

UNIwersYTET RZESZOWSKI

Collegium Medicum

Wydział Medyczny



mgr Agata Hańko

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

**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 pisania niniejszej rozprawy.*

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

*Pragnę podziękować całemu zespołowi Laboratorium Biologii Molekularnej
Przyrodniczo–Medycznego Centrum Badań Innowacyjnych
za pomoc w realizacji pracy doktorskiej,
szczególnie dr n. med. Marzenie Skrzypta 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	12
1.1 Etiologia i patogeneza choroby Alzheimera	12
1.1.1 Rodzinna postać choroby Alzheimera o wczesnym początku	20
1.1.2 Sporadyczna postać choroby Alzheimera o późnym początku	21
1.1.3 Sposoby diagnozowania i leczenia choroby Alzheimera	24
1.2 MikroRNA i ich rola w ekspresji genów	35
1.2.1 Biogeneza mikroRNA	35
1.2.2 Mechanizmy regulacji genów za pomocą miRNA	37
1.2.3 MiRNA zaangażowane w patogenezę choroby Alzheimera	39
1.2.4 Terapia otępienia alzheimerowskiego z wykorzystaniem miRNA	41
1.3 Przegląd wybranych miRNA pretendujących do roli biomarkerów otępienia	42
1.3.1 MiRNA-200a-3p	42
1.3.2 MiRNA-146a-5p	43
1.3.3 MiRNA-132-3p	45
2 ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	47
3 MATERIAŁY I METODY	48
3.1 Charakterystyka grupy badanej	48
3.2 Kryteria doboru grupy badanej	52
3.3 Materiał biologiczny	53
3.4 Metody	54
3.4.1 Oznaczenie poziomu białek w PMR metodą ELISA	54
3.4.2 Oznaczenie polimorfizmu w genie <i>ACE</i> metodą PCR	55
3.4.3 Oznaczenie polimorfizmu w genie <i>APOE</i> metodą PCR- RFLP	56
3.4.4 Izolacja miRNA z surowicy	57
3.4.5 Analiza ekspresji wybranych miRNA	58
3.4.5.1 Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy PCR	59
3.4.5.2 Synteza cDNA metodą RT-PCR	62
3.4.5.3 Kontrola jakości miRNA — miRCURY LNA® miRNA QC PCR Panel	64
3.4.5.4 Ilościowe oznaczenie ekspresji miRNA metodą real-time PCR	65
3.5 Analiza statystyczna	68
4 WYNIKI	69
4.1 Analiza grupy badanej i kontrolnej pod względem płci i wieku	69
4.2 Analiza grupy badanej i kontrolnej pod względem cech klinicznych	71

4.3	Analiza stężenia białek β - amyloidowych w zależności od stadium choroby	76
4.4	Analiza stężenia białek Tau w zależności od stadium choroby	78
4.5	Analiza charakterystycznych wskaźników w zależności od stadium choroby	79
4.6	Analiza polimorfizmu typu SNP w genie <i>APOE</i> w zależności od stadium otępienia. 81	
4.7	Analiza polimorfizmu insercyjno/delecyjnego (I/D) w genie <i>ACE</i> w zależności od stadium otępienia	82
4.8.	Analiza ekspresji badanych miRNA w zależności od stadium otępienia	83
4.9	Analiza ekspresji badanych miRNA w zależności od wieku oraz płci	87
4.10	Analiza korelacji ekspresji badanych miRNA z parametrami biochemicznymi	88
4.11	Analiza korelacji ekspresji badanych miRNA ze wskaźnikami diagnostycznymi	90
4.12	Analiza związku ekspresji badanych miRNA z polimorfizmem w genie <i>APOE</i>	91
4.13	Analiza związku ekspresji badanych miRNA z polimorfizmem w genie <i>ACE</i>	92
4.14	Modele predykcyjne zaburzeń otępiennych.....	95
5	DYSKUSJA.....	100
5.1	Czynniki ryzyka choroby Alzheimera.....	100
5.2	Choroby współistniejące wśród pacjentów z otępieniem.....	104
5.3	Ryzyka i szanse związane z polimorfizmem w genie <i>APOE</i>	107
5.4	Ryzyka i szanse związane z polimorfizmem w genie <i>ACE</i>	111
5.5	Zmiany poziomu ekspresji miRNA-146a-5p związane ze stadium otępienia.....	114
5.6	Zmiany poziomu ekspresji miRNA-200a-3p związane ze stadium otępienia.....	118
5.7	Zmiany poziomu ekspresji miRNA-132-3p związane ze stadium otępienia	122
5.8	Uwagi końcowe.....	127
6	WNIOSKI.....	130
7	STRESZCZENIE	132
7.1	Wstęp	132
7.2	Cel pracy	132
7.3	Grupa badana	132
7.4	Materiały i metody	133
7.5	Wyniki i wnioski.....	133
8	SUMMARY	134
8.1	Entry.....	134
8.2	Aim of the study.....	134
8.3	Study Group	134
8.4	Materials and Methods.....	135
8.5	Results and Conclusions	135

9	SPIS RYCIN.....	136
10	SPIS TABEL.....	137
11	SPIS WYKRESÓW	138
12	PIŚMIENNICTWO	140
13	ZAŁĄCZNIKI	157

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 Alzheimerera	ang. <i>Mice model Familial Alzheimer Disease</i>
ACE	gen konwertazy angiotensyny	ang. <i>Angiotensin-converting enzyme gene</i>
AD	choroba Alzheimerera	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 białka ApoE2, ApoE3, ApoE4	ang. <i>Apolipoprotein E</i>
APP	białko prekursora amyloidu	ang. <i>amyloid precursor protein</i>
APP	gen prekursora amyloidu	ang. <i>amyloid precursor protein gene</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>
Cq	cykl ilościowy	ang. <i>Quantification Cycle</i>
DCP2	enzym dekapujący mRNA	ang. <i>decapping MRNA 2 enzyme</i>
DGCR8	podjednostka mikroprocesowakrytyczny 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 triphosphates</i>
ECM	macierz zewnątrzkomórkowa	ang. <i>extracellular matrix</i>
EDTA	kwask wersenowy	ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	test immunoenzymatyczny	ang. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EOAD	choroba Alzheimer'a o wczesnym początku	ang. <i>early-onset Alzheimer's disease</i>
ERK2	kinaza białkowa aktywowana mitogenem 2	ang. <i>Extracellular signal-regulated kinase 2</i>
FAD	rodzinna postać choroby Alzheimer'a	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-3 β	ang. <i>glikogen synthase kinase 3 β</i>
GWAS	badania asocjacji całego genomu	ang. <i>Genome-Wide Association Studies</i>
HDAC4	deacetylaza histonowa 4	ang. <i>histone deacetylase 4</i>
HDL	lipoproteiny o wysokiej gęstości	ang. <i>high-density lipoprotein</i>
HNRNPU	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 1 β	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 Alzheimer'a 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>
MAPT	gen kodujący białko Tau	ang. <i>Microtubule Associated Protein Tau</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 cyklinozależnej	ang. <i>cyclin dependent kinase inhibitor1B</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	czynnik transkrypcyjny 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 Alzheimerera	ang. <i>sporadic Alzheimer's disease</i>
SH-SY5Y	linie komórkowe ludzkiej neuroblastomy	ang. <i>human neuroblastoma cell line</i>
SNORD 48	mały jąderkowy RNA, pole C/D 48	ang. <i>small nucleolar RNA, C/D box 48</i>
snRNA	mały jąderkowy RNA	ang. <i>small nuclear RNA</i>
snoRNA	mały jąderkowy 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>

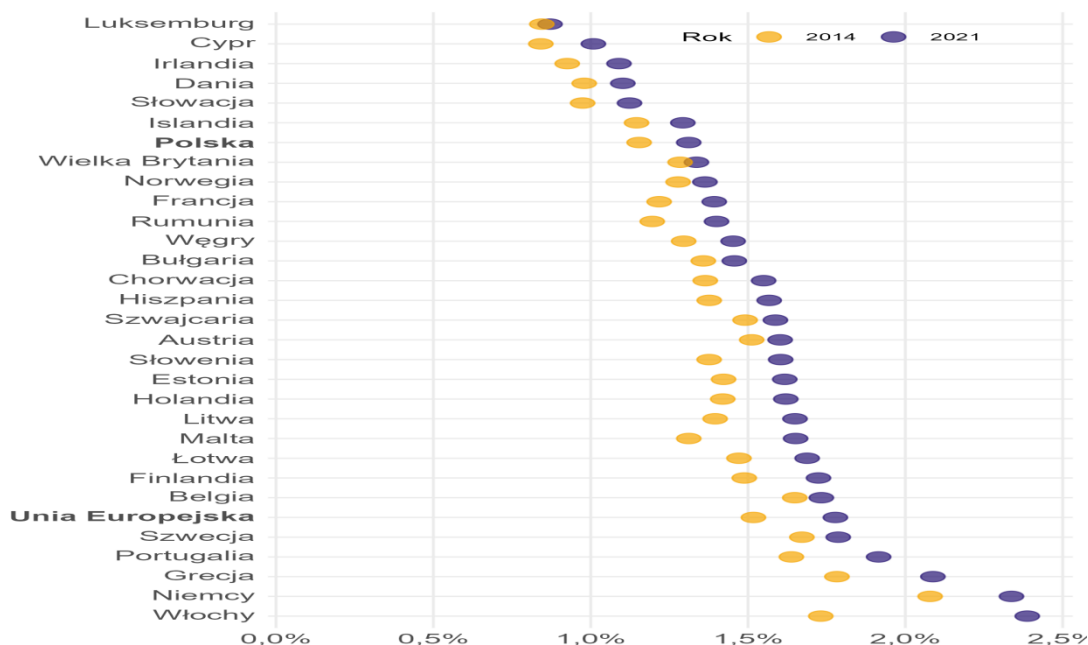
TNF-α	czynnik martwicy nowotworów α	ang. <i>tumor necrosis factor alpha</i>
TRBP	białko wiążące RNA w odpowiedzi na transaktywację	ang. <i>transactivation response RNA-binding protein</i>
TREM2	receptor wyzwalający wyrażany na komórkach mieloidalnych-2	ang. <i>triggering receptor expressed on myeloid 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].

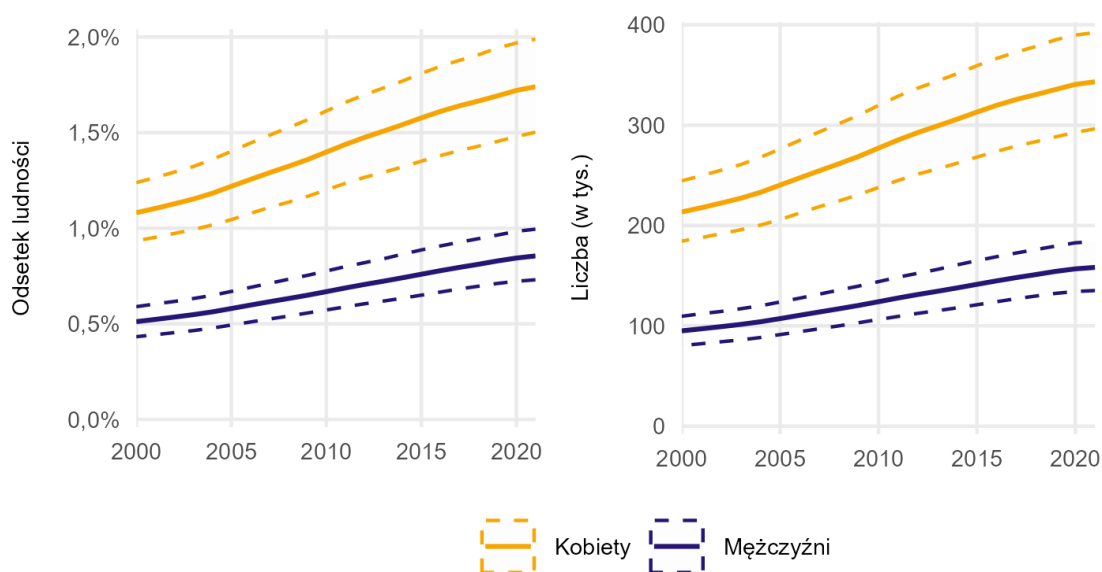
Według opracowań statystycznych prowadzonych przez Narodowy Fundusz Zdrowia na podstawie danych Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), w krajach europejskich częstotliwość zachorowania na chorobę Alzheimera między 2014 a 2021 rokiem wzrosła o 0,1% (m.in. w Polsce, Słowacji, Szwajcarii, Szwecji, 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).

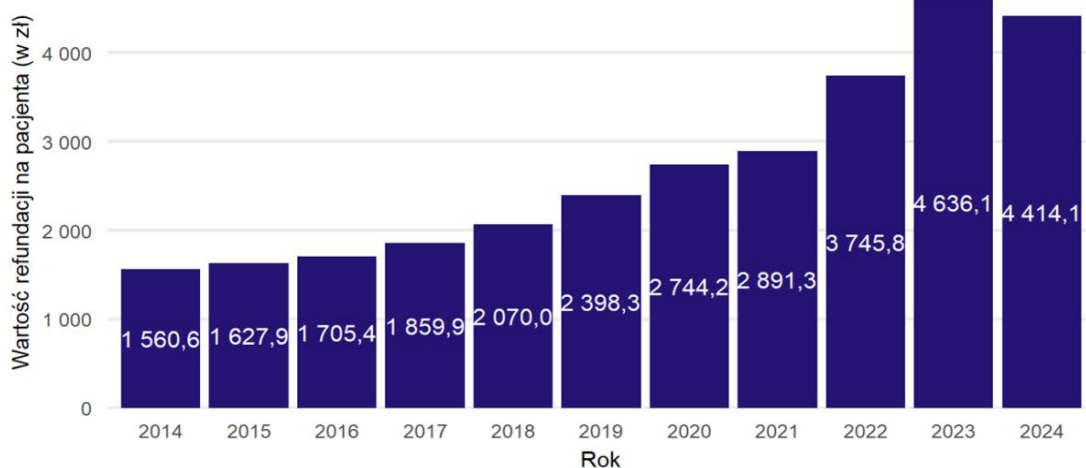
Zgodnie z danymi Narodowego Funduszu Zdrowia liczba osób chorujących na chorobę Alzheimera i choroby pokrewne w Polsce w 2024 roku wynosiła 383 tys. osób, w tym 272 tys. kobiet oraz 111 tys. mężczyzn. Wykres nr 2 przedstawia utrzymującą się tendencję wzrostową liczby pacjentów chorych na AD w Polsce 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%

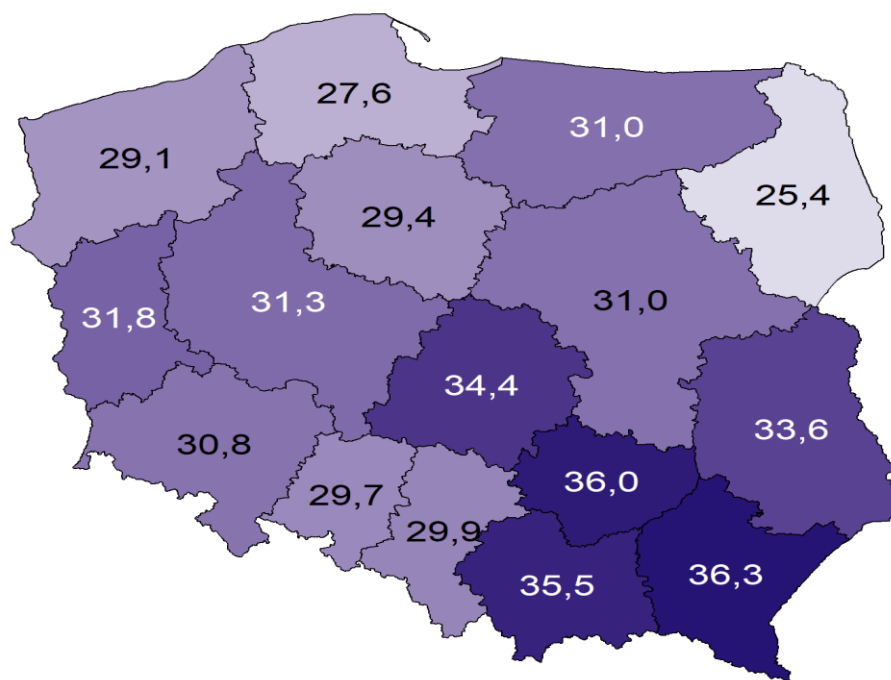
Źródło: Raport Narodowego Funduszu Zdrowia. 2024; <https://ezdrowie.gov.pl/portal/home/badania-i-dane/zdrowe-dane/raporty/nfz-o-zdrowiu-choroba-alzheimera-i-choroby-pokrewne> (06.11.2025)

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)

Niepokojąco są również dane przedstawione na rycinie nr 1, dotyczące rozkładu współczynnika chorowalności rejestrowanej na AD w poszczególnych województwach w Polsce, wg których południowa część kraju (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 AD 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 Alzheimerera 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 Alzheimerera, stając się nowym kierunkiem badań i leczenia [16].

Hipoteza kaskady amyloidu- β

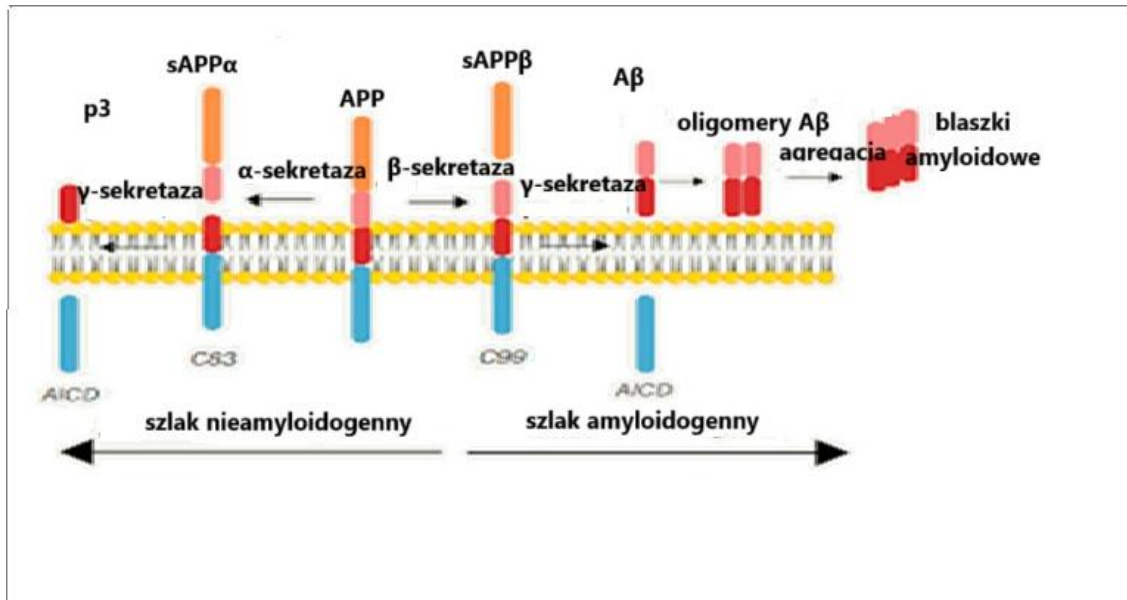
Hipoteza kaskady amyloidu sugeruje, że brak równowagi między wytwarzaniem a usuwaniem $A\beta$ jest kluczowym czynnikiem prowadzącym do AD. Pozakomórkowy $A\beta$ stanowi główny składnik włókienek amyloidowych występujących w blaszkach neurotycznych oraz złogach naczyniowych pacjentów. Wiele badań wskazuje, 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 -sekretaza. Rozszczepienie APP przez α -sekretazę generuje powstanie rozpuszczalnego peptydu sAPP α , który prawdopodobnie pełni funkcję neuroprotekcyjną. Stwierdzono, że peptyd ten odgrywa ważną rolę w plastyczności i przeżyciu neuronów oraz w ochronie przed cytotoxycznością. 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 -sekretaza (BACE1) oraz γ -sekretazę (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 zmiana ekspresji BACE1 i przesunięcie miejsca rozszczepienia przez β -sekretazę z Glu11 na Asp1 przyczynia się do produkcji A β i tworzenie blaszek neurytycznych [22]. A β jest produktem dwuetapowej proteolizy APP. Proces ten rozpoczyna BACE1, a kończy γ -sekretazę [21]. Gamma-sekretaza 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 w genach *PSEN1* i *PSEN2* jest najczęstszą przyczyną rodzinnej choroby

Alzheimera ang. Familial Alzheimer's disease (FAD), gdyż poprzez zmianę aktywności γ -sekretazy, zwiększa produkcję wysoce amyloidogenicznej izoformy $A\beta$ -42. *PSEN1* pośredniczy w większości zdarzeń proteolitycznych, o czym świadczy fakt, iż delecja *PSEN1* u myszy znacznie zmniejsza aktywność γ -sekretazy [25].



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

Hipoteza białka Tau

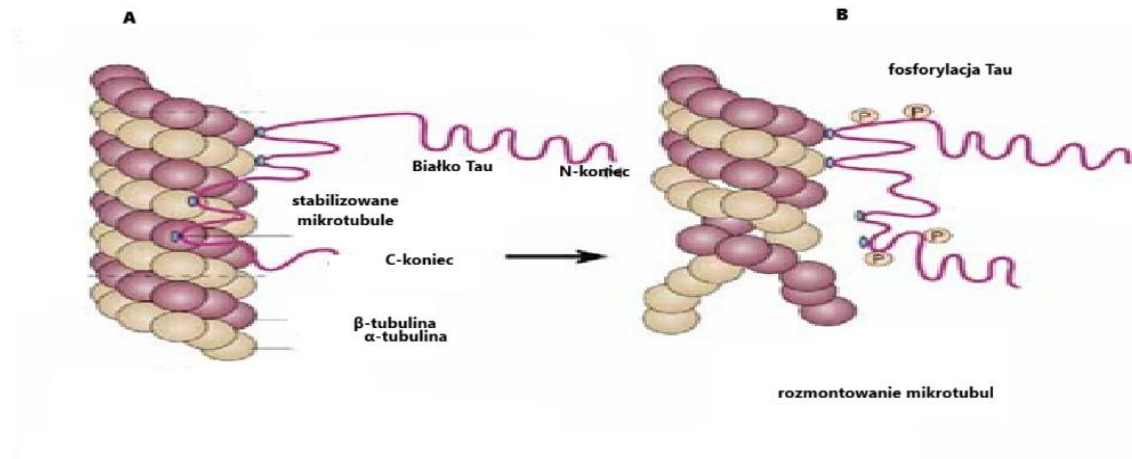
W drugiej hipotezie dotyczącej patogenyzy choroby Alzheimera, kluczową rolę odgrywa białko Tau występujące głównie w neuronach, należące do rodziny białek zasocjowanych z mikrotubulami ang. microtubule associated proteins (MAPs). Białko Tau w największych ilościach występuje w aksonach neuronów, gdzie 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 i stopniem ufosforylowania 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].

W mózgu dorosłego człowieka białko Tau występuje w 6 izoformach, wytwarzanych przez alternatywny splicing mRNA. Białka te składają się od 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 powtórzenie składające się z 31-aminokwasów, kodowane przez 10. ekson genu kodującego białko Tau ang. Microtubule Associated Protein Tau (*MAPT*), dający początek trzem izoformom białka Tau z 4 powtórzeniami każda. Pozostałe 3 izoformy mają po 3 powtórzenia. To właśnie te powtórzenia i niektóre sąsiadujące sekwencje stanowią domeny wiążące mikrotubule. Prawidłowa kora mózgowa zawiera izoformy 3-powtórzeniowe i 4-powtórzeniowe na podobnym poziomie [24, 30]. U pacjentów z chorobą Alzheimera transkrypt białka Tau w wyniku alternatywnego splicingu występuje w specyficznych izoformach łączących mikrotubule i formujących agregaty białka Tau [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 złożeń A β oraz patologii białka Tau w sporadycznym AD ang. sporadic Alzheimer's

disease (SAD), promują też 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.

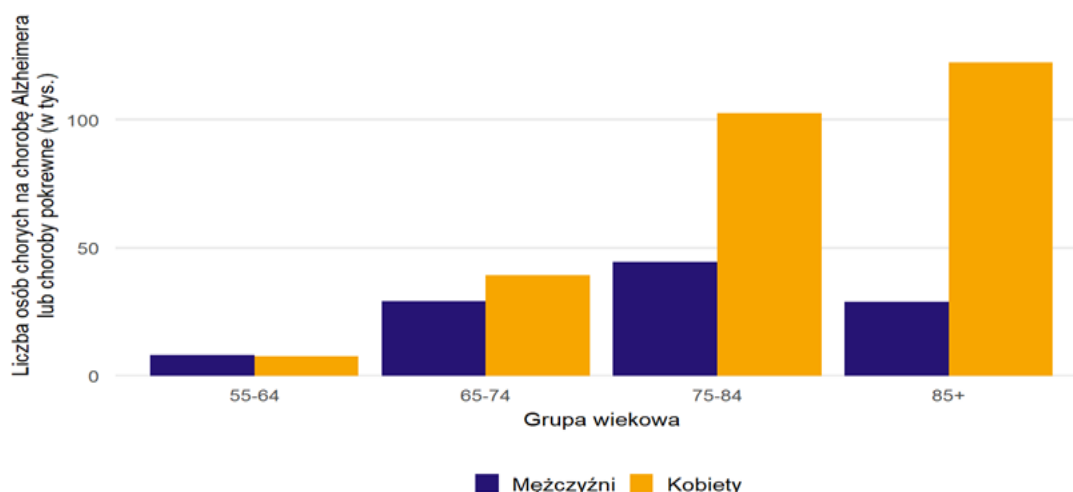
1.1.1 Rodzinna postać choroby Alzheimera o wczesnym początku

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 - 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 β 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 choroby Alzheimera o późnym początku

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 w Polsce(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 pozycji 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 splotkach 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 ang. Genome-Wide Association Studies (GWAS) przeprowadzone przez Kehoe i in., potwierdziły znaczenie zmienności w obrębie genu *ACE* w degradacji peptydu $A\beta$ 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].

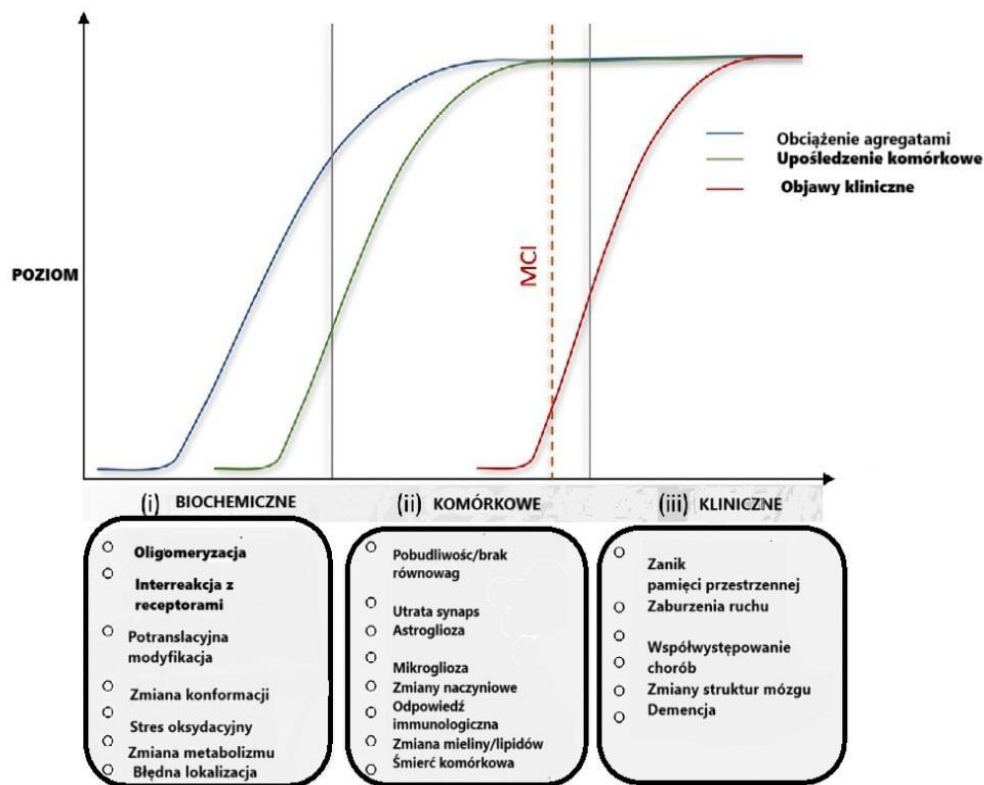
Polimorfizm indel w genie *ACE* został więc uznany za kandydata na predyktora podatności na AD. Osoby ze zdiagnozowanym otępieniem alzheimerowskim mogą wykazywać niższą aktywność ACE w płynie mózgowo-rdzeniowym w porównaniu z grupą osób zdrowych dobranych pod względem płci i wieku [51, 53, 54]. Inne badania wskazują, na zwiększoną aktywność ACE w kilku obszarach mózgu pacjentów umierających na chorobę Alzheimera. Aktywność enzymu była podwyższona w hipokampie przysrodkowym i zakręcie parahipokampowym, w korze czołowej i jądrze ogoniastym [55].

1.1.3 Sposoby diagnozowania i leczenia choroby Alzheimera

Ostatnie badania wskazują, że patogenezą 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 4.



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 zielona) do fazy klinicznej (linia czerwona). Wszystkie fazy najbardziej widoczne po przekroczeniu punktu granicznego tj. łagodnego upośledzenia funkcji poznawczych MCI.

Obecnie rozpoznanie AD opiera się głównie na ocenie neuropsychologicznej, badaniu 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 PMR, surowicy oraz badania neuroobrazowe: tomografię komputerową ang. computed tomography (CT), rezonans magnetyczny ang. magnetic resonance imaging (MRI) oraz pozytronową 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 PMR [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. Białka 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 i pokazują nieprawidłowości w metabolizmie, który związany jest z patologią $A\beta$ 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	$A\beta_{1-42}$	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 $A\beta_{1-42}$ i stosunku $A\beta_{1-42/40}$ sugeruje wysoki stopień obciążenia blaszkami starczymi, co potwierdzają skany PET, i znaczny spadek funkcji poznawczych [61, 65].
	$A\beta_{1-40}$	Niejednoznaczne wyniki dla samego $A\beta_{1-40}$, stosunek $A\beta_{1-42/40}$ może być lepszym biomarkerem niż sam $A\beta_{1-42}$.	
Stopień neurodegeneracji	Calkowite 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 [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 $A\beta_{42/40}$ w płynie mózgowo-rdzeniowym [62].

Patologia białka Tau	p-Tau 181	Rozróżnienie pomiędzy AD a kontrolą.	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 $A\beta_{1-42}$ i stosunku $A\beta_{1-42/40}$ [61].
	p-Tau 217	p-Tau 181 i p-Tau 231 odróżnia AD od	Osoby z patologią β -amyloidu, będące nosicielami allelu <i>APOE4</i> , wykazują wyższe poziomy p-Tau181 i p-Tau217 w osoczu, ale podobne stężenia $A\beta_{42/40}$, hTau i NfL [64].
	p-Tau 231	innych chorób neurodegeneracyjnych	
			<p>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].</p> <p>Poziomy p-Tau-231 wzrastają bardziej specyficznie w chorobie AD niż w innych chorobach neurodegeneracyjnych [65].</p>

Skróty: AD-Alzheimer disease; MCI- Mild Cognitive Impairment; $A\beta_{1-42}$ - amyloid β (1-42); $A\beta_{1-40}$ - amyloid β (1-40); h-Tau- całkowite białko Tau; p-Tau (181, 231,217)- fosforylowane białka Tau; NfL- łańcuchy lekkie neurofilamentów

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 Alzheimerera [66].

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

	A β w normie (0)	A β w strefie granicznej (+1)	A β 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; A β -amyloid β

Algorytm skali Erlangen poza wartościami patologicznymi podstawowych biomarkerów (spadek biomarkerów A β ₁₋₄₂ lub A β ₁₋₄₂ / A β ₁₋₄₀, 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 h-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-Tau 181- fosforylowane białko Tau

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].

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 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 acetylocholinoesterazy, 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 AD 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. Niektóre badania skupiają się 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 amyloidowe. Niestety zarówno aktywna, jak i bierna immunoterapia są jeszcze w toku badań klinicznych. Jedną z badanych szczepionek liposomowych ACI-24, ma na celu wywołanie odpowiedzi przeciwciał przeciwko zagregowanemu $A\beta$ 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 podskórnym, które wykazuje wysoką powinowatość do sfałdowanych w fibryle form $A\beta$, zarówno w regionie N-końcowym, jak i środkowym [75]. Natomiast badany w III fazie solanezumab skierowany przeciwko $A\beta$ oraz krenezumab nie wykazały efektu modyfikującego przebieg choroby [76, 77]. Prowadzone są również badania nad bierną immunoterapią wczesnego stadium AD 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 Alzheimera [70, 78]. Innym kierunkiem badań są leki przeciwhistaminowe np Latrepirdyna, która ma wpływ na budowę i funkcję mitochondriów oraz chroni przed apoptozą indukowaną przez $A\beta$ [79].

Postęp w badaniach nad biomarkerami i terapiami choroby Alzheimera jest widoczny, jednak nadal brakuje skutecznej i dostępnej metody wczesnego jej wykrywania oraz leczenia. MiRNA i nowoczesne immunoterapie stanowią kierunki o ogromnym potencjale. W połączeniu z oceną biomarkerów osoczowych (p-Tau, $A\beta$, 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].

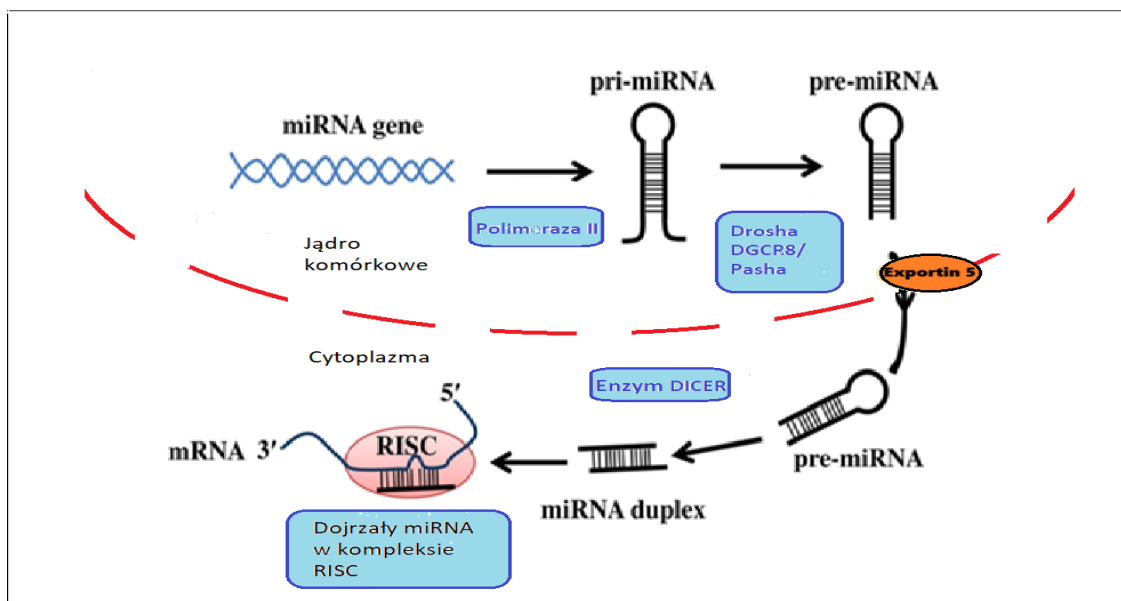
Te jednoniciowe kwasy nukleinowe są transkrybowane przez polimerazę RNA II lub III (RNA Pol II, RNA Pol III). MiRNA pochodzą z długich transkryptów o częściowo dwuniciowej strukturze, zwanych pierwotnym miRNA (pri-miRNA). Transkrypty pri-miRNA tworzą specyficzne struktury drugorzędowe w kształcie spinki 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 mRNA, 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' egzorybonukleaza 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 miRNA 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 ($A\beta$). 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 ze szlakiem białkowym kinaz regulowanych sygnałem zewnątrzkomórkowym ang. extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2). Transfekcja komórek HEK-293 T za pomocą miRNA-101a-3p wpływa na przebieg patogenezы AD, co czyni ten miRNA potencjalnym celem terapeutycznym [102]. Hèbert 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 transgeniczných *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 β , 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 β . 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 poprawiła 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 β , 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 ang. triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2) 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 również podlega modulacji przez liczne miRNA. W badaniu Wang i in. (2015) stwierdzono, że miRNA-138 ulega nadekspresji w AD 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-3b, 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 otępienia alzheimerowskiego z wykorzystaniem miRNA

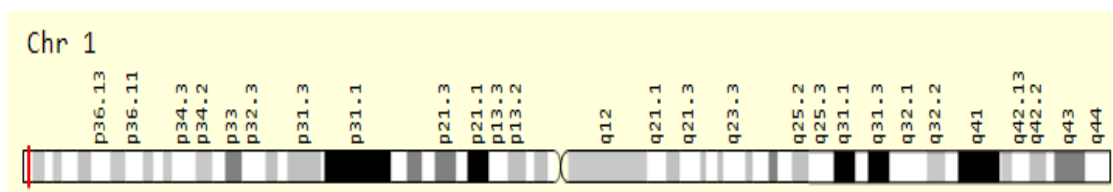
MiRNA są bardzo interesującymi potencjalnymi biomarkerami oraz celami terapeutycznymi. Zmiany ekspresji miRNA mogą odzwierciedlać złożone zmiany w homeostazie komórkowej i wskazywać na obecność wielu patologii [68]. Wykazano, że poziomy poszczególnych miRNA różnią się podczas rozwoju neuronów i różnicowania 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 otępienia

1.3.1 MiRNA-200a-3p

MIR200a (miRNA-200a) to gen kodujący niekodujący RNA, powiązany z klasą miRNA. Choroby związane z miR-200a 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 w 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 1.

Za: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR200A&keywords=miRNA200a#localization-ptm> (16.04.2025)

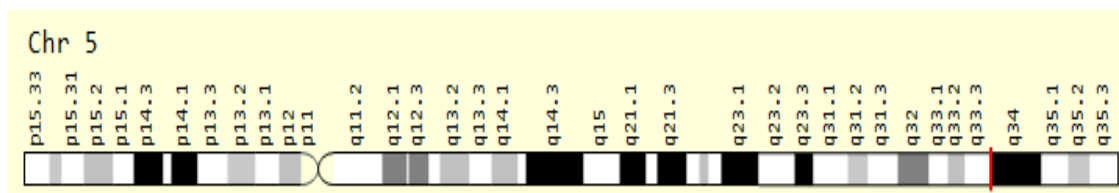
MiRNA-200a-3p, członek rodziny miRNA-200, odgrywa znaczącą rolę w nowotworach u ludzi. Ostatnie badania sugerują, że może on mieć również wpływ na patologię choroby Alzheimera. W modelu myszy transgenicznych (APP/PS1) wykazano, że poziom ekspresji miRNA-200a-3p obniża się podczas choroby Alzheimera. 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 APP^{swe}/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 miRNA 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

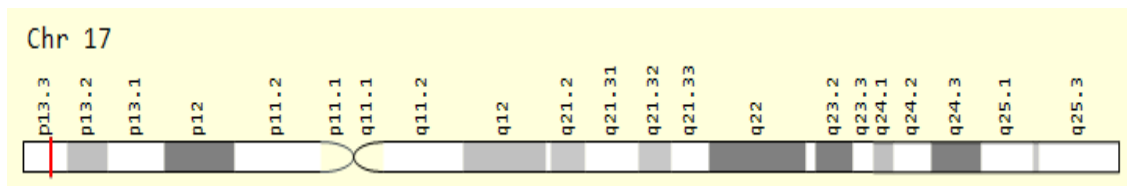
Za: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR200A&keywords=miRNA200a#localization-ptm> (16.04.2025)

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\oraz ogólnej patogenezie choroby. W komórkach nerwowych miRNA146a 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 zwiększała fosforylację białka Tau i hamowała 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 splątków neurofibrylarnych [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 miRNA, 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>. (16.04.2025)

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 MCI, jak i u pacjentów z AD, co korelowało z upośledzeniem pamięci. Wykorzystując w swoich badaniach myszy z zastosowanym nokautem miRNA-132/21, grupa badawcza potwierdziła wpływ delekcji 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 regulowaną sygnałem zewnątrzkomórkowym 2 ang. extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2). Kinaza ta jest kluczowym elementem szlaku MAPK, który reguluje proliferację i różnicowanie się komórek, dodatkowo wchodzi w interakcje z innymi ścieżkami takimi jak 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 zaburzeń ekspresji wybranych miRNA, w zależności od stadium choroby Alzheimera oraz związku pomiędzy ekspresją miRNA a polimorfizmami w genach *APOE* oraz *ACE*.

Do realizacji postawionego celu posłużono się:

1. Określeniem zmian ekspresji wybranych miRNA u pacjentów w różnym stadium 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 stadium 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 Kliniką Szpitala 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 diagnostykę laboratoryjną przeprowadzono w Klinikum 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 Klinikum 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 stadia choroby Alzheimera: 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 Alzheimera (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. Pacjenci z MCI (19 osób) stanowili 19,59% wszystkich badanych. Pacjenci z AD I (20 przypadków) stanowili 20,62% grupy badanej. Najliczniejszą przebadaną podgrupą byli

pacjenci z AD II (22 osoby) stanowiące 22,68 % całej grupy badanej, zaś najmniej liczną podgrupę 9,28% tworzyli pacjenci z AD III (9 osób). Porównawcza grupa kontrolna stanowiła 27,84% grupy poddanej badaniom. Średnia wieku grupy badanej 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 APOE (%)						
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 ACE (%)						
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. Badania 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 i udostępnione na potrzeby analiz statystycznych zawartych w niniejszej rozprawie doktorskiej.

W ramach niniejszej pracy badawczej zbadano poziomy 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 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* 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* w zakresie polimorfizmów rs429358 i rs7412 wykorzystano metodę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych ang. 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^o C, 5 min; II etap powtórzono 35 razy (denaturacja 95^o C, 30 s; przyłączenie starterów 65^o C, 30 s; elongacja 72^o C, 30 s) etap końcowy (elongacja końcowa 72^o C, 1 5 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 dokładnie mieszając. 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 μ l, oraz dwukrotnie buforem RPE objętość 500 μ l, 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. Wirowanie prowadzono 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, 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 oskrzydających 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 kpz. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodzi matryca DNA, polimeraza Taq, startery, dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), MgCl₂ 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.

- aneling (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 miRNA (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 próbce 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 Mg²⁺ 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 kalibrator między płytkowy ang. inter-plate calibrator (IPC),
- 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 cyklu ilościowego ang. quantification cycle (Cq) 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 specyficzną 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 próbce 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
Calkowita 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 specyficznego 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 Cq reakcji PCR 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-Wilcoxon dla par niezależnych. Analizę wariancji wykonano przy użyciu testu ANOVA Kruskala-Wallis. 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 chi2 (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 w różnym stadium zaawansowania choroby oraz grupę kontrolną poddano analizie, pod względem płci i wieku w dniu pobrania materiału do badań. Rozkład pacjentów wg płci z uwzględnieniem stadium 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 określonego stadium 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 stadium choroby (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 w grupie kontrolnej oraz w grupie pacjentów z podziałem na 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
Kwartyl 1 (Q1)	65,00	60,50	67,00	70,50	75,00
Kwartyl 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-kwartyl 1; Q3-kwartyl 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.

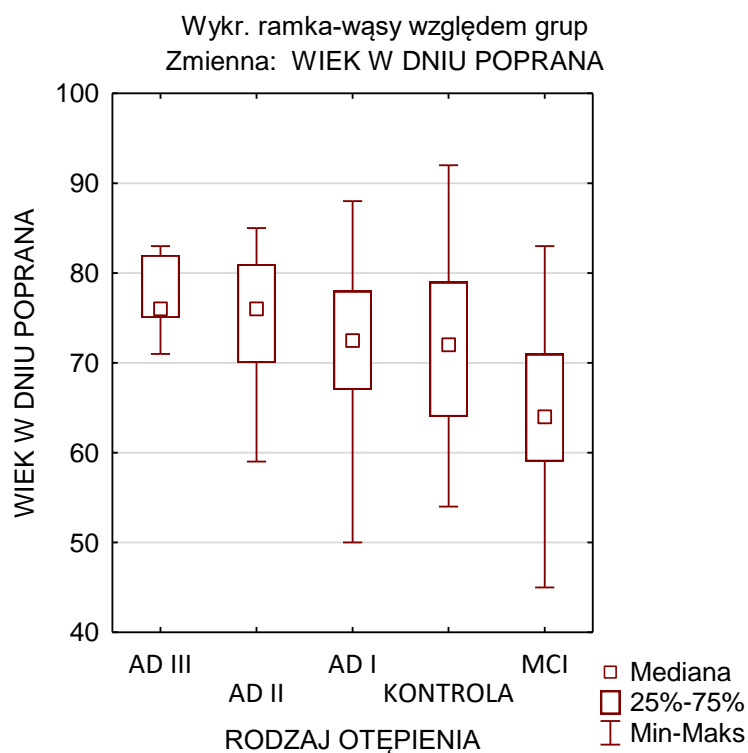
Tabela 11. Różnica wieku między grupą kontrolną oraz grupą pacjentów z podziałem na stadium otępienia

Grupy badane	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 progresji 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 $p=0,0030$. 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 MCI, 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.

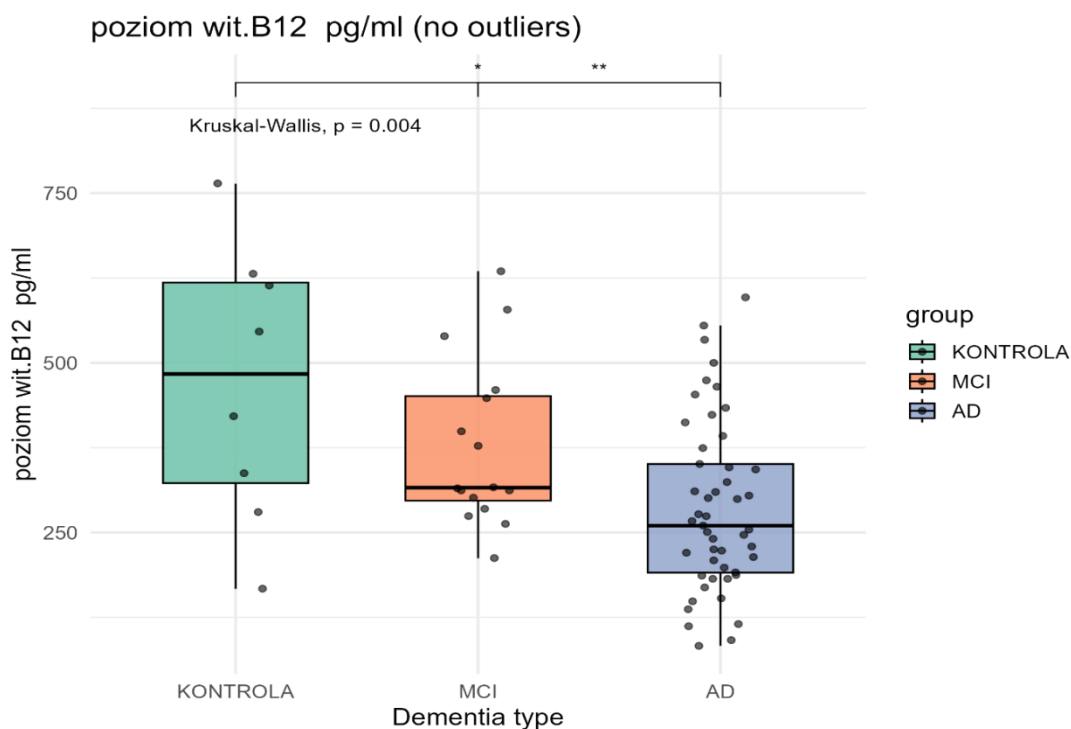
Tabela 12. Zestawienie cech klinicznych z uwzględnieniem podziału na podgrupy MCI, AD I, AD II, AD III oraz grupę kontrolną K

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 w zależności od progresji choroby, przeprowadzono test Kruskala-Wallisa. Nie zaobserwowano jednak istotnej różnicy w lipidogramie wśród osób bez objawów otępiennych oraz pacjentami z otępieniem. Z badanych parametrów jedynie poziom witaminy B₁₂ różnił się istotnie statystycznie pomiędzy podgrupami. Początkowo analizie statystycznej poddano poziom witaminy B₁₂ w grupie kontrolnej, pacjentów z MCI oraz ze stwierdzonym otępieniem alzheimerowskim, jednak bez podziału na stadia choroby. Uzyskane wyniki przedstawiono na wykresie nr 6.

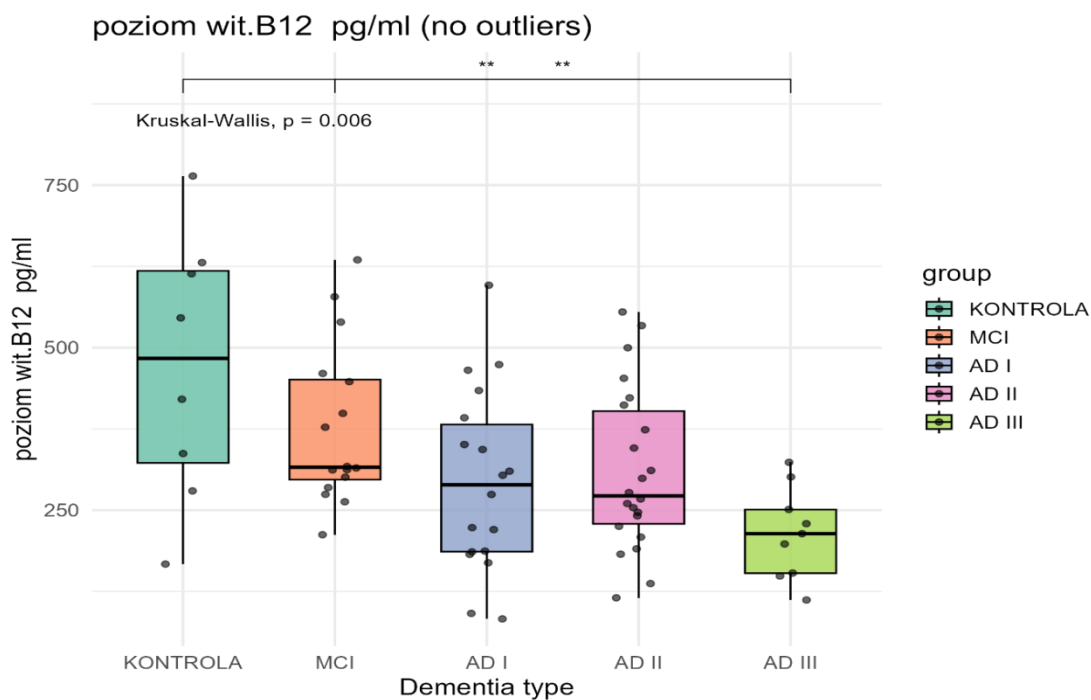


Wykres 6. Poziom witaminy B₁₂ w grupie kontrolnej, pacjentów z MCI oraz AD (bez wartości odstających)

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 pacjentami z MCI a AD przy poziomie istotności p<0,01 oraz pomiędzy grupą kontrolną K i pacjentami z 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 stadium zaawansowania AD, usunięto wartości odstające a następnie dokonano dodatkowej analizy z podziałem na podgrupy AD I, AD II oraz AD III, które pokazuje wykres nr 7.



Wykres 7. Poziom witaminy B₁₂ w zależności od stadium 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 AD III poziom witaminy B₁₂ jest istotnie niższy (Me=214, Q1=153; Q3=251) w porównaniu z pacjentami z MCI (Me=317; Q1=301; Q3=460) oraz badanymi 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 stopnia zaawansowania choroby (AD I, AD II, AD III). Uzyskane wyniki przedstawione w formie wykresu, wskazują na postępujące niedobory witaminy B₁₂ wraz z progresją choroby.

Badaną grupę z uwzględnieniem podziału na stadia otępienia, przeanalizowano pod kątem chorób współtowarzyszących przy zastosowaniu testu chi kwadrat. Na podstawie uzyskanych wyników nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi podgrupami 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 różna liczebność podgrup.

4.3 Analiza stężenia białek β - amyloidowych w zależności od stadium choroby

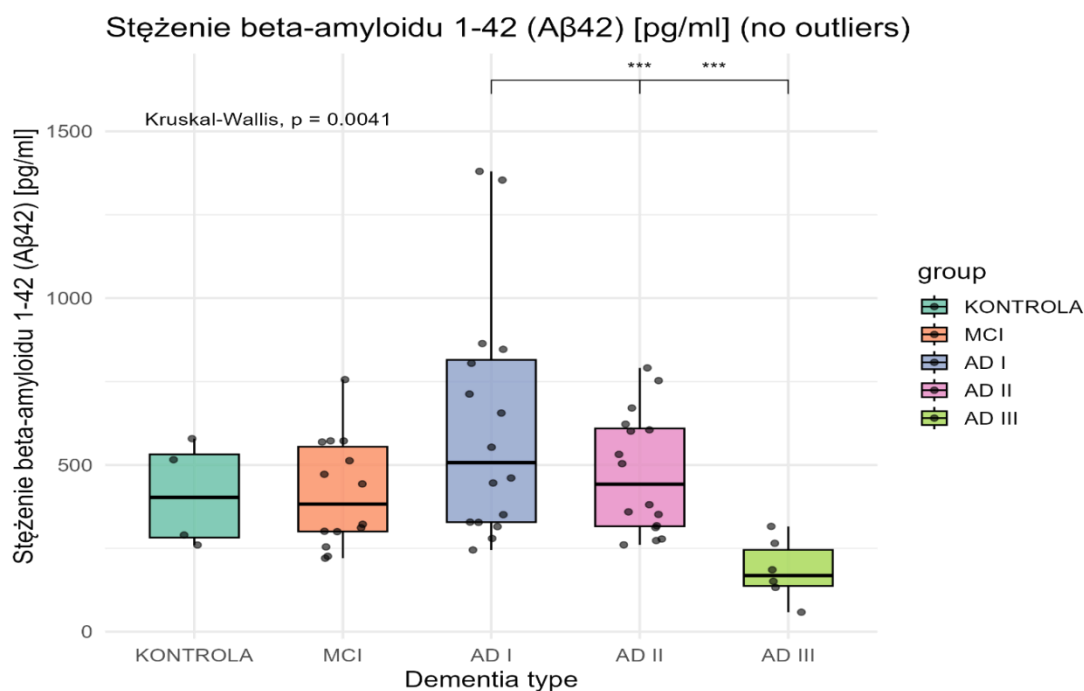
Wraz z progresją choroby AD, poziom amyloidu- β w mózgu wzrasta, co jest związane z odkładaniem się w formie blaszek starczych, natomiast w PMR maleje. W niniejszej pracy przeanalizowano udostępnione wyniki badań stężenia białek amyloidowych $A\beta_{1-42}$ oraz $A\beta_{1-40}$ w PMR. Wyniki badania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

Tabela 13. Stężenie białek β - amyloidowych w grupach badanych z uwzględnieniem stadium choroby

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 β amyloidu 1-42 (A β 42) w grupie kontrolnej oraz grupie badanej z podziałem na stadium choroby
Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach p i oznaczono gwiazdkami (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Analiza poziomu A β ₁₋₄₂ w grupie pacjentów oraz w grupie kontrolnej, po wyeliminowaniu wartości odstających, wykazała statystycznie istotną różnicę jedynie pomiędzy pacjentami w stadium AD I a pacjentami w stadium AD III (p<0,001) oraz pomiędzy stadium AD II i AD III (p<0,001). Na podstawie uzyskanych wyników, można zauważyć, że wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania choroby otępiennej, poziom amyloidu A β ₁₋₄₂ w PMR wyraźnie się obniża. Wśród pacjentów z podgrupy AD III zaobserwowano najniższy poziom amyloidu A β ₁₋₄₂ (Me=185,7; Q1=141,88; Q3=290,45) w porównaniu z pacjentami ze stwierdzonym 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 A β ₁₋₄₀ 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 stadium choroby

Zaawansowany proces neurozwyrodnieniowy prowadzi do przerwania bariery krew-mózg oraz rozpadu neuronów, czego konsekwencją jest wzrost poziomu białek hTau i pTau w PMR. W tym celu poddano analizie statystycznej wyniki badań stężenia białek Tau w 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 grupie kontrolnej oraz w grupie pacjentów z podziałem na stadium otępienia

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

Analiza poziomu całkowitego białka Tau oraz białka Tau fosforowanego 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, a pacjentami w głębokim stadium 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 stadium choroby

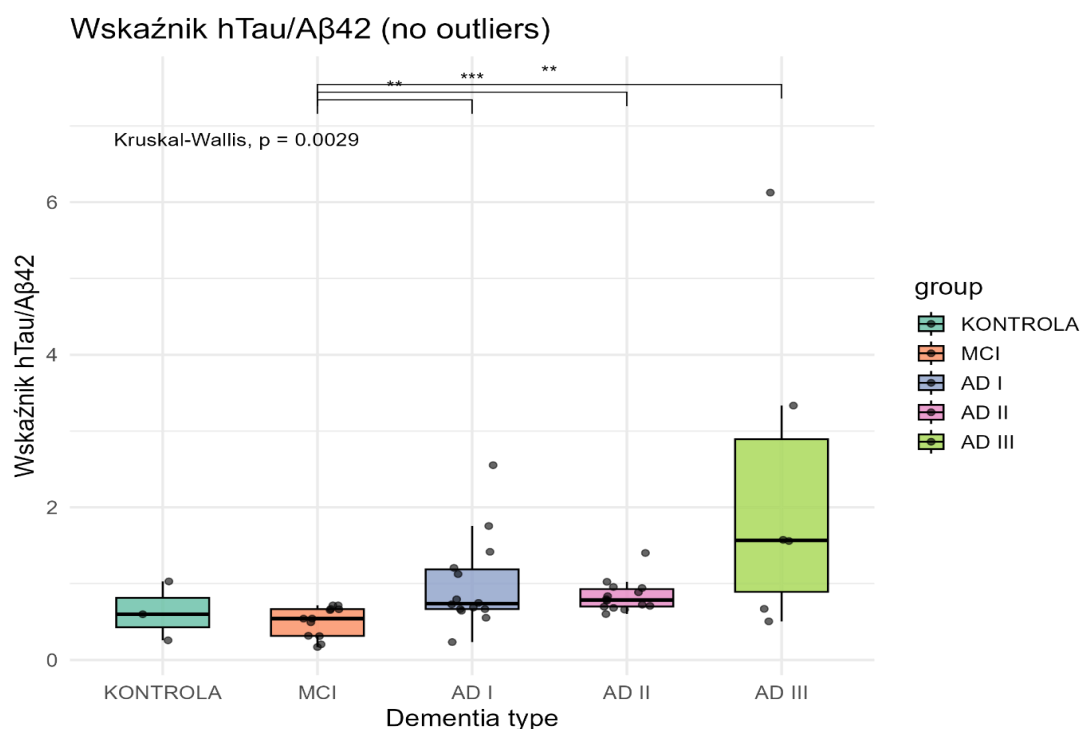
W kolejnym etapie pracy dokonano analizy charakterystycznych wskaźników diagnostycznych, wyliczanych na podstawie stosunku dwóch form amyloidu ($A\beta_{1-40}/A\beta_{1-42}$) oraz stosunku dwóch form białek Tau do amyloidu $A\beta_{1-42}$ ($hTau/A\beta_{1-42}$ oraz $pTau/A\beta_{1-42}$) we wszystkich 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 grupie kontrolnej oraz w grupie badanej z uwzględnieniem stadium choroby

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

Do porównania poziomu wskaźników diagnostycznych choroby Alzheimera $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$, $pTau/A\beta_{1-42}$ oraz $hTau/A\beta_{1-42}$ w poszczególnych podgrupach badanych, zastosowano nieparametryczny test statystyczny Kruskalla-Wallis'a wraz z analizą post-hoc przy użyciu testu Dunn'a. Po usunięciu wartości odstających stwierdzono, iż tylko współczynnik $hTau/A\beta_{1-42}$ w grupie badanej wykazał istotne statystycznie różnice. Wyniki te zostały przedstawione na wykresie nr 9.

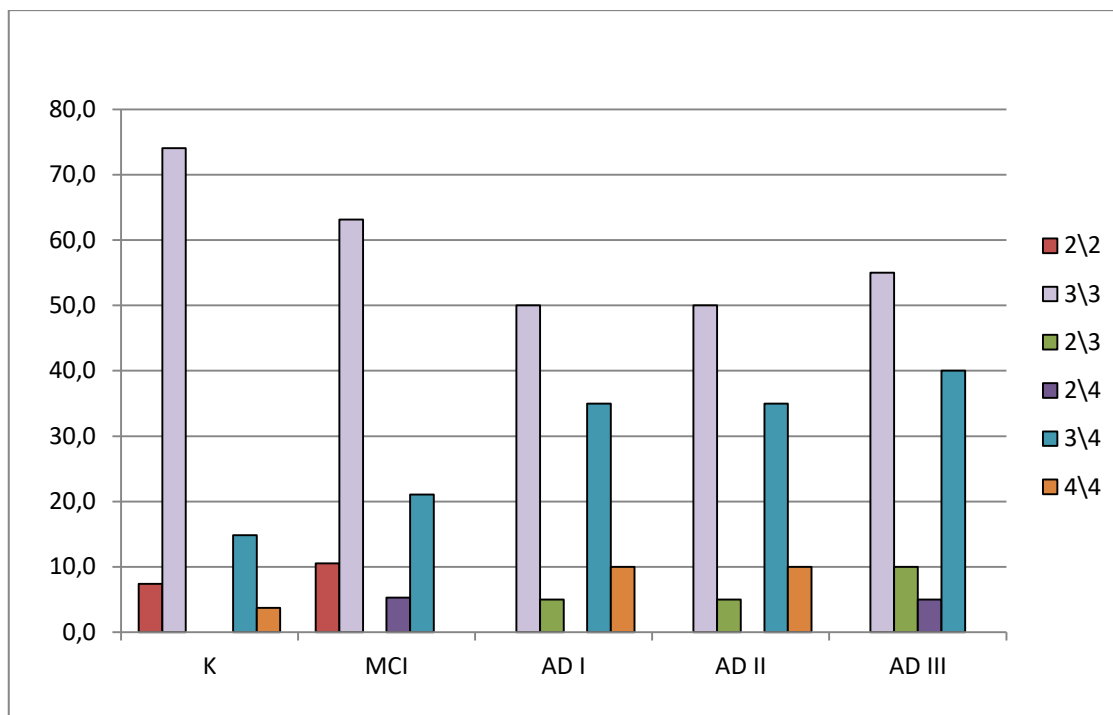


Wykres 9. Poziom współczynnika hTau/ A β 1-42 w grupie kontrolnej oraz grupie pacjentów z uwzględnieniem stadium choroby
Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach p i oznaczono gwiazdkami (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Najniższy współczynnik hTau/A β ₁₋₄₂ zaobserwowano wśród pacjentów z MCI (Me=0,65; Q1=0,40; Q3=0,71) w porównaniu z pacjentami ze stwierdzonym otępieniem alzheimerowskim w każdym stadium 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 β ₁₋₄₂/A β ₁₋₄₀ oraz współczynnika pTau/A β ₁₋₄₂ wraz z progresją stanu otępienia (p>0,05).

4.6 Analiza polimorfizmu typu SNP w genie *APOE* w zależności od stadium otępienia

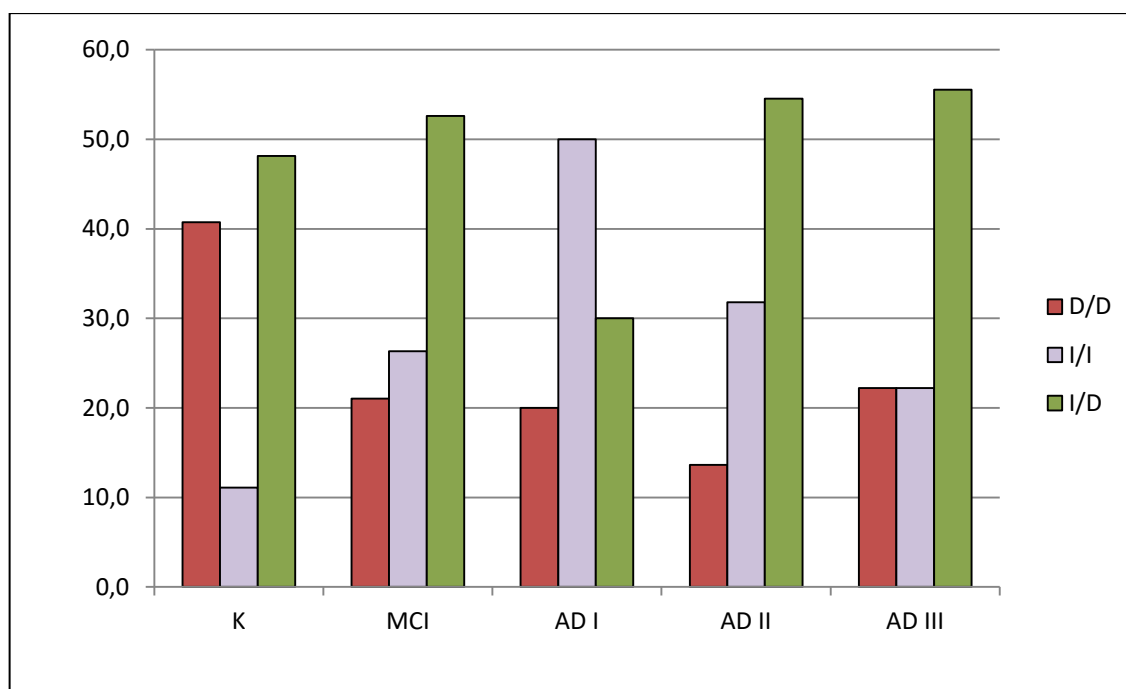
Analiza częstości występowania poszczególnych polimorfizmów rs429358 i rs7412 w genie *APOE* w badanej grupie wykazała, iż najczęstszym genotypem występującym wśród wszystkich badanych osób, zarówno ze stwierdzonym otępieniem, jak też u osób zdrowych, jest genotyp $\epsilon 3/\epsilon 3$ (57,73% całej 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). Wśród pacjentów z otępieniem z określonym stadium klinicznym, nie wykazano obecności tego genotypu. Genotyp $\epsilon 4/\epsilon 4$ (4,12% całej grupy badanej) kodujący izoformę Apo-E4, zwiększającą predyspozycje zachorowania, występuje w dwóch podgrupach przebadanych pacjentów tj. wśród pacjentów z MCI 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 u wszystkich pacjentów z AD bez względu na fenotyp kliniczny tj. AD I, AD II, AD III. Nie występuje natomiast u pacjentów z łagodnym zaburzeniem poznawczym oraz wśród osób zdrowych.



Wykres 10. Rozkład procentowy poszczególnych genotypów w genie *APOE* z podziałem na stadium otępienia

4.7 Analiza polimorfizmu insercyjno/delecyjnego (I/D) w genie *ACE* 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 u 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 MCI oraz otępieniem typu alzheimerowskiego w każdym stadium zaawansowania choroby. W grupie kontrolnej najczęściej występował genotyp I/D, drugim w kolejności był genotyp z dwoma allelami delecyjnymi D/D. Natomiast najrzadziej występującym polimorfizmem genu *ACE* w grupie kontrolnej był allel insercyjny (I) w postaci homozygoty I/I.



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

4.8. Analiza ekspresji badanych miRNA w zależności od stadium otępienia

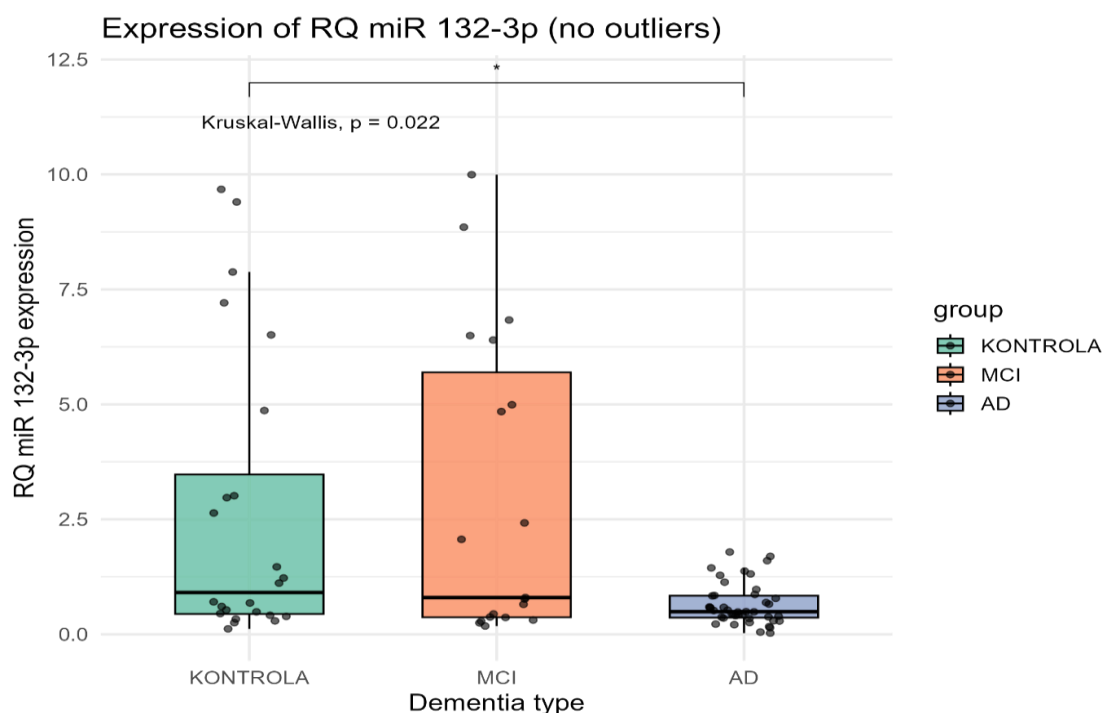
Na podstawie analizy bioinformatycznej oraz przeglądu literatury, wyselekcjonowano trzy miRNA: miRNA-200a-3p, miRNA-146a-5p oraz miRNA-132-3p, które zostały zidentyfikowane jako potencjalne regulatory genów, silnie związanych z procesem neurozwyrodnieniowym. Po wyizolowaniu krążących miRNA z surowicy pacjentów oraz osób z grupy kontrolnej, w pierwszym etapie przeprowadzono analizę poziomu ich ekspresji wśród pacjentów z MCI, pacjentów z AD oraz osób zdrowych z grupy kontrolnej (K), bez uwzględnienia progresji choroby. Uzyskane wartości względnej ekspresji (RQ) wszystkich analizowanych miRNA zestawiono w tabeli nr 16.

Tabela 16. Wartości względnej ekspresji [RQ] badanych miRNA w grupie kontrolnej oraz w grupie pacjentów z uwzględnieniem stadium choroby

Grupy badane		Me	Q1	Q3	Min.	Max.
miRNA-132-3p	K	1,22	0,47	6,86	0,12	86,20
	MCI	0,80	0,03	5,70	0,18	9,99
	AD I	0,76	0,43	1,43	0,05	16,87
	AD II	0,49	0,36	1,41	0,03	26,13
	AD III	0,52	0,3	0,84	0,14	3,39
miRNA-146a-5p	K	1,59	0,59	3,58	0,16	62,54
	MCI	1,63	0,85	2,51	0,08	7,35
	AD I	1,20	0,16	62,54	0,00	7,27
	AD II	1,28	0,90	1,88	0,04	5,88
	AD III	1,89	0,30	3,58	0,71	4,08
miRNA-200a-3p	K	0,72	0,22	1,34	0,10	13,80
	MCI	0,53	0,35	0,91	0,19	3,62
	AD I	0,97	0,34	1,64	0,15	11,01
	AD II	0,47	0,39	1,12	0,06	2,41
	AD III	0,34	0,33	1,07	0,06	5,33

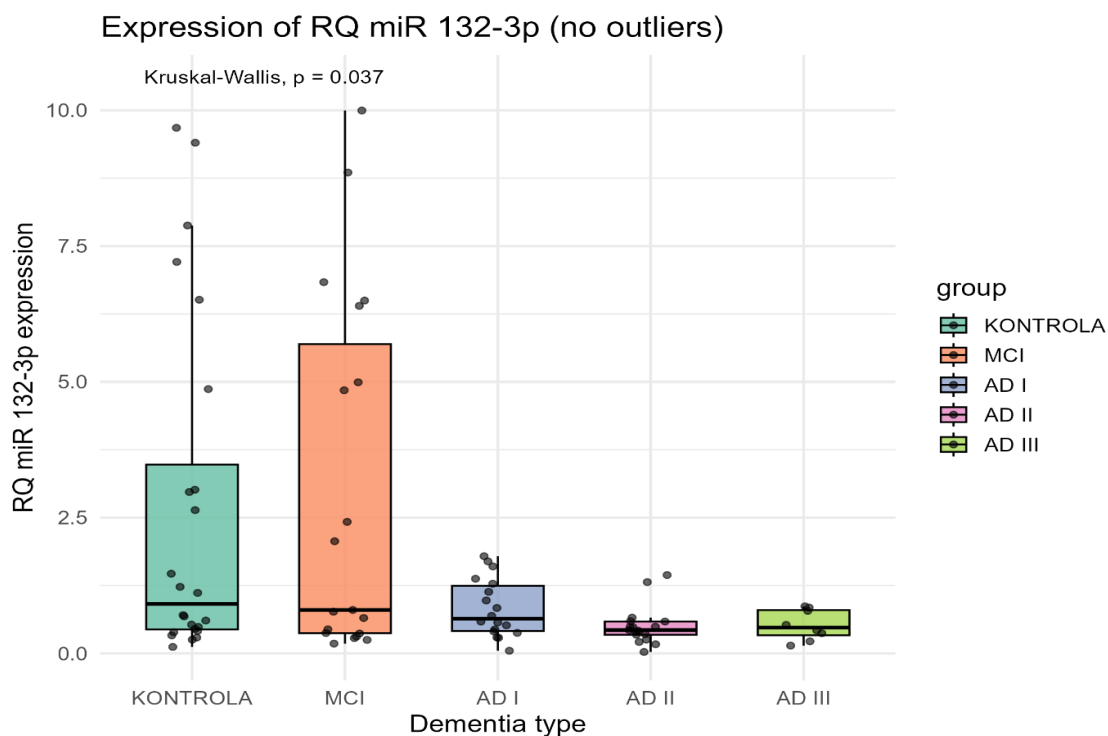
Me-mediana; **Q1**-kwartył 1; **Q3**- kwartył 3; **Min.**-wartość minimalna; **Max.**-wartość maksymalna

Spośród analizowanych cząsteczek miRNA, jedynie miRNA-132-3p, po usunięciu wartości odstających, wykazał istotne różnice w poziomie ekspresji pomiędzy badanymi podgrupami. Wykres nr 12 przedstawia wyniki testu Kruskala-Wallis'a badającego różnicę pomiędzy grupami.



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

Wśród pacjentów ze stwierdzonym otępieniem, poziom ekspresji miRNA-132-3p jest istotnie niższy niż w grupie kontrolnej ($p < 0,05$). Nie wykazano natomiast istotnej statystycznie różnicy pomiędzy stadium MCI a AD oraz pomiędzy MCI a grupą kontrolną ($p > 0,05$). W celu dokładnego określenia różnicy ekspresji miRNA-132-3p w zależności od zaawansowania procesu neurozwyrodnieniowego, dokonano analizy poziomu ekspresji wybranego miRNA wśród pacjentów z podziałem na podgrupy AD I, AD II oraz AD III. Uzyskane wyniki przy poziomie istotności $p = 0,037$ wykazały spadek poziomu ekspresji miRNA-132-3p wraz z progresją choroby. Nie wykazano natomiast istotnych różnic pomiędzy analizowanymi podgrupami w analizie post hoc. Wyniki przedstawia wykres nr 13.



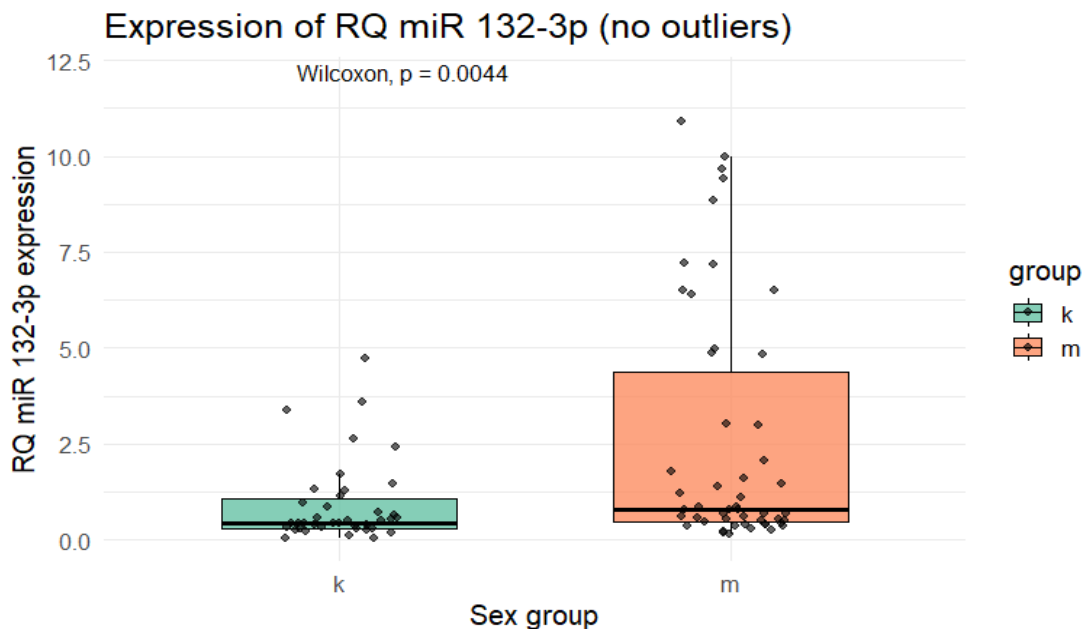
Wykres 13. Różnica ekspresji miR-132-3p w podgrupach MCI, AD I, AD II, AD III, K (bez wartości odstających)

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, 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 stadium choroby AD.

4.9 Analiza ekspresji badanych 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 w zależności od wieku pacjentów ($p > 0,05$). 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-Wilcozona 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 badanych miRNA z parametrami biochemicznymi

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej dokonano oceny związku ekspresji wybranych miRNA z poziomem cholesterolu całkowitego, trójglicerydów oraz 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 stadia zaawansowania. Następnie uzyskane wyniki porównano ze 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 17. Współczynnik korelacji R Spearmana ekspresji miRNA z parametrami biochemicznymi w grupie pacjentów badanych

ZMIENNE NIEZALEŻNE		Cholesterol całkowity (TC)	Trójglicerydy TG	Witamina B12
ZMIENNE ZALEŻNE				
miRNA	miRNA-132-3p R p	0,1538 0,2175	-0,0510 0,7399	-0,0410 0,7399
	miRNA-146a-5p R p	0,0627 0,6167	0,0906 0,5189	-0,0308 0,8030
	miRNA-200a-3p R p	0,1430 0,2799	0,0606 0,6858	0,0044 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, trójglicerydów oraz stężeniem witaminy B₁₂.

Tabela 18. Współczynnik korelacji R Spearmana ekspresji miRNA z parametrami biochemicznymi w grupie kontrolnej

ZMIENNE NIEZALEŻNE		Cholesterol całkowity (TC)	Trójglicerydy TG	Witamina B12
ZMIENNE ZALEŻNE				
miRNA	miRNA-132-3p R p	-0,1430 0,5475	0,69055 0,0270	0,8312 0,0029
	miRNA-146a-5p R p	-0,0958 0,6878	0,1640 0,6507	-0,1627 0,6423
	miRNA-200a-3p R p	-0,1175 0,7424	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 badanych miRNA ze 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 w grupie badanej 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 19. Współczynnik korelacji R Spearmana ekspresji miRNA z poziomem wskaźników diagnostycznych w grupie osób z otępieniem

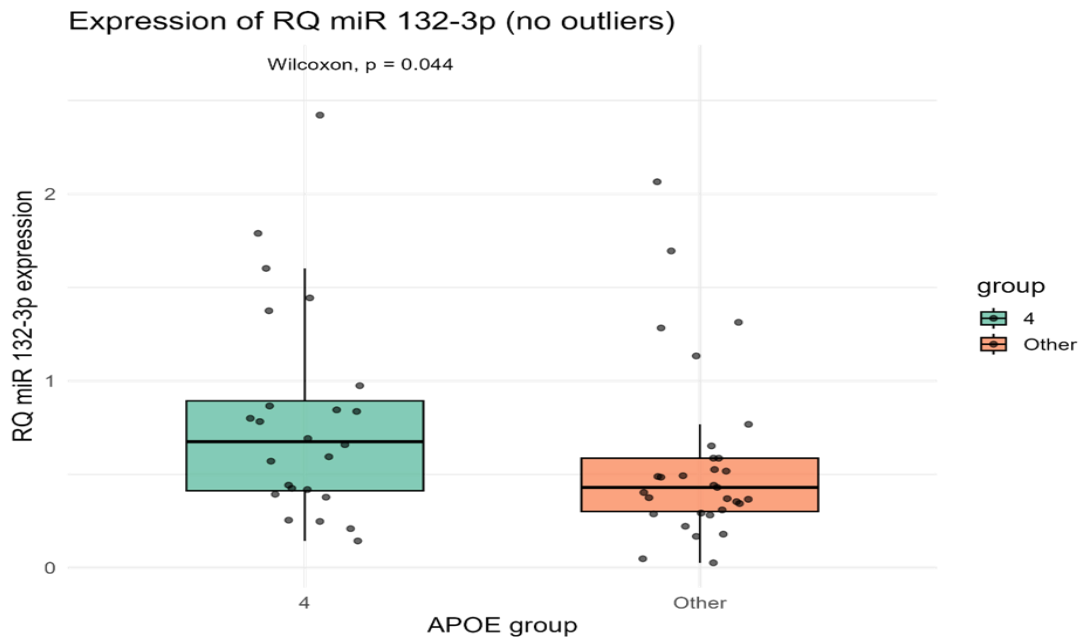
ZMIENNE NIEZALEŻNE		Wskaźnik $A\beta_{42}/A\beta_{40}$	Wskaźnik $pTau/A\beta_{42}$	Wskaźnik $hTau/A\beta_{42}$
ZMIENNE ZALEŻNE				
miRNA	miRNA-132-3p R p	-0,1155 0,4001	0,2361 0,0826	0,2280 0,0941
	miRNA-146a-5p R p	0,0832 0,5458	0,3480 0,0092	0,3373 0,0118
	miRNA-200a-3p R p	0,0015 0,9915	0,0279 0,8492	0,0013 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 badanych miRNA z polimorfizmem w genie *APOE*

W kolejnym etapie pracy dokonano analizy związku pomiędzy obecnością allelu $\epsilon 4$ w genie *APOE* a poziomem ekspresji wybranych miRNA. Celem tej analizy było określenie potencjalnego wpływu polimorfizmu w genie *APOE* na regulację miRNA mogących uczestniczyć w patogenezie choroby Alzheimera. W tej analizie zbadano tylko grupę pacjentów z wyłączeniem grupy kontrolnej. Grupa badana została podzielona 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 porównywanymi podgrupami. Wyniki przedstawia wykres nr 15.



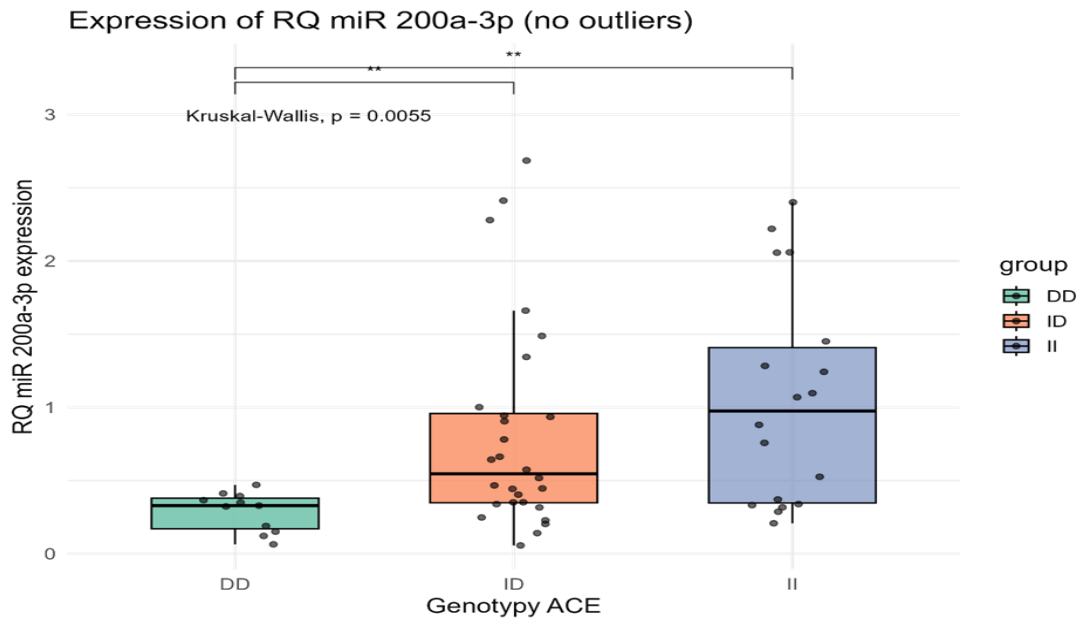
Wykres 15. Różnica ekspresji miR-132-3p w poszczególnych izoformach genu *APOE*. Wyniki przedstawiono jako RQ (ang. relative quantification). Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach p i oznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

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 w zależności od obecności allelu $\epsilon 4$ w genie *APOE*.

4.13 Analiza związku ekspresji badanych miRNA z polimorfizmem w genie *ACE*

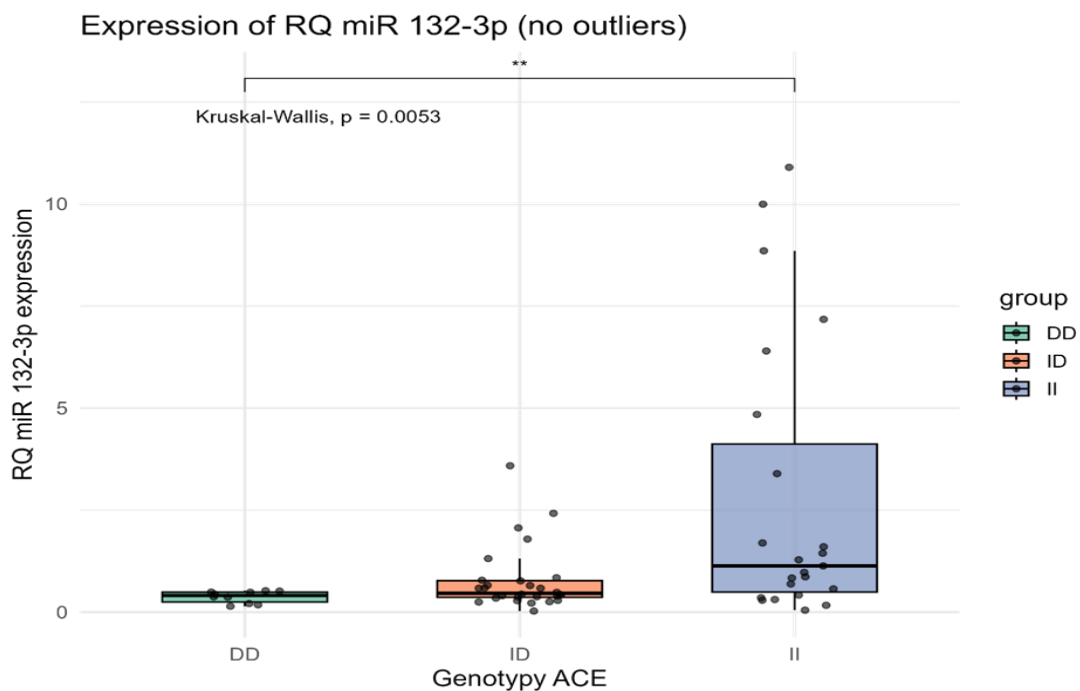
W celu określenia różnicy ekspresji wybranych miRNA w zależności od polimorfizmu w genie *ACE*, wykonano analizę statystyczną z podziałem pacjentów na trzy podgrupy, wykluczając grupę kontrolną. Podstawą klasyfikacji był rodzaj genotypu *ACE* wśród pacjentów: homozygota I/I, homozygota D/D lub heterozygota I/D. Do porównania grup zastosowano nieparametryczny test statystyczny Kruskalla-Wallis'a wraz z analizą 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 genotypami homozygotycznymi I/I oraz heterozygotami I/D ($p > 0,05$). Analiza pokazuje, że obecność przynajmniej jednego allelu insercyjnego (I) wpływa na podwyższenie ekspresji miRNA-200a-3p. Wyniki przedstawia wykres 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 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

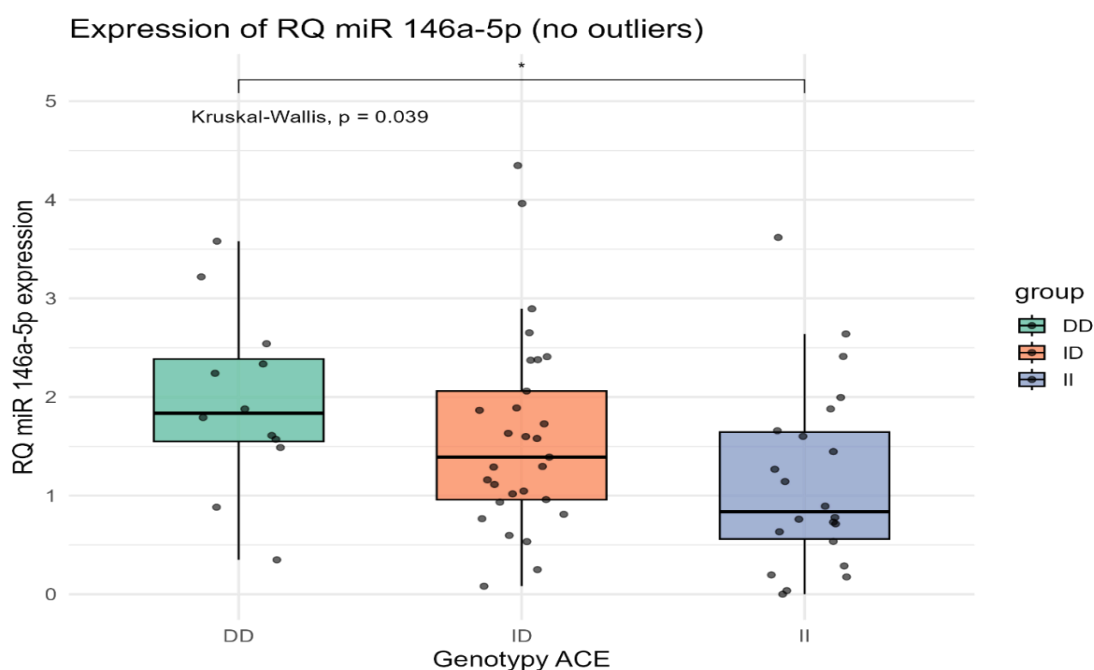
Istotne statystycznie różnice ($p < 0,05$) uzyskano również analizując ekspresję miRNA-132-3p w zależności od poszczególnych genotypów *ACE*, co przedstawione zostało na wykresie nr 17.



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 pacjentami o genotypie homozygot insercyjnych I/I a genotypie homozygot delecyjnych D/D przy poziomie istotności odpowiednio $p < 0,01$. Obecność przynajmniej jednego allelu insercyjnego (I) wyraźnie wpływa na ekspresję miRNA-132-3p. Ekspresja miRNA-132-3p jest najwyższa wśród homozygot posiadających dwa allele insercyjne (I/I) w stosunku do homozygot D/D, jak też heterozygot I/D.

Wykres nr 18 przedstawia wyniki analizy statystycznej ekspresji miRNA-146a-5p w poszczególnych genotypach 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, podobnie jak wcześniejsze badane miRNA, wykazała istotną statystycznie różnicę ($p < 0,05$) między genotypem I/I a homozygotą 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 ucząca 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 20. Imputacja danych testowanych w ramach PMM cz. I

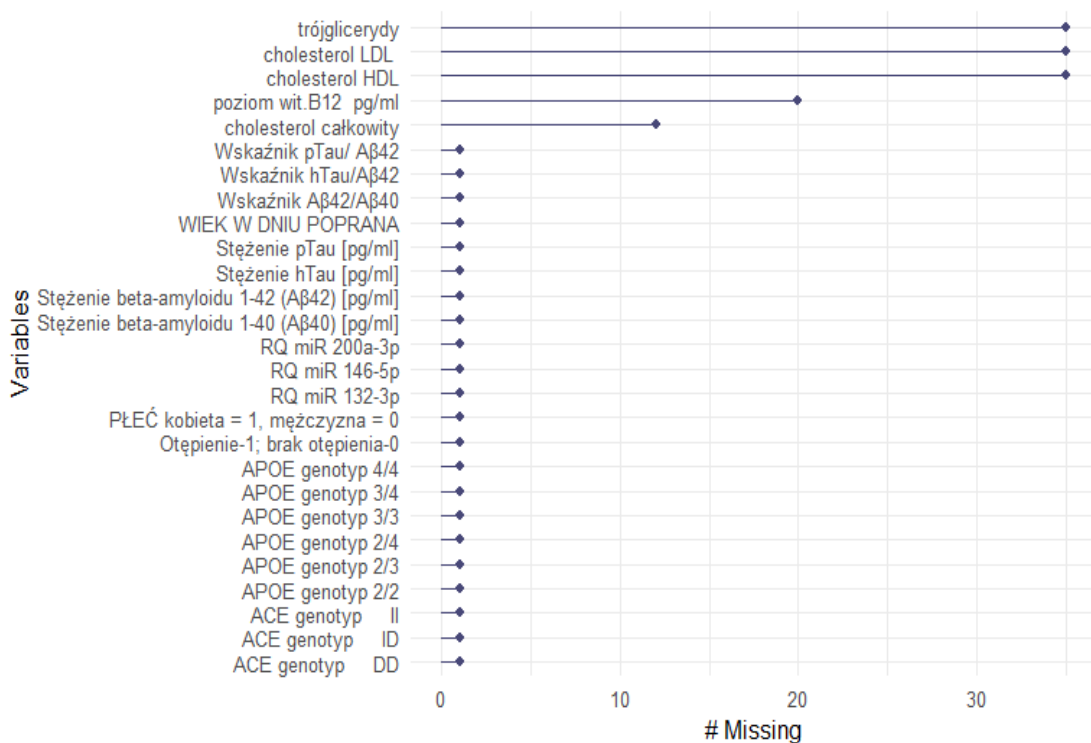
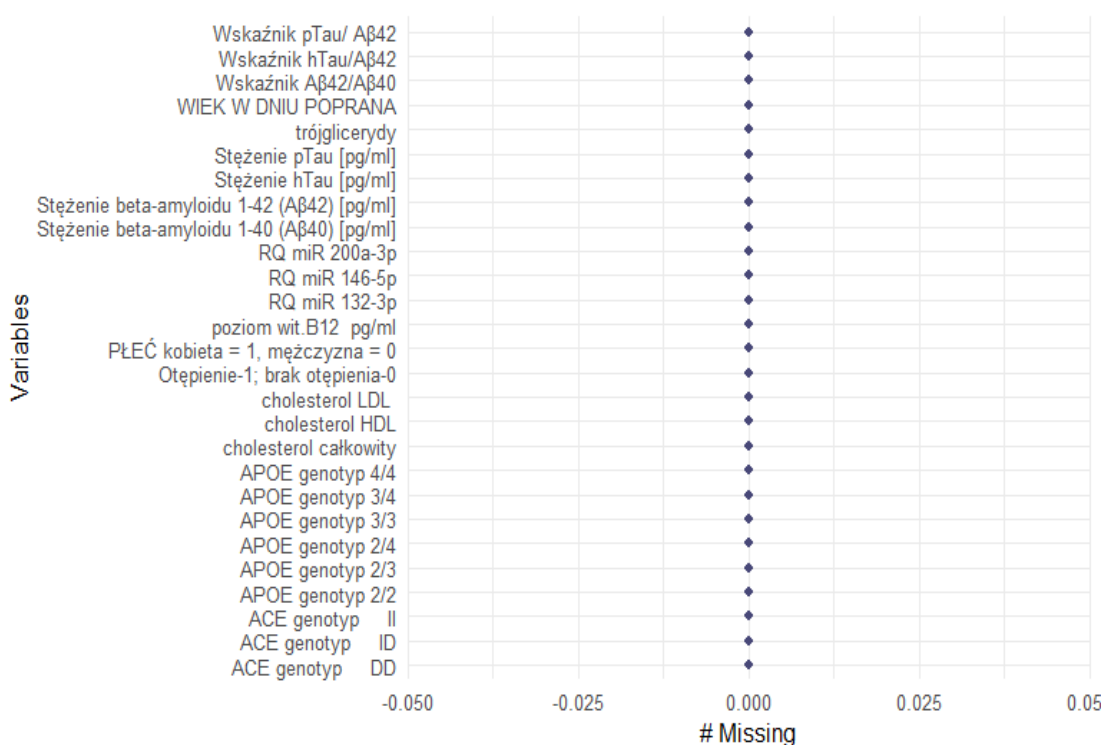


Tabela 21. Imputacja danych testowanych w ramach PMM cz.II

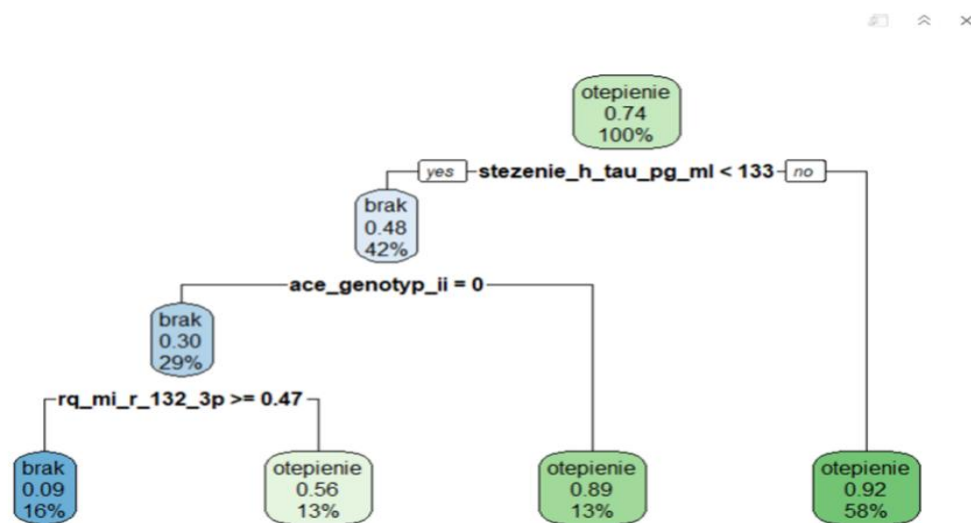


W ramach regresji logistycznej, wybrano następujące parametry do przetestowania możliwości predykcyjnych: poziom witaminy B₁₂, stężenie amyloidu Aβ₁₋₄₀, genotyp *APOE* ε3/3 oraz stężenie trójglicerydów. Model oceniono na podstawie czułości, specyficzności, wartości predykcyjnej dodatniej ang. positive predictive value (PPV) oraz wartości predykcyjnej ujemnej ang. negative predictive value (NPV). 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

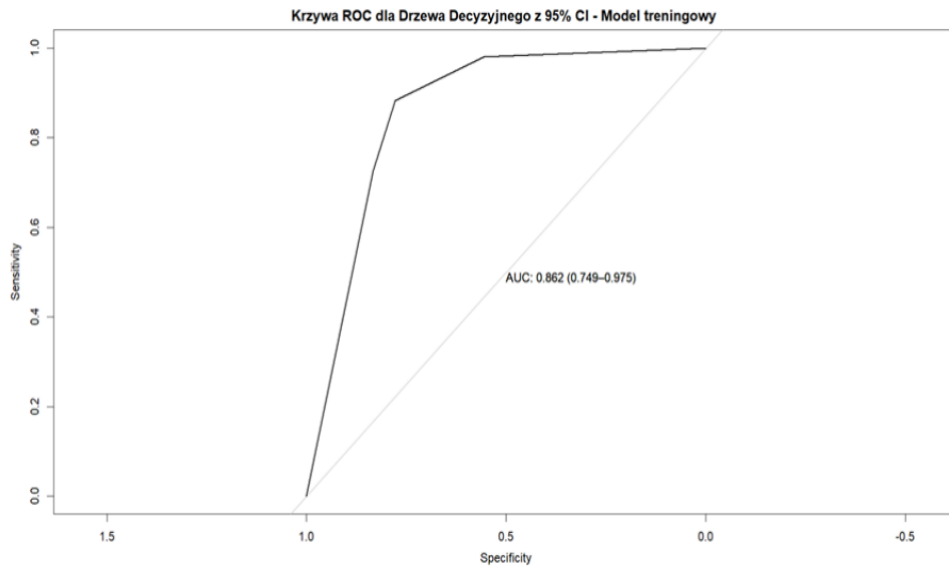
testowej, co świadczy o prawdopodobnym przeuczeniu modelu i uniemożliwia wykorzystanie modelu regresji LASSO do predykcji otępienia.

Model drzewa decyzyjnego wykazał najlepsze możliwości predykcyjne 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.



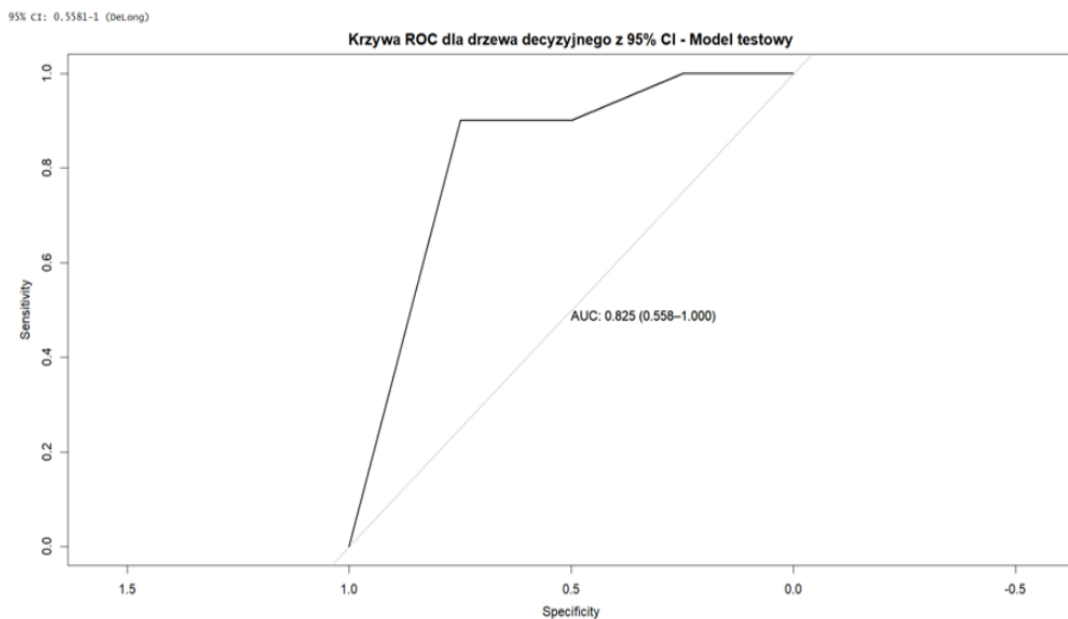
Rycina 9. Schemat drzewa decyzyjnego

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

Zarówno w grupie treningowej jak i testowej uzyskano wyniki na podobnym poziomie, co czyni drzewo decyzyjne przydatnym modelem predykcyjnym choroby otępiennej. Według tego modelu stężenie białka hTau poniżej 133 pg/ml, pacjenci posiadający genotyp inny niż homozygota I/I w genie *ACE* oraz ekspresja miRNA-132a-3p na poziomie wyższym niż 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 ponad 50% przypadków demencji na całym świecie, a liczba ta będzie stale się podwajać co 20 lat do roku 2040 co stanowi bardzo poważny problem wśród społeczeństw głównie w krajach wysoko rozwiniętych [5, 16, 70].

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 stadium otępienia. Zgodnie z przewidywaniami, pacjenci z zaawansowanym stadium otępienia (AD II i AD III) byli najstarsi w badanej grupie. Analiza statystyczna wykazała istotną różnicę wieku pomiędzy pacjentami z MCI a pacjentami w stadium średnim (ADII) oraz głębokim (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 sugerują, 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 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 MCI, a wejściem w stadium 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 wraz 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 AD zwiększa się trzykrotnie co 5 lat, aż do ukończenia 64. roku życia. Następnie podwaja się do 75. roku życia a po 85. roku życia tempo zapadalności na AD 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 (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 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 zmianach biologicznych jakie niesie on 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]. Podsumowując procesowi starzenia towarzyszą liczne zjawiska patofizjologiczne takie jak starzenie się neuronów, spadek całkowitej masy mózgowia, szczególnie istoty białej, zubożenie drzewa dendrytycznego i połączeń synaptycznych, redukcję liczby receptorów cholinergiczych.

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.

Szacuje 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 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 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 [142]. Gen *APOE* jest regulowany estrogenem, progesteronem i testosteronem. Estrogen zwiększając ekspresję i syntezę ApoE w mózgu, jest podstawą różnic płciowych w neurodegeneracji. *APOE- ϵ 3* najsilniej wzmaga neuroprotektoryjne 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. *APOE- ϵ 4* zaburza te mechanizmy neuroprotektoryjne a nawet nasila patologię u osób posiadających tą izoformę białka Apo-E [143].

5.2 Choroby współistniejące wśród pacjentów z otępieniem

Choroba otępienna typu alzheimerowskiego najczęściej związana z podeszłym wiekiem, nie stanowi jedyne 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 stadium otępienia 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, trójglicerydy oraz poziom witaminy B₁₂. Wykonane analizy statystyczne nie wykazały istotnych różnic częstotliwości występowania chorób współistniejących wśród pacjentów w różnym stopniu 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. Wśród pacjentów z AD III, wykazano najniższy poziom witaminy B₁₂ w porównaniu z pacjentami o łagodnych zaburzeniach poznawczych MCI (p= 0,006) oraz z grupą kontrolną 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 wyższym 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 transgenicznych potwierdziły wpływ diety ubogiej w witaminę B₁₂ na zwiększone odkładanie β -amyloidu w hipokampie oraz korze mózgowej [145]. Alam i in., za pomocą testu fluorescencji, wykazali, że witamina B₁₂ hamuje agregacje 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 mózgow 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 wydzielaniem. 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 włącznie [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 w młodym wieku zwiększa ryzyko zachorowania na AD nawet o 1,5 razy, niezależnie od obecności czynnika obciążającego *APOE4*. Może być więc 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 genotypem wśród pacjentów z otępieniem. Genotyp ϵ 2/ ϵ 3 również występuje u wszystkich pacjentów niezależnie od stadium otępienia tj. AD I, AD II, AD III. Wyniki te wskazują, iż Apo-E3 jest najczęściej występującą izoformą białka apolipoproteiny-E w grupie badanej. Izofорма Apo-E2, która wg danych literaturowych może pełnić funkcję protekcyjną w AD, występuje tylko w grupie kontrolnej osób bez otępienia oraz wśród pacjentów z MCI w postaci genotypu homozygotycznego ϵ 2/ ϵ 2. W grupach ze stwierdzonym otępieniem typu alzheimerowskiego w różnych stadiach nie wykazano obecności tego genotypu. Genotyp ϵ 4/ ϵ 4, kodujący izoformę Apo-E4 zwiększa predyspozycje zachorowania, co potwierdziły uzyskane wyniki analizy w niniejszej pracy. Występuje on najliczniej wśród pacjentów ze stwierdzonym otępieniem typu alzheimerowskiego (AD I oraz AD II). Polimorfizm ten można również zauważyć w grupie kontrolnej, lecz w niewielkim procencie. Należy podkreślić, że obecność allelu ϵ 4 w genie *APOE* sama w sobie nie przesądza o wystąpieniu choroby, a jedynie zwiększa predyspozycję 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 konwertaza angiotensyny (*ACE*) odgrywa ważną rolę w patogenezie choroby Alzheimera. Enzym konwertujący angiotensynę jest ważnym składnikiem układu renina-angiotensyna (*RAS*), który promuje przekształcenie angiotensyny I (*Ang I*) w angiotensynę II (*Ang II*). Ponadto *ACE* promuje odkładanie się $A\beta$ 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 w różnym stadium 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 najczęściej wśród pacjentów z *MCI* oraz *AD*. Homozygota insercyjna *I/I* najczęściej związana była z *AD*. 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 polimorfizmu 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 [177].

Dodatkowych informacji o wpływie polimorfizmu *ACE* dostarczyły badania *post mortem* mózgów pacjentów z chorobą Alzheimerera. 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 $A\beta_{1-40}$ mający tendencję do samoagregacji, pod wpływem ACE ulega degradacji. ACE zmniejsza agregacje $A\beta_{1-40}$ a przez to wpływa na obniżenie potencjału cytotoksycznego [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 μm , podwyższyła 1,5-krotnie stężenie $A\beta$ w komórkach [179].

Częstość występowania poszczególnych genotypów w grupie przebadanej w ramach niniejszej rozprawy, jest zgodna z wynikami licznych badań naukowych. Najczęściej występującym genotypem wśród przebadanych 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 Alzheimerera. 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 stadiem 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 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*, *PSENI* 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 cząsteczka miRNA-146a-5p na chorobę otępienną.

Wielu badaczy podjęło się analizy zmian 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 ostre odpowiedzi zapalne [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 stadiem otępienia. Badanie to wskazuje na wyższy poziom ekspresji miRNA-146a w mózgach osób w wyniku progresji choroby otępiennej, w związku z licznymi blaszkami neurotycznymi oraz zaburzonym przekazywaniem neuronalnym [186]. Do nadekspresji miRNA-146a zachodzi również w pierwotnych komórkach astroglijowych, 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 progresją 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 Alzheimerera (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].

W literaturze naukowej można spotkać wyniki badań wskazujące na obniżoną ekspresję cząsteczek miRNA-146a, pomimo wysokich poziomów czynników prozapalnych. Badania przeprowadzone wśród pacjentów z cukrzycą 1 typu, pokazują spadek ekspresji miRNA-146a, mimo wyraźnie podwyższonego poziomu cytokin prozapalnych TNF- α i IL-6 [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 szansę 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 $\epsilon 4$. 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 mózgu 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 stadium 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 podgrupy tj. MCI, AD. Do oceny poziomu ekspresji zastosowano technikę qPCR i analizowano wartości RQ. Wykonane analizy nie wykazały istotnych statystycznie różnic poziomu ekspresji miRNA-200a-3p w badanych podgrupach. 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 podlega modulacji 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. Należy pamiętać, 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 zasila puli cząsteczek miRNA w płynach ustrojowych. Podobnie jak wyniki ekspresji wcześniej opisywanego 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 wielu danych, wskazujących na różnice ekspresji tego miRNA w toku trwania i progresji choroby otępiennej. Przykładem może być porównanie poziomu miR-200a-3p w tkance hipokampu i krwi u myszy transgenicznych 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 miRNA-200a-3p zmienia się podczas choroby-wzrasta na wczesnym etapie AD, zaś spada w toku rozwoju choroby [194]. Wyniki te wskazywałyby na duży potencjał miRNA-200a-3p do różnicowania pacjentów z MCI oraz wczesnego stadium AD.

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 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 miRNA, 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 [196].

MiRNA-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 miRNA-200a-3p przyspiesza oraz wzmaga 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 neuroprotekcyjną 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 myszach (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*, 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 licznych badań, które wykazały podwyższoną ekspresję miRNA-200a-3p w trakcie choroby. Należy zaznaczyć, że allel I w *ACE* zwiększa tylko ryzyko rozwoju choroby otępiennej.

Jak dotąd nie został określony profil ekspresji miRNA-200a-3p, który potwierdziłby uzyskane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wnioski dotyczące wpływu danego polimorfizmu w genie *APOE* oraz *ACE* na tę ekspresję. 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 stadiem otępienia

Spośród licznych miRNA odgrywających rolę w neurodegeneracji, miRNA-132-3p od wielu lat analizowany jest 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. MiRNA-132 bierze udział w funkcjach przeciwzapalnych i wspomagających pamięć w układzie nerwowym [113].

Zaburzenia ekspresji tej cząsteczki miRNA, były przesłanką do przeprowadzenia szczegółowych badań kierunku zmian ekspresji w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej. W przeprowadzonych badaniach wykazano statystycznie istotną różnicę ($p=0,037$) ekspresji miRNA-132-3p podczas progresji choroby otępiennej. Zaobserwowano wyraźny spadek poziomu ekspresji wraz z postępem choroby. Najwyższą ekspresję zaobserwowano w grupie kontrolnej, niższą w MCI oraz kolejno w AD I oraz AD III i AD II. Dodatkowa analiza poziomu ekspresji miRNA-132-3p z podziałem pacjentów na płeć, wykazała istotnie wyższy poziom jego ekspresji u pacjentów płci męskiej. Wyniki te potwierdzają wpływ płci na zachorowalność na AD. W przypadku kobiet poziom ekspresji jest obniżony, ze względu na długość życia oraz dożywania stadium głębokiego otępienia alzheimerowskiego AD II i AD III, które charakteryzują się znacznie obniżoną ekspresją miRNA-132-3p. 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 obniżenie ekspresji miRNA-132-3p wraz z pogłębianiem zmian neurozwyrodnieniowych charakterystycznych dla AD. 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 miRNA-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 miRNA-132 i/lub miRNA-212 odgrywają znaczącą rolę w transmisji 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 cholinergiczej 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 jeden

z najważniejszych czynników transkrypcyjnych ssaków ang. cAMP 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 rolą 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 neuroprotekcijną 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. Najwyższy poziom miRNA-132 zaobserwowano w grupie kontrolnej, u pacjentów z MCI poziom miRNA-132 obniżył się, zaś najniższą ekspresję zaobserwowano u pacjentów w stadium AD. 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 mózgow, 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 u pacjentów posiadających przynajmniej jeden allel $\epsilon 4$ *APOE* w porównaniu z 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.

Istotną różnicę ekspresji miRNA-132-3p wykazano również 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 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 potranskrypcyjnej regulacji 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 określenie kierunku zaburzeń ekspresji trzech wybranych miRNA tj. miRNA-200a-3p, miRNA-146a-5p, miRNA-132-3p uwzględniając różne stadia choroby. Dodatkowo zbadano związek poziomu ekspresji wybranych miRNA z cechami klinicznymi pacjentów. Bardzo ważnym aspektem poruszonym w tej pracy jest związek poziomu ekspresji badanych miRNA, z polimorfizmem w genie *APOE* i *ACE*.

W ramach wykonanej analizy ekspresji wybranych miRNA wyizolowanych z surowicy pacjentów w różnym stadium otępienia oraz grupy kontrolnej, wykazano tendencję spadkową poziomu ekspresji miRNA-132-3p wraz z progresją choroby. Wyniki badań nad miRNA-200a-3p oraz miRNA-146a-5p nie wykazały zaburzeń ich ekspresji, co może być spowodowane niewystarczającą liczebnością badanych podgrup. 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 przedanalizyczne związane z pobraniem oraz przygotowaniem surowicy do badań molekularnych. Ponadto, jeden gen może być regulowany przez różne miRNA, dlatego należałoby podjąć próbą 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, trójglicerydy, witamina B₁₂) a poziomem ekspresji miRNA, nie zaobserwowano żadnych istotnych zależności.

Na podstawie analizy statystycznej stwierdzono natomiast 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. Natomiast 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 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.

Analiza statystyczna wieku grupy badanej, potwierdziła wpływ wieku na stadium otępienia. U osób starszych można zaobserwować głębsze stadia 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 stadium choroby.
- Obecność przynajmniej jednego allelu ε4 w genie *APOE* wpływa na ekspresję 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 splątków 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 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 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. STANDARYZOWANY OGÓLNOPOLSKĄ STRUKTURĄ WIEKU I PŁCI WSPÓLCZYNNIK CHOROBY AD ORAZ CHOROBY POKREWNYCH WG WOJEWÓDZTWA ZAMIESZKANIA PACJENTA (2024 R.)	15
RYCINA 2. PRZETWARZANIE BIAŁKA PREKURSOROWEGO AMYLOIDU (APP) W SZLAKU NIEAMYLOIDOGENNYM ORAZ AMYLOIDOGENNYM	18
RYCINA 3. PRAWDŁOWE BIAŁKO TAU ZAPEWNIAJĄCE SPÓJNOŚĆ MIKROTUBUL CYTOSZKIELETU NEURONÓW (A) ORAZ FOSFORYLOWANE BIAŁKO TAU DESTABILIZUJĄCE STRUKTURĘ MIKROTUBUL	20
RYCINA 4. SCHEMAT HIPOTETYCZNYCH POSTĘPUJĄCYCH ZMIAN NA POZIOMIE BIOCHEMICZNYM, KOMÓRKOWYM I KLINICZNYM	25
RYCINA 5. ETAPY DOJRZEWANIA MIRNA	37
RYCINA 6. LOKALIZACJA GENU KODUJĄCEGO MIR-200A NA CHROMOSOMIE 1.....	42
RYCINA 7. LOKALIZACJA GENU KODUJĄCEGO MIR-146A NA CHROMOSOMIE 5.....	44
RYCINA 8. LOKALIZACJA GENU KODUJĄCEGO MIR- 132 NA CHROMOSOMIE 17	45
RYCINA 9. SCHEMAT DRZEWA DECYZYJNEGO.....	97

10 SPIS TABEL

TABELA 1. BIOMARKERY DIAGNOSTYCZNE W CHOROBIE ALZHEIMERA Z KRWI.....	28
TABELA 2. SKALA ERLANGEN DIAGNOZUJĄCA CHOROBE ALZHEIMERA.	30
TABELA 3. INTERPRETACJA SKALI ERLANGEN	31
TABELA 4. CHARAKTERYSTYKA GRUPY BADANEJ	49
TABELA 5. GENOTYPY ACE W ZALEŻNOŚCI OD WIELKOŚCI UZYSKANYCH PRODUKTÓW PCR.....	55
TABELA 6. GENOTYPY APOE OKREŚLONE NA PODSTAWIE ANALIZY RESTRYKCYJNEJ.....	57
TABELA 7. SKŁAD MIESZANINY REAKCYJNEJ DO RT-PCR	63
TABELA 8. SKŁAD MIESZANINY REAKCYJNEJ REAL-TIME PCR DO AMPLIFIKACJI CDNA	65
TABELA 9. PODZIAŁ GRUPY BADANEJ ZE WZGLĘDU NA PŁEĆ	69
TABELA 10. WIEK W GRUPIE KONTROLNEJ ORAZ W GRUPIE PACJENTÓW Z PODZIAŁEM NA STADIUM OTĘPIENIA	70
TABELA 11. RÓŻNICA WIEKU MIĘDZY GRUPĄ KONTROLNĄ ORAZ GRUPĄ PACJENTÓW Z PODZIAŁEM NA STADIUM OTĘPIENIA	70
TABELA 12. ZESTAWIENIE CECH KLINICZNYCH Z UWZGLĘDNIENIEM PODZIAŁU NA PODGRUPY MCI, AD I, AD II, AD III ORAZ GRUPĘ KONTROLNĄ K.....	72
TABELA 13. STĘŻENIE BIAŁEK B- AMYLOIDOWYCH W GRUPACH BADANYCH Z UWZGLĘDNIENIEM STADIUM CHOROBY	76
TABELA 14. STĘŻENIE BIAŁEK TAU W GRUPIE KONTROLNEJ ORAZ W GRUPIE PACJENTÓW Z PODZIAŁEM NA STADIUM OTĘPIENIA	78
TABELA 15. WARTOŚCI CHARAKTERYSTYCZNYCH WSKAŹNIKÓW DIAGNOSTYCZNYCH W GRUPIE KONTROLNEJ ORAZ W GRUPIE BADANEJ Z UWZGLĘDNIENIEM STADIUM CHOROBY.....	79
TABELA 16. WARTOŚCI WZGLEDENJ EKSPRESJI [RQ] BADANYCH miRNA W GRUPIE KONTROLNEJ ORAZ W GRUPIE BADANEJ Z UWZGLĘDNIENIEM STADIUM CHOROBY	84
TABELA 17. WSPÓLCZYNNIK KORELACJI R SPEARMANA EKSPRESJI miRNA Z PARAMETRAMI BIOCHEMICZNYMI W GRUPIE PACJENTÓW BADANYCH.....	88
TABELA 18. WSPÓLCZYNNIK KORELACJI R SPEARMANA EKSPRESJI miRNA Z PARAMETRAMI BIOCHEMICZNYMI W GRUPIE KONTROLNEJ.....	89
TABELA 19. WSPÓLCZYNNIK KORELACJI R SPEARMANA EKSPRESJI miRNA Z POZIOMEM WSKAŹNIKÓW DIAGNOSTYCZNYCH W GRUPIE OSÓB Z OTĘPIENIEM.....	90
TABELA 20. IMPUTACJA DANYCH TESTOWANYCH W RAMACH PMM CZ. I.....	95
TABELA 21. IMPUTACJA DANYCH TESTOWANYCH W RAMACH PMM CZ.II	96

11 SPIS WYKRESÓW

WYKRES 1 . SZACOWANY ODSETEK CHORYCH NA CHOROBE ALZHEIMERA I CHOROBY POKREWNE W WYBRANYCH KRAJACH EUROPEJSKICH W LATACH 2014 I 2021	12
WYKRES 2. SZACOWANA LICZBA OSÓB CHORYCH NA CHOROBE ALZHEIMERA I CHOROBY POKREWNE W POLSCE (2000–2021)	13
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).....	14
WYKRES 4. LICZBA OSÓB CHORYCH NA CHOROBE ALZHEIMERA LUB CHOROBY POKREWNE WG PŁCI I WIEKU	22
WYKRES 5. WIEK PACJENTÓW PODCZAS DIAGNOSTYKI A STADIUM OTĘPIENIA.....	71
WYKRES 6. POZIOM WITAMINY B ₁₂ W GRUPIE KONTROLNEJ, PACJENTÓW Z MCI ORAZ AD (BEZ WARTOŚCI ODSTAJĄCYCH).	74
WYKRES 7. POZIOM WITAMINY B ₁₂ W ZALEŻNOŚCI OD STADIUM CHOROBY ORAZ W GRUPIE KONTROLNEJ (BEZ WARTOŚCI ODSTAJĄCYCH).....	75
WYKRES 8. STĘŻENIE B AMYLOIDU 1-42 (Aβ ₄₂) W GRUPIE KONTROLNEJ ORAZ GRUPIE BADANEJ Z PODZIAŁEM NA STADIUM CHOROBY	77
WYKRES 9. POZIOM WSPÓŁCZYNNIKA hTAU/ Aβ ₁₋₄₂ W GRUPIE KONTROLNEJ ORAZ GRUPIE PACJENTÓW Z UWZGLĘDNIENIEM STADIUM CHOROBY	80
WYKRES 10. ROZKŁAD PROCENTOWY POSZCZEGÓLNYCH GENOTYPÓW W GENIE APOE Z PODZIAŁEM NA STADIUM OTĘPIENIA	82
WYKRES 11. ROZKŁAD PROCENTOWY POSZCZEGÓLNYCH GENOTYPÓW W GENU ACE Z PODZIAŁEM NA STADIUM OTĘPIENIA	83
WYKRES 12. RÓŻNICA EKSPRESJI miR-132-3P W GRUPIE KONTROLNEJ K ORAZ PACJENTÓW Z PODZIAŁEM NA MCI, ORAZ AD (BEZ WARTOŚCI ODSTAJĄCYCH)	85
WYKRES 13. RÓŻNICA EKSPRESJI miR-132-3P W PODGRUPACH MCI, AD I, AD II, AD III, K (BEZ WARTOŚCI ODSTAJĄCYCH)	86
WYKRES 14. POZIOM EKSPRESJI miRNA 132-3P W ZALEŻNOŚCI OD PŁCI	87
WYKRES 15. RÓŻNICA EKSPRESJI miR-132-3P W POSZCZEGÓLNYCH IZOFORMACH GENU APOE WYNIKI PRZEDSTAWIONO JAKO RQ	91
WYKRES 16. RÓŻNICA EKSPRESJI miR-200a-3P W POSZCZEGÓLNYCH GENOTYPACH GENU ACE	93
WYKRES 17. RÓŻNICA EKSPRESJI miR-132-3P W POSZCZEGÓLNYCH GENOTYPACH GENU ACE	93

WYKRES 18. RÓŻNICA EKSPRESJI miR-146A-5P W POSZCZEGÓLNYCH GENOTYPACH GENU ACE.	94
WYKRES 19. KRZYWA ROC DLA KLASYFIKATORA OTĘPIENIA W GRUPIE TRENINGOWEJ .	98
WYKRES 20. KRZYWA ROC DLA KLASYFIKATORA OTĘPIENIA W GRUPIE TESTOWEJ	98

12 PIŚMIENICTWO

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; Available from: <https://ezdrowie.gov.pl/portal/home/badania-i-dane/zdrowe-dane/raporty/nfz-o-zdrowiu-choroba-alzheimer-a-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. 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.
31. 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.
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; Available from: <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: <https://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*. *Postepy 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; Available from: <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 17.07.2025; Available from: <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. Perła-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. Rigat, B., et al., *An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels*. J Clin Invest, 1990. **86**(4): p. 1343-6.
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 Cells1*. 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).

13 ZAŁĄCZNIKI

Uchwała nr 59/B/2015 Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej

Aneks nr K/B/8/D/2025 do Uchwały nr 59/B/2015