojawieniem się objawów, co umożliwiłoby porównanie poziomu jego ekspresji i określenie kierunku zmian. Z powodu zmienności osobniczej oraz czynników epigenetycznych związanych z nawykami żywieniowymi, przyjmowanymi lekami oraz używkami, bardzo pomocne mogłyby być badania długofalowe tych samych osób. Pokazałyby one przy jakim poziomie ekspresji miRNA-146a-5p dochodzi do zmian neurodegeneracyjnych, poznawczych i behawioralnych oraz przypisać konkretny poziom miRNA do konkretnego stadium choroby AD. Należy również zaznaczyć, iż na wynik badań określających poziom ekspresji miRNA może mieć wpływ postępowanie przedanalizacyjne związane z pobraniem oraz przygotowaniem surowicy do badania molekularnego. Ważnym czynnikiem wpływającym na wyniki badań jest też liczebność próby badanej. Im liczniejsza grupa badana, tym większe prawdopodobieństwo uzyskania wartości, które odzwierciedlają wynik dla całej populacji. Brak istotnej statystycznie różnicy w ekspresji miRNA-146a pomiędzy poszczególnymi podgrupami, nie wyklucza jego możliwej roli w przebiegu choroby AD. Wyniki wielu badań naukowych jednoznacznie wskazują wpływ cząsteczki miRNA-146a-5p na chorobę otępienną.

Wiele grup naukowych podjęło się analizy zmian w ekspresji miRNA-146a-5p oraz funkcji jaką pełni w komórkach. Jak do tej pory najwięcej badań skupiło się na aktywności miRNA-146a związanej z dysfunkcją wrodzonej odpowiedzi immunologicznej oraz wzmocnieniem odpowiedzi zapalnej. Ta cząsteczka miRNA hamując produkcję cytokin prozapalnych, moduluje intensywność odpowiedzi zapalnej [180]. Wykazano, że NF- κ B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) jako czynnik regulujący odpowiedź immunologiczną, zapalną, apoptozę komórkową i proliferację komórek, wyraźnie steruje poziomem ekspresji miRNA-146a. Gen miRNA-146a jest ściśle związany z NF- κ B, dlatego jego aktywacja wykazuje dodatnią korelację z poziomem NF- κ B. Biorąc pod uwagę fakt, iż choroby neurodegeneracyjne w tym AD, są stanem neurodegeneracji zapalnej, cząsteczka miRNA-146a odgrywa bardzo ważną rolę w tej chorobie [181-183]. Jest ona szczególnie liczna w neuronach mózgu i komórkach immunologicznych mikroglejowych oraz monocytach, pełniących rolę mediatora stanu zapalnego. W wyniku procesu neurodegeneracyjnego dochodzi do aktywowania komórek mikroglejowych, uwalniania prozapalnych cytokin i chemokin, wyzwalając ostry i przewlekły stan zapalny mózgu, prowadzący do uszkodzenia i dystrofii [183].

Parry i in. wykazali, że IL-1 β przy wysokich stężeniach indukuje wzrost ekspresji miRNA-146a, tym samym hamuje uwalnianie IL-8 i CCL5 (ang. C-C motif chemokine ligand 5). Zmienny poziom ekspresji miRNA jest w stanie regulować ostry stan zapalny [184]. Wyniki niektórych badań sugerują również, że miR-146a, hamuje aktywność wrodzonej odpowiedzi immunologicznej poprzez obniżenie stężenia kinazy 1 związanej z receptorem IL-1 (IRAK1) i białkowego czynnika 6 związanego z receptorem TNF (TRAF6) [185].

MiRNA-146a został również przebadany pod kątem roli w otępieniach alzheimerowskich. Li i in. prowadząc badania na myszach oraz linii komórkowej mózgu i siatkówki w ostrej fazie AD (III AD), odkryli, że w wyniku stresu indukowanego IL-1 β , w komórkach neuronalno-glejowych dochodzi do nadekspresji miRNA-146a. Zauważyli również korelacje z gęstością blaszek neurotycznych oraz zaburzeniami synaptycznymi co związane jest ze stopniem otępienia. Badanie to wskazuje na wyższy poziom ekspresji miRNA-146a w mózgach osób z zaawansowanym stopniem zwyrodnieniowym, licznymi blaszkami neurotycznymi

oraz zaburzonym przekazywaniem neuronalnym [186]. Do nadekspresji miRNA-146a zachodzi również w pierwotnych komórkach astroglowych, pod wpływem czynników stresogennych tj. cytokiny prozapalne, metale neurotoksyczne [187] i białka amyloidowego-A β ₄₂, których poziom w określonych obszarach mózgu oraz w zaawansowanych stadiach choroby jest stale podwyższony. Wykazano, iż przy neurozwyrodnieniach IL-1 β razem z A β ₄₂ silniej wpływają na nadekspresję miRNA w astrocytach niż sama IL-1 β [188]. Wraz z postępem choroby poziom miRNA-146a stopniowo wzrasta w przedziałach mózgu szczególnie dotkniętych neuropatologią zapalną oraz zwyrodnieniem spowodowanym odkładaniem amyloidu- A β ₄₂ [183].

Natomiast Arena i in. w swoich badaniach na pacjentach ze sporadyczną postacią Alzheimera (SAD) wykazała zwiększoną ekspresję miR-146a w hipokampie, która ujemnie korelowała z jego docelowym IRAK-1 [189].

MiRNA-146a odgrywa ważną rolę w apoptozie neuronów, co wykazał w swoich badaniach na komórkach SH-SY5Y Zhang i in. Cząsteczka tego miRNA wiążąc się w miejscu 3'UTR z mRNA LRP2, moduluje proces syntezy Lpr2. Nadekspresja miRNA-146a blokuje syntezę Lpr2 i wpływa negatywnie na ekspresję Akt. To z kolei indukuje aktywność kaspazy 3, która odpowiada za proces apoptozy komórkowej [190]. Nie możemy pominąć faktu, że AD powiązana jest z cukrzycą 1 typu, w przebiegu której można zaobserwować spadek cytokin prozapalnych TNF- α i IL-6 oraz ekspresji miRNA-146a [191].

Przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki dostępnych badań naukowych wskazują, że miRNA-146a w przyszłości może być wykorzystywana jako biomarker, jak również jako cel terapeutyczny. Interesujące wyniki uzyskano również w badaniach, w których wykazano zdolność tauryny do obniżenia poziomu ekspresji właśnie tej cząsteczki miRNA-146a, widząc w niej szanse na nową terapię w AD. Niestety na zastosowanie jej w terapii musimy jeszcze poczekać, gdyż badania te zostały przeprowadzone na linii komórkowej [192].

Przeprowadzone w niniejszej pracy badania związku pomiędzy polimorfizmem w genie *APOE* a poziomem ekspresji miRNA-146a w grupie pacjentów, nie wykazały istotnej statystycznie różnicy pomiędzy pacjentami posiadającymi przynajmniej jeden allel ϵ 4. Niewiele prac zostało poświęconych temu zagadnieniu. Spośród dostępnych

wyników badań odnoszących się do związku między izoformami ApoE a ekspresją miRNA-146a, warto zwrócić uwagę na badania Teter i in. na myszach z polimorfizmem *APOE4*. Wykazały one obniżenie poziomu ekspresji miR-146a do 29% w porównaniu z ekspresją u myszy *APOE3* ($p < 0,0001$). Model z FAD z obecną izoformą ApoE4 podobnie wskazały obniżony poziom miR-146a do 62% poziomu myszy z FAD z izoformą ApoE3 ($p < 0,05$). Wyniki tych badań pokazują, że choć w mózgach występuje nadekspresja miR-146a, to jest ona modulowana poprzez izoformę ApoE4. Allel $\epsilon 4$ genu *APOE* zaburza proces sprzężenia zwrotnego aktywowanego przez miR-146a. Obniżona ekspresja miR-146a prowadzi do przewlekłego stanu zapalnego, charakterystycznego dla nosicieli *APOE4*. Mało tego, defekty ekspresji miR-146a powodowane przez $\epsilon 4$ są obecne w fazie prodromalnej i przyczyniają się do ryzyka choroby. Mimo odkładania wyższego poziomu amyloidu w mózgu oraz NF κ B, który w wyniku przewlekłego stanu zapalnego aktywuje ekspresję miR-146a, w przypadku pacjentów z FAD obecność izoformy ApoE4 wyraźnie ją hamuje w porównaniu z pacjentami z FAD z izoformą ApoE3. To przeciwzapalne sprzężenie zwrotne może przyspieszyć przewlekły stan zapalny, przygotować mikroglej do starzenia się i choroby Alzheimera [193].

Badając związek pomiędzy polimorfizmem w genie *ACE* a poziomem ekspresji miRNA-146a-5p w badanej grupie osób chorych, wykazano, że ekspresja tego miRNA jest związana z polimorfizmem insercyjnym *ACE*. Obecność przynajmniej jednego allelu I powoduje obniżenie poziomu ekspresji miRNA-146a-5p. Tak więc najniższą ekspresję wykazują homozygoty insercyjne I/I zaś najwyższą homozygoty D/D.

Jak dotąd nie został określony profil ekspresji miRNA-146a, który byłby powiązany z konkretnym polimorfizmem insercyjno/delecyjnym w genie *ACE*. Opierając się na dostępnej krajowej i światowej literaturze należy podkreślić, że takie badania nie zostały do tej pory przeprowadzone. Można więc przypuszczać, iż jest to jedno z pierwszych na świecie tego typu badanie. Niniejsza praca miała na celu wymiar naukowo-poznawczy, otwierający drogę do dalszych badań w tym kierunku.

5.6. Zmiany poziomu ekspresji miRNA-200a-3p związane ze stopniem rozwoju otępienia

Podobny schemat badawczy został przyjęty do badania poziomu ekspresji miRNA-200a-3p w surowicy pacjentów z otępieniem oraz osób zdrowych. Pacjenci zostali podzieleni na trzy grupy tj. MCI, AD oraz grupę kontrolną. Do oceny poziomu ekspresji zastosowano technikę qPCR i analizowano wartości RQ (ang. relative quantification). Wykonane analizy nie wykazały istotnych statystycznie różnic poziomu ekspresji miRNA-200a-3p w badanych grupach. Nie oznacza to jednak, iż ekspresja tej cząsteczki miRNA jest stała podczas rozwoju choroby Alzheimera. MiRNA-200a-3p moduluje aktywność wielu genów związanych z AD oraz tych, które nie są bezpośrednio związane z neurodegeneracją. Można więc przypuszczać, że ekspresja miRNA-200a-3p jest regulowana przez inne białka związane z chorobami współwystępującymi na zasadzie sprzężenia zwrotnego. Ponieważ jeden gen regulowany jest przez wiele miRNA, niektóre cząsteczki miRNA wiążąc się w tych samych miejscach transkryptu lub w ich pobliżu, regulują dostępność danych sekwencji i blokują wiązanie badanego miRNA-200a-3p z konkretnym genem. Zmienna ekspresja jednej cząsteczki miRNA, może wpływać na ekspresję pozostałych miRNA, które kontrolują ten sam gen. Dobrym rozwiązaniem byłoby przeanalizowanie poziomu ekspresji wszystkich miRNA regulujących aktywność konkretnego genu związanego z AD. Dodatkowym problemem, podobnie jak w przypadku miRNA-146a-5p, jest brak badań długofalowych poziomu ekspresji miRNA-200a-3p u danego pacjenta na przełomie kilku lat. Badania te mogłyby wskazać poziom i kierunek zmian jego ekspresji w zależności od stopnia zaawansowania choroby. Bardzo dużą rolę odgrywa również materiał badany. Pamiętajmy, iż miRNA mogą być uwalniane do płynów ustrojowych biernie, na skutek degradacji komórek w wyniku ich ciężkiego uszkodzenia, stanów zapalnych, nekrozy i apoptozy oraz lizy komórek. Są to procesy patologiczne w tkance, które mogą zmienić ogólną pulę miRNA w krążeniu. Dlatego profil ekspresji miRNA-200a-3p w płynach ustrojowych może znacznie różnić się od profilu jego ekspresji w komórkach mózgowych. Inny model transportu aktywnego miRNA z komórek do płynów ustrojowych związany jest z zamykaniem ich w struktury odrywających się mikropęcherzyków lub egzosomy. Zdolność sekrecji posiadają tylko

niektóre komórki np. limfocyty T i B, retikulocyty, komórki dendrytyczne. W tym przypadku cząsteczki zamknięte w tych strukturach nie zawsze są wydzielane na zewnątrz komórki. Zdarza się, że są one przeznaczone do degradacji, więc nie zasilają puli cząsteczek miRNA w płynach ustrojowych. Podobnie jak wyniki ekspresji wcześniej opisywano miRNA-146a-5p, poziom miRNA-200a-3p również zależy w dużej mierze od procedury pobrania i przygotowania surowicy do badania molekularnego.

Literatura naukowa dostarcza nam jednak wielu danych, wskazujących na różnice ekspresji tego miRNA w toku trwania i rozwoju choroby otępiennej. Przykładem może być porównanie poziomu miR-200a-3p w tkance hipokampu i krwi u myszy transgenicznym 5XFAD w różnym wieku, z typem myszy dzikich WT w tym samym wieku. Badanie to wykazało istotny wzrost ekspresji miR-200a-3p u młodych myszy zarówno w tkance hipokampu szczególnie w obszarach CA1 i DG oraz w surowicy. Wyraźny wzrost ekspresji zaobserwowano tylko u młodych myszy, starsze myszy wykazywały niższą ekspresję. Badanie to pokazuje, iż ekspresja miR-200a-3p zmienia się podczas choroby-wzrasta na wczesnym etapie AD, zaś spada w toku rozwoju choroby [194].

W ramach tego samego badania, przeanalizowano zmiany ekspresji miR-200a-3p w surowicy 28 pacjentów podzielonych na trzy grupy: MCI, AD, K. Wyniki wskazały najwyższy poziom ekspresji miR-200a-3p u pacjentów z AD w porównaniu z grupą pacjentów z MCI oraz grupą kontrolną (test t-Studenta, $p < 0,05$). Ponadto zaobserwowano istotne różnice ekspresji, przy rozszerzeniu badań do czterech grup (kontrola, MCI, AD i wczesna postać AD -EOAD). W EOAD ekspresja miR-200a-3p wzrosła 5-krotnie w porównaniu z grupą MCI oraz 2 – 3 krotnie w porównaniu z grupą AD. Badania te pokazują, że ekspresja miRNA-200a-3p wyraźnie wzrasta jeszcze przed nagromadzeniem się białek amyloidowych A β , białek Tau oraz białka APP w mózgu. Można więc stwierdzić, że EOAD może być szybko zdiagnozowane, gdyż zmiany ekspresji miR-200a-3p są związane z postępem AD [194].

Nagaraj i in. dokonując analizy 179 różnych miRNA z osocza pacjentów podzielonych na trzy grupy: wczesne AD (MCI-AD) (n=15), późne AD (n=20) oraz grupa kontrolna (n=15), dokonali porównania ekspresji szukając potencjalnych markerów diagnostycznych. Z bazy tej wybrano 6 miRNA, które mogłyby odróżniać

pacjentów na wczesnym etapie choroby od osób zdrowych. W grupie tych 6 mikroRNA, znalazł się również miRNA-200a-3p, który wykazywał wyraźny, istotny statystycznie wzrost ekspresję $p < 0,05$. Wyniki te wskazują, że miRNA-200a pozwala różnicować pacjentów z AD od osób kontrolnych bez demencji oraz pacjentów z wczesną chorobą Alzheimera (MCI-AD) [195]. Podobnie Schipper i in. analizując profil licznych miRNA u osób z AD oraz osób zdrowych lecz w starszym wieku, wykazał tendencję nadmiernej ekspresji niektórych miRNA w tym również miRNA-200a-3p. Dodatkowo określił dodatnią korelację nadekspresji tej cząsteczki miRNA z osobami *APOE4*-ujemnymi [196].

MiR-200a-3p bierze udział w apoptozie neuronów indukowanej przez β -amyloid ($A\beta$), gdyż celuje bezpośrednio w białko przeciwapoptyczne sirtuinę 1 (ang. sirtuin1-SIRT1) [115]. SIRT1 odgrywa ważną rolę w utrzymaniu zdrowia neuronów oraz moduluje plastyczność synaptyczną [197]. Podczas rozwoju neuronów SIRT1 promuje wydłużanie aksonów, wzrost wypustek nerwowych i rozgałęzienia dendrytyczne, a nawet łagodzi patologie białka Tau [198]. Zwiększony poziom miR-200a-3p przyspiesza oraz wzmacnia proces apoptozy, poprzez wzrost ekspresji kaspazy-3 w komórkach poddanych działaniu $A\beta$. Wykazano, że przeciwciała anti-miR-200a-3p, tłumią ekspresję kaspazy-3, a wyzwalają ekspresję SIRT1, która może hamować apoptozę neuronów [115]. Ostatnie badania wskazują, iż resweratrol może odgrywać neuroprotekcijną rolę, gdyż jest w stanie zwiększyć ekspresję SIRT1 w AD i cukrzycy [199].

Należy podkreślić, że nie wszystkie badania wykazują nadekspresję miRNA-200a-3p w AD. Jak już wspomniano wcześniej w niniejszej rozprawie (rozdział 1.4.1) obniżony poziom miRNA-200a-3p został wykazany zarówno w wyniku badań eksperymentalnych na transgenicznym myszom (APP/PS1), jak też w badaniach klinicznych na osoczu pacjentów z chorobą Alzheimera. Te badania wykazują, że celem miRNA-200a-3p jest mRNA genu *BACE1*. Obniżona ekspresja miRNA-200a-3p prowadzi zatem do nadprodukcji toksycznej formy $A\beta$, zaś podwyższenie jej ekspresji może prowadzić do tłumienia produkcji $A\beta$. Dodatkowo miRNA-200a-3p celuje w gen *PRKACB* (ang. Protein Kinase CAMP-Activated Catalytic Subunit Beta), który koduje jedną z podjednostek katalitycznych rodziny kinazy białkowej (ang. protein kinase A-

PKA). Kinaza ta moduluje poziom fosforylowanego białka Tau a zastosowanie mimetyków miRNA-200a-3p znacząco zmniejsza ekspresję mRNA *PRKACB* [114].

Podobnie jak przy pierwszym analizowanym mikroRNA, czyli miRNA-146a-5p, tak też analizując poziom ekspresji miRNA-200a-3p, dokonano oceny wpływu wybranych polimorfizmów w genach *APOE* oraz *ACE* na jego ekspresję. W celu określenia różnicy ekspresji wybranego miRNA w grupach pacjentów wykazujących różny polimorfizm genu *APOE*, wykonano analizę statystyczną testem Kruskala-Wallis'a z podziałem pacjentów na 2 podgrupy, z wyłączeniem grupy kontrolnej. Podstawą klasyfikacji pacjentów była obecność lub brak przynajmniej jednego allelu $\epsilon 4$. Nie uzyskano istotnych różnic poziomu ekspresji pomiędzy tymi grupami. Jednakże na podstawie uzyskanych wyników badań przeprowadzonych w ramach tej pracy, nie możemy wnioskować o całej populacji, gdyż prawdopodobieństwo istotności wyników badań rośnie wraz z liczebnością grupy badanej. Zasadne wydaje się więc powiększenie liczebności próby badanej i powtórne przeprowadzenie oceny. Brak istotnych różnic w poziomie ekspresji miRNA-200a-3p pomiędzy pacjentami o różnych genotypach *APOE*, nie przekreśla roli tego polimorfizmu w ekspresji tego miRNA.

Podobne postępowanie zastosowano do badania zależności poziomu ekspresji miRNA-200a-3p od polimorfizmu insercyjno/delecyjnego w genie *ACE*. Podstawą klasyfikacji był rodzaj genotypu *ACE* wśród pacjentów: homozygota I/I, homozygota D/D lub heterozygota I/D. Przeprowadzone badania wykazały, że najwyższy poziom ekspresji miRNA-200a-3p występował u homozygot insercyjnych I/I, w porównaniu z genotypem D/D przy poziomie istotności $p < 0,01$. Natomiast heterozygoty I/D, wykazały wyższy poziom ekspresji badanego miRNA w porównaniu z homozygotami D/D ($p < 0,01$). Na podstawie tych wyników możemy stwierdzić, iż allel I, który zwiększa ryzyko zachorowania na AD, jest związany z podwyższoną ekspresją miRNA-200a-5p. Jest to potwierdzenie wcześniejszych badań, które wskazywały na podwyższoną ekspresję miRNA-200a-3p w trakcie choroby. Należy zaznaczyć, że allel I w *ACE* zwiększa prawdopodobieństwo rozwoju choroby otępiennej, podczas gdy homozygota D/D tej tendencji nie posiada.

Jak dotąd nie został określony profil ekspresji miRNA-200a-3p, który potwierdziłby uzyskane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wyniki badań związku ich ekspresji z danym polimorfizmem w genach *APOE* oraz *ACE*. Na

podstawie przeglądu dostępnej krajowej i światowej literatury, należy podkreślić, iż tego typu badania nie były jeszcze prowadzone. Wykonane w ramach niniejszej pracy badania, mają charakter nowatorski i mogą zapoczątkować dalsze prace nad analizą związku tego miRNA z polimorfizmami genów ściśle związanych z chorobą Alzheimera.

5.7. Zmiany poziomu ekspresji miRNA-132-3p związane ze stopniem rozwoju otępienia

Spośród licznych miRNA odgrywających rolę w neurodegeneracji, miRNA-132-3p od wielu lat jest analizowany w tym kierunku. Zmienny poziom ekspresji miRNA-132-3p w komórkach nerwowych świadczy, że uczestniczy on w różnych procesach neurodegeneracyjnych. Jest to jedna z lepiej poznanych niekodujących, jednoniciowych cząsteczek miRNA. Wraz z miRNA-212 tworzy ona klaster zlokalizowany na 17. chromosomie, kodowany w tym samym intronie. Bardzo często badaniom poddawane są te dwie cząsteczki miRNA razem. MicroRNA-132 bierze udział w funkcjach przeciwzapalnych i wspomagających pamięć w układzie nerwowym [113].

Zmiany poziomu ekspresji tej cząsteczki miRNA, były przesłanką do przeprowadzenia szczegółowych badań jej poziomu w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej. W przeprowadzonych badaniach wykazano statystycznie istotną różnicę ($p=0,037$) ekspresji miRNA-132-3p w zależności od stopnia zaawansowania choroby. Zaobserwowano wyraźny spadek poziomu ekspresji wraz z postępem choroby otępiennej. Najwyższą ekspresję zaobserwowano w grupie kontrolnej, niższą w MCI oraz kolejno w AD I oraz AD III i AD II. Dodatkowym potwierdzeniem tej hipotezy są wyniki badań predykcyjnych w postaci modelu drzewa decyzyjnego, które pozwalają wykluczyć otępienie u pacjentów na podstawie uzyskanej ekspresji miRNA-132-3p na poziomie $> 0,47$ RQ.

Wyniki te są spójne z licznymi doniesieniami literatury, wskazującymi na obniżanie ekspresji miRNA-132-3p wraz z rozwojem choroby. Salta i in. potwierdzili, że wyciszenie ekspresji miRNA-132 wzmacnia patologię na poziomie molekularnym

i funkcjonalnym [200]. Na podstawie swoich badań z 2016 r. stwierdzili, że obniżona ekspresja miRNA-132-3p nasila cechy patologiczne wywołane odkładaniem się białka amyloidowego A β oraz białka Tau, poprzez zwiększenie ekspresji inozytolu 1,4,5-trifosforanu 3-kinazy B (ang. Inositol-trisphosphate 3-kinase B; ITPKB) w osoczu pacjentów z AD. Wykazano, że miRNA-132-3p celuje bezpośrednio w 3'UTR genu *ITPKB*, który aktywuje produkcję A β . Wyciszenie ekspresji genu *ITPKB* jest więc wskazane, gdyż obniża poziom A β . Pokazuje to, że *ITPKB* podlega kontroli regulacyjnej miRNA-132-3p. Tak więc, silne obniżenie jego ekspresji zaobserwowane w mózgu osób z AD, jest nie tylko konsekwencją procesu chorobowego, ale przyczynia się do zmian patologicznych w procesach biochemicznych mózgu [201].

Celem miRNA 132/212 jest również mRNA *PTEN* i *CDK5* w hipokampie. Badania prowadzone na tkance hipokampu myszy nie wykazały jednak zmian w poziomie *PTEN* i *CDK5* w wyniku zahamowania miRNA-132/212. Może to sugerować, że miRNA-132/212 niekoniecznie odgrywają główną rolę w regulacji poziomów *PTEN* i *CDK5* w hipokampie. Sami autorzy jednak nie wysuwają takich wniosków, wskazując na konieczność rozszerzenia swoich badań o konkretne obszary hipokampu [202].

Badania na myszach z zastosowanym zjawiskiem knockout miR-132/212 wskazują, że utrata tych cząsteczek miRNA prowadzi do zauważalnych zmian w funkcji synaptycznej. Zarówno w hipokampie, jak i w korze nowej knockout zmniejszył podstawową transmisję synaptyczną. Wyniki te wskazują, że miR-132 i/lub miRNA-212 odgrywają znaczącą rolę w funkcji synaptycznej, prawdopodobnie poprzez regulację liczby postsynaptycznych receptorów AMPA (ang. α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor) [203].

Bormann i in. również potwierdzili hipotezę, w której klaster miRNA-132/212 odgrywa ważną rolę w sygnalizacji cholinergicznej i transmisji synaptycznej. Wpływa on również na ochronną odpowiedź neuronalną w wyniku niedotlenienia [204]. Dojrzewanie dendrytów w nowych neuronach oraz tworzenie kolców w odpowiedzi synaptycznej podlega modulacji miRNA-132 regulowanego przez czynnik transkrypcyjny CREB (ang. cyclic AMP responsive element binding protein-CREB) [205].

Odkryto również, że miR-132-3p jest zaangażowany w procesy proapoptyczne poprzez pośrednią regulację poziomu fosfatazy białkowej 1F (ang. protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependent 1F- PPM1F). MiRNA-132 bezpośrednio celuje w FOXO3a (ang. Forkhead box O3), czynnik transkrypcyjny pośredniczący w wielu procesach komórkowych, w tym apoptozie, proliferacji, postępie cyklu komórkowego i uszkodzeniu DNA. Ekspozycja na A β ₁₋₄₂ powoduje wzrost poziomu PPM1F, która odpowiada za defosforylację i aktywację FOXO3a oraz promuje jego transport komórkowy z cytoplazmy do jądra. U pacjentów z AD ekspresja miRNA-132 negatywnie korelowała z PPM1F [206].

Ochronną rolę miRNA-132 w apoptozie wykazał również Qu i in. Opierając się na wynikach badań prowadzonych na szczurach leczonych homocysteiną, wykazał, że miR-132-3p w obecności homocysteiny tłumi poziom genów apoptycznych w hipokampie i zmniejsza upośledzenie zdolności uczenia się i zapamiętywania. Mechanistycznie miRNA-132 ukierunkowany jest na heterogeniczne jądrowe rybonukleoproteiny U (ang. heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-HNRNPU). HNRNPU działając jako białko wiążące RNA, reguluje stabilność mRNA *BACE1*. Nadmierna ekspresja *HNRNPU* lub *BACE1* negatywnie koreluje z poziomem ekspresji miR-132-3p. Zatem miR-132-3p poprzez modulację osi *HNRNPU/BACE1* zmniejsza apoptozę komórek i łagodzi upośledzenie zdolności uczenia się i zapamiętywania u szczurów z chorobą Alzheimera [204].

W badaniu na transgenicznym mysz (APP/PS1) wykazano neuroprotekcyjną rolę miR-132-3p poprzez regulację deacetylazy histonowej 3 (HDAC3). Do badania wykorzystano lentiwirusy do modulowania ekspresji miR-132-3p w hipokampie myszy. Nadmierna ekspresja miR-132-3p w hipokampie łagodziła deficyty pamięci przestrzennej, zmniejszyła akumulację A β ₁₋₄₂, apoptozę oraz zwiększała liczbę komórek hipokampu. Badania te wskazują, iż miRNA-132 w przyszłości może być obiecującym celem terapeutycznym w AD [207].

Choć liczne badania nad miRNA-132 prowadzono w oparciu o eksperymenty na myszach transgenicznym, dostępne są również badania prowadzone na kohorcie pacjentów. Sbriscia i in. analizował poziom miR-132-3p w osoczu, oraz pęcherzykach zewnątrzkomórkowych pacjentów z AD. Wykazał różnice w jego ekspresji w zależności od stadium choroby. U pacjentów z MCI poziom miRNA-132 był

wyraźnie podwyższony, podczas gdy w fazie AD poziom ten wyraźnie się obniżał i był niższy w porównaniu z grupą kontrolną. Co ciekawe poziom badanego miRNA w osoczu i pęcherzykach były zbliżone. Badania te sugerują, iż miRNA-132-3p może w przyszłości pretendować jako potencjalny marker wczesnego wykrywania oraz monitorowania postępu AD [208].

Nie wszystkie badania potwierdzają hipotezę o obniżonej ekspresji miRNA-132-3p w chorobie Alzheimera. Liu i in. na podstawie swoich badań stwierdzili wyraźną nadekspresję miR-132 w pośmiertnych tkankach mózgów, zarówno osób z AD jak też z MCI, w porównaniu z grupą kontrolną [209]. Może to być związane z różnicą w wydzielaniu cząsteczek czynnych biologicznie na zewnątrz komórki do płynów ustrojowych. Profil ekspresji miRNA w komórkach mózgowych może być znacznie wyższy od profilu w płynach ustrojowych.

Przeanalizowany w ramach niniejszych badań poziom ekspresji miRNA-132-3p, powiązano z polimorfizmem w genie *APOE* oraz *ACE*. Analiza statystyczna wykazała istotny ($p < 0,05$) spadek ekspresji miRNA-132-3p pomiędzy pacjentami posiadającymi przynajmniej jeden allel $\epsilon 4$ *APOE* a pacjentami bez tego allelu. Wyniki te są spójne z danymi literatury naukowej wskazującymi na obniżenie ekspresji miRNA-132-3p wraz z postępem choroby AD. Ponieważ forma polimorficzna *APOE4* zwiększa ryzyko choroby AD, poziom miRNA-132-3p będzie sukcesywnie obniżał w trakcie choroby a w grupie pacjentów z najbardziej zaawansowanym stadium (AD III) będzie wykazywał najniższy poziom ekspresji.

MiRNA-132-3p wykazał również istotną różnicę w ekspresji pomiędzy grupą homozygot insercyjnych I/I a grupą homozygot delecyjnych D/D przy poziomie istotności $p < 0,05$. Genotyp I/I wykazywał wyższą ekspresję miRNA-132-3p w stosunku do genotypu D/D jak również w porównaniu z grupą heterozygot I/D. Wyniki te mogą sugerować, iż mimo wyższego prawdopodobieństwa zachorowania na AD przy obecności allelu I, poziom ekspresji miRNA-132-3p może utrzymywać się wyższy przez dłuższy czas. Należy zauważyć, że nie świadczy to o nadekspresji tego miRNA w grupie z allelem I lecz tylko o nieznacznie wyższym poziomie w stosunku do homozygot D/D.

Obecnie brakuje badań, które mogłyby potwierdzić i porównać uzyskane w niniejszej pracy wyniki badań nad wpływem polimorfizmów w genach *APOE* oraz

ACE na poziom ekspresji miRNA-132-3p. Analizując dostępną literaturę naukową nie znaleziono tego rodzaju badań, co może sugerować iż jest to pierwsze na świecie tego typu badanie. Dlatego też wyniki uzyskane w ramach tej pracy, mogą być impulsem do kontynuowania i pogłębiania badań w tym zakresie.

5.8. Uwagi końcowe

Choroba Alzheimera jest najczęstszą formą demencji wśród pacjentów w starzejącej się populacji. Powoduje poważne i nieodwracalne deficyty funkcji poznawczych, behawioralnych oraz psychologicznych. Stanowi ogromny problem społeczny ale również ekonomiczny. Jest to choroba wielogenowa i wieloczynnikowa. Nie ma konkretnych modeli predykcyjnych tej choroby, gdyż zmiany zachodzące w czasie rozwoju AD powiązane są z licznymi szlakami metabolicznymi, biochemicznymi oraz zależą od ekspresji wielu genów. Zainteresowania naukowców coraz częściej kierowane są w stronę mechanizmów epigenetycznych, do których zaliczamy potranskrypcyjną regulację genów za pomocą miRNA. MiRNA odgrywają ważną rolę w regulacji ekspresji genów determinujących procesy neurodegeneracyjne w chorobie AD np. *APP*, *PSEN 1*, *PSEN 2*, *BACE*.

Wyniki przedstawione w ramach niniejszego badania stanowią próbę określenia zaburzeń ekspresji trzech wybranymi miRNA tj. miRNA-200a-3p, miRNA-146a-5p, miRNA-132-3p w zależności od stadium AD oraz związku z cechami klinicznymi choroby. Bardzo ważnym aspektem poruszonym w tej pracy jest również związek poziomu ekspresji analizowanych miRNA z polimorfizmem w genach *APOE* oraz *ACE*. W ramach wykonanej analizy ekspresji wybranych miRNA, wyizolowanych z surowicy pacjentów z otępieniem oraz grupy kontrolnej, wykazano obniżony poziom ekspresji miRNA-132-3p u pacjentów w zaawansowanym stadium AD. Wyniki badań miRNA-200a-3p oraz miRNA-146a-5p nie wykazały zaburzeń ekspresji, co może być spowodowane niewystarczającą liczebnością badanych grup. Wiedząc, że prawdopodobieństwo istotności wyników badań rośnie wraz z liczebnością grupy badanej, można uznać to jako czynnik ograniczający niniejsze badania. Zasadne więc wydaje się powiększenie liczebności próby badanej i powtórne przeprowadzenie analizy pacjentów. Należy również zaznaczyć, iż na wynik badań określających poziom

ekspresji miRNA może mieć wpływ postępowanie przedanalizacyjne związane z pobraniem oraz przygotowaniem surowicy do badań molekularnych. Ponadto, jeden gen może być regulowany przez różne miRNA, dlatego należałoby podjąć próbę zbadania ekspresji wszystkich miRNA modulujących aktywność docelowego genu związanego z procesami neurodegeneracyjnymi w AD. Mocną stroną tej pracy było zastosowanie modeli predykcyjnych, które potwierdziły, iż obniżona ekspresja miRNA-132-3p może być czynnikiem predykcyjnym stadium choroby AD.

Badając związek zaburzenia ekspresji poszczególnych miRNA z chorobami współistniejącymi oraz korelacje pomiędzy poziomem parametrów biochemicznych (cholesterol całkowity i jego frakcje HDL, LDL, TG, witamina B₁₂) a ekspresją miRNA, nie zaobserwowano żadnych istotnych zależności.

Na podstawie analizy statystycznej stwierdzono pozytywną korelację pomiędzy ekspresją miRNA-146a-5p a wartością wskaźników diagnostycznych w AD tj. pTau/Aβ₄₂ oraz hTau/ Aβ₄₂. Wyniki te potwierdzają liczne doniesienia naukowe na temat wzrostu poziomu białka hTau oraz pTau w PMR pacjentów z otępieniem. Dostępne wyniki badań nad miRNA-146a-5p pokazują, iż poziom ekspresji tego miRNA w czasie choroby AD również ulega podwyższeniu. Czynnikiem ograniczającym badania korelacyjne może być liczebność grupy oraz niepełny zakres badań białek konformacyjnych u wszystkich badanych osób.

Niewątpliwie mocną stroną tej pracy doktorskiej jest analiza związku ekspresji wybranych miRNA z polimorfizmem w dwóch genach, które odgrywają ważną rolę w chorobie Alzheimera: *APOE* oraz *ACE*. Należy podkreślić, że tego typu badania zostały przeprowadzone po raz pierwszy w tej pracy, co świadczy o innowacyjnym charakterze prowadzonych badań. Polimorfizm w genie *APOE* wykazał istotny związek z ekspresją miRNA-132-3p. Obecność przynajmniej jednego allelu ε4 w *APOE*, wiązała się z obniżoną ekspresją miRNA-132-3p. Polimorfizm w genie *ACE* wykazał istotny wpływ na poziom ekspresji wszystkich analizowanych miRNA (miRNA-200a-3p, miRNA-132-3p oraz miRNA-146a-5p). Obecność przynajmniej jednego allelu insercyjnego (I) w genie *ACE* wpływała na zmianę ekspresji tych miRNA. Najwyższy poziom ekspresji miRNA-200a-3p zaobserwowano wśród homozygot insercyjnych I/I, najniższy wśród homozygot delecyjnych D/D. Podobnie poziom ekspresji miRNA-132-

3p u homozygot I/I był wyższy w porównaniu z genotypami I/D oraz D/D. Natomiast poziom ekspresji miRNA-146a-5p wykazuje najniższą ekspresję wśród homozygot insercyjnych, zaś najwyższą u homozygot delecyjnych D/D.

Dodatkowa analiza statystyczna grupy badanej, potwierdziła wpływ wieku na stadium otępienia. U osób starszych można zaobserwować głębsze fazy otępienia niż u osób młodszych, u których najczęściej diagnozuje się MCI lub łagodną postać AD I. Potwierdzone zostały również liczne badania, dotyczące poziomu witaminy B₁₂. Wraz z postępem choroby otępiennej można zauważyć spadek poziomu witaminy B₁₂, a w fazie AD II i AD III nawet jej niedobory.

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej pozwalają na potwierdzenie wszystkich postawionych hipotez badawczych. Jedna hipoteza badawcza została potwierdzona w pełnym zakresie badanych miRNA, natomiast dwie pozostałe potwierdzono w oparciu o jedną z trzech badanych cząsteczek miRNA.

- Analiza ekspresji trzech wybranych krążących miRNA wykazała, że poziom miRNA-132-3p różni się u pacjentów z chorobą Alzheimera, a różnice te są związane ze stopniem zaawansowania choroby.
- Obecność przynajmniej jednego allelu ε4 w genie *APOE* wpływa na ekspresję jednego z trzech analizowanych miRNA- miRNA-132-3p.
- Obecność allelu insercyjnego (I) w genie *ACE* wpływa na ekspresję wszystkich analizowanych w ramach niniejszej pracy miRNA: miRNA-200a-3p, miRNA-146a-5p, miRNA-132-3p.

Uzyskane w ramach niniejszej rozprawy wyniki badań mogą być użyteczne w wyjaśnianiu mechanizmów otępienia typu alzheimerowskiego. MiRNA w przyszłości mogą stanowić ważne i skuteczne markery diagnostyczne lub prognostyczne. Niemniej jednak, znaczenie miRNA-200a-3p, miRNA-132-3p i miRNA-146a-5p jako potencjalne biomarkery wymagają dalszych dokładnych badań i analiz. Ogromny wkład wniosłyby badania długofalowe, które należałoby wykonać na tych samych osobach. Pozwoliłyby one określić zmiany poziomu miRNA wraz z wiekiem oraz chorobami współwystępującymi. Dodatkowo ważny jest dokładny wywiad związany z dietą,

aktywnością, sposobem życia oraz stosowanymi lekami i używkami, wpływającymi na czynniki epigenetyczne, które mogą potęgować lub redukować ryzyko wszystkich chorób. Z całą pewnością przedstawione w niniejszej dysertacji wyniki badań mogą nadać kierunek dalszym badaniom.

6. WNIOSKI

Przedstawione w rozprawie wyniki badań pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

1. Ekspresja miRNA-132-3p może być ważnym markerem progresji stadium otępienia w chorobie Alzheimera. Obniżający się poziom ekspresji miRNA-132-3p może wskazywać na coraz bardziej zaawansowane stadium AD.
2. MiRNA-146a-5p może mieć wpływ na regulację białek konformacyjnych odpowiedzialnych za procesy neurodegeneracyjne w mózgu pacjentów z AD.
3. Mi-RNA-132-3p może być wykorzystywany jako marker do diagnozy i progresji stadium AD szczególnie u osób posiadających przynajmniej jeden allel $\epsilon 4$ w genie *APOE*. Obecność takiego genotypu może być związana z obniżającą się ekspresją miRNA-132-3p u pacjentów w trakcie przebiegu AD.
4. Mi-RNA-132-3p może być wykorzystywany jako marker diagnostyczny AD szczególnie u osób posiadających allel insercyjny (I) w genie *ACE*. Jest to związane z podwyższoną ekspresją miRNA-132-3p u pacjentów z AD, którzy są nosicielami przynajmniej jednego allelu insercyjnego w genie *ACE*.
5. Mi-RNA-200a-3p może być wykorzystywany jako marker diagnostyczny AD szczególnie u osób posiadających allel insercyjny (I) w genie *ACE*. Jest to związane z nadekspresją miRNA-200a-3p u pacjentów z AD, którzy są nosicielami przynajmniej jednego allelu insercyjnego w genie *ACE*.
6. Mi-RNA-146a-5p może być wykorzystywany jako marker diagnostyczny AD szczególnie u osób posiadających allel insercyjny (I) w genie *ACE*. Jest to związane z obniżoną ekspresją miRNA-146a-5p u pacjentów z AD, którzy są nosicielami przynajmniej jednego allelu insercyjnego w genie *ACE*.
7. Wiek jest ważnym czynnikiem ryzyka choroby Alzheimera. U osób starszych często diagnozuje się bardziej zaawansowane stadium choroby w porównaniu z osobami młodszymi.

8. Dodatkowa suplementacja witaminy B₁₂ może odgrywać korzystną rolę w zahamowaniu progresji choroby AD u pacjentów.
9. Wraz z progresją choroby otępiennej oraz zwiększonym gromadzeniem amyloidu A β ₁₋₄₂ w mózgu, dochodzi do obniżenia jego poziomu w PMR u pacjentów z AD.
10. Bardzo ważnym czynnikiem ryzyka SAD jest polimorfizm w genie *APOE*. Najczęściej występującym genotypem *APOE* jest homozygota ϵ 3/ ϵ 3 oraz heterozygota ϵ 3/ ϵ 4. Obecność przynajmniej jednego allelu ϵ 4 zwiększa ryzyko choroby oraz przyspiesza jej objawy, o czym może świadczyć fakt, iż pacjenci z genotypem ϵ 4/ ϵ 4 najliczniej występują w grupie MCI.
11. Wśród pacjentów ze stwierdzonym otępieniem typu alzheimerowskiego allel insercyjny (I) w genie *ACE* występował częściej w porównaniu z grupą kontrolną.

7. STRESZCZENIE

7.1. Wstęp

Choroba Alzheimerera (ang. Alzheimer's disease - AD) stanowi 70 % demencji wśród starzejącej się populacji. Patogeneza AD związana jest z akumulacją blaszek amyloidowych w przestrzeni zewnątrzkomórkowej mózgu, poprzez gromadzenie nierozpuszczalnego peptydu β amyloidowego ($A\beta$) oraz wewnątrzkomórkowych splotków neurofibrylarnych (NFT) zawierających głównie wysoce ufosforylowane białko Tau. Utrzymująca się tendencja wzrostowa chorych w Polsce i na całym świecie wskazuje na rosnącą potrzebę szybkiej diagnostyki i leczenia.

Wiele badań wskazuje na ważną rolę jaką pełnią cząsteczki miRNA w procesach neurodegeneracyjnych. Poziom miRNA może się zmieniać w zależności od regulowanego genu oraz etapu choroby.

7.2. Cel pracy

Celem pracy było zbadanie zmian ekspresji trzech wybranych miRNA, (miRNA-132-5p, miRNA-146a-5p oraz miRNA-200a-3p) w zależności od stopnia zaawansowania choroby Alzheimerera oraz związku pomiędzy ekspresją miRNA a polimorfizmem w genach *APOE* oraz *ACE*. Dokonano również analizy związku ekspresji wybranych miRNA z chorobami współistniejącymi oraz korelacji z wybranymi parametrami biochemicznymi (TC, HDL, LDL, TG, witamina B₁₂), białkami i wskaźnikami diagnostycznymi izolowanymi z PMR ($A\beta$ 1-42, $A\beta$ 1-40, p-Tau, t-Tau, $A\beta$ 1-42/ $A\beta$ 1-40, p-Tau/ $A\beta$ 1-42, h-Tau/ $A\beta$ 1-42).

7.3. Grupa badana

Grupę badaną stanowiło 70. pacjentów z Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego Nr 2 w Rzeszowie oraz 27 osób zdrowych bez objawów otępiennych stanowiących grupę kontrolną. Analizie molekularnej poddano 70 pacjentów w wieku między 59 a 92 rokiem życia z rozpoznaną chorobą otępienną od stadium łagodnego zaburzenia

poznawczego MCI, poprzez trzy fazy choroby AD: AD I, AD II, AD III. Klasyfikacji dokonał zespół specjalistyczny z Kliniki Neurologii z Pododdziałem Leczenia Udaru Mózgu.

7.4. Materiały i metody

Materiałem biologicznym do badań była surowica biobankowana, z której dokonano izolacji RNA według metodyki producenta QIAGEN miRNeasy Serum/Plasma Advanced. Analizę ekspresji wybranych miRNA przeprowadzono przy użyciu metody qPCR. Do amplifikacji wykorzystano zestaw miRCURY® LNA® SYBR® Green PCR Kit oraz specyficzne startery z zestawu miRCURY® LNA® miRNA PCR Assays, zgodnie z zaleceniami producenta.

7.5. Wyniki i wnioski

W wyniku analizy molekularnej wykazano, że wraz z postępem choroby, następowała spadek ekspresji miRNA-132-3p oraz stężenie witaminy B₁₂. Dodatkowo wykazano pozytywną korelację pomiędzy ekspresją miRNA-146a-5p a wartością wskaźników diagnostycznych w AD tj. pTau/Aβ₄₂ oraz hTau/Aβ₄₂. Analiza statystyczna wykazała związek polimorfizmu w genie *APOE* z obniżoną ekspresją miRNA-132-3p. Wykazano też związek między polimorfizmem w genie *ACE* a poziomem ekspresji miRNA-200a-3p, miRNA-132-3p oraz miRNA-146a-5p. Obecność przynajmniej jednego allelu insercyjnego (I) w genie *ACE*, wpływała na podwyższony poziom ekspresji miRNA-200a-3p i miRNA-132-3p, oraz obniżony poziom ekspresji miRNA-146a-5p.

Dodatkowo analiza statystyczna grupy badanej, potwierdziła wpływ wieku na stadium otępienia. U osób starszych można zaobserwować głębsze fazy otępienia, podczas gdy u osób młodszych najczęściej diagnozuje się MCI lub łagodną postać ADI.

8. SUMMARY

8.1. Entry

Alzheimer's disease (AD) accounts for 70% of dementias among the aging population. The pathogenesis of AD is associated with the accumulation of amyloid plaques in the extracellular space of the brain, resulting from the accumulation of insoluble amyloid β peptide ($A\beta$) and intracellular neurofibrillary tangles (NFTs), which primarily contain highly phosphorylated tau protein. The continuing upward trend in the number of patients in Poland and worldwide indicates a growing need for rapid diagnosis and treatment. Many studies indicate the important role of miRNA molecules in neurodegenerative processes. MiRNA levels can vary depending on the gene being regulated and the stage of the disease.

8.2. Aim of the study

The aim of the study was to examine changes in the expression of three selected miRNAs (miRNA-132-5p, miRNA-146a-5p, and miRNA-200a-3p) in relation to the stage of Alzheimer's disease and the relationship between miRNA expression and polymorphisms in the APOE and ACE genes. The association of selected miRNA expression with comorbidities and correlations with selected biochemical parameters (TC, HDL, LDL, TG, vitamin B12), proteins, and diagnostic markers isolated from CSF ($A\beta$ 1-42, $A\beta$ 1-40, p-Tau, t-Tau, $A\beta$ 1-42/ $A\beta$ 1-40, p-Tau/ $A\beta$ 1-42, h-Tau/ $A\beta$ 1-42) were also analyzed.

8.3. Study Group

The study group consisted of 70 patients from the Provincial Clinical Hospital No. 2 in Rzeszów and 27 healthy individuals without dementia as controls. Molecular analysis was performed on 70 patients aged 59-92 years diagnosed with dementia ranging from mild cognitive impairment (MCI) through the three stages of Alzheimer's disease: AD I,

AD II, and AD III. Classification was performed by the staff of the Neurology Clinic with the Stroke Treatment Unit.

8.4. Materials and Methods

The biological material used for the study was biobanked serum from which RNA was isolated according to the manufacturer's QIAGEN miRNeasy Serum/Plasma Advanced methodology. Analysis of selected miRNA expression was performed using qPCR. The miRCURY® LNA® SYBR® Green PCR Kit and specific primers from the miRCURY® LNA® miRNA PCR Assays kit were used for amplification, according to the manufacturer's recommendations.

8.5. Results and Conclusions

Molecular analysis demonstrated that as the disease progresses, there is a decline in the levels of both microRNA-132-3p expression and vitamin B12 concentration. Furthermore, a positive correlation was identified between the expression of microRNA-146a-5p and the values of diagnostic indicators in Alzheimer's disease (AD), specifically pTau/A β 42 and hTau/A β 42. Statistical analysis revealed a relationship between polymorphism in the *APOE* gene and reduced expression of miRNA-132-3p. Additionally, a relationship was observed between polymorphism in the *ACE* gene and the expression levels of miRNA-200a-3p, miRNA-132-3p, and miRNA-146a-5p. The presence of at least one insertion allele (I) in the *ACE* gene resulted in increased expression of microRNA-200a-3p and microRNA-132-3p, and decreased expression of microRNA-146a-5p.

Moreover, statistical analysis of the study group confirmed the influence of age on the stage of dementia. Older individuals tend to exhibit more severe stages of dementia, while younger individuals are more frequently diagnosed with mild cognitive impairment (MCI) or mild Alzheimer's disease impairment (ADI).

9. SPIS RYCIN

RYCINA 1. STANDARDYZOWANY OGÓLNOPOLSKĄ STRUKTURĄ WIEKU I PŁCI WSPÓŁCZYNNIK CHOROBOWOŚCI CHOROBY ALZHEIMERA ORAZ CHORÓB POKREWNYCH WG WOJEWÓDZTWA ZAMIESZKANIA PACJENTA (2024 R.)	14
RYCINA 2. PRZETWARZANIE BIAŁKA PREKURSOROWEGO AMYLOIDU (APP) W SZLAKU NIEAMYLOIDOGENNYM ORAZ AMYLOIDOGENNYM [26]. MODYFIKACJA WŁASNA. ...	17
RYCINA 3. PRAWIDŁOWE BIAŁKO TAU ZAPEWNIAJĄCE SPÓJNOŚĆ MIKROTUBUL CYTOSZKIELETU NEURONÓW (A) ORAZ FOSFORYLOWANE BIAŁKO TAU DESTABILIZUJĄCE STRUKTURĘ MIKROTUBUL [35]. MODYFIKACJA WŁASNA.	19
RYCINA 4. SCHEMAT HIPOTETYCZNYCH POSTĘPUJĄCYCH ZMIAN NA POZIOMIE BIOCHEMICZNYM, KOMÓRKOWYM I KLINICZNYM [58] . MODYFIKACJA WŁASNA	24
RYCINA 5. ETAPY DOJRZEWANIA MIRNA [93]. MODYFIKA WŁASNA.	35
RYCINA 6. LOKALIZACJA GENU KODUJĄCEGO MIR-200A NA CHROMOSOMIE	41
RYCINA 7. LOKALIZACJA GENU KODUJĄCEGO MIR-146A NA CHROMOSOMIE 5.....	42
RYCINA 8. LOKALIZACJA GENU KODUJĄCEGO MIR- 132 NA CHROMOSOMIE 17	44
RYCINA 9. SCHEMAT DRZEWA DECYZYJNEGO.....	94

10. SPIS TABEL

TABELA 1. BIOMARKERY DIAGNOSTYCZNE W CHOROBY ALZHEIMERA Z KRWI.....	27
TABELA 2. SKALA ERLANGEN DIAGNOZUJĄCA CHOROBY ALZHEIMERA	29
TABELA 3. INTERPRETACJA SKALI ERLANGEN	30
TABELA 4. CHARAKTERYSTYKA GRUPY BADANEJ	47
TABELA 5. GENOTYPY ACE DLA POLIMORFIZMU RS1799752 W ZALEŻNOŚCI OD WIELKOŚCI UZYSKANYCH PRODUKTÓW PCR.....	53
TABELA 6. GENOTYPY APOE OKREŚLONE NA PODSTAWIE ANALIZY RESTRYKCYJNEJ.....	55
TABELA 7. SKŁAD MIESZANINY REAKCYJNEJ DO RT-PCR PRZEPISUJĄCEGO miRNA NA cDNA	61
TABELA 8. SKŁAD MIESZANINY REAKCYJNEJ REAL-TIME PCR DO AMPLIFIKACJI cDNA	63
TABELA 9. PODZIAŁ GRUPY BADANEJ ZE WZGLĘDU NA PŁEĆ	67
TABELA 10. WIEK PACJENTA A STADIUM OTĘPIENIA.....	68
TABELA 11. RÓŻNICA ROZKŁADU WIEKU PACJENTÓW W POSZCZEGÓLNYCH PODGRUPACH W ZALEŻNOŚCI OD STADIUM OTĘPIENIA	68
TABELA 12. ZESTAWIENIE CECH KLINICZNYCH PRZEBIEGU CHOROBY AD Z UWZGLĘDNIENIEM PODZIAŁU NA GRUPY MCI, AD I, AD II, AD III ORAZ GRUPĘ KONTROLNĄ K.....	70
TABELA 13. STĘŻENIE BIAŁEK B- AMYLOID W POSZCZEGÓLNYCH GRUPACH BADANYCH.	74
TABELA 14. STĘŻENIE BIAŁEK TAU W POSZCZEGÓLNYCH STADIACH CHOROBY.....	76
TABELA 15. WARTOŚCI CHARAKTERYSTYCZNYCH WSKAŹNIKÓW DIAGNOSTYCZNYCH W ZALEŻNOŚCI OD STOPNIA ZAAWANSOWANIA AD.....	77
TABELA 16. WSPÓŁCZYNNIK KORELACJI R SPEARMANA EKSPRESJI miRNA Z PARAMETRAMI BIOCHEMICZNYMI W GRUPIE OSÓB Z OTĘPIENIEM	85
TABELA 17. WSPÓŁCZYNNIK KORELACJI R SPEARMANA EKSPRESJI miRNA Z PARAMETRAMI BIOCHEMICZNYMI W GRUPIE KONTROLNEJ	86
TABELA 18. WSPÓŁCZYNNIK KORELACJI R SPEARMANA EKSPRESJI miRNA Z POZIOMEM WSKAŹNIKÓW DIAGNOSTYCZNYCH W GRUPIE OSÓB Z OTĘPIENIEM	87
TABELA 19. IMPUTACJA DANYCH TESTOWANYCH W RAMACH PMM CZ. I.....	92
TABELA 20. IMPUTACJA DANYCH TESTOWANYCH W RAMACH PMM CZ.II	93

11. SPIS WYKRESÓW

WYKRES 1 . SZACOWANY ODSETEK CHORYCH NA CHOROBE ALZHEIMERA I CHOROBY POKREWNE W WYBRANYCH KRAJACH EUROPEJSKICH W LATACH 2014 I 2021	11
WYKRES 2. SZACOWANA LICZBA OSÓB CHORYCH NA CHOROBE ALZHEIMERA I CHOROBY POKREWNE W POLSCE (2000–2021)	12
WYKRES 3. ŚREDNIA WARTOŚĆ REFUNDACJI ŚWIADCZEŃ UDZIELONYCH Z ROZPOZNANIEM GŁÓWNYM CHOROBY ALZHEIMERA LUB CHORÓB POKREWNYCH W WIEKU 55 LAT I WIĘCEJ W PRZELICZENIU NA PACJENTA (2014–2024)	13
WYKRES 4. LICZBA OSÓB CHORYCH NA CHOROBE ALZHEIMERA LUB CHOROBY POKREWNE WG PŁCI I WIEKU (2024R.).....	21
WYKRES 5. WIEK PACJENTÓW PODCZAS DIAGNOSTYKI A STADIUM OTĘPIENIA.....	69
WYKRES 6. POZIOM WITAMINY B ₁₂ W GRUPIE KONTROLNEJ, PACJENTÓW Z MCI ORAZ AD (BEZ WARTOŚCI ODSTAJĄCYCH)	72
WYKRES 7. POZIOM WITAMINY B ₁₂ Z PODZIAŁEM NA GRUPY W ZALEŻNOŚCI OD STOPNIA ZAAWANSOWANIA CHOROBY ORAZ W GRUPIE KONTROLNEJ (BEZ WARTOŚCI ODSTAJĄCYCH).....	73
WYKRES 8. STĘŻENIE BETA AMYLOIDU 1-42 (Ab42) Z PODZIAŁEM NA GRUPY W ZALEŻNOŚCI OD STOPNIA ZAAWANSOWANIA CHOROBY ORAZ W GRUPIE KONTROLNEJ	75
WYKRES 9. POZIOM WSPÓŁCZYNNIKA hTAU/ Ab1-42 Z PODZIAŁEM NA GRUPY W ZALEŻNOŚCI OD STOPNIA ZAAWANSOWANIA CHOROBY ORAZ W GRUPIE KONTROLNEJ.	78
WYKRES 10. ROZKŁAD PROCENTOWY WYSTĘPOWANIA POSZCZEGÓLNYCH GENOTYPÓW W rs429358 I rs7412 W GENIE APOE Z PODZIAŁEM NA STADIUM OTĘPIENIA	80
WYKRES 11. ROZKŁAD PROCENTOWY WYSTĘPOWANIA POSZCZEGÓLNYCH GENOTYPÓW W rs1799752 GENU ACE Z PODZIAŁEM NA STADIUM OTĘPIENIA.....	81
WYKRES 12. RÓŻNICA EKSPRESJI miR-132-3P W GRUPIE MCI, AD , K (BEZ WARTOŚCI ODSTAJĄCYCH).	82
WYKRES 13. RÓŻNICA EKSPRESJI miR-132-3P W GRUPIE MCI, AD I, AD II, AD III, K (BEZ WARTOŚCI ODSTAJĄCYCH).	83
WYKRES 14. POZIOM EKSPRESJI miRNA 132-3P W ZALEŻNOŚCI OD PŁCI	84
WYKRES 15. RÓŻNICA EKSPRESJI miR-132-3P W POSZCZEGÓLNYCH IZOFORMACH GENU APOE	88

WYKRES 16. RÓŻNICA EKSPRESJI miR-200a-3p W POSZCZEGÓLNYCH GENOTYPACH GENU ACE	89
WYKRES 17. RÓŻNICA EKSPRESJI miR-132-3p W POSZCZEGÓLNYCH GENOTYPACH GENU ACE	90
WYKRES 18. RÓŻNICA EKSPRESJI miR-146a-5p W POSZCZEGÓLNYCH GENOTYPACH GENU ACE	91
WYKRES 19. KRZYWA ROC DLA KLASYFIKATORA OTĘPIENIA W GRUPIE TRENINGOWEJ .	95
WYKRES 20. KRZYWA ROC DLA KLASYFIKATORA OTĘPIENIA W GRUPIE TESTOWEJ	95

12. PIŚMIENNICTWO

1. Siedlecki-Wullich, D., A.J. Miñano-Molina, and J. Rodríguez-Álvarez, *microRNAs as Early Biomarkers of Alzheimer's Disease: A Synaptic Perspective*. Cells, 2021. **10**(1): p. 113.
2. McKhann, G., et al., *Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group* under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease*. Neurology, 1984. **34**(7): p. 939-939.
3. Prince, M., et al., *World Alzheimer Report 2016.Improving healthcare for people living with dementia: Coverage, Quality and costs now and in the future*. 2016, Alzheimer's Disease International.
4. Braak, H. and E. Braak, *Diagnostic criteria for neuropathologic assessment of Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 1997. **18**(4 Suppl): p. S85-8.
5. Reitz, C., C. Brayne, and R. Mayeux, *Epidemiology of Alzheimer disease*. Nature Reviews Neurology, 2011. **7**(3): p. 137-152.
6. *Raport Narodowego Funduszu Zdrowia*. 2024; <https://ezdrowie.gov.pl/portal/home/badania-i-dane/zdrowe-dane/raporty/nfz-o-zdrowiu-choroba-alzheimera-i-choroby-pokrewne>.
7. Zhang, H., J. Liang, and N. Chen, *The Potential Role of miRNA-Regulated Autophagy in Alzheimer's Disease*. International Journal of Molecular Sciences, 2022. **23**(14): p. 7789.
8. Tasker, R., et al., *Co-Expression Network Analysis of Micro-RNAs and Proteins in the Alzheimer's Brain: A Systematic Review of Studies in the Last 10 Years*. Cells, 2021. **10**(12): p. 3479.
9. Jack, C.R., Jr., et al., *NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement, 2018. **14**(4): p. 535-562.
10. Adwan, L. and N.H. Zawia, *Epigenetics: A novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease*. Pharmacology & Therapeutics, 2013. **139**(1): p. 41-50.
11. Millan, M.J., *The epigenetic dimension of Alzheimer's disease: causal, consequence, or curiosity?* Dialogues in Clinical Neuroscience, 2014. **16**(3): p. 373-393.
12. Zhao, Y., et al., *microRNA-Based Biomarkers in Alzheimer's Disease (AD)*. Front Neurosci, 2020. **14**: p. 585432.
13. Chen, M.-L., et al., *Inhibition of miR-331-3p and miR-9-5p ameliorates Alzheimer's disease by enhancing autophagy*. Theranostics, 2021. **11**(5): p. 2395-2409.
14. Moradifard, S., et al., *Analysis of microRNA and Gene Expression Profiles in Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis Approach*. Scientific Reports, 2018. **8**(1).
15. Mastroeni, D., et al., *Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease*. Neurobiology of Aging, 2011. **32**(7): p. 1161-1180.
16. Han, C., et al., *Mechanism of microRNA-22 in regulating neuroinflammation in Alzheimer's disease*. Brain and Behavior, 2020. **10**(6).
17. Silvestro, Bramanti, and Mazzon, *Role of miRNAs in Alzheimer's Disease and Possible Fields of Application*. International Journal of Molecular Sciences, 2019. **20**(16): p. 3979.

18. Chyung, A.S., et al., *Novel beta-secretase cleavage of beta-amyloid precursor protein in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells*. J Cell Biol, 1997. **138**(3): p. 671-80.
19. Eriksen, J.L. and C.G. Janus, *Plaques, tangles, and memory loss in mouse models of neurodegeneration*. Behav Genet, 2007. **37**(1): p. 79-100.
20. Wang, M., L. Qin, and B. Tang, *MicroRNAs in Alzheimer's Disease*. Front Genet, 2019. **10**: p. 153.
21. Sathya, M., et al., *BACE1 in Alzheimer's disease*. Clin Chim Acta, 2012. **414**: p. 171-8.
22. Deng, Y., et al., *Amyloid- β protein ($A\beta$) Glu11 is the major β -secretase site of β -site amyloid- β precursor protein-cleaving enzyme 1(BACE1), and shifting the cleavage site to $A\beta$ Asp1 contributes to Alzheimer pathogenesis*. Eur J Neurosci, 2013. **37**(12): p. 1962-9.
23. Kovacs, D.M., et al., *Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells*. Nat Med, 1996. **2**(2): p. 224-9.
24. Li, J., et al., *Alzheimer presenilins in the nuclear membrane, interphase kinetochores, and centrosomes suggest a role in chromosome segregation*. Cell, 1997. **90**(5): p. 917-27.
25. Wolfe, M.S., et al., *Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity*. Nature, 1999. **398**(6727): p. 513-7.
26. Arslan D, M.J., Kulczyńska-Przybik A, *Diagnosis of Alzheimer's disease- the role of biochemical markers*. 2022: Diagnostyka Laboratoryjna. p. 120-129.
27. Neve, R.L., et al., *Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2*. Brain Res, 1986. **387**(3): p. 271-80.
28. Delobel, P., et al., *Abnormal Tau phosphorylation of the Alzheimer-type also occurs during mitosis*. Journal of Neurochemistry, 2002. **83**(2): p. 412-420.
29. Hanger, D.P., B.H. Anderton, and W. Noble, *Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease*. Trends Mol Med, 2009. **15**(3): p. 112-9.
30. Goedert, M., et al., *Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(11): p. 4051-5.
31. Hutton, M., et al., *Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17*. Nature, 1998. **393**(6686): p. 702-5.
32. Alonso, A.C., I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal, *Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules*. Nat Med, 1996. **2**(7): p. 783-7.
33. Lu, P.-J., et al., *The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein*. Nature, 1999. **399**(6738): p. 784-788.
34. Delacourte, A., et al., *Nonoverlapping but synergetic tau and APP pathologies in sporadic Alzheimer's disease*. Neurology, 2002. **59**(3): p. 398-407.
35. Mazanetz, M.P. and P.M. Fischer, *Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases*. Nature Reviews Drug Discovery, 2007. **6**(6): p. 464-479.

36. Chang, W.-S., et al., *Genome-Wide Profiling of miRNA and mRNA Expression in Alzheimer's Disease*. Medical Science Monitor, 2017. **23**: p. 2721-2731.
37. Evans, D.A., et al., *Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported*. Jama, 1989. **262**(18): p. 2551-6.
38. Rebeck, G.W., et al., *Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions*. Neuron, 1993. **11**(4): p. 575-80.
39. Riedel, B.C., P.M. Thompson, and R.D. Brinton, *Age, APOE and sex: Triad of risk of Alzheimer's disease*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2016. **160**: p. 134-147.
40. Campion, D., et al., *Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum*. Am J Hum Genet, 1999. **65**(3): p. 664-70.
41. Tun, H., et al., *Lipid rafts play an important role in A beta biogenesis by regulating the beta-secretase pathway*. J Mol Neurosci, 2002. **19**(1-2): p. 31-5.
42. Lambert, J.-C. and P. Amouyel, *Genetics of Alzheimer's disease: new evidences for an old hypothesis?* Current Opinion in Genetics & Development, 2011. **21**(3): p. 295-301.
43. Poirier, J., et al., *Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease*. The Lancet, 1993. **342**(8873): p. 697-699.
44. Sando, S.B., et al., *APOE epsilon 4 lowers age at onset and is a high risk factor for Alzheimer's disease; a case control study from central Norway*. BMC Neurol, 2008. **8**: p. 9.
45. Genin, E., et al., *APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance*. Mol Psychiatry, 2011. **16**(9): p. 903-7.
46. Serrano-Pozo, A., S. Das, and B.T. Hyman, *APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches*. Lancet Neurol, 2021. **20**(1): p. 68-80.
47. Evans, D.A., et al., *Incidence of Alzheimer Disease in a Biracial Urban Community*. Archives of Neurology, 2003. **60**(2): p. 185.
48. Reid, I.A., *Interactions between ANG II, sympathetic nervous system, and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure*. Am J Physiol, 1992. **262**(6 Pt 1): p. E763-78.
49. Bernstein, K.E., et al., *A modern understanding of the traditional and nontraditional biological functions of angiotensin-converting enzyme*. Pharmacol Rev, 2013. **65**(1): p. 1-46.
50. Kehoe, P.G., et al., *Haplotypes extending across ACE are associated with Alzheimer's disease*. Human Molecular Genetics, 2003. **12**(8): p. 859-867.
51. Yang, Y.H. and C.K. Liu, *Angiotensin-converting enzyme gene in Alzheimer's disease*. Tohoku J Exp Med, 2008. **215**(4): p. 295-8.
52. Lehmann, D.J., et al., *Large Meta-Analysis Establishes the ACE Insertion-Deletion Polymorphism as a Marker of Alzheimer's Disease*. American Journal of Epidemiology, 2005. **162**(4): p. 305-317.
53. Zubenko, G.S., et al., *Cerebrospinal fluid levels of angiotensin-converting enzyme in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy*. Brain Research, 1985. **328**(2): p. 215-221.
54. Hu, J., et al., *Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (A beta); retards A beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity*. J Biol Chem, 2001. **276**(51): p. 47863-8.

55. Arregui, A., et al., *Angiotensin converting enzyme in Alzheimer's disease: increased activity in caudate nucleus and cortical areas*. Journal of Neurochemistry, 1982. **38**(5): p. 1490-1492.
56. Kenny, A., et al., *Elevated Plasma microRNA-206 Levels Predict Cognitive Decline and Progression to Dementia from Mild Cognitive Impairment*. Biomolecules, 2019. **9**(11): p. 734.
57. De Felice, B., et al., *MicroRNA Expression Signature in Mild Cognitive Impairment Due to Alzheimer's Disease*. Molecular Neurobiology, 2020. **57**(11): p. 4408-4416.
58. Balusu, S., et al., *Neurodegeneration cell per cell*. Neuron, 2023. **111**(6): p. 767-786.
59. Folstein, M.F., S.E. Folstein, and P.R. McHugh, *"Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician*. J Psychiatr Res, 1975. **12**(3): p. 189-98.
60. Zhang, F., et al., *Combination of Serum and Plasma Biomarkers Could Improve Prediction Performance for Alzheimer's Disease*. Genes, 2022. **13**(10): p. 1738.
61. Smirnov, D.S., et al., *Plasma biomarkers for Alzheimer's Disease in relation to neuropathology and cognitive change*. Acta Neuropathol, 2022. **143**(4): p. 487-503.
62. Barthélemy, N.R., et al., *Blood plasma phosphorylated-tau isoforms track CNS change in Alzheimer's disease*. Journal of Experimental Medicine, 2020. **217**(11).
63. Moscoso, A., et al., *Time course of phosphorylated-tau181 in blood across the Alzheimer's disease spectrum*. Brain, 2021. **144**(1): p. 325-339.
64. Brickman, A.M., et al., *Plasma p-tau181, p-tau217, and other blood-based Alzheimer's disease biomarkers in a multi-ethnic, community study*. Alzheimer's & Dementia, 2021. **17**(8): p. 1353-1364.
65. Zhou, S., et al., *Alzheimer's disease, a metabolic disorder: Clinical advances and basic model studies (Review)*. Exp Ther Med, 2024. **27**(2): p. 63.
66. Somers, C., et al., *Validation of the Erlangen Score Algorithm for Differential Dementia Diagnosis in Autopsy-Confirmed Subjects*. J Alzheimers Dis, 2019. **68**(3): p. 1151-1159.
67. Lewczuk, P., et al., *Cerebrospinal fluid and blood biomarkers for neurodegenerative dementias: An update of the Consensus of the Task Force on Biological Markers in Psychiatry of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*. World J Biol Psychiatry, 2018. **19**(4): p. 244-328.
68. Zampetaki, A., et al., *Profiling of circulating microRNAs: from single biomarkers to re-wired networks*. Cardiovasc Res, 2012. **93**(4): p. 555-62.
69. Jia, L., et al., *Prediction of P-tau/A β 42 in the cerebrospinal fluid with blood microRNAs in Alzheimer's disease*. BMC Medicine, 2021. **19**(1).
70. Alzheimer Europe Organization. 2025; <https://www.alzheimer-europe.org/dementia/alzheimers-dementia>.
71. Lu, L., et al., *Analysis of Serum miRNAs in Alzheimer's Disease*. American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias, 2021. **36**: p. 153331752110217.
72. Valera, E., B. Spencer, and E. Masliah, *Immunotherapeutic Approaches Targeting Amyloid- β , α -Synuclein, and Tau for the Treatment of Neurodegenerative Disorders*. Neurotherapeutics, 2016. **13**(1): p. 179-89.

73. Farlow, M.R., et al., *Long-term treatment with active A β immunotherapy with CAD106 in mild Alzheimer's disease*. *Alzheimers Res Ther*, 2015. **7**(1): p. 23.
74. Vitek, G.E., B. Decourt, and M.N. Sabbagh, *Lecanemab (BAN2401): an anti-beta-amyloid monoclonal antibody for the treatment of Alzheimer disease*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2023. **32**(2): p. 89-94.
75. Bateman Randall, J., et al., *Two Phase 3 Trials of Gantenerumab in Early Alzheimer's Disease*. *New England Journal of Medicine*, 2023. **389**(20): p. 1862-1876.
76. Liu-Seifert, H., et al., *Delayed-Start Analyses in the Phase 3 Solanezumab EXPEDITION3 Study in Mild Alzheimer's Disease*. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 2018. **5**(1): p. 8-14.
77. Genentech. 2022; Available from: www.gene.com/media/press-releases/14957/2022-06-15/genentech-provides-update-on-alzheimers-.
78. Budda, B., et al., *Development of AL101 (GSK4527226), a progranulin-elevating monoclonal antibody, as a potential treatment for Alzheimer's disease*. *Alzheimers Res Ther*, 2025. **17**(1): p. 174.
79. Młynarczyk, R., et al., *Choroba Alzheimera — nowe strategie leczenia*. *Psychiatria*, 2016. **13**(4): p. 210-214.
80. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. *Cell*, 1993. **75**(5): p. 843-54.
81. Ambros, V., et al., *MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in C. elegans*. *Curr Biol*, 2003. **13**(10): p. 807-18.
82. O'Brien, J., et al., *Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018. **9**: p. 402.
83. Gregory, R.I. and R. Shiekhattar, *MicroRNA biogenesis and cancer*. *Cancer Res*, 2005. **65**(9): p. 3509-12.
84. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. *Embo j*, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
85. Hammond, S.M., *An overview of microRNAs*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015. **87**: p. 3-14.
86. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. *Science*, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
87. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. *Nature*, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
88. Koralewska, N., et al., *Ludzka rybonukleaza Dicer — struktura i funkcje biologiczne*. *Postępy Biochemii*, 2019. **65**: p. 173-182.
89. Swarbrick, S., et al., *Systematic Review of miRNA as Biomarkers in Alzheimer's Disease*. *Molecular Neurobiology*, 2019. **56**(9): p. 6156-6167.
90. Zhao, Y., et al., *Regulation of Neurotropic Signaling by the Inducible, NF-kB-Sensitive miRNA-125b in Alzheimer's Disease (AD) and in Primary Human Neuronal-Glial (HNG) Cells*. *Molecular Neurobiology*, 2014. **50**(1): p. 97-106.
91. Delay, C., et al., *miRNA-dependent target regulation: functional characterization of single-nucleotide polymorphisms identified in genome-wide association studies of Alzheimer's disease*. *Alzheimer's Research & Therapy*, 2016. **8**(1).
92. Ambros, V., *MicroRNA-mediated gene regulation and the resilience of multicellular animals*. *Postępy Biochem*, 2024. **70**(1): p. 62-70.

93. Lang, M.-F. and Y. Shi, *Dynamic Roles of microRNAs in Neurogenesis*. Frontiers in Neuroscience, 2012. **6**: p. 71.
94. *MiRBase*. 2025; <https://www.mirbase.org/browse/results/?organism=hsa>.
95. Lim, L.P., et al., *Vertebrate microRNA genes*. Science, 2003. **299**(5612): p. 1540-1540.
96. Angelucci, F., et al., *MicroRNAs in Alzheimer's Disease: Diagnostic Markers or Therapeutic Agents?* Front Pharmacol, 2019. **10**: p. 665.
97. Huntzinger, E. and E. Izaurralde, *Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(2): p. 99-110.
98. Bartel, D.P., *MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-297.
99. Zeng, Q., et al., *Expression of microRNA-222 in serum of patients with Alzheimer's disease*. Molecular Medicine Reports, 2017. **16**(4): p. 5575-5579.
100. Simonson, B. and S. Das, *MicroRNA Therapeutics: the Next Magic Bullet?* Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2015. **15**(6): p. 467-474.
101. Patel, N., et al., *MicroRNAs can regulate human APP levels*. Mol Neurodegener, 2008. **3**: p. 10.
102. Li, Q., et al., *MicroRNA-101a Regulates Autophagy Phenomenon via the MAPK Pathway to Modulate Alzheimer's-Associated Pathogenesis*. Cell Transplant, 2019. **28**(8): p. 1076-1084.
103. Hébert, S.S., et al., *MicroRNA regulation of Alzheimer's Amyloid precursor protein expression*. Neurobiol Dis, 2009. **33**(3): p. 422-8.
104. Liu, C.-g., et al., *MicroRNA-135a and -200b, potential Biomarkers for Alzheimer's disease, regulate β secretase and amyloid precursor protein*. Brain Research, 2014. **1583**: p. 55-64.
105. Yang, G., et al., *MicroRNA-29c targets β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and has a neuroprotective role in vitro and in vivo*. Mol Med Rep, 2015. **12**(2): p. 3081-3088.
106. Zhang, Y., et al., *MicroRNA-135b has a neuroprotective role via targeting of β -site APP-cleaving enzyme 1*. Exp Ther Med, 2016. **12**(2): p. 809-814.
107. Ai, J., et al., *MicroRNA-195 Protects Against Dementia Induced by Chronic Brain Hypoperfusion via Its Anti-Amyloidogenic Effect in Rats*. The Journal of Neuroscience, 2013. **33**(9): p. 3989-4001.
108. Zhao, Y., V. Jaber, and W.J. Lukiw, *Over-Expressed Pathogenic miRNAs in Alzheimer's Disease (AD) and Prion Disease (PrD) Drive Deficits in TREM2-Mediated A β 42 Peptide Clearance*. Front Aging Neurosci, 2016. **8**: p. 140.
109. Wang, X., et al., *MicroRNA-138 promotes tau phosphorylation by targeting retinoic acid receptor alpha*. FEBS Lett, 2015. **589**(6): p. 726-9.
110. Wang, G., et al., *MicroRNA-146a suppresses ROCK1 allowing hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 26697.
111. Kumar, S. and P.H. Reddy, *The role of synaptic microRNAs in Alzheimer's disease*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020. **1866**(12): p. 165937.
112. Islam, M.R., et al., *A microRNA signature that correlates with cognition and is a target against cognitive decline*. EMBO Mol Med, 2021. **13**(11): p. e13659.
113. *The Human ncRNA Gene DataBase*. 2025; <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene>.

114. Wang, L., et al., *MicroRNA-200a-3p Mediates Neuroprotection in Alzheimer-Related Deficits and Attenuates Amyloid-Beta Overproduction and Tau Hyperphosphorylation via Coregulating BACE1 and PRKACB*. Front Pharmacol, 2019. **10**: p. 806.
115. Zhang, Q.S., W. Liu, and G.X. Lu, *miR-200a-3p promotes b-Amyloid-induced neuronal apoptosis through down-regulation of SIRT1 in Alzheimer's disease*. J Biosci, 2017. **42**(3): p. 397-404.
116. Huang, P., M. Xu, and Y.X. He, *MicroRNA-146a regulates the expression of the A β 1-42 protein in Alzheimer's disease*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2021. **25**(4): p. 2003-2012.
117. Maffioletti, E., et al., *miR-146a Plasma Levels Are Not Altered in Alzheimer's Disease but Correlate With Age and Illness Severity*. Front Aging Neurosci, 2019. **11**: p. 366.
118. Hernandez-Rapp, J., et al., *microRNA-132/212 deficiency enhances A β production and senile plaque deposition in Alzheimer's disease triple transgenic mice*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 30953.
119. Deng, Y., et al., *miR-132 improves the cognitive function of rats with Alzheimer's disease by inhibiting the MAPK1 signal pathway*. Exp Ther Med, 2020. **20**(6): p. 159.
120. Engvall, E. and P. Perlmann, *Enzyme linked immunosorbant assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 1974. **8**.
121. Sanhueza, J.A., et al., *Association of Anxiety-Related Polymorphisms with Sports Performance in Chilean Long Distance Triathletes: A Pilot Study*. J Sports Sci Med, 2016. **15**(4): p. 554-561.
122. Zivelin, A., et al., *Improved method for genotyping apolipoprotein E polymorphisms by a PCR-based assay simultaneously utilizing two distinct restriction enzymes*. Clin Chem, 1997. **43**(9): p. 1657-9.
123. Brock, T.D. and H. Freeze, *Thermus aquaticus gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile*. J Bacteriol, 1969. **98**(1): p. 289-97.
124. Brow, D.A. and C. Guthrie, *Spliceosomal RNA U6 is remarkably conserved from yeast to mammals*. Nature, 1988. **334**(6179): p. 213-218.
125. Anderson, M.A.E., et al., *Expanding the CRISPR Toolbox in Culicine Mosquitoes: In Vitro Validation of Pol III Promoters*. ACS Synthetic Biology, 2020. **9**(3): p. 678-681.
126. Dieci, G., M. Preti, and B. Montanini, *Eukaryotic snoRNAs: a paradigm for gene expression flexibility*. Genomics, 2009. **94**(2): p. 83-8.
127. Sauer, E., et al., *An evidence based strategy for normalization of quantitative PCR data from miRNA expression analysis in forensic organ tissue identification*. Forensic Science International: Genetics, 2014. **13**: p. 217-223.
128. Gao, S., et al., *The Relationships Between Age, Sex, and the Incidence of Dementia and Alzheimer Disease: A Meta-analysis*. Archives of General Psychiatry, 1998. **55**(9): p. 809-815.
129. Bowirrat, A., et al., *Genetic and environmental risk factors for Alzheimer's disease in Israeli Arabs*. J Mol Neurosci, 2002. **19**(1-2): p. 239-45.
130. Gavrilova, S.I. and A.L. Bratsun, *[Epidemiology and risk factors of Alzheimer's disease]*. Vestn Ross Akad Med Nauk, 1999(1): p. 39-46.
131. Karve, S.J., et al., *Comparison of clinical characteristics between familial and non-familial early onset Alzheimer's disease*. J Neurol, 2012. **259**(10): p. 2182-8.
132. Peters, R., *Ageing and the brain*. Postgrad Med J, 2006. **82**(964): p. 84-8.

133. Esiri, M.M., *Ageing and the brain*. J Pathol, 2007. **211**(2): p. 181-7.
134. Bowen, D.M. and A.N. Davison, *Biochemical changes in the cholinergic system of the ageing brain and in senile dementia*. Psychol Med, 1980. **10**(2): p. 315-9.
135. Talbot, K. and H.Y. Wang, *The nature, significance, and glucagon-like peptide-1 analog treatment of brain insulin resistance in Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement, 2014. **10**(1 Suppl): p. S12-25.
136. Lopez-Lee, C., et al., *Mechanisms of sex differences in Alzheimer's disease*. Neuron, 2024. **112**(8): p. 1208-1221.
137. Xiong, J., et al., *FSH blockade improves cognition in mice with Alzheimer's disease*. Nature, 2022. **603**(7901): p. 470-476.
138. Pinto-Almazán, R., et al., *Effect of chronic administration of estradiol, progesterone, and tibolone on the expression and phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β and the microtubule-associated protein tau in the hippocampus and cerebellum of female rat*. J Neurosci Res, 2012. **90**(4): p. 878-86.
139. Ferretti, M.T., et al., *Sex differences in Alzheimer disease—the gateway to precision medicine*. Nature Reviews Neurology, 2018. **14**(8): p. 457-469.
140. Irwin, R.W., et al., *Selective oestrogen receptor modulators differentially potentiate brain mitochondrial function*. Journal of neuroendocrinology, 2012. **24**(1): p. 236-248.
141. Sundermann, E.E., et al., *Women's higher brain metabolic rate compensates for early Alzheimer's pathology*. Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring, 2020. **12**(1): p. e12121.
142. Kinney, J.W., et al., *Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease*. Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions, 2018. **4**: p. 575-590.
143. Ratnakumar, A., et al., *Estrogen activates Alzheimer's disease genes*. Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions, 2019. **5**: p. 906-917.
144. Green, R., et al., *Vitamin B12 deficiency*. Nature reviews Disease primers, 2017. **3**(1): p. 1-20.
145. Zhuo, J.-M. and D. Praticò, *Acceleration of brain amyloidosis in an Alzheimer's disease mouse model by a folate, vitamin B6 and B12-deficient diet*. Experimental gerontology, 2010. **45**(3): p. 195-201.
146. Alam, P., et al., *Vitamin B12 offers neuronal cell protection by inhibiting A β -42 amyloid fibrillation*. International journal of biological macromolecules, 2017. **99**: p. 477-482.
147. Perla-Kaján, J., et al., *Paraoxonase 1, B vitamins supplementation, and mild cognitive impairment*. Journal of Alzheimer's Disease, 2021. **81**(3): p. 1211-1229.
148. Ma, F., et al., *Effects of folic acid and vitamin B12, alone and in combination on cognitive function and inflammatory factors in the elderly with mild cognitive impairment: a single-blind experimental design*. Current Alzheimer Research, 2019. **16**(7): p. 622-632.
149. De Jager, C.A., et al., *Cognitive and clinical outcomes of homocysteine-lowering B-vitamin treatment in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial*. International journal of geriatric psychiatry, 2012. **27**(6): p. 592-600.

150. Rasmussen, J., *The LipiDiDiet trial: what does it add to the current evidence for Fortasyn Connect in early Alzheimer's disease?* Clinical interventions in aging, 2019: p. 1481-1492.
151. Shen, L. and H.-F. Ji, *Associations between homocysteine, folic acid, vitamin B12 and Alzheimer's disease: insights from meta-analyses.* Journal of Alzheimer's Disease, 2015. **46**(3): p. 777-790.
152. Castellano, J.M., et al., *Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance.* Science translational medicine, 2011. **3**(89): p. 89ra57-89ra57.
153. Xiong, H., et al., *Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high β -and γ -secretase activities and A β production.* Neurobiology of disease, 2008. **29**(3): p. 422-437.
154. Grimm, M.O.W., et al., *Independent inhibition of Alzheimer disease β -and γ -secretase cleavage by lowered cholesterol levels.* Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(17): p. 11302-11311.
155. Burillo, J., et al., *Insulin Resistance and Diabetes Mellitus in Alzheimer's Disease.* Cells, 2021. **10**(5).
156. Nguyen, T.T., et al., *Role of insulin resistance in the Alzheimer's disease progression.* Neurochemical research, 2020. **45**: p. 1481-1491.
157. Nguyen, T.T., et al., *Type 3 Diabetes and Its Role Implications in Alzheimer's Disease.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(9).
158. Farris, W., et al., *Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid β -protein, and the β -amyloid precursor protein intracellular domain in vivo.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(7): p. 4162-4167.
159. Rönnekaa, E., et al., *Impaired insulin secretion increases the risk of Alzheimer disease.* Neurology, 2008. **71**(14): p. 1065-71.
160. Asada, T., T. Motonaga, and T. Kinoshita, *Predictors of severity of behavioral disturbance among community-dwelling elderly individuals with Alzheimer's disease: a 6-year follow-up study.* Psychiatry and clinical neurosciences, 2000. **54**(6): p. 673-677.
161. Singh, N.K., et al., *Gene–environment interaction in Alzheimer's disease.* American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias®, 2012. **27**(7): p. 496-503.
162. *N CBI. National Center for Biotechnology Information APOE gene.*
163. Huang, Y., et al., *Apolipoprotein E: diversity of cellular origins, structural and biophysical properties, and effects in Alzheimer's disease.* Journal of Molecular Neuroscience, 2004. **23**: p. 189-204.
164. Ward, A., et al., *Prevalence of apolipoprotein E4 genotype and homozygotes (APOE e4/4) among patients diagnosed with Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis.* Neuroepidemiology, 2012. **38**(1): p. 1-17.
165. Farrer, L.A., 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): p. 1349-56.
166. Pontifex, M., D. Vauzour, and A.-M. Minihane, *The effect of APOE genotype on Alzheimer's disease risk is influenced by sex and docosahexaenoic acid status.* Neurobiology of aging, 2018. **69**: p. 209-220.

167. Qin, W., et al., *Race-Related Association between APOE Genotype and Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis*. J Alzheimers Dis, 2021. **83**(2): p. 897-906.
168. Agarwal, R. and C.B. Tripathi, *Association of Apolipoprotein E Genetic Variation in Alzheimer's Disease in Indian Population: A Meta-Analysis*. American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias®, 2014. **29**(7): p. 575-582.
169. Tran, T.T.T., et al., *APOE genotype influences the gut microbiome structure and function in humans and mice: relevance for Alzheimer's disease pathophysiology*. Faseb j, 2019. **33**(7): p. 8221-8231.
170. Sebastiani, P., et al., *APOE Alleles and Extreme Human Longevity*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2019. **74**(1): p. 44-51.
171. Liu, S., et al., *A clinical dose of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor and heterozygous ACE deletion exacerbate Alzheimer's disease pathology in mice*. Journal of Biological Chemistry, 2019. **294**(25): p. 9760-9770.
172. Cafiero, C., et al., *Angiotensin system polymorphisms' in SARS-CoV-2 positive patients: assessment between symptomatic and asymptomatic patients: a pilot study*. Pharmacogenomics and personalized medicine, 2021: p. 621-629.
173. Xin, X.Y., et al., *Angiotensin-converting enzyme polymorphisms AND Alzheimer's disease susceptibility: An updated meta-analysis*. PLoS One, 2021. **16**(11): p. e0260498.
174. Hu, J., et al., *Angiotensin-converting enzyme genotype is associated with Alzheimer disease in the Japanese population*. Neurosci Lett, 1999. **277**(1): p. 65-7.
175. Elkins, J.S., V.C. Douglas, and S.C. Johnston, *Alzheimer disease risk and genetic variation in ACE*. Neurology, 2004. **62**(3): p. 363-368.
176. Nacmias, B., et al., *Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism in sporadic and familial Alzheimer's disease and longevity*. Arch Gerontol Geriatr, 2007. **45**(2): p. 201-6.
177. Wang, H.K., et al., *Apolipoprotein E, angiotensin-converting enzyme and kallikrein gene polymorphisms and the risk of Alzheimer's disease and vascular dementia*. J Neural Transm (Vienna), 2006. **113**(10): p. 1499-509.
178. Katzov, H., et al., *A cladistic model of ACE sequence variation with implications for myocardial infarction, Alzheimer disease and obesity*. Human molecular genetics, 2004. **13**(21): p. 2647-2657.
179. Hemming, M.L. and D.J. Selkoe, *Amyloid β -Protein Is Degraded by Cellular Angiotensin-converting Enzyme (ACE) and Elevated by an ACE Inhibitor**. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(45): p. 37644-37650.
180. Taganov, K.D., et al., *NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(33): p. 12481-6.
181. Lukiw, W.J., et al., *Upregulation of micro RNA-146a (miRNA-146a), a marker for inflammatory neurodegeneration, in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD) and Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) syndrome*. J Toxicol Environ Health A, 2011. **74**(22-24): p. 1460-8.
182. Pogue, A., Y. Zhao, and W. Lukiw, *microRNA-146a as a biomarker for transmissible spongiform encephalopathy*. Folia Neuropathol, 2022. **60**(1): p. 24-34.

183. Lukiw, W.J., *microRNA-146a Signaling in Alzheimer's Disease (AD) and Prion Disease (PrD)*. Front Neurol, 2020. **11**: p. 462.
184. Perry, M.M., et al., *Rapid Changes in MicroRNA-146a Expression Negatively Regulate the IL-1 β -Induced Inflammatory Response in Human Lung Alveolar Epithelial Cells*. The Journal of Immunology, 2008. **180**(8): p. 5689-5698.
185. Lee, H.M., T.S. Kim, and E.K. Jo, *MiR-146 and miR-125 in the regulation of innate immunity and inflammation*. BMB Rep, 2016. **49**(6): p. 311-8.
186. Li, Y.Y., et al., *Increased expression of miRNA-146a in Alzheimer's disease transgenic mouse models*. Neurosci Lett, 2011. **487**(1): p. 94-8.
187. Alexandrov, P.N., et al., *Synergistic effects of iron and aluminum on stress-related gene expression in primary human neural cells*. Journal of Alzheimer's Disease, 2005. **8**(2): p. 117-127.
188. Cui, J.G., et al., *Differential regulation of interleukin-1 receptor-associated kinase-1 (IRAK-1) and IRAK-2 by microRNA-146a and NF-kappaB in stressed human astroglial cells and in Alzheimer disease*. J Biol Chem, 2010. **285**(50): p. 38951-60.
189. Arena, A., et al., *Developmental Expression and Dysregulation of miR-146a and miR-155 in Down's Syndrome and Mouse Models of Down's Syndrome and Alzheimer's Disease*. Curr Alzheimer Res, 2017. **14**(12): p. 1305-1317.
190. Zhang, B., et al., *MicroRNA-146a represses LRP2 translation and leads to cell apoptosis in Alzheimer's disease*. FEBS Lett, 2016. **590**(14): p. 2190-200.
191. Mohamed, A., et al., *Evaluation of miRNA-146a, miRNA-34a, and Pro-inflammatory Cytokines as a Potential Early Indicators for Type 1 Diabetes Mellitus*. Non-coding RNA Research, 2024. **9**.
192. Al-Attabi, A., et al., *Evaluation of the effect of taurine on the matrix metalloproteinase-9 and the expression changes of miRNA-21 and miRNA-146a in SH-SY5Y cell line*. Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation, 2024. **45**(4): p. 165-170.
193. Teter, B., et al., *Apolipoprotein E isotype-dependent modulation of microRNA-146a in plasma and brain*. Neuroreport, 2016. **27**(11): p. 791-5.
194. Lee, M., et al., *MicroRNA super-resolution imaging in blood for Alzheimer's disease*, in *BMB Rep*. 2023: Korea (South). p. 190-195.
195. Nagaraj, S., et al., *Profile of 6 microRNA in blood plasma distinguish early stage Alzheimer's disease patients from non-demented subjects*. Oncotarget, 2017. **8**(10): p. 16122-16143.
196. Schipper, H.M., et al., *MicroRNA expression in Alzheimer blood mononuclear cells*. Gene Regul Syst Bio, 2007. **1**: p. 263-74.
197. Herskovits, A.Z. and L. Guarente, *SIRT1 in neurodevelopment and brain senescence*. Neuron, 2014. **81**(3): p. 471-83.
198. Kim, D., et al., *SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis*. The EMBO journal, 2007. **26**(13): p. 3169-3179.
199. Ma, X., et al., *Neuroprotective Effect of Resveratrol via Activation of Sirt1 Signaling in a Rat Model of Combined Diabetes and Alzheimer's Disease*. Front Neurosci, 2019. **13**: p. 1400.
200. Salta, E. and B. De Strooper, *microRNA-132: a key noncoding RNA operating in the cellular phase of Alzheimer's disease*. Faseb j, 2017. **31**(2): p. 424-433.
201. Salta, E., et al., *miR-132 loss de-represses ITPKB and aggravates amyloid and TAU pathology in Alzheimer's brain*. EMBO Mol Med, 2016. **8**(9): p. 1005-18.

202. Kouhnavardi, S., et al., *miRNA-132/212 Deficiency Disrupts Selective Corticosterone Modulation of Dorsal vs. Ventral Hippocampal Metaplasticity*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(11).
203. Remenyi, J., et al., *miR-132/212 knockout mice reveal roles for these miRNAs in regulating cortical synaptic transmission and plasticity*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e62509.
204. Bormann, D., et al., *miRNA-132/212 Gene-Deletion Aggravates the Effect of Oxygen-Glucose Deprivation on Synaptic Functions in the Female Mouse Hippocampus*. Cells, 2021. **10**(7).
205. Magill, S.T., et al., *microRNA-132 regulates dendritic growth and arborization of newborn neurons in the adult hippocampus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(47): p. 20382-7.
206. Fu, X., et al., *Identification of potential therapeutic and diagnostic characteristics of Alzheimer disease by targeting the miR-132-3p/FOXO3a-PPM1F axis in APP/PS1 mice*. Brain Res, 2022. **1790**: p. 147983.
207. Zeng, C., et al., *Overexpression of miR-132-3p contributes to neuronal protection in in vitro and in vivo models of Alzheimer's disease*. Behav Brain Res, 2022. **417**: p. 113584.
208. Sbriscia, M., et al., *miR-132-3p is down-regulated in plasma and CD171(+) extracellular vesicles isolated from patients with mild Alzheimer's disease*. Mech Ageing Dev, 2025. **225**: p. 112063.
209. Liu, D.Y. and L. Zhang, *MicroRNA-132 promotes neurons cell apoptosis and activates Tau phosphorylation by targeting GTDC-1 in Alzheimer's disease*. European Review for Medical & Pharmacological Sciences, 2019. **23**(19).