

Angelika Więckowska-Gacek

**Wpływ diety zachodniej na rozwój stanu zapalnego
i patologicznych zmian w mózgu w mysim modelu
choroby Alzheimera**

Praca doktorska

wykonana w Pracowni Badań Przedklinicznych o Podwyższonym Standardzie
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:

Prof. dr hab. Urszula Wojda

PROMOTOR POMOCNICZY:

dr Anna Mietelska-Porowska

Warszawa, 2023

Praca została sfinansowana w ramach projektów badawczych Narodowego Centrum Nauki:
Preludium nr UMO-2018/29/N/NZ7/01724 (kierownik: mgr inż. Angelika Więckowska-Gacek),
Sonata nr UMO-2014/15/D/NZ4/04361 (kierownik: dr Anna Mietelska-Porowska, doktorantka:
mgr inż. Angelika Więckowska-Gacek), oraz ze środków statutowych Instytutu Nenckiego.

Podziękowania

Przede wszystkim chciałam złożyć serdeczne podziękowania moim promotorkom, Pani Profesor Urszuli Wojdzie oraz dr Annie Mietelskiej-Porowskiej za zaangażowanie, życzliwość i doświadczenie, którym dzieliły się ze mną w czasie mojej pracy w Pracowni Badań Przedklinicznych o Podwyższonym Standardzie.

Serdecznie dziękuję wszystkim obecnym i byłym pracownikom LaPrec, z którymi miałam przyjemność współpracować, za wspólną rozwijającą pracę, wszelkie pomysły, wsparcie, inspirujące rozmowy oraz przyjazną, rodzinną atmosferę w Pracowni.

Dziękuję też mojej Rodzinie, ojcu Jerzemu oraz siostrze Alicji i Agnieszce, za ich wsparcie i wiarę we mnie na każdym etapie mojej edukacji i pracy naukowej.

Szczególnie pragnę też podziękować mężowi Arkowi oraz teściom, Gizeli i Arturowi, gdyż bez ich pomocy ta rozprawa by nie powstała.

Pracę tę dedykuję mojej córce Anielce, która jest dla mnie największą inspiracją.

Spis treści

Streszczenie	7
Abstract	8
Wykaz najważniejszych skrótów	9
1. Wstęp	11
1.1. Charakterystyka i przebieg choroby Alzheimera (AD)	12
1.2. Progresja zmian patologicznych w mózgu w AD	14
1.3. Podstawowe hipotezy oraz genetyczne czynniki ryzyka AD	16
1.4. Hipoteza amyloidowa: A β jako główny czynnik wyzwalający stan zapalny mózgu	18
1.5. Alternatywne hipotezy patogenezy AD	19
1.5.1. Hipoteza stanu zapalnego mózgu w AD w świetle modelu podwójnego szlaku	20
1.6. Modyfikowalne czynniki ryzyka AD	22
1.7. Dieta zachodnia i metaboliczny stan zapalny jako potencjalny czynnik ryzyka AD	23
1.7.1. Charakterystyka diety zachodniej (WD)	23
1.7.2. Zespół metaboliczny i metaboliczny stan zapalny w rozwoju AD	24
1.7.3. Wpływ WD na upośledzenie pamięci i markery AD w mózgu	27
1.8. Ogólnoustrojowy stan zapalny powstały w wyniku infekcji jako czynnik rozwoju AD	28
1.8.1. Ogólnoustrojowy stan zapalny wywołany przez bakteryjny lipopolisacharyd (LPS)	30
1.8.2. Wpływ dootrzewnowej iniekcji LPS na stan zapalny w mózgu i patogenezę AD	30
2. Założenia i cele pracy	32
3. Materiały i Metody	33
3.1. Spis zastosowanych odczynników, roztworów, przeciwciał i urządzeń	33
3.2. Hodowla zwierząt oraz schemat doświadczalny	39
3.2.1. Charakterystyka szczepu myszy doświadczalnych i warunki hodowli	39
3.2.2. Grupy doświadczalne zwierząt	40
3.2.3. Charakterystyka stosowanych diet	41
3.3. Uśmiercanie, perfuzja oraz pobieranie krwi i tkanek	42
3.4. Hematologiczna i biochemiczna analiza krwi	42
3.4.1. Procedura pobrania oraz przygotowania krwi i surowicy do analizy	42
3.4.2. Hematologiczna analiza krwi	42
3.4.3. Analiza biochemiczna parametrów krwi	42
3.5. Analiza immunohistochemiczna	43
3.5.1 Przygotowanie tkanek do znakowania histologicznego	43
3.5.2. Znakowanie histologiczne skrawków tkanki mózgu i wątroby	43
3.5.3. Znakowanie immunohistochemiczne	44

Spis treści

3.5.4. Analiza mikroskopowa stopnia stłuszczenia wątroby.....	44
3.5.5. Analiza mikroskopowa powierzchni znakowania białka Iba1.....	44
3.5.6. Analiza mikroskopowa znakowania H&E oraz białek 6E10, pTau(Thr231).....	45
3.6. Analiza ilościowa tkanki mózgowej za pomocą metody Western Blotting.....	45
3.6.1. Przygotowanie lizatów tkankowych.....	45
3.6.2. Technika SDS-PAGE i Western blotting.....	45
3.6.3. Analiza chemiluminescencji i densytometria.....	46
3.7. Statystyczna analiza danych.....	46
4. Wyniki.....	47
4.1. Grupy doświadczalne i sposób przedstawienia wyników.....	47
4.2. Wpływ WD i LPS na rozwinięcie zespołu metabolicznego.....	48
4.3. Wpływ WD i LPS na rozwinięcie ogólnoustrojowego stanu zapalnego.....	53
4.4. Wpływ WD i LPS na aktywację komórek astrogleju i mikrogleju.....	56
4.4.1. Aktywacja astrocytów.....	56
4.4.2. Zmiana sposobu proteolizy izoform białka akwaporyny-4.....	59
4.4.3. Aktywacja mikrogleju, napływ obwodowych makrofagów oraz zaburzenie zdolności fagocytozy.....	62
4.5. Wpływ WD i LPS na poziom cytokin prozapalnych oraz szlak TLR4 - IL-6/IL1- β	70
4.6. Wpływ WD i LPS na markery charakterystyczne dla AD.....	77
4.6.1. Gromadzenie się amyloidu β i tworzenie blaszek starczych w mózgu.....	77
4.6.2. Fosforylacja białka Tau oraz morfologia cytoszkieletu neuronów.....	86
4.7. Wpływ WD i LPS na markery neurodegeneracji.....	92
4.7.1. Związane z wiekiem zaburzenia parametrów charakteryzujących synapsy i neurony.....	92
4.7.2. Porównanie zmian morfologicznych neuronów w hipokampie oraz w korze śródwęczowej.....	99
4.7.3. Porównanie zmian morfologicznych neuronów myszy APP ^{swe} do myszy szczepu dzikiego C57BL/6.....	106
5. Dyskusja.....	108
5.1. Sekwencja procesów neuropatologicznych jest odmienna w hipokampie w porównaniu z korą śródwęczową u myszy APP ^{swe}	108
5.2. WD wywołuje zespół metaboliczny i ogólnoustrojowy stan zapalny.....	113
5.3. WD przyspiesza rozwinięcie neurozapalenia i neuropatologii AD: szczególna wrażliwość hipokampa w porównaniu do kory śródwęczowej.....	116
5.4. LPS przyspiesza neurozapalenie, ale nie patologię amyloidu.....	122
5.5. Jednoczesne stosowanie WD i LPS wywołuje zmiany podobne do zmian obserwowanych pod wpływem WD, ale bez efektu addytywnego.....	125

Spis treści

5.6. WD, przeciwieństwo LPS, jest czynnikiem wywołującym metaboliczny stan zapalny skutkujący silną odpowiedzią neurozapalną i neuropatologiczną w mózgu	129
5.6.1. Zaburzenia bariery krew-mózg wywołane przez WD jako "otwarta brama" dla napływu A β do mózgu w progresji AD.....	130
5.6.2. Istotne dla AD konsekwencje narażenia mózgu na cholesterol pochodzący z WD	131
5.6.3. Istotne dla AD konsekwencje napływu do mózgu nasyconych kwasów tłuszczowych pochodzących z WD.....	133
6. Podsumowanie i wnioski	136
7. Bibliografia.....	138
8. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej.....	167
9. Publikacje dodatkowe	167

Streszczenie

Choroba Alzheimera (ang. *Alzheimer's disease* - AD) przez wiele lat rozwija się bez objawów, a dopiero po ok. 10-20 latach pojawiają się objawy kliniczne, takie jak zanik pamięci i funkcji poznawczych. Istnieje wiele hipotez przyczyn, sekwencji zdarzeń oraz mechanizmów molekularnych rozwoju AD, jednak żadna z nich nie obejmuje złożoności choroby, co przekłada się na brak skutecznych metod leczenia. Ponadto, coraz więcej dowodów wskazuje, że modyfikowalne czynniki środowiskowe, takie jak niezdrowa dieta czy przebyte infekcje, odgrywają istotną rolę w rozwoju AD. Wobec braku skutecznych metod leczenia, działania prewencyjne wydają się najlepszą drogą do ograniczenia zachorowalności na AD. Jednak zaprojektowanie skutecznej strategii prewencyjnej wymaga holistycznego zrozumienia wzajemnych powiązań pomiędzy narządami, komórkami i ścieżkami sygnalizacyjnymi łączącymi czynniki ryzyka z patologią AD. **Celem niniejszej pracy było zweryfikowanie, czy niezdrowy sposób odżywiania, taki jak dieta zachodnia (WD), poprzez wywołanie zespołu metabolicznego i ogólnoustrojowego stanu zapalnego może przyspieszać i/lub intensyfikować stan zapalny mózgu oraz zmiany neuropatologiczne charakterystyczne dla AD.**

W pracy badano myszy transgeniczne z ekspresją ludzkiego genu białka prekursorowego amyloidu z mutacją szwedzką (APP^{swe}). Myszy analizowano w 5 grupach wiekowych: 4, 8, 12, 16 i 20 miesięcy, które odzwierciedlały przedziały wiekowe u ludzi: 25, 35, 45, 65, 75 lat. Myszy w wieku 4 - 12 miesięcy odpowiadały różnym etapom stadium przedobjawowego AD, w których zachodzą procesy patologiczne prowadzące do agregacji peptydów A β , natomiast nie występują jeszcze złogi A β w postaci płytek starczych. W każdej grupie wiekowej badano 4 podgrupy doświadczalne: 1) CTR – kontrolna, myszy karmione dietą standardową, 2) WD – myszy karmione WD, 3) LPS – myszy karmione dietą standardową, którym poprzez dootrzewnowe podanie lipopolisacharydu (LPS) indukowano ogólnoustrojowy stan zapalny oraz 4) WD+LPS – myszy karmione WD, którym dootrzewnowo podano LPS.

W pracy po raz pierwszy scharakteryzowano szczegółową sekwencję zmian ogólnoustrojowych i metabolicznych, a następnie zmiany neurozapalne i patologię A β w obszarze hipokampa i kory śródwęchowej wywołane przez WD u myszy APP^{swe}. Wykazano, że WD po 3 tygodniach wywołuje hipercholesterolemię, a po 5 miesiącach otyłość i niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby, co świadczy o rozwiniętym zespole metabolicznym. W tym samym czasie obserwowano wzrost stężenia białych krwinek, co sugeruje obecność ogólnoustrojowego stanu zapalnego o niskim nasileniu. Analiza tkanki mózgowej wykazała, że hipokamp w porównaniu do kory śródwęchowej jest strukturą bardziej wrażliwą na skład diety. 3 tygodnie WD przyspieszyło o 4 miesiące wzrost poziomu APP i jego C-końcowych produktów proteolizy oraz aktywację astrocytów. Po 5 miesiącach WD zaobserwowano przyspieszoną o 4 miesiące aktywację mikrogleju oraz zaburzenie fagocytozy, co prawdopodobnie było przyczyną przyspieszonego o 8 miesięcy odkładania się blaszek amyloidu w hipokampie. Stwierdzono też, że WD indukuje silniejszą odpowiedź zapalną niż LPS, oraz w przeciwieństwie do LPS odpowiedź na WD jest ściśle związana z procesami amyloidogenezy, a nie z fosforylacją białka pTau(Thr231) w mózgu myszy APP^{swe}.

Otrzymane wyniki wskazują, że WD przyspiesza patologię AD oraz że AD jest zaburzeniem całego organizmu, w którym narządy obwodowe mogą odgrywać kluczową rolę patogenną. W szczególności, wywołane przez WD uszkodzenie wątroby wpływa na zaburzoną gospodarkę cholesterolu oraz prowadzi do zaburzenia procesów degradacji i usuwania amyloidu, co wydaje się być jednym z głównych czynników przyspieszających rozwój choroby. Uzyskane wyniki mogą wspomóc opracowanie metod skutecznej prewencji i wczesnej terapii AD.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) develops silently as a pre-symptomatic stage for many years, and only after 10-20 years clinical symptoms appear, such as memory and cognitive decline. There are many hypotheses regarding the causes, sequence of events and molecular mechanisms of AD development, but none of them covers the complexity of the etiology of the disease, which translates into the lack of effective treatments. In addition, increasing evidence indicates that modifiable environmental factors, such as an unbalanced diet or past infections, play an important role in the development of AD. In the absence of effective treatments for AD, preventive measures seem to be the best way to reduce the incidence of AD. However, designing an effective preventive strategy requires a holistic understanding of the interrelationships between organs, cells, and signaling pathways linking risk factors with the development of AD pathology. Therefore, **the aim of this study was to verify the hypothesis that an improper diet, such as the Western diet (WD), by inducing metabolic syndrome and systemic inflammation, may accelerate and/or intensify brain inflammation and neuropathological changes characteristic of AD.**

In this PhD study, transgenic mice expressing the human amyloid precursor protein gene with the Swedish mutation (APP^{swe}) were studied. Mice were analyzed in 5 age groups: 4, 8, 12, 16 and 20 months, which mirrored the age ranges in humans: 25, 35, 45, 65, 75 years, respectively. The 4- to 12-month-old mice corresponded to pre-symptomatic stages where the pathological processes leading to the aggregation of A β peptides are taking place, while A β deposits in the form of senile plaques are not yet present. In each age group, 4 experimental subgroups were tested: 1) CTR – control group, mice fed a standard diet, 2) WD – mice fed a Western diet, 3) LPS – mice fed a standard diet, which were treated with intraperitoneal administration of lipopolysaccharide (LPS) for induction of systemic inflammation, and 4) WD+LPS – WD-fed mice given LPS intraperitoneally.

This PhD thesis characterizes for the first time a detailed sequence of systemic and metabolic changes, followed by neuroinflammatory changes and A β pathology in the hippocampus and entorhinal cortex induced by WD in APP^{swe} mice. It has been shown that 3 weeks of feeding WD causes hypercholesterolemia and fatty changes in hepatocytes. After 5 months of WD, the induced metabolic changes were joined by obesity and non-alcoholic fatty liver disease, which indicates a developed metabolic syndrome. At the same time, an increase in the concentration of white blood cells was observed, suggesting the presence of low-grade systemic inflammation. The analysis of brain tissue showed that the hippocampus, compared to the entorhinal cortex, is a structure more sensitive to the composition of the diet. 3 weeks of WD accelerated by 4 months the increase in the level of APP and its C-terminal proteolytic fragments and the activation of astrocytes. After 5 months of WD, the activation of microglial cells was additionally observed to be accelerated by 4 months and its phagocytic functions disturbed, which was most likely the cause of the process of amyloid plaque deposition in the hippocampus accelerated by 8 months. Comparison of WD-induced changes with LPS-induced changes showed that WD induces a stronger inflammatory response in the brain and, unlike LPS, is closely related to amyloidogenesis processes and not pTau(Thr231) protein phosphorylation in APP^{swe} mice.

The obtained results indicate that WD can significantly accelerate the pathology of AD, and that AD is a disorder not only of the brain, but of the whole organism, and peripheral organs may play a key role in its pathogenesis. In particular, WD-induced liver damage may affect the disturbed cholesterol metabolism and lead to impaired amyloid degradation and removal processes, which seems to be one of the main factors accelerating the development of the disease. The obtained results may support the development of methods for effective prevention and early treatment of AD.

Wykaz najważniejszych skrótów

4M, 8M, 12M, 16M, 20M – myszy w wieku 4, 8, 12, 16 i 20 miesięcy

AD (Alzheimer's disease) – choroba Alzheimera

ANOVA (Analysis of Variation) – analiza wariancji

APP (Amyloid Precursor Protein) – białko prekursorowe amyloidu

APP^{swe} – transgeniczna linia myszy zawierająca transgen kodujący 695-aminokwasową izoformę ludzkiego APP z mutacją szwedzką

AQP4 (aquaporin 4) – akwaporyna 4

A β – amyloid β

BBB (blood-brain barrier) – bariera krew-mózg

BSA (Bovine Serum Albumin) – albumina surowicy bydłowej

CA 1 i 3 – pola hipokampa 1 i 3

CD68 (cluster differentiation 68) – klaster różnicowania 68

CTFs (C-terminal fragments) – fragmenty białka APP cięte od C-końca

CTR – kontrola

CX3CL1 (chemokine (C-X3-C motif) ligand 1, fractalkine) – fraktalkina

CX3CR1 (CX3C motif chemokine receptor 1) – receptor chemokinowy 1 z motywem CX3C, inaczej receptor dla fraktalkiny

DG (dentate gyrus) – zakręt zębaty

EtOH – etanol

FAD (familial Alzheimer's disease) rodzinna postać AD

FFA (free fatty acids) – wolne kwasy tłuszczowe

GFAP (glial fibrillary acidic protein) – glejowe białko fibrylarne

HChol – hipercholesterolemia

Iba1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1) – zjonizowana cząsteczka adaptera wiążącego wapń 1

IL (interleukin) – interleukina

LPS (lipopolysaccharides) – lipopolisacharyd

LTD (long-term depression) – długotrwałe osłabienie synaptyczne

LTP (long-term potentiation) – długotrwałe wzmocnienie synaptyczne

MCI (Mild Cognitive Impairment) – łagodne zaburzenia poznawcze

Wykaz skrótów

- MetS** (metabolic syndrome) – zespół metaboliczny
- NAFLD** (non-alcoholic fatty liver disease) – niealkoholowa stłuszczenie wątroby
- NASH** (non-alcoholic steatohepatitis) – niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenia wątroby
- NeuN** (neuronal nuclei marker) – marker znakujący jądra neuronalne
- NGS** (normal goat serum) – surowica kozia
- NTF** (neurofibrillary tangles) – splątki neurofibrylarne
- P2RY12** (purinergic receptor P2Y12) – purynergiczny receptor P2Y12
- PHF** (Paired Helical Filaments) – podwójne helikalne filamenty
- PS1** (Presenilin 1) – presenilina 1
- PS2** (Presenilin 2) – presenilina 2
- PSD95** (postsynaptic density protein 95) – białko gęstości synaptycznej 95
- p-tau** – phospho-tau
- PVDF** (Polyvinylidene difluoride) – polifluorek winylidenu
- SAD** (sporadic Alzheimer's disease) – sporadyczna postać choroby Alzheimera
- SDS-PAGE** (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) – elektroforeza białek w denaturującym żelu poliakryloamidowym
- SFA** (saturated fatty acids) – nasycone kwasy tłuszczowe
- TLR** (toll-like receptor) – receptor typu toll
- TNF- α** (tumor necrosis factor- α) – czynnik martwicy nowotworu α
- WD** (western diet) – dieta zachodni

1. Wstęp

Postęp naukowy spowodował w czasach współczesnych wzrost średniej długości życia ludzkiego w porównaniu z poprzednimi wiekami. Prognozy demograficzne wskazują wyraźnie na proces starzenia się społeczeństw, głównie krajów uprzemysłowionych, w tym także Polski. Od 1950 do 2019 r. w Polsce średnia długość życia mężczyzn wzrosła o około 18 lat, a kobiet o 20 lat. Wzrost średniej długości życia przez wiele lat wynikał głównie ze zmniejszenia umieralności niemowląt, natomiast w ostatnich latach coraz większe znaczenie miał również spadek częstości zgonów wśród osób starszych. W latach 2000–2021 liczebność grupy wiekowej „65+” w Polsce zwiększyła się o prawie 2,9 mln, do wielkości 8,5 mln, a jej odsetek wzrósł w tym okresie z niespełna 15% do ponad 22%. Ponadto szacuje się, że w 2050 r. grupa wiekowa „65+” osiągnie liczebność ok. 12 mln osób (GUS, Sytuacja demograficzna Polski do roku 2021).

Konsekwencją wzrostu średniej długości życia są choroby związane z wiekiem, będące coraz większym wyzwaniem zdrowotnym i ekonomicznym na świecie. Proces starzenia się jest ściśle związany z rozwojem chorób neurodegeneracyjnych i otępiennych, a naturalną konsekwencją starzejącego się społeczeństwa jest gwałtowny wzrost przypadków demencji. W 2019 roku na świecie z demencją żyło około 55 milionów ludzi; przewiduje się, że do 2030 roku liczba ta wzrośnie do 78 mln, a do 2050 roku 139 mln (WHO Global status report, 2021, <https://www.alzint.org/about/dementia-facts-figures/dementia-statistics/>). W krajach europejskich populacja osób żyjących z demencją wyniosła 9,8 mln w 2018 roku i przewiduje się, że wzrośnie do 11,4 mln w 2025 roku, a 18,8 mln do 2050 roku (Georges i in., 2020). Istnieje kilka różnych typów demencji, zwanej także otępieniem, a choroba Alzheimera (ang. *Alzheimer's disease* – AD), będąca nieodwracalnym zaburzeniem neurodegeneracyjnym, jest najczęstszą ich przyczyną, gdyż stanowi 60-80% przypadków (Alzheimer's disease facts and figures, 2023).

Częstość występowania demencji i AD w Polsce także nie wygląda optymistycznie. Opublikowane w 2020 roku wyniki najnowszego badania, dotyczącego występowania zaburzeń funkcji poznawczych w populacji polskich seniorów, realizowanego w ramach projektu PolSenior2 wskazują, że objawy otępienia występują u 15,8% osób w wieku 60+ (Wierucki i in., 2022). Według danych NFZ w 2019 roku w Polsce zarejestrowano około 379 tys. osób z AD, w tym 271 tys. kobiet i 109 tys. mężczyzn (NFZ o zdrowiu. Alzheimer. 2022). Jak wynika z prognoz dla Polski, już w 2050 r. liczba osób w wieku 65+ z demencją może wynosić ponad 1,7 mln, z czego demencja typu alzheimerowskiego może dotyczyć nawet 1,2 mln osób (raport PEX 2022, Wierucki i in., 2022), czyli ponad trzykrotnie więcej niż w 2019 roku.

Otępienie, a zwłaszcza AD, należą do najkosztowniejszych chorób współczesnego świata. Na koszty generowane przez to schorzenie składają się koszty bezpośrednie (leczenie i opieka pielęgniarska, codzienna opieka w domu), jak i te, które można określić jako pośrednie (utrata produktywności zawodowej oraz społecznej pacjenta i opiekuna). W 2019 roku światowe koszty demencji oszacowano na 1,3 mld USD, a do 2030 koszty te wzrosną do 2,8 mld USD (WHO Global status report, 2021).

AD została po raz pierwszy opisana na początku XX wieku i od tego czasu nieustannie trwają intensywne badania mające na celu poznanie przyczyn jej rozwoju i mechanizmów

molekularnych prowadzących do neurozwyrodnienia. Dziś wiemy, że AD jest chorobą wielopostaciową o bardzo złożonej etiologii i długiej, utajonej, fazie przedklinicznej. Wiadomo, że poza podłożem genetycznym występuje wiele modyfikowalnych czynników ryzyka AD. Obecnie intensywnie prowadzone są badania nad korelacją AD z występowaniem chorób cywilizacyjnych związanych z zaburzeniami metabolizmu i indukcją ogólnoustrojowego stanu zapalnego, takich jak nadciśnienie tętnicze, insulinooporność, cukrzyca typu 2 czy choroby układu krążenia (Więckowska-Gacek i in., 2021; Edwards i in., 2019). Wymienione czynniki ryzyka mogą zajmować dominującą rolę w mechanizmach molekularnych odpowiedzialnych za rozwój AD, co dodatkowo komplikuje kwestie związane z doбором skutecznych metod leczenia. Do dzisiaj w terapii AD stosowane są głównie leki objawowe, które podane odpowiednio wcześnie, mają szansę na złagodzenie lub spowolnienie niektórych klinicznych objawów choroby (Alzheimer's disease facts and figures, 2023). Ze względu na złożoność i różnorodność procesów, które mogą wyzwać mechanizmy neurozwyrodnienia alzheimerskiego, określenie szczegółowej etiologii AD jest bardzo trudne, a bez określenia wpływu czynników ryzyka oraz efektów ich współwystępowania trudno będzie opracować skuteczne metody leczenia i prewencji. Co więcej, dzisiejsze dane wskazują, że przede wszystkim należy położyć ogromny nacisk na prewencję i kwestie związane z uświadamianiem społeczeństwa na temat wpływu stylu życia na rozwój chorób neurodegeneracyjnych w tym AD, w celu zapobiegania jej rozwojowi w kolejnych pokoleniach. Tym bardziej, że najnowsze doniesienia naukowe wskazują, że czynniki ryzyka AD są odpowiedzialne za epigenetyczne modyfikacje, które mogą być dziedziczne (Sharma i in., 2020). Dodatkowo dzisiejsza wiedza pozwala przypuszczać, że w przyszłości jedynym skutecznym narzędziem terapii AD będzie medycyna spersonalizowana, której celem będzie określenie etiologii choroby w danym przypadku i ustalenie indywidualnych metod terapii do potrzeb danego pacjenta.

1.1. Charakterystyka i przebieg choroby Alzheimera (AD)

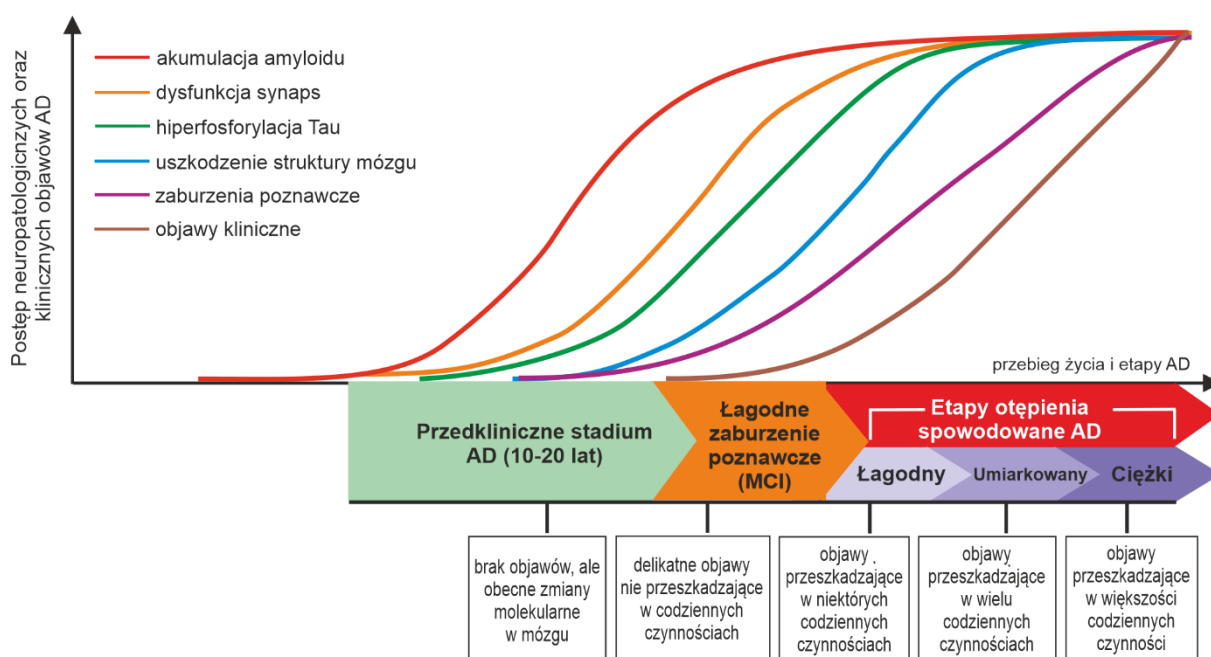
AD cechuje się stopniowym zanikiem pamięci, funkcji poznawczych oraz zmianami neurozwyrodnieniowymi w mózgu. Po raz pierwszy została opisana przez Aloisa Alzheimera, niemieckiego lekarza psychiatrę i neuropatologa w 1906 roku, natomiast pojęcie „choroba Alzheimera“ zostało użyte po raz pierwszy w roku 1910 przez Kraepelina – jednego z czołowych niemieckich psychiatrów (Wade, 2007; Armstrong, 2013). W Międzynarodowej Statystycznej Klasyfikacji Chorób i Problemów Zdrowotnych (ang. ICD-10) AD jest oznaczona symbolem G30 i uznana za chorobę neurodegeneracyjną, która na poziomie molekularnym i anatomicznym powiązana jest ze starzeniem się (Raskin i in. 2015).

Choroba trwa długo i początkowo przez wiele lat przyjmuje formę bezobjawową (stadium przedkliniczne). Zachodzące w stadium przedklinicznym zmiany w mózgu dopiero po ok. 10-20 latach powodują objawy kliniczne, takie jak zaburzenia pamięci oraz nasilające się wraz z wiekiem otępienie. Pierwsze objawy choroby to łagodne zaburzenie poznawcze (ang. *Mild Cognitive Impairment* – MCI), które można określić jako stan o podwyższonym ryzyku wystąpienia otępienia. Jednak u osób z MCI spadek zdolności poznawczych nie spełnia kryteriów diagnostycznych demencji. Następnie AD postępuje od etapu łagodnego przez etap umiarkowany, aż dochodzi do ciężkiego otępienia, co znajduje odzwierciedlenie w rosnącym stopniu niezdolności do wykonywania codziennych czynności (**Rycina 1**), (Aisen i in., 2017;

Alzheimer's disease facts and figures, 2023). W stadium klinicznym AD wyróżnia się trzy etapy choroby, między którymi trudno jednak zdefiniować wyraźne granice:

- ✓ **etap I** – z otępieniem o niewielkim nasileniu, charakteryzujący się m.in. zaburzeniem procesów poznawczych, pamięci, dekoncentracją, zmianą osobowości, zaburzeniami emocjonalnymi, mogącymi manifestować się wystąpieniem depresji;
- ✓ **etap II** – z pogłębionymi zaburzeniami pamięci, trudnościami z orientacją w terenie, zaburzeniami zachowania przejawiającymi się złością i agresją; mogą pojawić się także objawy psychiatryczne, tj. urojenia, omamy wzrokowe czy słuchowe;
- ✓ **etap III** – brak zdolności do samodzielnego życia, chory nie rozpoznaje bliskich, nie orientuje się w czasie, traci zdolność wykonywania wszelkich czynności; narastają trudności z poruszaniem się, jedzeniem i przełykaniem. Zaburzenia te prowadzą z kolei do niedożywienia i mogą przyczynić się do powstania innych chorób, które jako następstwo AD doprowadzają do śmierci chorego.

W przebiegu klinicznego stadium AD dochodzi do istotnego zmniejszenia masy mózgu i poszerzenia komór mózgu, co jest spowodowane degeneracją i obumieraniem komórek nerwowych, szczególnie w obszarze formacji hipokampa i kory mózgu.

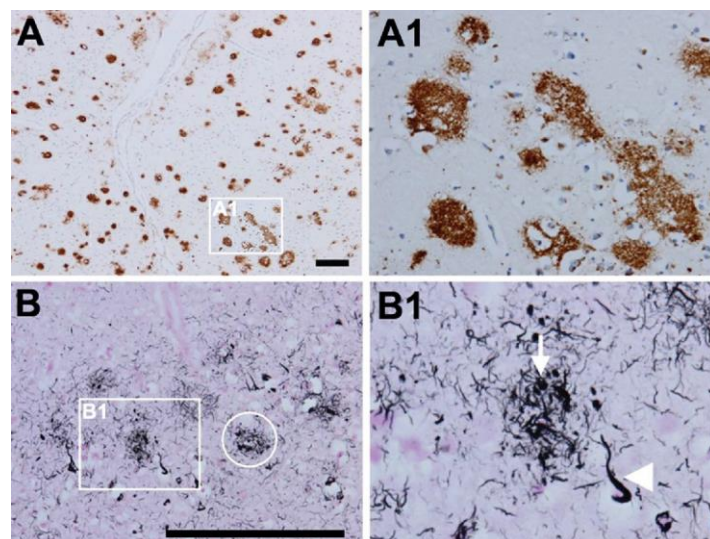


Rycina 1. Etapy choroby Alzheimera (AD) i następstwo zmian neuropatologicznych w jej przebiegu. Schemat opracowany na podstawie (Więckowska-Gacek i in. 2021 oraz Alzheimer's disease facts and figures, 2023). Strzałki nie zachowują proporcji pomiędzy czasem trwania poszczególnych etapów choroby.

1.2. Progresa zmian patologicznych w mózgu w AD

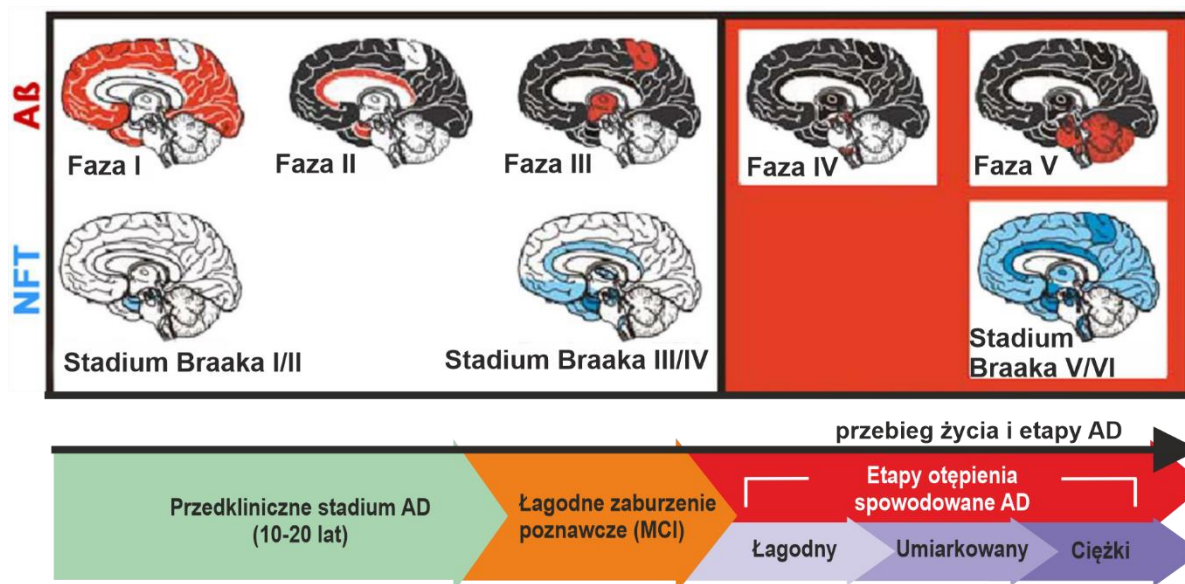
Neurodegeneracja w AD rozpoczyna się w obszarze skroniowym mózgu, w korze śródwęczowej oraz hipokampie, i postępuje do innych obszarów, kory nowej płata skroniowego, ciemieniowego, czołowego, a na końcu potylicznego, co klinicznie objawia się utratą pamięci, zaburzeniami poznawczymi, zmianami osobowości i zachowania. Choroba rozpoczyna się jednak około 10-20 lat wcześniej niż wystąpienie objawów i rozwija się najpierw bezobjawowo przez długi okres przedkliniczny (**Rycina 1**).

W mózgu w AD występują dwie główne neuropatologiczne zmiany: pozakomórkowe blaszki starcze oraz splątki neurofibrylarne występujące wewnątrz neuronów (ang. *Neurofibrillary tangles* – NFT). Pojęciem „blaszki starcze” określa się pozakomórkowe, peptydowe agregaty zbudowane z włókien amyloidowych tworzących rdzeń, dystroficznych neurytów oraz astrocytów i mikrogleju. Występują one najliczniej w korze nowej (szczególnie w rejonach kojarzeniowych) i w hipokampie. Podstawowym składnikiem depozytów w blaszce starczej jest peptyd amyloid A β 42 i A β 40 (Stewart i Radford 2017). Splątki neurofibrylarne (nazywane też zwyrodnieniem włókienkowym) składają się z helikalnie zwiniętych sparowanych włókien (ang. *Paired helical filaments* – PHF), składających się głównie z nadmiernie fosforylowanego białka tau. Tau należy do rodziny białek związanych z mikrotubulami i jego główną funkcją jest utrzymanie prawidłowej struktury mikrotubul, które służą jako „autostrady” transportujące ładunek wzdłuż włókien neuronalnych i warunkują sygnalizację wewnątrzneuronalną i międzyneuronalną oraz przeżycie neuronów. Nadmierna fosforylacja białka tau i akumulacja NFTs powoduje dezintegrację cytoszkieletu neuronów i prowadzi do postępującej dysfunkcji synaptycznej, utraty kolców dendrytycznych i śmierci neuronów (Barthélemy i in., 2020; Busche i Hyman, 2020). Co więcej, złogi A β mogą znajdować się w centrum skupiska dystroficznych neurytów, które często, ale nie zawsze, wykazują immunoreaktywność fosfo-tau; tworzą one podgrupę blaszek starczych zwanych blaszkami neurytowymi.



Rycina 2. Blaszkamyloidowe, neurytowe i splątki neurofibrylarne. A i A1. Liczne rozproszone blaszki amyloidowe w korze nowej (przeciwciacho 4G8). **B i B1.** Blaszkamyrytowe zawierające A β i tau w korze nowej (tj. neuryty dystroficzne, barwnik Gallyas); pierścien w B, blaszka neurytowa; strzałka w B1, neuryt dystroficzny; grot strzałki w B1, splątki neurofibrylarne. Skala: 200 μ m (na podstawie pracy Jellinger, 2020).

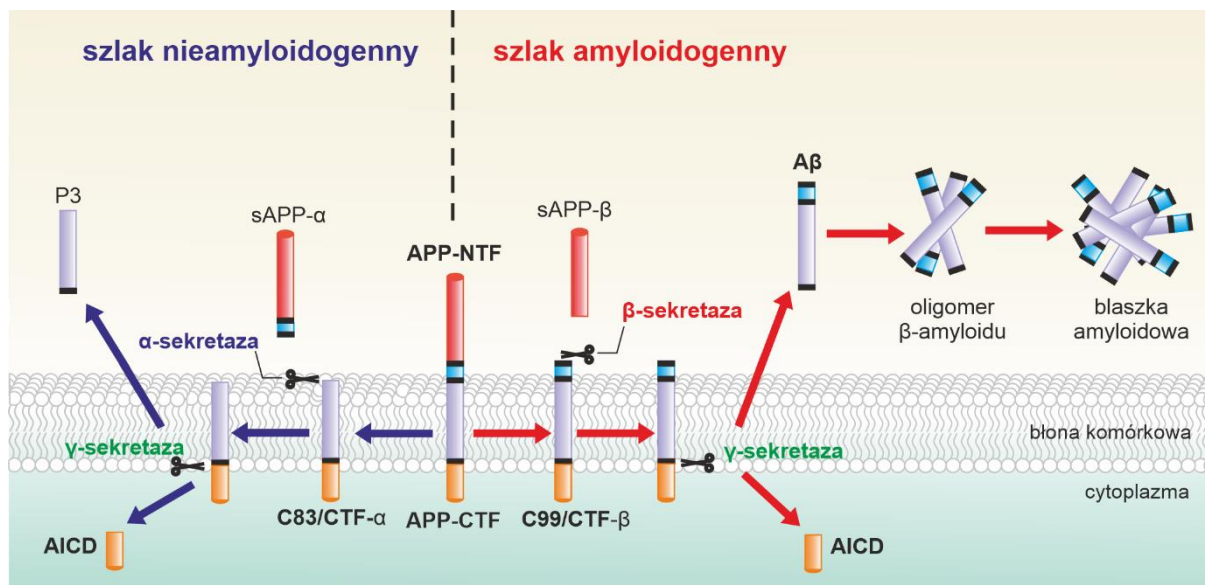
Patologia AD związana jest z pojawianiem się agregatów amyloidu- β ($A\beta$) i tau w różnych obszarach w mózgu, oraz przyjęcia przez nie nieco odmiennych dróg rozprzestrzeniania zmian patologicznych. Pojawianie się złożeń $A\beta$ następuje w wyraźnie sekwencyjnej kolejności w różnych obszarach mózgu, a proces ten został podzielony przez Thala na 5 etapów (**Rycina 3**). W fazie 1. występują złoże $A\beta$ w korze nowej czołowej, ciemieniowej, skroniowej lub potylicznej. Następnie, w fazie 2, oprócz złożeń $A\beta$ widocznych w fazie 1, $A\beta$ pojawia się w regionie kory śródwęczowej, pola CA1 hipokampa, w korze wyspowej oraz pojedyncze złoże $A\beta$ występują w ciele migdałowatym, zakręcie obręczy, okolicy przedpęcherzykowej, czy warstwie molekularnej powięzi zębatej. Następnie w fazie 3, międzymózgowie i prążkowie również wykazują obecność złożeń $A\beta$; kilka jąder pnia mózgu zostaje zajętych amyloidozą w fazie 4, a faza 5 charakteryzuje się występowaniem złożeń $A\beta$ w mózdzku i pozostałych obszarach mózgu (Thal i in., 2002). Natomiast patologia rozprzestrzeniania się NFT w tkance mózgowej chorych na AD została opisana przez Braaka za pomocą sześciostopniowej skali (**Rycina 3**). Stadia Braaka od I do VI oznaczają progresję patologii zależnej od białka tau od najmniejszej do największej w obrębie obwodu pamięciowego przyśrodkowego płata skroniowego. Etapy I i II wykazują ograniczone NFT w korze śródwęczowej i obszarach ściśle z nią związanych. Takie stadium często obserwowane jest jeszcze przy normatywnych profilach poznawczych i klinicznych. Stadium III i IV wg Braaka wykazuje obecność NFT w hipokampie i ciele migdałowatym, z progresją w kierunku kory asocjacyjnej i odnosi się do fazy limbicznej, w której początkowo obserwuje się ograniczone zaburzenia funkcji poznawczych. Etap V i VI, określane jako faza kory nowej- i charakteryzuje się największą liczbą i rozległością NFT i wiąże się ze znacznym upośledzeniem funkcji poznawczych i funkcjonalnych (Malek-Ahmadi i in., 2020; Jellinger i in., 2014).



Rycina 3. Kolejność rozprzestrzeniania się patologii amyloidu ($A\beta$ – czerwony kolor) i tau (NFT- niebieski kolor) w różnych obszarach mózgu u pacjentów z chorobą Alzheimera (AD) zestawione z przebiegiem stadiów choroby (na podstawie Jellinger i in., 2014 oraz Alzheimer's disease facts and figures, 2023). Strzałki nie odzwierciedlają proporcji pomiędzy czasem trwania poszczególnych etapów choroby.

1.3. Podstawowe hipotezy oraz genetyczne czynniki ryzyka AD

W związku z występowaniem charakterystycznych znamion AD, w badaniach przez lata eksploatowane były dwie główne hipotezy dotyczące przyczyn AD: kaskada amyloidowa i propagacja tau. Toksyczne peptydy A β , głównie A β 42 i A β 40, powstają z białka prekursorowego amyloidu (APP) w szlaku amyloidogennej proteolizy, inaczej nazywanym szlakiem β -sekreazy. W szlaku amyloidogennym białko APP rozszczepiane jest najpierw przez β -sekreazę (BACE1), a powstały fragment C99/CTF- β stanowi substrat dla γ -sekreazy, w którym rdzeń enzymatyczny stanowi presenilina 1 lub presenilina 2 (PS1, PS2). W wyniku tego ostatniego cięcia powstaje fragment AICD (ang. *APP intracellular domain*) oraz peptydy A β o długości 39-43 reszt aminokwasowych (**Rycina 4**). Tak wygenerowane monomery A β agregują w neurotoksyczne rozpuszczalne formy oligomeryczne, które mogą dyfundować przez błony synaptyczne powodując niewydolność synaptyczną, dysfunkcję neuronów, neurozapalenie i neurodegenerację (Brito-Moreira i in., 2017; Walsh i Selkoe, 2020). Ponadto zakłada się, że toksyczny A β wyzwała tworzenie NFT przez indukcję nadmiernej fosforylacji białka tau, a synergia pomiędzy A β i tau silnie wpływa na patologię AD (Busche i Hyman, 2020). Obok szlaku amyloidogennego występuje także szlak nieamyloidogeny, nazywany inaczej szlakiem α -sekreazy, gdzie APP jest trawiony proteolitycznie kolejno przez α - i γ -sekreazę (**Rycina 4**). Szlak ten nie prowadzi do produkcji A β . Szacuje się, iż w warunkach fizjologicznych około 90% białka APP kierowane jest na szlak nieamyloidogeny, a pozostałe 10% na ścieżkę amyloidogeną. Tymczasem w AD przeważa szlak amyloidogeny (Sasaguri i in., 2017). W mózgach osób z AD współistnieją różne formy peptydów A β , monomery, oligomery, fibryle i blaszki amyloidowe. Wyniki eksperymentalne sugerują, że blaszki utrzymują dynamiczną równowagę z toksycznymi typami oligomerów A β (Roda i in., 2022), natomiast występowanie NFT lepiej wiąże się z utratą neuronów i objawami klinicznymi choroby (Hanseeuw i in., 2019) i choć A β może inicjować kaskadę zdarzeń, to upośledzenie funkcji tau jest prawdopodobnie przyczyną neurodegeneracji. Tau odgrywa rolę w różnych procesach komórkowych i fizjologicznych: stabilizowaniu mikrotubul, a tym samym i cytoszkieletu komórkowego, transporcie aksonalnym, mielinizacji, neurogenezie, pobudliwości synaptycznej, metabolizmie glukozy, homeostazie żelaza i ochronie DNA, odpowiedzialnych m.in. za funkcje motoryczne, procesy uczenia się i pamięci, za neurotransmisję i przeżywalność neuronów (Kent i in., 2020). Należy wspomnieć, że o ile akumulacja A β jest charakterystyczna dla AD, patologia tau występuje również w grupie chorób neurodegeneracyjnych zwanych tauopatiami, które są odmienne od AD.



Rycina 4. Ścieżki proteolizy białka APP. W szlaku nieamyloidogennym (lewa strona schematu) białko APP jest trawione proteolitycznie kolejno przez α - i γ -sekretagę bez produkcji $A\beta$. W szlaku amyloidogennym (prawa strona schematu) APP jest w pierwszej kolejności trawione proteolitycznie przez β -sekretagę, a następnie przez γ -sekretagę, co powoduje uwolnienie peptydu $A\beta$ (opracowanie własne na podstawie Sasaguri i in., 2017 oraz Roda i in., 2022).

Pogląd, że główną rolę w inicjacji patogenezy AD można przypisać toksycznemu peptydowi $A\beta$, wywodzi się z badań nad rzadką, wczesną, rodzinną postacią AD (ang. *familial Alzheimer's disease* – FAD). FAD stanowi mniej niż 1% przypadków AD i jest związana z mutacjami w jednym z trzech genów zaangażowanych w szlak amyloidogenny, tj. kodujących białka APP, PS1 lub PS2. Niestety, hipoteza kaskady amyloidowej nie wyjaśnia przyczyn zmian neuropatologicznych w okresie długiej fazy utajonej, przedobjawowej, charakterystycznej dla formy AD o późnym początku (z ang. *sporadic Alzheimer's disease* – SAD), występującej u około 99% przypadków. SAD ma bardzo złożoną etiologię, która jest trudna do precyzyjnego określenia (Avila i Perry, 2021). Wśród genów zidentyfikowanych jako czynniki ryzyka predysponujące do rozwoju SAD kluczowy jest allel $\epsilon 4$ apolipoproteiny E (APOE), jeden z trzech możliwych alleli ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ lub $\epsilon 4$) (Alzheimer's disease facts and figures, 2021). APOE pośredniczy w metabolizmie cholesterolu, a w AD wydaje się być związana zarówno z upośledzonym metabolizmem cholesterolu, jak i upośledzeniem odpowiedzi układu odpornościowego (Yassine i Finch, 2020). Osoby z kombinacją alleli $\epsilon 4\epsilon 3$ wykazują około trzykrotnie większą podatność na rozwój AD w porównaniu z osobami z kombinacją $\epsilon 3\epsilon 3$, natomiast osoby z kombinacją $\epsilon 4\epsilon 4$ wykazują 8- do 12-krotnie większe ryzyko AD (Alzheimer's disease facts and figures, 2021). Ponadto badania asocjacyjne o zasięgu genomowym (z ang. *genome-wide association studies*, GWAS) oraz proteomika tkanki mózgu ujawniły wiele dodatkowych genów i białek związanych nie tylko z patologią amyloidu i tau, ale także z metabolizmem cholesterolu i lipidów, reakcjami immunologicznymi i transportem endocytarnym (Karaca i in., 2017; Andrews i in., 2020; Johnson i in., 2020; Schwartzenruber i in., 2021). Stwierdzono, że prawdopodobieństwo rozwoju SAD koreluje z niektórymi wariantami alleli genów zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną: *TLR4* (ang. *toll-like receptor 4*), *CD14* (ang. *cluster of differentiation 14*), *CD33* (z ang. *cluster of differentiation 33*), *TREM2* (z ang. *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*), *CRI* (z ang. *complement receptor 1*), oraz interleukiny-6 (*IL-6*) (Garbusz i in., 2021). Wyniki te wskazują na złożoność

mechanizmów molekularnych zaangażowanych w rozwój AD oraz na złożony udział czynników genetycznych i niegenetycznych w jej patogenezie.

1.4. Hipoteza amyloidowa: A β jako główny czynnik wyzwalający stan zapalny mózgu

Stan zapalny mózgu nazywany także neurozapaleniem (ang. *neuroinflammation*) definiuje się jako reakcję zapalną w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), w której pośredniczy produkcja cytokin razem z chemokinami i enzymami zapalnymi. OUN, jako struktura oddzielona barierą krew-mózg (z ang. *blood-brain barrier* - BBB), jest wyposażony w rezydujące komórki immunokompetentne, czyli mikroglej i astrocyty. Mikroglej to rodzaj komórek glijowych spokrewnionych z makrofagami, które stanowią główną pulę komórek odpornościowych w mózgu i rdzeniu kręgowym. Mikroglej odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy w tkance nerwowej OUN poprzez wykrywanie i eliminację zbędnych produktów przemiany materii, ciał obcych i resztek komórkowych. Udowodniono jednak, że rola mikrogleju wykracza poza funkcje porządkowe, ponieważ bierze udział w rozwoju mózgu, neuromodulacji, plastyczności synaptycznej oraz uczestniczy w procesach uczenia się i przetwarzania pamięci (Verkhatsky i in., 2022). Kolejną grupą komórek OUN, które posiadają właściwości immunologiczne, są astrocyty. Podobnie jak mikroglej, astrocyty pełnią wiele różnych funkcji. Są niezbędne zarówno dla rozwijającego się, jak i dorosłego mózgu, a ich najważniejszą rolą jest utrzymanie prawidłowej funkcji BBB, regulacja metabolizmu energetycznego neuronów oraz przekazywania synaptycznego. Jednak, jak wspomniano powyżej, zarówno mikroglej, jak i astrocyty są komórkami immunokompetentnymi i odgrywają kluczową rolę w procesach związanych z regulacją neurozapalenia (Verkhatsky i in., 2022).

Podczas gdy niewielkie oznaki neurozapalenia można znaleźć w normalnie starzejącym się mózgu, obszernie dane wskazują, że neurozapalenie odgrywa kluczową rolę w rozwoju AD (przegląd w Schwabe i in., 2020). Neurozapalenie w mózgu objawia się jako silna aktywacja systemów zapalnych obejmujących cytokiny prozapalne, chemokiny i komórki glijowe, zarówno mikroglej, jak i reaktywne astrocyty (Kaur i in., 2019; Streit i in., 2020). Jednak przyczyny i rola neurozapalenia w patogenezie AD nie są w pełni wyjaśnione, a nasze zrozumienie tego zjawiska jest obecnie w intensywnej fazie rozwoju.

Hipoteza kaskady amyloidowej zakłada, że neurozapalenie rozwija się w mózgu w wyniku toksycznego odkładania się A β , a w procesie tym pośredniczy głównie komórki mikrogleju. W warunkach fizjologicznych mikroglej utrzymuje homeostazę w OUN, pełniąc funkcje fagocytarne i produkując szereg cytokin, chemokin oraz reaktywnych form tlenu i azotu (Butovsky i Weiner, 2018; Gray i in., 2020). Rola mikrogleju w AD wydaje się dwufazowa. Fagocytoza mikrogleju we wczesnej fazie AD jest uważana za korzystną, będąc kluczowym mechanizmem zapobiegania tworzenia się blaszek A β oraz odpowiedzialnym za ich usuwanie (Salter i Stevens, 2017; Richter i in., 2020). Mikroglej fagocytuje także monomery i oligomery nadmiernie fosforylowanego białka tau, które wydobywają się z komórki do przestrzeni synaptycznych (Ritzel i in., 2015; Španić i in., 2019; Yuan i in., 2020). Sugerowano, że w miarę postępu AD aktywność fagocytarne komórek mikrogleju staje się niewystarczająca i raczej szkodliwa, w połączeniu z ich aktywnością prozapalną, nie przeciwdziałając, lecz promując patologię (Vogels i in., 2019; Streit i in., 2020). Po aktywacji komórki mikrogleju mogą również rekrutować astrocyty, które wzmacniają odpowiedź zapalną na pozakomórkowe złogi

A β (Lian i in., 2016). Prowadzi to do lokalnej, odpowiedzi ostrej fazy z udziałem cytokin, aktywacji kaskady dopełniacza i indukcji enzymów zapalnych, takich jak indukowalna syntaza tlenu azotu (iNOS) i prostanoidogenna cyklooksygenaza-2 (COX-2), przyczyniając się do dysfunkcji i śmierci neuronów (Chen i in., 2018; Ji i in., 2020). W miarę jak komórki mikrogleju stają się mniej efektywne w oczyszczaniu z agregatów A β , zwiększa się ich liczba, powodując aktywację innych komórek mikrogleju poprzez sygnalizację poprzez receptory typu toll (ang. *toll-like receptors* – TLRs), receptory NOD-podobne (ang. *nod-like receptors* – NLRs), receptory zmiatające (ang. *steroid receptor RNA activator 1 and 2* – SRA1, 2) i klaster różnicowania 36 (ang. *cluster differentiation 36* – CD36), a dalej dochodzi do zwiększenia wydzielania mediatorów prozapalnych (Allendorf i in., 2020; Yuan i in., 2020). W tym świetle procesy odpowiedzialne za przełączenie mikrogleju na polaryzację prozapalną są kluczowe dla progresji neurodegeneracji, ale wciąż pozostają niejasne.

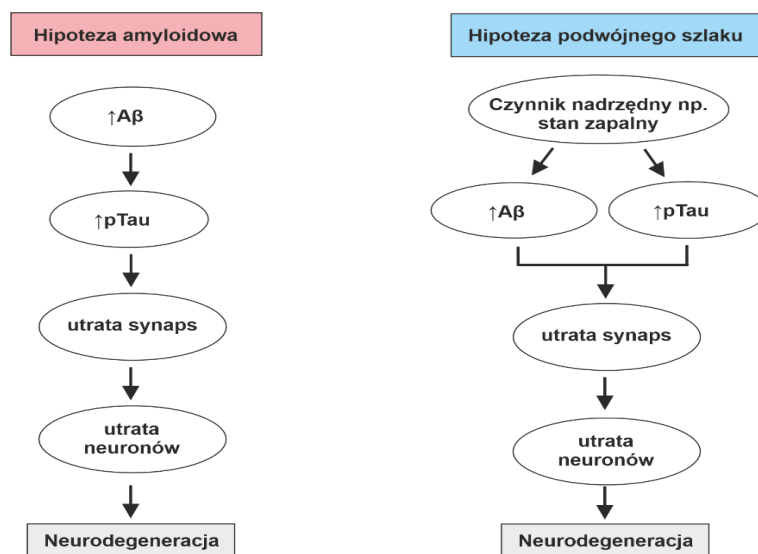
Co ciekawe, odpowiedź neurozapalna indukowana zarówno przez A β , jak i tau prowadzi do śmierci neuronów, wycieku plazmatycznego i atrofii mózgu (Yoshiyama i in., 2007; Alawieyah Syed Mortadza i in., 2018). Z jednej strony, mikroglej wydaje się być zaangażowany we wczesną utratę synaps indukowaną przez oligomeryczne formy A β (Hong i in., 2016). Z drugiej strony, niektóre badania sugerują, że mikroglej może odgrywać kluczową rolę w rozprzestrzenianiu się tau, czyniąc synapsy bardziej podatnymi na upośledzenie indukowane przez modyfikacje białka tau. Warto zauważyć, że układ odpornościowy jest nie tylko mediatorem pomiędzy A β czy tau a śmiercią neuronów, ale oligomery A β mogą aktywować układ odpornościowy, przed utworzeniem się blaszki starczej wywołując nadmierną fosforylację tau, a następnie, tworzenie się NFT. Oligomery A β są w stanie aktywować inflammasom, który z kolei reguluje kinazy, takie jak m.in. kinaza syntazy glikogenu 3 (GSK-3) i fosfatazy, jak np. fosfataza białkowa 2A (PP2A), odpowiedzialne za regulację poziomu fosforylacji białka tau. Upośledzenie równowagi pomiędzy aktywnością kinaz i fosfataz prowadzi do nieprawidłowej fosforylacji białka tau, a w konsekwencji do powstawania splotów wewnątrzkomórkowych w postaci PHF i zdegenerowanych neuronów w postaci NFT (Ising i in., 2019). Dane te wskazują na wyraźny związek między pojawieniem się peptydów A β , aktywacją układu odpornościowego i patologią białka tau.

1.5. Alternatywne hipotezy patogenezy AD

Brak sukcesu w poszukiwaniu skutecznej terapii opartej na nadrzędnej roli amyloidu w rozwoju AD powoduje, że coraz więcej badaczy upatruje celów terapeutycznych innych niż A β . Hipoteza amyloidowa powstała na bazie defektów molekularnych, które okazały się być główną przyczyną powstawania FAD, podczas gdy SAD jest złożonym, a nie monogenicznym zaburzeniem. Patogeneza SAD zakłada, że pomimo iż A β oraz NFT odgrywają kluczową rolę w przebiegu choroby, to jednak charakteryzują one późniejsze jej stadia, a ich rola patogenna jest wtórna. Według hipotezy zwanej „modelem podwójnego szlaku” (ang. *„dual pathway model”*), zobrazowanego na **Rycinie 5**, aktywacja szlaku amyloidogennego i propagacja patologicznie fosforylowanego białka tau są wynikiem działania jednego, bądź wielu nadrzędnych czynników poprzez niezależne, ale równoległe mechanizmy (Small i Duff, 2008). Uważa się, że założenia „hipotezy podwójnego szlaku” są szczególnie istotne dla wyjaśnienia przyczyn

rozwoju SAD, które, jak wspomniano wcześniej, są bardziej skomplikowane niż w przypadku FAD.

Bazując na „hipotezie podwójnego szlaku” oraz poglądzie że AD jest procesem złożonym, przez ostatnie lata zaproponowano wiele potencjalnych procesów patogenezy AD, poprzedzających bądź występujących równoległe z patologią A β i tau. W ten sposób powstało kilka alternatywnych hipotez omawiających pierwotną przyczynę patologii choroby, w tym hipoteza procesów zapalnych (Blach-Olszewska i in., 2015; Liu i in., 2019; Breijyeh i Karaman 2020), która jest przedmiotem badań niniejszej rozprawy i została szczegółowo omówiona w kolejnych podrozdziałach.



Rycina 5. Hipoteza amyloidowa vs. hipoteza „podwójnego szlaku” w patogenezie choroby Alzheimera. Hipoteza kaskady amyloidowej (lewa strona schematu) zakłada tzw. model sekwencyjny, gdzie zwiększony poziom A β uruchamia kaskadę zdarzeń prowadzących do neurodegeneracji. Według alternatywnej hipotezy „podwójnego szlaku” (prawa strona schematu) zarówno podwyższony poziom A β , jak i nadmierna fosforylacja białka tau są wynikiem innych, procesów, pełniących pierwotną rolę w patogenezie AD, (zmodyfikowane, na podstawie Small i Duff, 2008).

1.5.1. Hipoteza stanu zapalnego mózgu w AD w świetle modelu podwójnego szlaku

Istnieją przekonujące dane o wzajemnych powiązaniach między rozwojem stanu zapalnego mózgu, inaczej zwanego neurozapaleniem (ang. *neuroinflammation*), a gromadzeniem się peptydów A β . Wykazano, że oligomery i agregaty fibrylarne A β w mózgu są w stanie indukować neurozapalenie poprzez aktywację mikrogleju i wydzielanie cytokin prozapalnych i prostaglandyn (Carrero i in., 2012). Tak więc akumulacja A β może promować apoptozę neuronów nie tylko poprzez kaskady z udziałem białka tau, ale również poprzez inicjację przewlekłego stanu zapalnego w tkankach mózgu. Wykazano, też że za rozpoznawanie monomerów i oligomerów A β odpowiedzialne są receptory TLR2/4, które mogą działać jako induktory ekspresji cytokin prozapalnych (Go i in., 2016; Liu i in., 2020). Natomiast wiele prac eksperymentalnych i epidemicznych sugeruje, że reakcje zapalne są nie tylko uwarunkowane akumulacją A β , ale mogą stanowić początkowy mechanizm także w SAD. Wykazano, że zapalenie sprzyja proliferacji i aktywacji komórek mikrogleju, a następnie aktywacji astrocytów, co wpływa pobudzająco na wydzielanie zwiększonej ilości peptydów A β 40 i A β 42 na drodze amyloidogennej proteolizy APP (Catorce i Gevorkian, 2016; Więckowska-Gacek i in., 2021).

Zapalenie przyspiesza również oligomeryzację A β w wyniku tworzenia i wydzielania kompleksów działających jako centra oligomeryzacji, na przykład kompleksu inflamasomu, zawierającego białko NLRP3 (kriopiryna) (Leng i Edison, 2020). Zwiększone stężenie oligomerów A β może odtąd służyć jako dodatkowy induktor neurozapalenia. W efekcie zapalenie i akumulacja A β tworzą błędne koło, sprzyjające progresji choroby. Jednocześnie złoży fibrylarnych agregatów A β (także u osób zdrowych) można uznać nie za proces patologiczny, ale za jeden z mechanizmów usuwania peptydów A β . W FAD w przeciwieństwie do SAD, główną przyczyną powstawania neurozapalenia nie są przewlekłe infekcje, ani upośledzenie regulacji aktywności mikrogleju, lecz przeciążenie tkanek układu nerwowego oligomerami A β , których nadprodukcja jest spowodowana mutacjami w genach APP i/lub presenilin (PS1 i PS2).

Rosnąca liczba dowodów na występowanie reakcji zapalnych w mózгах pacjentów, tkankach pośmiertnych, a nawet w przedklinicznych modelach AD (Gomez-Nicola i in., 2015; Lagarde i in., 2018) sugeruje, że neurozapalenie odgrywa bardziej centralną rolę w patogenezie choroby. Wykazano, że AD może rozwijać się jako długotrwały efekt urazu mózgu, w tym operacji (Brett i in., 2022). W niektórych przypadkach w grę wchodzi nie tylko pierwotne neurozapalenie, ale także przewlekły proces zapalny na obwodzie, utrzymujący się długotrwale w organizmie w wyniku przetrwałych infekcji lub zaburzeń metabolicznych. Gromadzone są dane o tym, że przewlekłym procesom zapalnym na obwodzie towarzyszy odpowiedź mózgu w postaci aktywacji komórek mikrogleju i astrocytów oraz wydzielania cytokin prozapalnych. Z jednej strony mózg, oddzielony od układu krążenia barierą krew-mózg, jest narządem immuno-uprzywilejowanym. Z drugiej strony bariera krew-mózg (ang. blood-brain barrier – BBB) jest przepuszczalna dla obwodowych monocytów i prostaglandyn. Poza tym w mózgu istnieją obszary (np. podwzgórze, czy narządy okołokomorowe, tj. tylny płąt przysadki mózgowej, narząd naczyniowy blaszki krańcowej, narząd podsklepieniowy, narząd podspoidłowy, pole najdalsze, szyszynka czy sploty naczyniowe), gdzie BBB ma zwiększoną przepuszczalność (Duvernoy i Risold, 2007; Miyata, 2022).

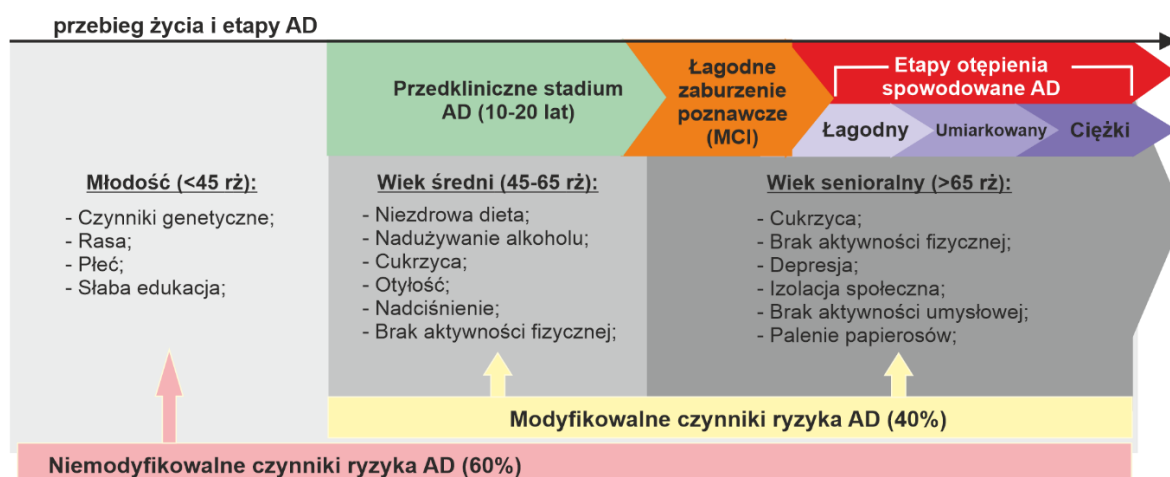
Hipotezę neurozapalenia jako czynnika nadrzędnego w patogenezie AD wspierają dane z szeregu badań retrospektywnych i klinicznych, które wskazują, że długotrwałe stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) zmniejsza ryzyko wystąpienia AD i spowalnia rozwój objawów, (Moore i in., 2010; Benito-Leon i in., 2019). Według niektórych danych stosowanie NLPZ po pojawieniu się objawów AD nie dawało pozytywnego efektu, ale u osób bez objawów AD istotnie statystycznie zmniejszało ryzyko rozwoju objawów przez kolejne 2-3 lata (Hoozemans i in., 2011). Pozytywny wpływ NLPZ wykazano również w doświadczeniach na modelach AD (gryzonie) (Daniels i in., 2016). Zapalenie w OUN może indukować wiele efektów przypisywanych wcześniej amyloidowi- β : aktywację kaskady kinaz białkowych, które prowadzą do nadmiernej fosforylacji białka tau, zwiększenie aktywności receptorów N-metylo-D-asparaginowych (NMDA), czy stres oksydacyjny (Wenk, 2006).

W świetle przytoczonych informacji można stwierdzić, że peptyd A β jest koniecznym, ale nie nadrzędnym uczestnikiem procesu, który ostatecznie prowadzi do rozwoju AD. Powstawanie i odkładanie peptydów A β jest procesem, który zachodzi również w zdrowym mózgu i nie musi skutkować upośledzeniem funkcji poznawczych, a akumulacja A β jest obserwowana w wielu przypadkach u osób klinicznie zdrowych i nie może być uważana za jedyną przyczynę choroby (Bassendine i in., 2020). Co więcej, według najnowszych danych to właśnie neurozapalenie o różnej etiologii może być bodźcem prowadzącym do akumulacji A β

i rozwoju SAD, a identyfikacja źródeł neurozapalenia jako ważnego czynnika w patogenezie AD otwiera nowe kierunki w poszukiwaniu metod terapii i/lub prewencji tej choroby.

1.6. Modyfikowalne czynniki ryzyka AD

Znana jest już całkiem długa lista czynników ryzyka, które w różnym stopniu predestynują do rozwoju AD (**Rycina 6**). Oprócz czynników genetycznych, coraz więcej dowodów wskazuje, że modyfikowalne czynniki środowiskowe często związane ze stylem życia, takie jak niezrównoważona dieta, cukrzyca, otyłość, nadciśnienie, przebyte infekcje, brak aktywności fizycznej, czy zaburzenia snu i cyklu dobowego odgrywają istotną rolę w rozwoju AD (Alzheimer's disease facts and figures, 2023). Czynniki modyfikowalne stanowią prawie 40% spośród wszystkich dzisiaj znanych czynników ryzyka AD (Armstrong, 2019; Livingston i in., 2020) i mogą silnie wpływać na przebieg fazy przedklinicznej u osób bezobjawowych (**Rycina 6**). W świetle braku skutecznych metod leczenia AD, działania prewencyjne wydają się obecnie najlepszą drogą do ograniczenia zachorowań na AD. Co więcej ostatnie dane pokazują też, że w ciągu najbliższych 25 lat będzie można zapobiec jednej trzeciej przypadków demencji poprzez eliminację czynników ryzyka (Montero-Odasso i in., 2020). Ponieważ lepiej zapobiegać niż leczyć, a także biorąc pod uwagę, że wieku, podłoża genetycznego i rodzinnej historii choroby nie można zmienić, w 2019 roku Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) zaproponowała działania prewencyjne poprzez zmiany w obrębie modyfikowalnych czynników ryzyka, ze szczególnym zwróceniem uwagi na czynniki związane ze stylem życia, w tym głównie sposobu odżywiania oraz dodatkowo inne działania mające na celu zapobieganie powstawania stanów zapalnych w organizmie. Natomiast biorąc pod uwagę złożoność i dynamikę procesów w rozwoju AD, zaprojektowanie skutecznej strategii prewencyjnej wymaga lepszego, holistycznego, zrozumienia wzajemnych powiązań pomiędzy narządami, komórkami i ścieżkami sygnalizacyjnymi łączącymi modyfikowalne czynniki ryzyka z rozwojem patologii AD.



Rycina 6. Modyfikowalne i niemodyfikowalne czynniki ryzyka choroby Alzheimera w przebiegu życia oraz ich korelacja z etapami AD. Niemodyfikowalne czynniki ryzyka stanowią ok 60%, a modyfikowalne 40% wszystkich obecnie znanych czynników ryzyka AD. (Na podstawie: Więckowska-Gacek i in., 2021; Livingston i in., 2020).

1.7. Dieta zachodnia i metaboliczny stan zapalny jako potencjalny czynnik ryzyka AD

1.7.1. Charakterystyka diety zachodniej (WD)

Dieta zachodnia (ang. *Western diet*, WD) to szerokie pojęcie określające współczesny wzorzec żywienia typowy dla społeczeństw zachodnich, który wywodzi się z USA, ale obecnie jest coraz powszechniejszy także w Europie i Azji. WD powstała jako skutek szybkiego postępu cywilizacyjnego i znana jest jako jeden z największych czynników ryzyka dla zdrowia i znacząco przyczynia się do rozwoju zespołu metabolicznego.

WD oparta jest przede wszystkim na wysoko przetworzonej żywności gotowej do spożycia, wyprodukowanej z substancji rafinowanych, bogatej w głównie cukry proste (fruktoza, glukoza) na niekorzyść węglowodanów złożonych, a także w sól, nasycone kwasy tłuszczowe (ang. *saturated fatty acids* – SFA), kwasy trans, oraz cholesterol. WD charakteryzuje się także dużą zawartością tłustego czerwonego mięsa i ciężkostrawnego białka kazeiny. Taki schemat żywienia jest również ubogi w ziarna zbóż, błonnik pokarmowy oraz zawartość jedno- i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, w tym przeciwzapalnych kwasów omega-3, -6 i -9. Ponadto WD charakteryzuje się również zmniejszoną zawartością mikrośladków (witamin i mikroelementów) dostarczanych z posiłkiem, co sprzyja rozwojowi niedoborów witamin i mikroelementów, oraz niedożywieniu organizmu, mimo nadmiernej podaży kalorii w diecie (Cordain., 2005; Więckowska-Gacek i in., 2021).

Termin “dieta zachodnia” odnosi się do dosyć szerokiego spektrum proporcji cukrów, tłuszczu i białka w diecie. W przykładowej diecie zachodniej ponad połowa dostarczanej energii pochodzi z węglowodanów (52%), z tłuszczu około 33% oraz z białka około 15%, co nie odbiega od proporcji poszczególnych składników w zdrowej zbilansowanej diecie, natomiast za jej niezdrowe działanie odpowiada zmiana składu i proporcji w poszczególnych grupach makroelementów.

WD jest czynnikiem sprzyjającym rozwojowi różnych chorób, gdzie elementem odpowiedzialnym za wzrost ryzyka zachorowania w wyniku stosowania WD jest rodzaj dostarczanych substancji w poszczególnych grupach makrośladków, oraz niedobory mikro-śladków. Ponadto WD w istotny sposób wpływa na funkcjonowanie jelit i komensalnej mikrobioty jelitowej, przez co pośrednio prowadzi do zmniejszenia wchłaniania składników odżywczych i witamin dostarczanych z pożywieniem (Christ i in., 2019; Lustig, 2020).

Wiele dowodów wskazuje na to, że sposób odżywiania może istotnie wpływać na mózg, gdyż wiele składników dostarczanych z dietą ma kluczowe znaczenie w utrzymaniu jego prawidłowej kondycji (Szczechowiak i in., 2019). Tak jak dieta śródziemnomorska jest uważana za jeden z najzdrowszych sposobów odżywiania zarówno pod kątem zapobiegania rozwojowi wielu chorób cywilizacyjnych (cukrzyca, nadciśnienie, choroby układu krążenia) (Martín-Peláez i in., 2020; Martín-Peláez i in., 2022) jak i utrzymania prawidłowej kondycji mózgu (Mazza i in., 2021), tak też coraz więcej przesłanek sugeruje, że “niezdrowa dieta” taka jak WD jest związana z występowaniem zaburzeń metabolicznych przez co może wpływać na stan zapalny w OUN, co skutkuje upośledzeniem pamięci i procesów poznawczych (Więckowska-Gacek i in., 2021).

1.7.2. Zespół metaboliczny i metaboliczny stan zapalny w rozwoju AD

Liczne badania wykazały, że WD ma destrukcyjny wpływ na ogólny stan zdrowia. WD indukuje takie zaburzenia jak hipercholesterolemia, otyłość, niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby (ang. *non-alcoholic fatty liver disease* – NAFLD), cukrzycę typu 2 i wysokie ciśnienie krwi, łącznie tworząc tzw. zespół metaboliczny (ang. *metabolic syndrome* – MetS) (Więckowska-Gacek i in., 2021, Mietelska-Porowska i in., 2022). Warunki te wywołują i wzmacniają ogólnoustrojowy stan zapalny o niskim stopniu nasilenia, charakteryzujący się zwiększoną aktywnością obwodowych cytokin prozapalnych (Ali i in., 2020; Dabke i in., 2019). MetS bezsprzecznie stanowi czynnik ryzyka dla chorób sercowo-naczyniowych i znacząco podnosi ryzyko udarów mózgu oraz neurodegeneracji (Rojas-Gutierrez i in., 2017; Li i in., 2019; Ko i Chye, 2020), co u pacjentów z MetS prowadzi do zwiększonego ryzyka rozwoju AD (Baker i in., 2011; Ko i Chye, 2020). Wydaje się, że MetS powstały w wyniku działania niezdrowej diety nasila neurodegenerację głównie poprzez upośledzenie bariery krew-mózg (BBB), co skutkuje zwiększoną akumulacją A β w mózgu i wyzwalaniem neurozapalenia (Więckowska-Gacek i in., 2021). Ponadto WD wpływa na różnorodność i funkcjonalność mikrobioty jelitowej, a indukowana dietą dysbioza jelitowa istotnie wpływa na procesy związane z MetS i rozwojem ogólnoustrojowego stanu zapalnego o niskim nasileniu (Mazidi i in., 2016; Chen i Devaraj, 2018; Dabke i in., 2019), co sprzyja z kolei rozwojowi neurodegeneracji (Calvo-Ochoa i in., 2014; Liu i in., 2014) i progresji AD (Pugazhenthii, 2017; Hosny i in., 2018).

Hipercholesterolemia

Jedną z głównych konsekwencji WD jest zaburzenie gospodarki lipidowej i rozwój hipercholesterolemii (HChol), definiowanej jako podwyższony poziom trójglicerydów i frakcji cholesterolu lipoprotein małej gęstości (ang. *low-density lipoprotein* – LDL) ("złego cholesterolu") oraz niski poziom frakcji lipoprotein dużej gęstości (ang. *high-density lipoprotein* – HDL) ("dobrego cholesterolu") w osoczu krwi (Jiang i in., 2021). HChol zaburza funkcjonowanie mózgu i zwiększa ryzyko wystąpienia AD i innych chorób neurodegeneracyjnych (Xue-Shan i in., 2016; Kivipelto i in., 2018). Podczas gdy utrzymujący się wysoki poziom cholesterolu w osoczu krwi jest szkodliwy dla funkcji mózgu, wysoki poziom cholesterolu w mózgu jest jednym z kluczowych elementów dla utrzymania homeostazy i funkcji neuronów. Około 25% całkowitego cholesterolu w organizmie znajduje się w mózgu, przy czym około 80% cholesterolu w mózgu gromadzi się w osłonkach mielinowych oligodendrocytów, niektórych astrocytów i aksonów neuronów, a pozostałe 20% jest zlokalizowane w tratwach lipidowych błony (Hussain i in., 2019). W warunkach fizjologicznych te mikro-struktury są związane z sygnalizacją komórkową i komunikacją w prawidłowo funkcjonujących komórkach nerwowych, ale w warunkach patologicznych biorą udział w procesie amyloido-genezы poprzez promowanie interakcji białka APP z β -sekreazą w mózgu AD (Colin i in., 2016; Diaz i in., 2018; Grassi i in., 2020).

Biorąc pod uwagę ważne funkcje cholesterolu w mózgu, jego poziom musi być ściśle kontrolowany. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa bariera krew-mózg (BBB), która w warunkach fizjologicznych oddziela mózg od puli cholesterolu we krwi blokując cholesterol w osoczu przed dostępem do mózgu (Zhang i Liu, 2015). Wiadomo jednak, że w AD wysokie

poziomy LDL wywołują zmiany naczyniowe podobne do wczesnych zmian zapalnych oraz miażdżycy, i zostały powiązane z zaburzeniem przepuszczalności BBB (Schreurs i in., 2013; Chakraborty i in., 2017). W rzeczywistości, HChol i AD dzielą zapalenie jako wspólną cechę patofizjologiczną. Eksperymenty z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych wskazują, że HChol jest jednym z ważniejszych czynników, które nasilają odpowiedź neurozapalną, upośledzają funkcje poznawcze i są związane ze zwiększonym poziomem fosforylacji białka tau (p-tau) i generowaniem toksycznych peptydów A β (Park i in., 2013; Heverin i in., 2015; Rutkowsky i in., 2018).

Otyłość

Kolejną poważną konsekwencją spożycia WD jest otyłość. Tkanka tłuszczowa, zarówno trzewna jak i podskórna, w warunkach fizjologicznych wydziela hormony, cytokiny i metabolity, które kontrolują homeostazę i systemowy bilans energetyczny. W odpowiedzi na WD, tkanka tłuszczowa ulega dynamicznej przebudowie, w tym ilościowym i jakościowym zmianom w komórkach rezydujących. Otyłość indukowana WD zmienia metaboliczną i endokrynną funkcję tkanki tłuszczowej i prowadzi do zwiększonego uwalniania wolnych kwasów tłuszczowych (z ang. *free fatty acids* – FFA) i adipocytokin (Reichardt i in., 2017; Zhou i in., 2020). Proces ten wiąże się z utrzymującym się, przewlekłym zapaleniem o niskim stopniu nasilenia zarówno w tkance tłuszczowej, jak i w organach wewnętrznych uczestniczących w metabolizmie, a proces ten jest zwany zapaleniem metabolicznym lub ogólnoustrojowym.

Makrofagi (ang. *adipose tissue macrophages* – ATM) są jednym z najważniejszych typów komórek odpornościowych rezydujących w tkance tłuszczowej. ATM pełnią kluczowe funkcje w procesach związanych z rozwinięciem zapalenia metabolicznego. Populacja ATM zwiększa się z 10-15% do 45-60% wraz z progresją otyłości (Zatterale i in., 2020). Makrofagi pod wpływem nasyconych kwasów tłuszczowych pochodzących z diety lub produkowanych *de novo* przez komórki tłuszczowe ulegają przełączeniu z przeciwzapalnych makrofagów M2 do prozapalnych makrofagów M1, co skutkuje zwiększonym wydzielaniem cytokin prozapalnych, będącym charakterystycznym elementem zapalenia metabolicznego (Guillemot-Legrin i in., 2016).

Szerokie dane dotyczące badań u ludzi wykazują wyraźny związek między otyłością wywołaną przez WD a wystąpieniem łagodnego zaburzenia poznawczego – MCI i AD (Besser i in., 2014; Chong i in., 2019; Baranowski i in., 2020). Otyłość sześciokrotnie zwiększa szansę na pogorszenie funkcji poznawczych i rozwój AD w wieku dorosłym (Kivipelto i in., 2005; 2018). Obszerne metaanalizy dotyczące ludzi i badania długoterminowe potwierdzają, że otyłość w połowie życia znacząco zwiększa ryzyko demencji i AD w przeciwieństwie do otyłości w późnym okresie życia (Li i in., 2019; Rasmussen Eid i in., 2019; Sun i in., 2020). Szczególnie niepokojący jest fakt, że dramatycznie wzrasta nie tylko liczba przypadków otyłości u osób starszych, ale także u dorosłych i u dzieci (Development Initiatives, 2018). Co więcej, typ rozwiniętej otyłości (otyłość metabolicznie zdrowa lub niezdrowa) wydaje się być istotnym elementem ryzyka wystąpienia AD (Ma i in., 2019).

Metody obrazowe ujawniają, że osoby otyłe mają zmniejszoną objętość kory i hipokampa i zwiększone tempo atrofii mózgu, a w testach neuropsychologicznych zmniejszoną wydajność w różnych zadaniach pamięciowych i deficyty w funkcjonowaniu wykonawczym

(Isaac i in., 2011; Shefer i in., 2013; Coppin i in., 2014; Dye i in., 2017). Interwencja prowadząca do utraty wagi wykazała pozytywny wpływ na poprawę funkcji poznawczych u osób otyłych doświadczających niskiego poziomu uwagi i funkcjonowania wykonawczego u ludzi (Espeland i in., 2014 i 2018). U myszy karmionych dietą wysokotłuszczową (HFD) wykazano przyrost masy ciała związany ze zwiększonym poziomem A β w hipokampie, zmniejszoną neurogenezą hipokampa i deficytami w zadaniach poznawczych (Graham i in., 2016; Niu i in., 2016; Haleem i Mahmood, 2021; Nissankara Rao i in., 2021). Te wyniki u ludzi i gryzoni podkreślają udział otyłości w deficytach poznawczych i cechach patologicznych AD.

Niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby

Niezdrowa dieta, w tym WD przyczynia się do zaburzenia pracy wątroby i rozwinięcia niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby. Wątroba w zdrowym organizmie odpowiada za: metabolizm lipidów, immunomodulację, detoksykację oraz aktywność endokrynologiczną (Cheng i in., 2020). Ze względu na swoją funkcję detoksykacyjną, wątroba jest narządem, który degraduje wadliwe i niebezpieczne produkty, w tym krążące peptydy A β . Istotna rola wątroby w usuwaniu (ang. *klirens*) A β wynika z wysokiego powinowactwa A β do krążącej lipoproteiny o dużej gęstości (HDL), z którą A β jest dostarczany z obwodu do wątroby (Robert i in., 2017). 70-90% zawartości A β w osoczu jest transportowane do wątroby za pośrednictwem rozpuszczalnej formy osoczowej białka związanego z receptorem lipoprotein o niskiej gęstości 1 (sLRP1). Wysoką ekspresję LRP1 potwierdzono również w hepatocytach, gdzie A β jest usuwany z udziałem żółci. W *klirensie* żółciowym A β pośredniczy nie tylko LRP1, ale również pompa wypływu leku - glikoproteina P (P-gp). Co ciekawe, LRP1 w wątrobie jest bardzo podatna na zmiany w odpowiedzi na procesy patologiczne, w tym reakcje zapalne, i jej poziom może być szybko i łatwo obniżony, co prowadzi do upośledzenia efektywności wątroby w usuwaniu A β , a w konsekwencji do akumulacji A β , zarówno w naczyniach, jak i w mózgu (Tamaki i in., 2006; Sagare i in., 2007; Mohamed i Kaddoumi, 2013).

Niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby charakteryzuje się nagromadzeniem tłuszczu w wątrobie i napływem komórek odpornościowych do mięszu wątroby, gdzie wydzielają one cytokiny prozapalne powodujące uszkodzenie hepatocytów i późniejszą patologię wątroby (Friedman i in., 2018; Luo i Lin, 2021). NAFLD jest dynamicznym procesem, który obejmuje patologiczne upośledzenie od stłuszczenia do niealkoholowego stłuszczeniowego zapalenia wątroby (ang. *non-alcoholic steatohepatitis* - NASH) i prowadzi do różnego stopnia zwłóknienia wątroby, marskości i raka wątrobowokomórkowego. Liczne badania na zwierzętach i ludziach wskazują, że dieta bogata w cholesterol, SFA, cukier, ale uboga w wielonienasycone kwasy tłuszczowe, błonnik i antyoksydanty ma szkodliwy wpływ na wątrobę (Barbosa-da-Silva i in., 2014; Yang i in., 2020c) i skutkuje wyraźnym odkładaniem się kropli lipidowych w hepatocytach, naciekiem makrofagów oraz silnym uwalnianiem cytokin prozapalnych (Kim i in., 2016; Pilling i in., 2021). W szczególności dieta bogatsza we fruktozę niż w sacharozę prowadzi do zwiększenia ilości tłuszczu w wątrobie, zwłóknienia wątroby i rozwinięcia stanu zapalnego u ludzi (Nier i in., 2018).

Z kolei wzrost poziomu SFA podczas spożycia WD zaburza zarówno homeostazę cholesterolu w surowicy jak i wywołuje zmiany w wątrobowych poziomach cholesterolu, trójglicerydów, aminotransferazy asparaginianowej, aminotransferazy alaninowej i bioaktywnych

lipidów (Nam i in., 2015; Chen i in., 2020). W połączeniu wszystkie te zaburzenia prowadzą do rozwoju NAFLD i indukcji systemowego stanu zapalnego. Biorąc pod uwagę, że jedną z głównych funkcji wątroby jest usuwanie krążącego w krwioobiegu amyloidu β , uszkodzenia wątroby pod wpływem diety skutkujące rozwinięciem NAFLD i NASH może okazać się istotnym elementem w patogenezie AD.

1.7.3. Wpływ WD na upośledzenie pamięci i markery AD w mózgu

Poznanie, pamięć, uczenie się i plastyczność synaptyczna

Dostępna literatura przedstawia szereg dowodów wskazujących, że sposób odżywiania istotnie wpływa na mózg, a “zła dieta” może wywoływać lub intensyfikować patologiczne cechy AD w mózgu, upośledzać poznanie, uczenie się i pamięć, zarówno u gryzoni (Kanoski i Davidson, 2011; Ke i in., 2020; Leigh i Morris, 2020), jak i u ludzi (Francis i Stevenson, 2013 i 2017; Attuquayefio i in., 2017; Stevenson i in., 2020). Obszerny przegląd badań na zwierzętach przedstawia szeroki zakres upośledzenia w zależnych od hipokampa behawioralnych testach uczenia się i pamięci, gdy gryzonie były krótko i długoterminowo karmione dietą odzwierciedlająca cechy diety zachodniej (o wysokiej zawartości SFA i sacharozy/cukru) (McLean i in., 2018; Abbott i in., 2019; Alghamdi, 2021; Rebai i in., 2021), co jest zgodne z danymi badań przeprowadzonych u ludzi karmionych dietą o wysokiej zawartości SFA (Attuquayefio i in., 2017). Myszy karmione WD konsekwentnie wykazywały znaczne obniżenie długoterminowego wzmocnienia synaptycznego (ang. *long-term potentiation* – LTP), wskazując na niższą plastyczność synaptyczną (Jena i in., 2018). Stwierdzono również, że sposób odżywiania może wpływać na poziom białek mózgowych zaangażowanych w plastyczność synaptyczną, takich jak acetylocholina, dopamina, gefiryna, serotonina, synaptofizyna, białko gęstości postsynaptycznej 95 (PSD-95) i czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (BDNF) (Jena i in., 2018; Lizarbe et al., 2019; Nissankara Rao et al., 2021; Rebai et al., 2021). Ponadto, spożycie WD wiąże się ze zmniejszeniem objętości lewego hipokampa w badaniu przeprowadzonym u mężczyzn w przedziale wiekowym 60-64 lata (Jacka i in., 2015). Co ciekawe, w badaniach na gryzoniach odnotowano takie zjawiska, jak gorsze uczenie się, tendencje do otyłości oraz zmiany w funkcjonowaniu metabolicznym, behawioralnym i endokrynologicznym u osobników, których matki karmiono WD w czasie ciąży i laktacji (Ke i in., 2020; Wijenayake i in., 2020), co wskazuje, że konsekwencje złych nawyków żywieniowych mogą być przekazywane z matek na potomstwo poprzez mechanizmy epigenetyczne.

Poziomy $A\beta$ i p-tau w mózgu

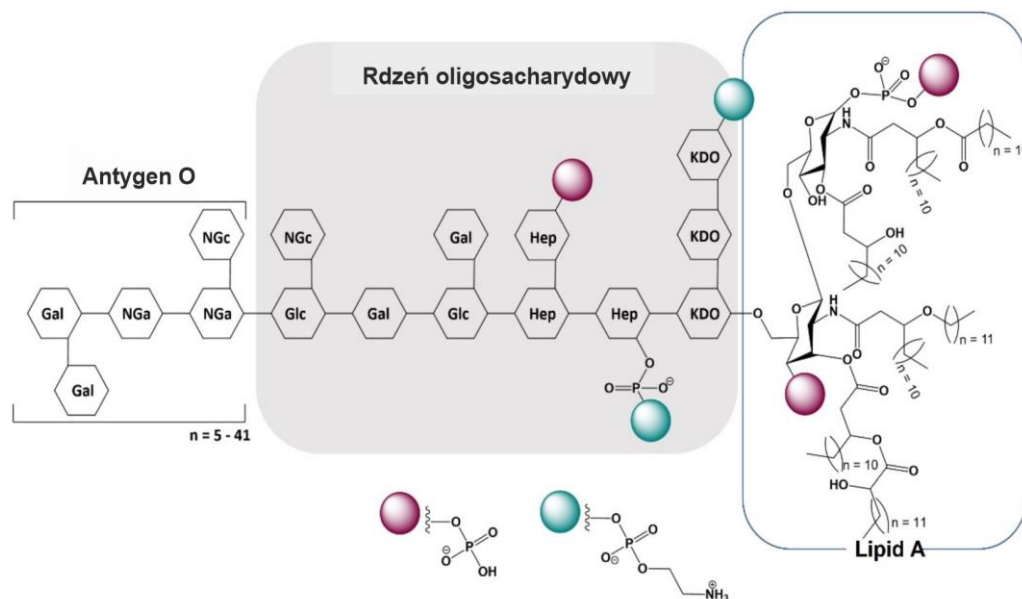
Wyniki badań przeprowadzonych na gryzoniach, w modelach AD, pokazują wpływ sposobu odżywiania na główne cechy neuropatologiczne AD w mózgu, czyli amyloidogenne gromadzenie toksycznych peptydów $A\beta$ i fosforylację białka tau. Co więcej, dane te pokazują, że efekty molekularne są silnie zależne od składu diety, czasu startu i trwania karmienia (szczegółowo zreferowane w pracy Więckowska-Gacek i in., 2021). Na przykład cztero-miesięczny czas stosowania diety wysokotłuszczowej (HFD) wywołał 2-krotne podwyższenie zawartości peptydów $A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$ w hipokampie (Ho i in., 2004), 9 miesięcy diety HFD wzbogaconej w SFA doprowadziło do zwiększonego poziomu tau, nasilonej fosforylacji białka

tau (p-tauThr¹⁸¹, p-tauSer²⁰², p-tauSer^{396/404}) oraz zwiększonego stężenia Aβ40 i Aβ42 (Julien i in., 2010; Vandal i in., 2014), a 18 miesięcy diety bogatej w cholesterol skutkowało zwiększonym poziomem PHF-tau i Aβ (Hohsfield i in., 2014) w mózgach mysich modeli AD. Dane te pokazują, że zmiany zawartości poszczególnych składników w diecie mogą prowadzić do przyspieszenia pojawienia się i/lub wzmocnienia nagromadzenia amyloidu w mózgu i patologii p-tau w modelach zwierzęcych AD. Obserwacja ta wyraźnie wskazuje, że schemat żywienia może być czynnikiem wpływającym na rozwój i przebieg AD, jak wykazano w zwierzęcych modelach AD. Wniosek ten jest zgodny z wynikami, które pokazują, że WD ma zdolność upośledzania pamięci, uczenia się i funkcji poznawczych zarówno u gryzoni typu dzikiego, jak i u ludzi. W świetle przytoczonych danych ważne jest przeprowadzenie szczegółowych badań umożliwiających identyfikację procesów łączących zaburzenia składu WD z powstającym zapaleniem metabolicznym, a następnie przeanalizowanie zależności tych zmian z indukcją patologii AD, w tym m.in. wpływ na procesy zapalne w mózgu i neurodegenerację. Połączenie tych elementów może umożliwić lepsze zrozumienie patologii choroby i może przyczynić się do powstania nowych sposobów wsparcia leczenia lub zapobiegania demencji w tym AD.

1.8. Ogólnoustrojowy stan zapalny powstały w wyniku infekcji jako czynnik rozwoju AD

Hipoteza, że czynniki zakaźne mogą powodować AD powstała ponad sto lat temu i została zaproponowana przez czeskiego lekarza Oskara Fischera, rówieśnika Aloisa Alzheimerera. Od tamtej pory na podstawie licznych badań naukowych i klinicznych udowodniono, że stan zapalny mózgu jest ważną cechą w patogenezie i progresji chorób neuro-degeneracyjnych, takich jak AD (Nava Catorce i Gevorkian, 2016). Ostatnimi laty wykazano, że infekcje obwodowe, którym towarzyszy stan zapalny, stanowią jeden z uznanych czynników ryzyka rozwoju AD (Holmes, 2013; Xie i in., 2022). W przebiegu wielu infekcji w wyniku odpowiedzi układu odpornościowego dochodzi do powstania ogólnoustrojowego stanu zapalnego przejawiającego się zarówno zwiększonym poziomem takich białek jak CRP (białko ostrej fazy) czy cytokiny i chemokiny prozapalne, a także do zwiększenia poziomu endotoksyny – lipopolisacharydu (LPS), która jest produkowana przez szereg bakterii patogennych.

LPS jest głównym składnikiem błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych, który indukuje wyraźną odpowiedź zapalną. Częsteczką LPS składa się z lipidu A, oligosacharydu rdzeniowego i O-polisacharydu, określanego również jako antygen O (**Rycina 7**). Hydrofobowy lipid A jest najbardziej immunogenną częścią LPS, osadzoną w zewnętrznej błonie bakteryjnej i łączącą ją z resztą cząsteczki LPS (Skrzypczak-Wiercioch i Sałat. 2022). Lipid A jest najbardziej stabilnym składnikiem LPS, a cząsteczki O-polisacharydu i rdzenia mogą się znacznie różnić, nawet wśród tych samych gatunków bakterii. Wpływ struktury lipidu A na immunogenność LPS jest dobrze opisany i obecnie uważa się, że najbardziej immunogenną postacią LPS jest sześćo-łańcuchowy lipid A (Bertani i Ruiz, 2018; Knirel i in., 2021; Mohr i in., 2022). Ta zależność stanowi fundamentalną podstawę dla rozróżnienia bakterii chorobotwórczych i niepatogennych przez układ odpornościowy (Garcia-Vello i in., 2022). Sześćo-acylowany wariant lipidu A znajduje się w silnych patogenach, takich jak *Escherichia coli* i *Salmonella enterica Typhimurium* (Mazgaen i Gurung, 2020).



Rycina 7. Ogólna budowa lipopolisacharydu z *E. coli* O111:B4. Skrót: Gal-galaktoza; Glc-glukoza; Hep-L-glicerol-D-manno-heptoza; kwas KDO-2-keto-3-dezoksyoktonowy; Nga-N-acetylo-galaktozamina; NGc-N-acetylo-glukozamina (Skrzypczak-Wiercioch i Sałat, 2022, zmodyfikowano).

Poziom endotoksyn w osoczu krwi jest zwykle niski, natomiast dochodzi do jego wzrostu podczas infekcji, zapalenia jelit, chorób dziąseł czy chorób neurodegeneracyjnych, w tym AD. Co ciekawe, stężenie LPS w osoczu pacjentów z AD jest 3-6 razy większe niż normalnie; podobnie, stężenie LPS we krwi zwierząt będących modelami AD jest około 3-krotnie wyższe niż normalnie (Brown, 2019; Lee i in. 2019). Sugeruje się, że w AD indukowana przez LPS prozapalna immunomodulacja ma negatywny wpływ na patologię choroby (Zhan i in., 2018). Endotoksyna ta wiąże się bezpośrednio z APOE, a wariant APOE4 zarówno uwrażliwia na endotoksynę, jak i predysponuje do AD. Co więcej, choroby obwodowe, które podnoszą poziom endotoksyny we krwi, takie jak posocznica, czy niewydolność wątroby, stany zapalne jelit, czy paradontoza również mogą przyczyniać się do neurodegeneracji. Endotoksyna aktywuje mikroglej, który uszkadza neurony poprzez uwalnianie tlenu azotu i cytokin prozapalnych. Ponadto podejrzewa się, że sama obecność czynników zakaźnych indukuje zarówno miejscowe, jak i ogólnoustrojowe reakcje zapalne sprzyjające uszkodzeniu komórek i utracie neuronów. W ten sposób powstały "hipoteza infekcji" oraz „hipoteza endotoksyny” jako przyczyna rozwoju AD, które m.in. głoszą, że bakterie patogenne i ich produkty, takie jak LPS, indukują procesy związane z rozwinięciem neurozapalenia, co prowadzi do amyloido- i tauopatii w mózgu (Brown, 2019; Zhan i in., 2018).

Ostatnimi laty wykonano wiele badań dotyczących związku pomiędzy infekcjami wywołanymi przez bakterie G (-) takich jak choroba przyzębia, zakażenie *Helicobacter pylorii* czy dysbioza jelitowa, a występowaniem AD. Wykazano, że wiążą się one ze zwiększonym poziomem stanu zapalnego i spadkiem funkcji poznawczych w AD (Roubaud Baudron i in., 2013; Ide i in., 2016; Cattaneo i in., 2017). Przewlekła obwodowa infekcja wywołana przez bakterie G (-) może wywołać ośrodkową odpowiedź zapalną na dwa sposoby, poprzez indukowaną przy pomocy LPS lokalną produkcję cząsteczek zapalnych, zdolnych do przedostania się do OUN przez krążenie systemowe i penetracji dysfunkcyjnej bariery krew-mózg, oraz przez stymulację nerwu trójdzielnego. Wydzielane cytokiny mogą działać synergistycznie z Aβ

na aktywowany mikroglej, powodując wzmocnioną reakcję sprzyjającą progresji AD (Ganz i in., 2022). Ponadto wykazano, że wyższy poziom LPS w mózgu chorych na AD koreluje z powstawaniem blaszek A β (Zhan i in., 2016; Zhao i in., 2017; Zhan i in., 2018).

1.8.1. Ogólnoustrojowy stan zapalny wywołany przez bakteryjny lipopolisacharyd (LPS)

Silne właściwości prozapalne i dobrze zbadane mechanizmy aktywacji układu odpornościowego spowodowały szerokie zastosowanie LPS jako modelu posocznicy i stanu zapalnego u zwierząt (Fink, 2019), ze szczególnym zastosowaniem w obszarze badań neuro-naukowych. W typowym scenariuszu LPS aktywuje kompleks CD14-TLR4/MD-2 obecny w błonie komórkowej monocytów, makrofagów, komórek dendrytycznych i w mniejszym stopniu neutrofilów, prowadząc do produkcji cytokin prozapalnych i interferonów typu I (Płóciennikowska i in., 2015). Następnie dochodzi do rozregulowania odpowiedzi układu odpornościowego gospodarza, co prowadzi do ogólnoustrojowego stanu zapalnego o różnym stopniu nasilenia. W sytuacji dużych dawek LPS w organizmie może dojść do bardzo silnego zaburzenia funkcji układu odpornościowego, co może skutkować rozwinięciem sepsy nazywanej inaczej posocznicą.

1.8.2. Wpływ dootrzewnowej iniekcji LPS na stan zapalny w mózgu i patogenezę AD

Zostało dobrze udokumentowane, że obwodowe wstrzyknięcie LPS, będące uznanym i stosowanym modelem ogólnoustrojowych infekcji bakteryjnych, indukuje także różnorodne efekty w ośrodkowym układzie nerwowym. Liczne badania z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych wykazały, że LPS podany obwodowo jest zdolny do wywołania stanu zapalnego w mózgu poprzez stymulację syntezy cytokin prozapalnych takich jak IL-1 β , IL-6 i TNF- α (Nava Catorce i Gevorkian, 2016), indukcję zmian morfologicznych charakterystycznych dla aktywowanego mikrogleju (Qin i in., 2007; Sheng i in., 2003; Kitazawa i in., 2005; Ifuku i in., 2012; Okuyama i in., 2013), czy wywołania wzrostu liczby aktywowanych astrocytów, jak również hipertrofię astrocytów (Biesmans i in., 2013; Sheng i in., 2003; Ifuku i in., 2012; Okuyama i in., 2013). Istnieją jednak doniesienia, w których autorzy nie zaobserwowali takiego wpływu (Cunningham i in., 2005; Chen i in., 2012; Camara i in., 2015). Rozbieżności w wynikach mogą wynikać z licznych szczegółowych zmiennych eksperymentu, które różnią się we wszystkich dostępnych badaniach, w tym zastosowany szczep myszy, miejsce wstrzyknięcia, rodzaj zastosowanego LPS i jego dawka, liczba podań czy czas od iniekcji, po którym zwierzęta poddano eutanazji. Pomimo tych rozbieżności, dootrzewnowa iniekcja LPS jest dziś uznana i z powodzeniem stosowana jako jeden z modeli indukcji stanu zapalnego w mózgu. Natomiast wykazano, że u myszy transgenicznym APP traktowanych LPS dochodzi do wewnątrzkomórkowej akumulacji białka prekursorowego amyloidu, peptydu A β i nadmiernie fosforylowanego białka tau, oraz nasilenia deficytów pamięci (Sheng i in., 2003; Kitazawa i in., 2005) i upośledzenie neurogenety w obszarze hipokampa (Ormerod i in., 2013).

Neurodegeneracja pod wpływem dootrzewnowej iniekcji LPS

Wiadomo, że stan zapalny w mózgu skutkuje upośledzeniem plastyczności synaps w hipokampie, zaburza procesy uczenia się i pamięci zależne od hipokampa oraz wzmaga wymieranie neuronów (Cunningham i in., 2005, Sparkman i in., 2005; Sparkman i in., 2006). Zbadano więc, czy analogiczne zjawiska zachodzą u myszy, u których wywołano ogólnoustrojowy stan zapalny poprzez pojedyncze lub wielokrotne podanie LPS dootrzewnowo. Wykazano, że iniekcja LPS prowadzi do zwiększonej apoptozy neuronów, postępującej utraty neuronów dopaminergicznych, zmniejszonego poziomu neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgo-wego (BDNF) i serotoniny oraz do zmniejszonego poziomu markerów autofagii. Co więcej, LPS pogarsza także zachowania społeczne i aktywność lokomotoryczną, a także upośledza wydajność w różnych zadaniach związanych z uczeniem się i pamięcią, (Qin i in., 2007; Okuyama i in., 2013; Cunningham i in., 2005; Chen i in., 2008; Sparkman i in., 2006; Sparkman i in., 2005).

Podsumowując, kluczowym punktem wspólnym między neurozapaleniem, a ogólnoustrojowym stanem zapalnym wywołanym przez LPS jest szlak sygnałowy związany z receptorem TLR4. Podanie LPS powoduje odpowiedź zapalną, prowadząc do aktywacji komórek glejowych i indukcji neurozapalenia, co skutkuje degeneracją neuronów, utratą synaps i ostatecznie śmiercią komórek nerwowych (Yang i in., 2020b). W procesie tym istotną rolę odgrywa również produkcja cytokin prozapalnych, takich jak TNF- α , IL-6 i IL-1 β , zwiększona aktywność enzymów: iNOS, COX-2, β -sekretazy i γ -sekretazy, a także stres oksydacyjny oraz produkcja i akumulacja A β (Yang i in., 2020b; Kshirsagar i in., 2021). Zgromadzone dane wskazują, że LPS i ogólnoustrojowy stan zapalny prowadzą do rozwinięcia neurozapalenia, uruchomienia mechanizmów molekularnych prowadzących do rozwoju patologii A β i/lub tau, co skutkuje neurodegeneracją oraz upośledzeniem funkcji poznawczych.

2. Założenia i cele pracy

Biorąc pod uwagę, że wiele znanych czynników ryzyka AD jest związanych z zaburzeniami metabolizmu, takimi jak otyłość, cukrzyca typu 2, czy hipercholesterolemia, które jednocześnie są konsekwencją nieprawidłowego sposobu odżywiania, w niniejszej pracy testowano hipotezę, że **dieta zachodnia (WD) poprzez wywołanie zespołu metabolicznego i ogólnoustrojowego stanu zapalnego może przyspieszać lub intensyfikować stan zapalny mózgu oraz zmiany neuropatologiczne charakterystyczne dla AD, takie jak nadprodukcja A β czy zwiększona fosforylacja białka tau.**

W ostatnich latach znacznie wzrosła liczba publikacji dokumentujących rolę sposobu odżywiania w zaburzeniach funkcjonowania mózgu, a badania wykazały szkodliwy wpływ zmienionej zawartości poszczególnych makroelementów (kwasy tłuszczowe, cukier, cholesterol) na takie czynniki jak pamięć czy funkcje poznawcze (przegląd badań w Więckowska-Gacek i in., 2021). Natomiast brakuje jednoznacznych danych pokazujących wpływ WD na sekwencję patologicznych procesów w przebiegu AD, zwłaszcza podczas przedobjawowego stadium choroby.

W związku z tym **głównym celem pracy było przeprowadzenie pierwszej szczegółowej analizy sekwencji patologicznych zdarzeń wywołanych przez WD podczas przedobjawowego stadium AD w dwóch kluczowych dla tej choroby strukturach mózgu: w hipokampie i korze śródwęchowej.**

Dodatkowym celem pracy było porównanie sekwencji patologicznych zdarzeń w mózgu wywołanych przez WD z sekwencją wywołaną dootrzewnowym podaniem LPS, odzwierciedlającym przejście ostrej infekcji bakteryjnej. LPS jest jednym z dobrze przebadanych czynników indukcji stanu zapalnego w mózgu, a infekcje bakteryjne zaliczają się do czynników ryzyka AD.

Do badań wybrano dobrze scharakteryzowany myszy model AD: myszy transgeniczne APP^{swE} z mutacją szwedzką w ludzkim genie *APP*. Model ten wybrano ze względu na obecność wolno rozwijającej się patologii AD z długim okresem przedobjawowym, co odpowiada długoletniemu okresowi rozwoju tej choroby u ludzi.

Szczegółowymi celami pracy było znalezienie odpowiedzi na pytania:

- 1) Czy i po jakim czasie od rozpoczęcia WD występują zaburzenia charakterystyczne dla zespołu metabolicznego, takie jak hipercholesterolemia, otyłość, oraz uszkodzenie wątroby?
- 2) Czy i po jakim czasie od rozpoczęcia WD rozwija się ogólnoustrojowy stan zapalny?
- 3) Czy i po jakim czasie od rozpoczęcia WD następuje przyspieszenie procesów zapalnych w mózgu oraz zaburzenia funkcji gleju?
- 4) Czy i po jakim czasie od rozpoczęcia WD dochodzi do wzmożenia procesu amyloidogenezy oraz indukcji nadmiernej fosforylacji białka tau w mózgu?
- 5) Czy i na jakim etapie życia WD może wpływać na zmiany poziomu markerów neurodegeneracji, takich jak PSD95, NeuN i zmiany morfologiczne neuronów?

3. Materiały i Metody

3.1. Spis zastosowanych odczynników, roztworów, przeciwciał i urządzeń

Tabela 1. Spis odczynników.

Odczynnik	Producent
NaCl, KCl, NaHCO ₃ , NaH ₂ CO ₃ , cytrynian trójsodowy	POCH, Gliwice, Polska
1M HCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Stany Zjednoczone
Glicerol	Carl Roth, Karlsruhe, Niemcy
NGS (surowica kozia)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Stany Zjednoczone
40% Formalina	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Stany Zjednoczone
Etanol 99,9%	Hempur, Piekary Śląskie, Polska
Ksylen	Hempur, Piekary Śląskie, Polska
Alkohol poliwinylowy 4-88	Fluka, Steinheim, Niemcy
DABCO (1,4-diazabicyclo-2,2,2-octan)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Stany Zjednoczone
Hoechst, 33342	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Stany Zjednoczone
Tween20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Stany Zjednoczone
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Stany Zjednoczone
Roztwór hematoksyliny Mayera	Leica Mayers Hematoxylin
0,2% alkoholowym roztworze EOSIN Y	O. Kindler & Orsatec GmbH, Bobingen, Niemcy
odczynnika różnicującym barwę niebieską	Leica Scott's Tap Water Substitute Working Solution Concentrate
Ksylen	Hempur, Piekary Śląskie, Polska
Medium do zaklejania szkieł na bazie ksylenu	Consul-Mount, Thermo Scientific Shandon
Heparyna	Baxter Polska Sp. z o.o.
Lipopolisacharyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Stany Zjednoczone
Trizma base	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Stany Zjednoczone
Glicyna	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Stany Zjednoczone
Trycyna	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Stany Zjednoczone

SDS (dodecylosiarczan sodu)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Stany Zjednoczone
EDTA (kwas wersenowy)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Stany Zjednoczone
30% Akrylamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Stany Zjednoczone
BSA (albumina bydlęca)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Stany Zjednoczone
B-merkaptioetanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Stany Zjednoczone
Bufor Laemmliego 4x	Bio-Rad, Hercules, CA, Stany Zjednoczone
Bufor RIPA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Stany Zjednoczone
Inhibitory proteaz - Protease inhibitor cocktail tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy
Inhibitory fosfataz - PhosStop cocktail tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy
APS (nadsiarczan amonu)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Stany Zjednoczone
TEMED (N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Stany Zjednoczone
Precision Plus Protein™ Dual Xtra	Bio-Rad, Hercules, CA, Stany Zjednoczone
Membrany wykonane z polifluorku winylidenu (PVDF) 0,21 μm	Merck Millipore, Burlington, MA, Stany Zjednoczone
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific

Tabela 2. Roztwory do perfuzji i krioprotekcji tkanki.

Sól fizjologiczna z dodatkiem KCl w buforze fosforanowym (PBS) oraz 0,1% ortowanadau sodu i 1% heparyną	10mM PB pH 7,4 150mM NaCl 3,7mM KCl
10% formalina buforowana	100 ml 40% formaldehydu 900 ml H ₂ O 4,0 g NaH ₂ PO ₄ 6,5 g Na ₂ HPO ₄

Tabela 3. Roztwory do immunohistochemii i zabezpieczania preparatów.

10 nM Bufor cytrynianowy (pH = 6) z Tween20	10 mM trójzasadowy dihydrat cytrynian sodu, pH 6,0 0,05% Tween 20
Sól fizjologiczna w buforze fosforanowym z dodatkiem Tritonu (PBS-TX)	PBS pH 7,4 0,3% Triton X-100
5% roztwór surowicy do blokowania nieswoistych oddziaływań przeciwciał z tkanką oraz do rozcieńczania przeciwciał pierwszo- i drugorzędowych	100% NGS 0,01 M PBS-TX pH 7,4

1% roztwór albuminy bydlęcej	BSA 0,01 M PBS-TX pH 7,4
Odczynnik do zatapiania preparatów do immunofluorescencji – roztwór Mowiolu	alkohol poliwinylowy 99,5% Glicerol 98% 1,4-diazabicylo-2,2,2-octan (DABCO) 0,2.M Tris pH 8,5

Tabela 4. Roztwory do Western blottingu z użyciem transferu półsuchego.

TBS 10x	1.5 M NaCl 0.5 M Tris-HCl, pH 7.5
TBS-T	TBS 1x 0,1% Tween20
Bufor Laemmliego 4x do obciążania próbek	Gotowy bufor Laemmliego 4 x 20% (v/v) s merkaptoetanol
Bufor Tris-glicyna do elektroforezy białek	0.25 M Tris, pH 8.4 192 nM glicyna 10% SDS
Bufory Tris-trycyna do elektroforezy białek:	
- KATODA 1x	0,1M Tris 0,1M trycyna 0,1% SDS
- ANODA 5x	0,2M Tris-Cl, pH 8,9
Bufor do transferu białek z żelu poliakryloamidowego na PVDF z 20% metanolem (bufor Towbina)	25 mM Tris pH 8.3, 192 mM glicyna, 20% metanol
Bufor do szybkiego transferu białek z żelu poliakryloamidowego na PVDV z 20% metanolem (bufor TURBO 1x)	40,7 g Tris 19,52 g Glicyny 25,08 g trycyny 0,73 g EDTA 200 ml Metanolu dopełnić ddH ₂ O do 1L
Roztwór 5% BSA do blokowania membrany po elektrotransferze	BSA TBS-T 1x
Zestaw do wywoływania reakcji chemiluminescencji	Clarity™ ECL Western Blotting Substrate (Bio-Rad)
Gotowy kit do wylewania żeli do elektroforezy na bazie glicyny	TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Solutions

żel trycynowy 4% - zagęszczający	objętość całkowita 3ml: - 2,1 ml ddH ₂ O - 0,45 ml 30% akrylamidu - 0,45 ml 1M Tris-HCl pH 6,8 - 30 ul 10% SDS - 30 ul 10% APS - 3 ul TEMED
żel trycynowy 10% - rozdzielający	objętość całkowita 8ml: - 2,1 ml 38% glicerolu - 1,2 ml ddH ₂ O - 2,4 ml 30% akrylamidu - 2,85 ml 3M Tris-HCl pH 8,45 - 80 ul 10% SDS - 80 ul 10% APS - 4 ul TEMED

Tabela 5. Spis przeciwciał pierwszorzędowych.

Przeciwciało	Nr katalogowy	Technika	Rozcieńczenie	Producent
mysie anti- α -tubulina	3873S	WB	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, Stany Zjednoczone
mysie anti-AQP4	ab9512	WB	1:500	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania
mysie anti- β -aktyna [8H10D10]	3700S	WB	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, Stany Zjednoczone
mysie anti- β -Amyloid, 1-16 [6E10]	803001	IF	1:250	BioLegend
mysie anti IL-6	sc-57315	WB	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
mysie anti-NeuN	MAB377	WB	1:500	Millipore
mysie anti-TLR4	sc-293072	WB	1:250	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
królicze anti- β -aktyna [D6A8]	8457S	WB	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, Stany Zjednoczone
królicze anti-APP C-koniec (Y188)	ab32136	WB	1:500	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania
królicze anti-CD68	ab125212	WB	1:500	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania
królicze anti-CX3CL1	ab25088	WB	1:500	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania
królicze anti-CX3CR1	ab8020	WB	1:1000	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania

królicze anty-GFAP	ab7260	WB/IF	1:1000	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania
królicze anty IL-1 β	ab9722	WB	1:500	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania
królicze anty-Iba1 [EPR16588]	ab178846	IF	1:500	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania
królicze anty-P2RY12 [EPR18611]	ab184411	WB	1:1000	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania
królicze anty-PSD95	ab2730	WB	1:500	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania
królicze anty-Phospho-Tau (Thr231) poliklonalne	44 746G	IF	1 : 100	Thermo Fisher Scientific/Invitrogen Stany Zjednoczone
królicze anty-pTau Thr231	GTX01563	WB	1:500	GeneTex, Irvine, CA, Stany Zjednoczone

skrót: WB – Western blotting, IF – immunofluorescencja

Tabela 9. Spis przeciwciał drugorzędowych.

Przeciwciało	Nr katalogowy	Technika	Rozcieńczenie	Producent
mysie przeciwciało drugorzędowe skoniugowane z peroksydazą chrzanową	7076S	WB	1:3000/1:5000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, Stany Zjednoczone
królicze przeciwciało drugorzędowe skoniugowane z peroksydazą chrzanową	7074S	WB	1:3000/1:5000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, Stany Zjednoczone
Kozie anty-mysie IgG H&L (Alexa Fluor® 594)	ab150116	IF	1:250	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania
Kozie anty-królicze IgG H&L (Alexa Fluor® 594)	ab150080	IF	1:250	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania

skrót: WB – Western blotting, IF – immunofluorescencja

Tabela 6. Leki i środki do znieczulenia ogólnego dla zwierząt.

Nazwa produktu leczniczego	Nazwa substancji czynnej	Producent
AErrane	Isofluranum	Baxter Polska Sp. z o.o.
Dexdomitor 0,5 mg/mL	Medetomidyna	ORION
Ketamina 100 mg/mL	Ketamina	Biowet Polska Sp. z o.o.

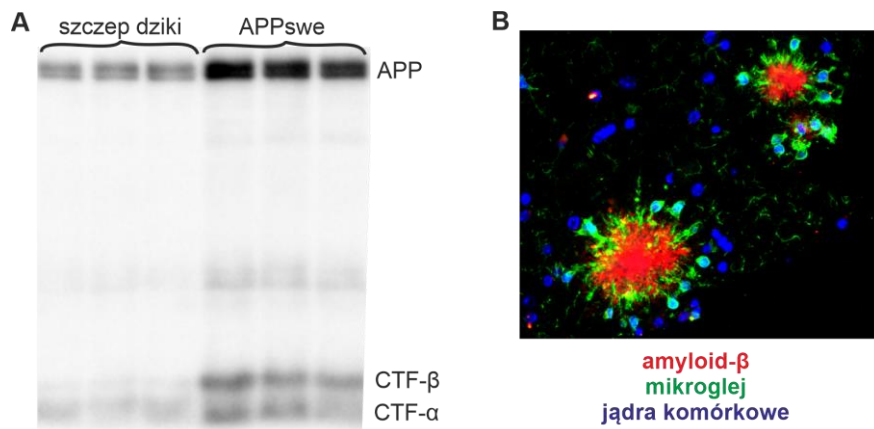
Tabela 7. Zastosowane urządzenia i oprogramowania.

Automatyczny analizator hematologiczny	SCIL Vet ABC Hematology Analyzer, Scil Animal Care Company GmbH
Automatyczny analizator biochemiczny pracujący w technologii suchej płytki	automatyczny analizator chemii klinicznej Fuji DriChem NX500
Automatyczny procesor histologiczny	Spin Tissue STP 120, Thermo Scientific
Stacja robocza do zatapiania tkanek w blokach parafinowych	HistoStar, Thermo Scientific
Mikrotom obrotowy	Thermo Scientific
Automatyczna barwiarka histologiczna	Thermo Scientific, Varistain Gemini ES Automated Slide Stainer
System obrazowania żeli i membran	ChemiDoc™ XRS+Imaging System z oprogramowaniem Image Lab™ Software (Bio-Rad)
Mikroskop fluorescencyjny i świetlny	Nikon Eclipse Ni + oprogramowania Image Pro-Plus 7 (Media Cybernetic) i NIS (Nikon)
Obiektyw mikroskopu	Nikon, obiektywy do lustrzanek, cele CFI Plan Achromat Lambda, NA: 20x/0,50
Kamera w mikroskopie	Nikon Digital Sight DS-Fi1c

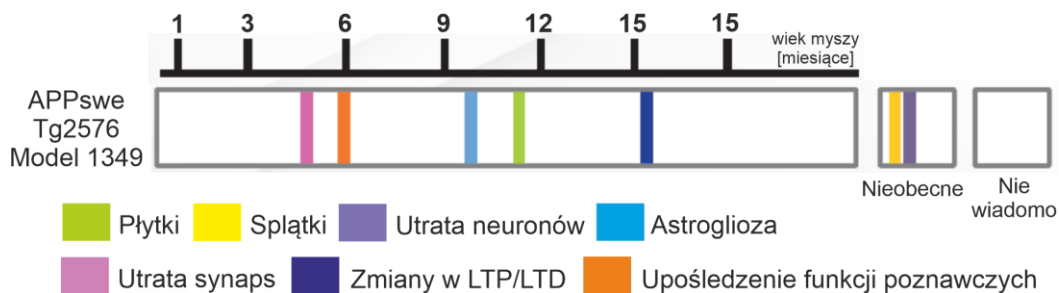
3.2. Hodowla zwierząt oraz schemat doświadczalny

3.2.1. Charakterystyka szczepu myszy doświadczalnych i warunki hodowli

Dziesięcioletnie samce transgenicznych myszy APPswe (linia Tg #1349; B6;SJL-Tg(APPswe)2576Kha) zakupiono z TACONIC BIOSCIENCES Laboratory, USA. Myszy APPswe niosą transgen kodujący 695-aminokwasową izoformę ludzkiego białka prekursorowego amyloidu (APP) z mutacją szwedzką (ludzki gen APP695 zawierający podwójną mutację K670N, M671L), charakteryzują się nadekspresją zmutowanego APP i C-końcowych produktów jego proteolizy – CTFs oraz rozwijają płytki amyloidu $A\beta$ w mózgu w późnym wieku (**Rycina 8**). Szczegółową charakterystykę neuropatologicznych zmian zachodzących w tym modelu deklarowanych przez hodowcę przedstawiono na **Rycinie 9**.



Rycina 8. Amyloidopatia w modelu APPswe. A) przykładowa membrana Western blottingu pokazująca zwiększony poziom białka APP oraz produktów jego proteolizy ciętych od C-końca (CTFs) w mózgu myszy w modelu APPswe; B) przykładowe zdjęcie mikroskopii fluorescencyjnej pokazujące wygląd płytek amyloidu β , które rozwija model APPswe w późnym wieku (opracowanie własne).



Rycina 9. Charakterystyka modelu APPswe. Chronologia patologicznych zmian zachodzących w mózgu modelu myszy APPswe deklarowanych przez producenta. Linki źródłowe:

<https://www.taconic.com/transgenic-mouse-model/appswe-model-1349>

<https://info.taconic.com/hubfs/collateral/brochures-and-sell-sheets/literature-library-us/alzheimers-disease-models.pdf>;

https://info.taconic.com/hubfs/collateral/brochures-and-sell-sheets/APPswe_Microinjected_Mouse_Model.pdf

Wszystkie doświadczenia na zwierzętach przeprowadzono zgodnie z wytycznymi instytucjonalnymi po uzyskaniu zgody I Lokalnej Komisji Etycznej w Warszawie (nr 783/2015, 24/2015 217/2016, 630/2018) oraz zgodnie z ustawą z dnia 15.01.2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych oraz Dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. Wszystkie myszy utrzymywano w indywidualnie

wentylowanych klatkach (ang. *individually ventilated cages*, IVC, Techniplast, Włochy), w warunkach światło/ciemność 12/12h, temperatura 22 (\pm 2) $^{\circ}$ C i wilgotność 45-65%. Zwierzęta miały stały, nieograniczony dostęp do świeżej wody i specjalistycznej suchej karmy bytowej dla myszy (Sniff 1534, Włochy), sterylizowanej promieniami gamma *ad libitum*.

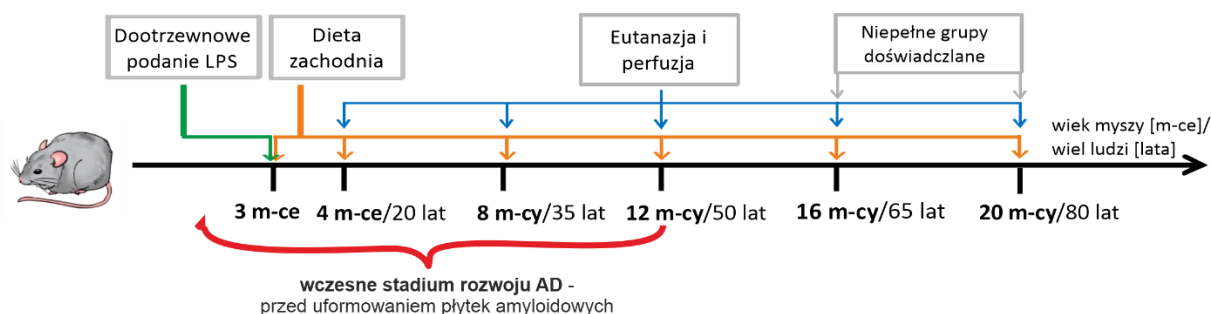
3.2.2. Grupy doświadczalne zwierząt

Doświadczenia *in vivo* rozpoczęto u trzynastotygodniowych samców myszy APPswe. Poprzez losowe przydzielanie zwierząt utworzono pięć grup wiekowych myszy: 4M, 8M, 12M, 16M i 20M (M – wiek w miesiącach) (**Rycina 10**). Utworzone grupy wiekowe myszy APPswe odzwierciedlały następujące przedziały wiekowe u ludzi: odpowiednio 20, 35, 50, 65, 80 lat (Flurkey i in., 2007, zmodyfikowano dla modelu APPswe). Następnie w każdej z grup wiekowych utworzono cztery grupy doświadczalne myszy: 1) grupa kontrolna (CTR), która była karmiona standardową dietą przez cały okres eksperymentu; 2) grupa WD, która była karmiona doświadczalną dietą zachodnią (z ang. *Western diet* – WD) przez cały okres eksperymentu, 3) grupa LPS, której w 13. tygodniu życia dootrzewnowo wstrzyknięto lipopolisacharyd (LPS) i otrzymywały dietę standardową przez okres eksperymentu; 4) WD+LPS, grupa której w 13. tygodniu życia dootrzewnowo wstrzyknięto LPS i otrzymywały dietę WD przez cały okres eksperymentu (**Rycina 10**). Odpowiednie czasy karmienia dietą standardową lub WD w odpowiednich grupach wiekowych były następujące: w grupach 4M – 3 tygodnie, 8M – 5 miesięcy, 12M – 9 miesięcy, 16M – 13 miesięcy i 20M – 17 miesięcy.

Niestety ze względu na znaczną śmiertelność nie udało się utrzymać przy życiu wszystkich myszy w grupach eksperymentalnych 16M i 20M, które odzwierciedlały objawowe etapy rozwoju patologii AD u myszy APPswe. Analizę ilościową badanych markerów przeprowadzono we wszystkich grupach doświadczalnych: CTR, LPS, WD i WD+LPS w podgrupach wiekowych 4M, 8M i 12M, które według charakterystyki modelu APPswe, odzwierciedlają przed-platekowy, przedobjawowy etap rozwoju AD. Liczbę zwierząt w danej grupie doświadczalnej i wiekowej podano w **Tabeli 8**. Dane z grup myszy 16M i 20M przedstawiono jako wzbogacające informacje uzyskane z analiz jakościowych mikroskopii świetlnej i fluorescencyjnej grup niepełnych.

Tabela 8. Liczba myszy linii APPswe przypadająca na grupę doświadczalną.

APPswe	4M	8M	12M
CTR	n=7	n=8	n=5
LPS	n=4	n=4	n=4
WD	n=4	n=5	n=5
WD+LPS	n=5	n=5	n=5



Rycina 10. Schemat doświadczalny. Opis w tekście.

3.2.3. Charakterystyka stosowanych diet

Dieta zachodnia (z ang. *western diet* - WD) to współczesny sposób odżywiania, który wyewoluował ze złych nawyków w stylu życia oraz sposobie odżywiania dzisiejszego społeczeństwa zachodniego, typowy dla krajów rozwiniętych i stopniowo obejmujący kraje rozwijające się. Dieta zachodnia charakteryzuje się wysokim poziomem nasyconych kwasów tłuszczowych, węglowodanów prostych i cholesterolu. **Tabele 9 i 10** przedstawiają szczegółowe porównanie obu zastosowanych w niniejszej pracy typów diet: zbilansowanej diety standardowej (R/M-H V1534) i zachodniej (EF R/M E15126-34), obie opracowane przez firmę Sniff®.

Tabela 9. Procentowa zawartość wybranych makroelementów w diecie.

Makroelement	Dieta standardowa [%]	Dieta zachodnia [%]
Tłuszcz	3.3	30.0
Nasycone kwasy tłuszczowe	0.57	14.19
Nienasycone kwasy tłuszczowe	2.68	12.68
Błonnik	36.5	17.2
Cukier	4.7	16.3
Białko	19.0	20.7
Cholesterol	-	284 [mg/kg]

Tabela 10. Procentowy rozkład energii pochodzącej z poszczególnych makroelementów.

Makroelement	Dieta standardowa [%]	Dieta zachodnia [%]
Węglowodany	58.0	29.0
Tłuszcz	9.0	54.0
Białko	33.0	17.0

3.2.4. Dootrzewnowa iniekcja LPS

Myszom w 13. tygodniu życia wstrzyknięto dootrzewnowo LPS w dawce 0,5 mg/kg mc przez trzy kolejne dni. Dawkę LPS i schemat eksperymentu określono na podstawie dostępnej literatury (Nava Catorce i Gevorkian 2016; Cazareth i in., 2014) oraz empirycznie poprzez wykonanie badania pilotażowego testującego trzy dawki (0,25; 0,5; 1 mg/kg m.c.) w jednym lub trzykrotnym podaniu. Dawkę do niniejszego eksperymentu wybrano na podstawie oceny kondycji, stanu zdrowia i przeżywalności myszy w badaniu pilotażowym, oraz ocenie skutecznego przyspieszenia astrocytozy w tkance mózgowej po dwóch tygodniach od iniekcji. Dootrzewnowe podanie LPS wywołuje ostre ogólnoustrojowe zapalenie w wyniku reakcji na czynnik infekcyjny pochodzenia bakteryjnego (Gasparotto i in., 2017) i, wg dostępnej literatury, prowadzi do neurozapalenia, co może wpływać na mechanizmy molekularne związane z patologią AD (Nava Catorce i Gevorkian 2016).

3.3. Uśmiercanie, perfuzja oraz pobieranie krwi i tkanek

W dniu eutanazji zwierzęta były ważone oraz miały ostatni swobodny dostęp do pokarmu na 5-6 godzin przed ostatecznym znieczuleniem. Przed wykonaniem iniekcji dootrzewnowej mieszaniną medetomidyny w dawce 1mg/kg i ketaminy w dawce 75 mg/kg w sterylnym 0,9% chlorku sodu (NaCl), myszy poddano sedacji parami izofluranu przez 30 s w celu zminimalizowania stresu związanego z wejściem do pomieszczenia nekropsji i wykonaniem iniekcji. Następnie przerwano ciągłość skóry i mięśni, oraz otwarto klatkę piersiową znieczulonych myszy. Z prawej komory bijącego serca myszy, do probówek z EDTA (Sarstedt, Niemcy) pobrano 50µl próbki krwi pełnej do analizy hematologicznej, a do probówek heparynizowanych (Sarstedt, Niemcy) pobrano 500-800µl krwi przeznaczonej na osocze do analiz biochemicznych. Po pobraniu krwi z serca przeprowadzono perfuzję przezsercową zimną solą fizjologiczną buforowaną fosforanem (PBS) z 0,1% heparyną i 0,1% ortowanadanem sodu – inhibitorem fosfataz. Następnie wykonano sekcję zwłok i pobrano mózg i narządy wewnętrzne. Ze względu na konieczność wykonania różnych typów analizy tkanek mózgi podzielono na dwie półkule, a pozostałe organy podzielono na mniejsze fragmenty. Do analizy histologicznej i immunofluorescencyjnej wykorzystano prawe półkule mózgu. Prawe półkule mózgowe oraz wydzielone fragmenty wątroby utrwalono w 10% buforowanej formalinie. Po utrwaleniu tkanki metodą nasiękową próbki tkanek mózgu i wątroby poddano procesowaniu, zatapianiu w parafinie i skrawaniu w celu uzyskania tkankowych preparatów mikroskopowych. Z lewej półkuli mózgowej wydzielono hipokamp i korę śródwęchową w celu przygotowania homogenatów/lizatów tkanki mózgowej do analizy ilościowej metodą Western blotting. Tkanekę poddano procedurze szybkiego mrożenia w ciekłym azocie, a następnie do momentu homogenizacji przechowywano w temperaturze głębokiego mrożenia -80 °C.

3.4. Hematologiczna i biochemiczna analiza krwi

3.4.1. Procedura pobrania oraz przygotowania krwi i surowicy do analizy

Jak opisano powyżej, krew do analizy pobrano terminalnie bezpośrednio z serca znieczulonej myszy, do probówek SARSTEDT z heparyną litową lub EDTA K do analizy biochemicznej i hematologicznej odpowiednio. Osocze do analizy biochemicznej uzyskano z pobranych próbek krwi przez wirowanie w 4065 rcf przez 30 min w temperaturze 15°C.

3.4.2. Hematologiczna analiza krwi

Analizę hematologiczną przeprowadzono przy użyciu automatycznego analizatora hematologicznego Scil Vet abc z wykorzystaniem techniki impedancji elektrycznej.

3.4.3. Analiza biochemiczna parametrów krwi

Krew do analizy biochemicznej była pobierana po ok 5-6h od odstawienia myszy od pożywienia. Stężenie takich parametrów biochemicznych w osoczu jak glukoza, cholesterol całkowity oraz trójglicerydy oznaczano za pomocą analizatora biochemicznego Fuji Dri-Chem NX500 pracującego w technologii suchej płytki.

3.5. Analiza immunohistochemiczna

3.5.1 Przygotowanie tkanek do znakowania histologicznego

Tkanki mózgu myszy i narządów wewnętrznych utrwalano 10% buforowaną formaliną przez 14 dni, a następnie odwodniono w 70% etanolu (EtOH) przed przygotowaniem w automatycznym procesorze tkankowym Thermo Microm STP120 Tissue, w którym zastosowano proces dalszego odwodnienia tkanki w serii wzrastających stężeń EtOH (70%, 80%, 96%, 99,8% x 3), prześwietlenia tkanki w trzech zmianach ksylenu i nasycenia tkanki parafiną w dwóch zmianach ciekłej parafiny o temperaturze 60°C, w pierwszej przez 1h, a w drugiej przez 2h. W celu przygotowania bloczków parafinowych przygotowane w procesorze fragmenty tkanek zatopiono w parafinie w postaci bloków za pomocą stacji do zatapiania HistoStar. Bloki parafinowe skrojono na obrotowym mikrotomie Microm na skrawki o grubości 8 µm (mózg) oraz 5 µm (wątroba).

Tkankę ludzkiego mózgu pobrano ze zbiorów Polskiego Banku Mózgu w Instytucie Psychiatrii i Neurologii w Warszawie (IPiN), dzięki uprzejmości prof. dr hab. n. med. Teresie Wieźbie-Bobrowicz, Kierownika Zakładu Neuropatologii IPiN oraz pomocy dr n. med. Dominika Chutorańskiego, diagnosty i analityka medycznego w Zakładzie Neuropatologii IPiN. Materiał diagnostyczny zachowany w archiwum IPiN, przechowywany był w roztworze 10% buforowanej formaliny. Po długotrwałym przechowywaniu w utrwalczu próbki tkanek płukano wodą przez 24 godziny, a następnie w zamkniętym systemie automatycznie odwodniono w rosnącej serii alkoholowej (70% x 1, 96% x 2, 99,8% x 3), inkubowano w ksylenu (4 zmiany) oraz nasycano w 3 zmianach ciekłej parafiny o temperaturze 62°C po 2h każda, a następnie zatopiono w blokach. Bloki parafiny zawierające fragmenty mózgow ludzkich pocięto na skrawki o grubości 8 µm.

3.5.2. Znakowanie histologiczne skrawków tkanki mózgu i wątroby

Wizualizację struktury histologicznej tkanek wątroby przeprowadzono przez rutynowe barwienie topograficzne hematoksyliną i eozyną (H&E) przygotowanych preparatów mikroskopowych. Szkiełka tkanki wątroby wybarwiono przy użyciu automatycznego urządzenia do barwienia zgodnie ze standardowym protokołem. Preparaty z tkanki mózgu przygotowano ręcznie. Najpierw skrawki wątroby lub mózgu poddano procesowi deparafinizacji w 3 zmianach ksylenu, a następnie uwodniono przez inkubację z mieszaniną ksylenu i alkoholu o różnych zawartościach procentowych, a następnie w serii zmniejszających się stężeń EtOH (99,8% x 2, 96%, 70%, 50%), aż do wody. Następnie tkankę barwiono przez 2 minuty w roztworze hematoksyliny Mayera, różnicowano w kwaśnym alkoholu EtOH 70% z dodatkiem 1% HCl 1M przez 1 minutę, inkubowano w odczynniku różnicującym barwę niebieską przez 4 minuty i inkubowano przez 7 minut w 0,2% roztworze alkoholowym EOSIN Y. Wszystkie etapy rozdzielono przez 1-minutowe płukanie w wodzie destylowanej. Następnie tkankę ponownie odwodniono stosując odwrotny szereg alkoholowy EtOH 70%, 96%, 100% etanol przez 30 sekund każde i 3 zmianach ksylenu po 1 minucie. Na koniec szkiełka zostały ręcznie zatapiane za pomocą medium do zaklejania szkiełek i przykryte szkiełkami nakrywkowymi. Dzięki hematoksylinie jądra uzyskują kolor od niebieskiego do ciemno-fioletowego, a roztwór

eozyiny EOSIN Y barwi kwasochłonne struktury, w tym cytoplazmę i substancje międzykomórkowe, na kolor od różowego do czerwono-pomarańczowego.

3.5.3. Znakowanie immunohistochemiczne

Przed wykonaniem znakowania immunofluorescencyjnego swoistymi przeciwciałami, odparafinowane i uwodnione skrawki tkanki mózgu myszy APPswe poddano procesowi odsłaniania antygeny poprzez inkubację z 10 mM buforem cytrynianu sodu (pH 6.0) z 0,05% Tween20, w trzech 5-minutowych sesjach ogrzewania w kuchenie mikrofalowej (600 V), oddzielone przez stopniowe chłodzenie najpierw w temperaturze pokojowej, a następnie na lodzie. Po ujawnieniu epitopów tkankę przemyto buforem fosforanowym z 0,3% Triton X-100 (PBS-TX) i umieszczono na 2 godziny w roztworze blokującym zawierającym 5% normalnej surowicy koziej i 1% BSA (ang. *Bovine Serum Albumin*) w PBS-TX. Następnie skrawki mózgu inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie przez 16 godzin w 4°C z jednym z następujących przeciwciał pierwszorzędowych: królicze anti-Iba1, mysie anti- β -amyloid (6E10), królicze anti-pTau(Thr231). Numery katalogowe i rozcieńczenia stosowanych przeciwciał pierwszo- i drugorzędowych umieszczono w **Tabelach 5 i 6**. Następnie skrawki tkanki przemywano PBS-TX (3 razy przez 5 minut) i inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym skoniugowanym z fluorochromem Alexa Fluor 594. Na koniec skrawki tkanki płukano, inkubowano przez 10 minut z roztworem Hoechst w PBS w rozcieńczeniu 1:100 w celu uwidocznienia jąder komórkowych, płukano ponownie PBS-TX i zatopiono w roztworze Mowiol 4-88 (przepis w **Tabeli 2**).

3.5.4. Analiza mikroskopowa stopnia stłuszczenia wątroby

Wzór znakowania skrawków wątroby metodą H&E analizowano przy użyciu mikroskopu świetlnego Nikon Eclipse Ni. Zdjęcia tkanki wątroby wykonano za pomocą programu NIS przy powiększeniu obiektywu x20. Analizę ilościową powierzchni stłuszczenia w wątrobie przeprowadzono przy użyciu oprogramowania ImageJ v.1.46 i Image Pro-Plus 7. Obrazy w rozszerzeniu .tif zebrane w skali szarości przekształcano na obrazy binarne z zastosowanym progiem (ang. *threshold*), wyznaczonym przez oprogramowanie poprzez oddzielenie obszaru stłuszczenia tkankowego od obszaru tkanki wątroby i obszaru światła naczyń. Obszar stłuszczenia tkanki wątroby był mierzony w różnych płatach wątroby oraz różnych częściach danego płata (minimum 3 obszary przypadające na płat) i następnie liczone średnią procentową powierzchnię stłuszczenia tkankowego (w μm^2) podzielonego przez powierzchnię całkowitą analizowanego fragmentu tkanki.

3.5.5. Analiza mikroskopowa powierzchni znakowania białka Iba1

Sygnal znakowania immunofluorescencyjnego skrawków mózgowych analizowano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse Ni. Zdjęcia tkanki mózgowej wykonano za pomocą oprogramowania Image Pro-Plus 7 i NIS przy powiększeniu obiektywu x20. Analizę ilościową obszaru barwienia Iba1 przeprowadzono przy użyciu oprogramowania ImageJ v.1.46 i Image Pro-Plus 7. Obrazy immunofluorescencji (.tif) w skali szarości przekształcano na obra-

zy binarne z zastosowanym progiem (ang. *threshold*), obliczonym przez oprogramowanie poprzez odcięcie tła autofluorescencji tkankowej i artefaktów niespecyficznych. Następnie, powierzchnia pozytywnie zabarwionego obszaru Iba1 była mierzona w różnych częściach i przekrojach hipokampa (CA1, CA2, CA3 i zakręt zębaty - DG) oraz kory śródwęchowej i została przedstawiona jako średnia procentowa powierzchnia dodatniego znakowania Iba1 (w μm^2) zawsze mierzona w równym obszarze tkanki hipokampa (ang. *region of interest*: ROI = 78525.65 μm^2). Przekroje tkanki mózgowej analizowano w kierunku przednio-tylnym (anterior-posterior AP) w zakresie koordynat stereotaktycznych dla hipokampa od -1,94 do -4,40 Bregma, a dla kory śródwęchowej od -2,46 do -3,40.

3.5.6. Analiza mikroskopowa znakowania H&E oraz białek 6E10, pTau(Thr231)

Wzór jakościowego znakowania skrawków mózgowych metodą H&E oraz znakowania immunofluorescencyjnego markerów 6E10 i pTau(Thr231) analizowano za pomocą mikroskopu świetlnego i fluorescencyjnego Nikon Eclipse Ni. Zdjęcia tkanki mózgowej wykonano za pomocą oprogramowania Image Pro-Plus 7 oraz NIS przy powiększeniu obiektywu x20 (Nikon, CFI Plan Aplanachromat Lambda, NA: 20x/0,50). Ocenę jakościową znakowania przeprowadzono w obszarach hipokampa (CA1, CA2, CA3 i zakręt zębaty - DG) oraz kory śródwęchowej w zakresie koordynat stereotaktycznych dla hipokampa od -1,94 do -4,40 Bregma, a dla kory śródwęchowej od -2,46 do -3,40.

3.6. Analiza ilościowa tkanki mózgowej za pomocą metody Western Blotting

Próbki tkanki mózgowej myszy poddano lizie schłodzonym na lodzie buforze RIPA uzupełnionym mieszaniną inhibitorów fosfataz i proteaz. Wydajną lizę osiągnięto przez pipetowanie w górę i w dół, przepuszczanie przez igłę o rozmiarze 27 i obracanie w 4°C przez 1,5 godziny. Po lizie próbki wirowano przy 14 000 RCF przez 15 minut w 4°C. Supernatanty zebrano, a stężenie białka zmierzono za pomocą testu Pierce BCA Protein Assay.

3.6.1. Przygotowanie lizatów tkankowych

Próbki do SDS-PAGE przygotowano poprzez rozcieńczenie lizatów wodą destylowaną i mieszaniną buforu Laemmli z β -merkaptanoolem do uzyskania stężenia białka w przedziale 15-30 μg na dołek w zależności od analizowanego markera. Mieszaninę buforu Laemmli z β -merkaptanoolem przygotowano zgodnie z zaleceniami producenta BioRad. Następnie tak przygotowane próbki poddawano denaturacji w 95°C przez 10 min.

3.6.2. Technika SDS-PAGE i Western blotting

W kolejnym kroku przygotowane białka rozdzielono metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym z dodecylsulfianem sodu (SDS-PAGE) na 10% żelach trycynowych lub glicynowych i przeniesiono na membrany z difluorku winylidenu (PVDF) o szerokości porów od 0,45 μm do 0,21 μm w zależności od rodzaju badanego białka, przy użyciu tradycyjnego transferu na mokro lub transferu półsuchego za pomocą systemu Trans-Blot Turbo System. Następnie membrany inkubowano przez 2 godziny w 5% roztworze albuminy surowicy bydlęcej (BSA) rozpuszczonej w soli fizjologicznej buforowanej Trisem uzupełnionej 0,1% Tween20 (TBS-T). Białka wykrywano metodą immunoblottingu ze specyficznymi

przeciwciałami pierwszo- oraz drugorzędowymi, których spis i informacja o zastosowanych rozcieńczeniach znajdują się w **Tabelach 5 i 6**. Przeciwciała pierwszorzędowe rozcieńczano w 5% roztworze BSA, a membrany inkubowano w nich przez 12 godzin w 4 °C. Przeciwciała drugorzędowe rozcieńczano w roztworze 3% mleka, a membrany inkubowano w nich przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Sygnał na membranach po immunoblottingu wywołano poprzez inkubację z roztworem Clarity ECL Western Blotting Substrate.

3.6.3. Analiza chemiluminescencji i densytometria

Sygnał reakcji immunoenzymatycznej uzyskano za pomocą chemiluminescencji w urządzeniu ChemiDocTMXRS+Imaging System z oprogramowaniem Image LabTM Software. Półilościową analizę intensywności sygnału prążków, odpowiadających względnej ilości białek, przeprowadzono metodą densytometryczną z użyciem oprogramowania ImageJ v.1.46 (Schneider i in., 2012) lub Image LabTM Software.

3.7. Statystyczna analiza danych

Analizę statystyczną przeprowadzono w programie GraphPad Prism 8. Dane z analiz biochemicznych, hematologicznych, immunohistochemicznych i Western blotting przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm odchylenie standardowe ($n =$ od 3 do 8). Po zbadaniu rozkładu normalnego testem Shapiro-Wilka oraz równości wariancji dobrano odpowiednie testy statystyczne. Istotność statystyczną określono przy użyciu niesparowanego testu t-Studenta, oraz jedno- i dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), a następnie post-hoc Bonferroniego. Wartość $p < 0,05$ uznano za z górny próg dla istotności statystycznej (na wykresach zaznaczone pogrubieniem czcionki), natomiast w wynikach uwzględniono także wartości p mieszczące się w przedziale $0,1 < p \leq 0,05$ oznaczone jako tendencja (na wykresach zaznaczone czcionką bez pogrubienia).

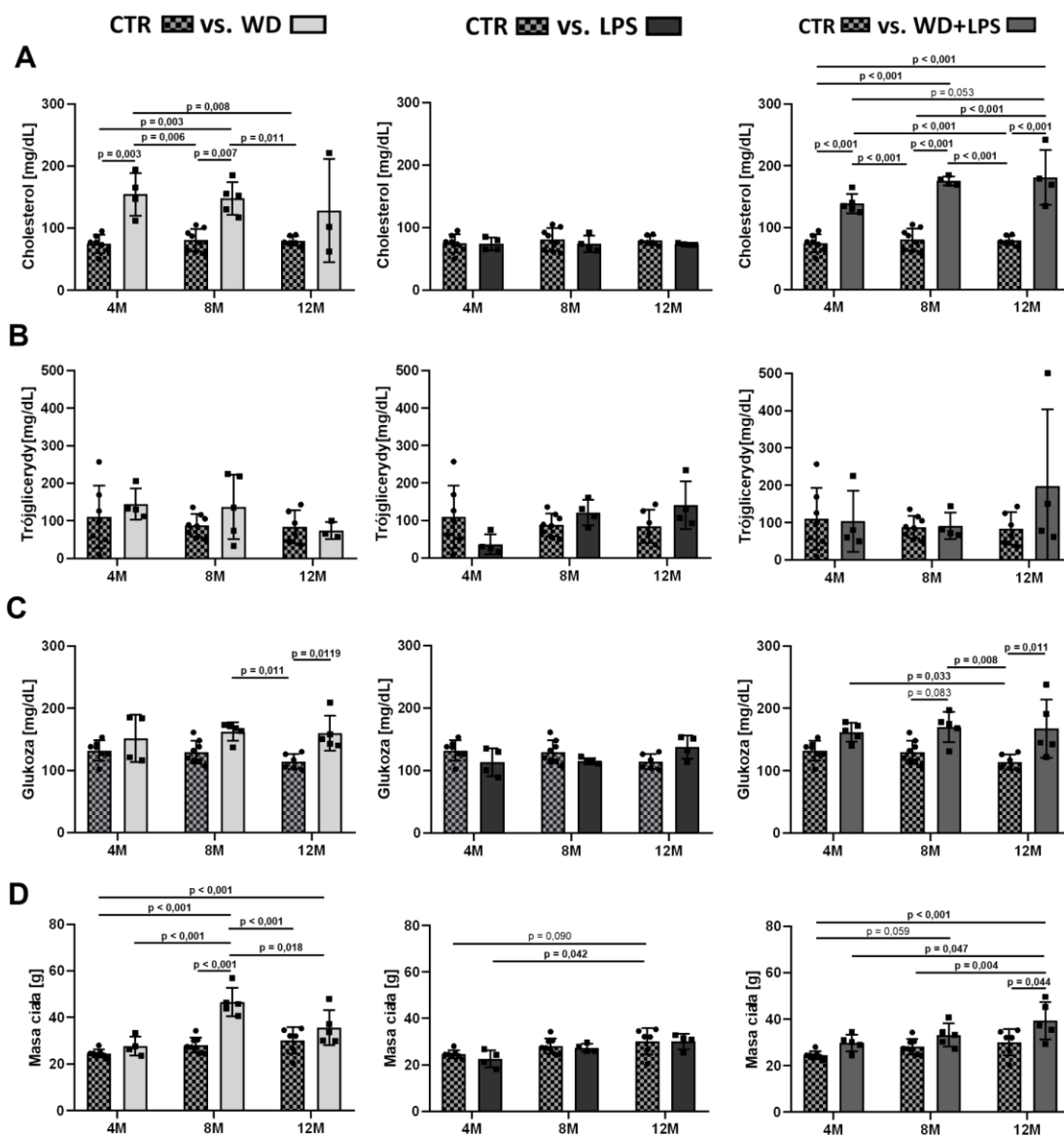
4. Wyniki

4.1. Grupy doświadczalne i sposób przedstawienia wyników

Jak opisano w rozdziale „Materiały i Metody”, w badaniu wykorzystano cztery grupy doświadczalne myszy: 1) CTR, 2) WD 3) LPS oraz 4) WD+LPS. Każda grupa zwierząt została przeanalizowana w 5 grupach wiekowych: 4M, 8M, 12M, 16M i 20M. Kontrolne myszy APPswe w wieku od 4M do 12M odpowiadały początkowym stadiom AD, przed pojawieniem się blaszek amyloidowych, a utworzone grupy wiekowe myszy APPswe (4, 8, 12, 16 i 20 miesięcy) odzwierciedlały następujące przedziały wiekowe u ludzi: odpowiednio 20, 35, 50, 65, 80 lat (Flurkey i in., 2007, zmodyfikowano dla modelu APPswe). W użytych modelu myszy APPswe zaobserwowano pojawienie się depozytów amyloidowych nieco później, niż wynika to z charakterystyki tego modelu przedstawionej przez hodowlę źródłową, to jest w wieku 16, a nie 12 miesięcy. W przedłożonym badaniu depozyty amyloidowe obserwowano w obu badanych strukturach mózgu myszy, w hipokampie jak i korze śródwęchowej. W niniejszej pracy przeanalizowano różne sposoby modelowania stanu zapalnego: WD – model chronicznego stanu zapalnego o niskim nasileniu wywołanego dietą zachodnią, LPS – model ogólnoustrojowego stanu zapalnego wywołanego poprzez dootrzewnową iniekcję lipopolisacharydu bakterii Gram (-), który w zastosowanym modelu doświadczalnym symuluje przebieg ostrej infekcji bakteryjnej w młodym wieku, oraz WD+LPS – model polegający na nałożeniu się na siebie dwóch typów stanów zapalnych wywołanych zarówno niezdrową dietą, jak i przebiegiem infekcji. Opisane trzy sposoby modelowania zostały porównane względem grupy kontrolnej – CTR, czyli karmionej zdrową, zbilansowaną dietą bez iniekcji LPS. W celu oceny wpływu wieku na analizowane procesy, opisane grupy doświadczalne badano w różnych punktach czasowych od podania przedstawionych czynników. Niestety ze względu na wysoką śmiertelność nie udało się utrzymać przy życiu wszystkich myszy w grupach eksperymentalnych 16M i 20M. Dlatego analizę ilościową badanych markerów przeprowadzono na myszach 4M, 8M i 12M we wszystkich grupach doświadczalnych: CTR, LPS, WD i WD+LPS. Dane z wybranych myszy z niepełnych grup wiekowych 16M i 20M przedstawiono jako wzbogacające informacje uzyskane z analiz jakościowych znakowania płytek amyloidu za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej i degeneracji neuronów za pomocą mikroskopii świetlnej.

4.2. Wpływ WD i LPS na rozwinięcie zespołu metabolicznego

W pierwszej kolejności przeanalizowano parametry metaboliczne u myszy APPswe pod wpływem badanych czynników WD oraz LPS. Jak pokazano na **Rycinie 11 A**, panele CTR vs. WD: 4M oraz CTR vs. WD+LPS: 4M, krótkotrwałe karmienie dietą zachodnią (3 tygodnie) wywołało hipercholesterolemię już u młodych, czteromiesięcznych myszy (4M) APPswe. Wysoki poziom cholesterolu utrzymywał się u myszy 8M i 12M karmionych WD, tj. po pięciu i dziewięciu miesiącach karmienia WD. W grupach myszy, które otrzymały LPS poziom cholesterolu nie uległ zmianie niezależnie od wieku (**Rycina 11 A**, panel CTR vs LPS). Analiza poziomu trójglicerydów w surowicy nie wykazała różnic bez względu na sposób traktowania myszy (**Rycina 11 B**, panele CTR vs. WD, CTR vs. LPS, CTR vs. WD+LPS). Stwierdzono natomiast wzrost stężenia glukozy w surowicy u myszy 8M i 12M karmionych WD, tj. po pięciu i dziewięciu miesiącach karmienia WD (**Rycina 11 C**, panele CTR vs. WD: 8M i 12M oraz CTR vs. WD+LPS: 8M i 12M), oraz brak różnic w stężeniu glukozy w surowicy w grupach myszy otrzymujących LPS (**Rycina 11 C**, panel CTR vs. LPS). Co więcej, dieta zachodnia wywołała otyłość u myszy 8M (**Rycina 11 D**, panele CTR vs. WD: 8M oraz CTR vs. WD+LPS: 8M), czego nie obserwowano w grupie z LPS (**Rycina 11 D**, panel CTR vs. LPS). Przyrost masy ciała pod wpływem WD utrzymywał się w grupie myszy w wieku 12M (**Rycina 11 D**, panele CTR vs. WD: 12M oraz CTR vs. WD+LPS: 12M). Natomiast zaobserwowano mniejsze różnice w średniej masie ciała pomiędzy grupami CTR vs. WD i CTR vs. WD+LPS w wieku spowodowane prawdopodobnie procesami związanymi ze starzeniem się badanych zwierząt. W grupie z LPS lekki przyrost masy ciała w 12M porównywany do 4M był związany z naturalnym procesem przyrostu masy ciała z wiekiem (**Rycina 11 D**, panele CTR vs. LPS, **Tabela 12**: CTR vs. LPS, masa ciała). Wyniki analizy ANOVA dwuczynnikowa dla analizowanych parametrów zostały przedstawione w **Tabeli 12**.



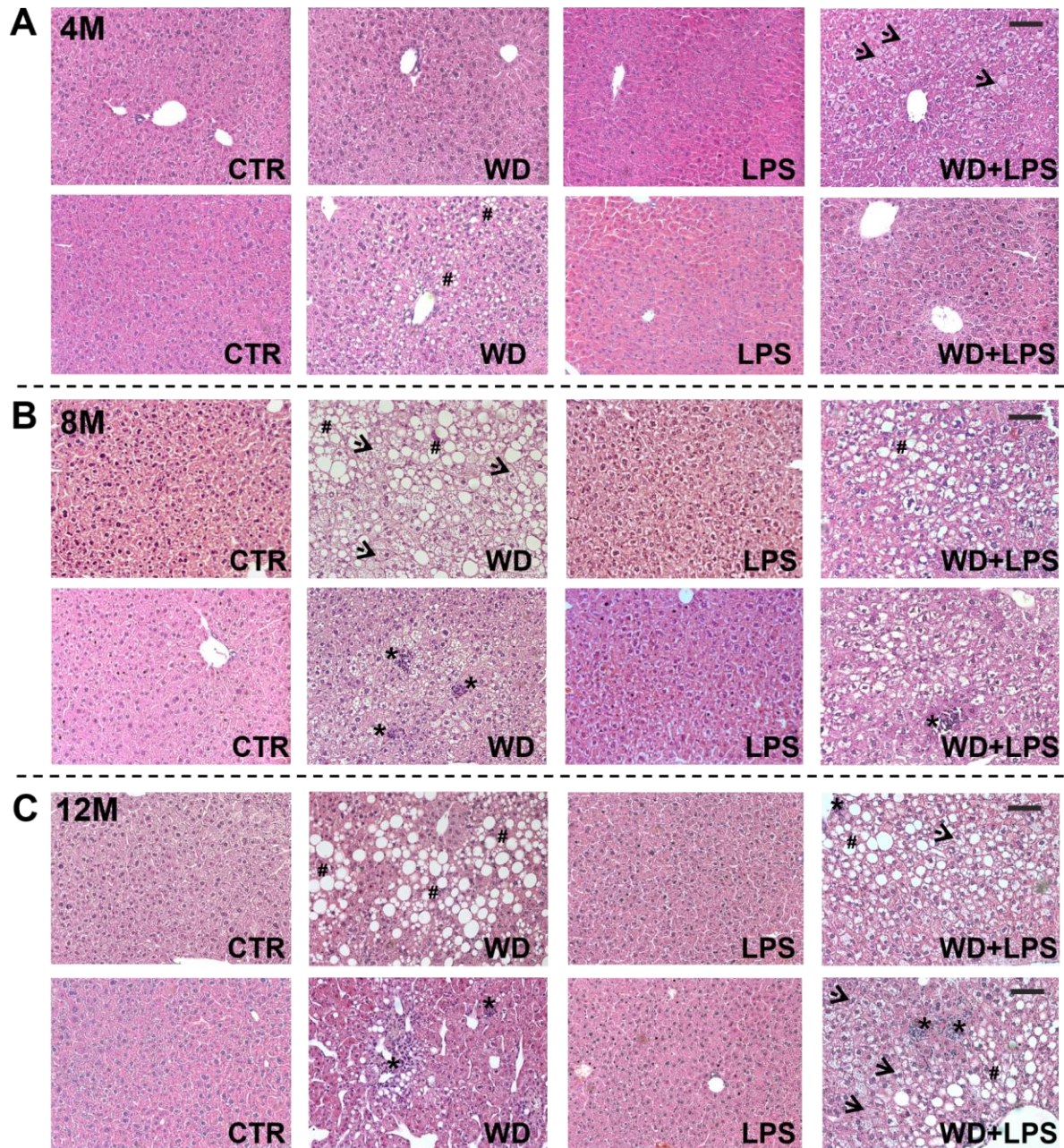
Rycina 11. Wpływ WD oraz dootrzewnowej iniekcji LPS na parametry krwi i przyrost masy ciała u myszy APPSwe w wieku 4, 8 i 12 miesięcy (4M, 8M, 12M) w grupach WD, LPS i WD+LPS w porównaniu do kontroli (CTR) bez iniekcji LPS utrzymywanych na diecie standardowej. Wykresy przedstawiają: **A)** stężenie cholesterolu, **B)** stężenie trójglicerydów, **C)** stężenie glukozy we krwi, oraz **D)** przyrost masy ciała myszy APPSwe. Dane liczbowe przedstawiono za pomocą średniej arytmetycznej \pm odchylenie standardowe (n = od 4 do 8 zwierząt na grupę doświadczalną; kropki i kwadraty przedstawiają wartości dla pojedynczych osobników). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego. Wartości $p < 0,05$ uznano za z górny próg dla istotności statystycznej (pogrubiona czcionka), natomiast wartości p mieszczące się w przedziale $0,1 < p \leq 0,05$ uznano jako tendencję (czcionka bez pogrubienia).

Tabela 12. Wyniki analizy ANOVA dwuczynnikowa, będące uzupełnieniem Ryciny 11.

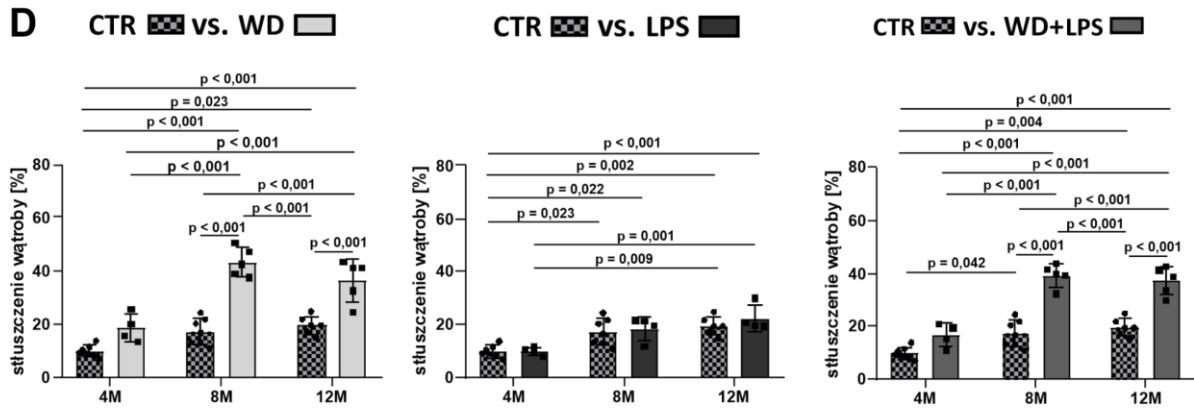
Parametr	CTR vs. WD			CTR vs. LPS			CTR vs. WD+LPS		
	wiek	WD	interakcja	wiek	LPS	interakcja	wiek	WD+LPS	interakcja
Cholesterol	NS	p < 0,001	NS	NS	NS	NS	NS	p < 0,001	NS
Trójglicerydy	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Glukoza	NS	p < 0,001	NS	NS	NS	p = 0,015	NS	p < 0,001	NS
Masa ciała	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,012	p = 0,001	NS	NS	p = 0,003	p < 0,001	NS

NS – brak istotnych różnic

Niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby (NAFLD) charakteryzuje się akumulacją tłuszczu w wątrobie i naciekaniami komórek odpornościowych do mięszu wątroby, co prowadzi do uwalniania cytokin pro-zapalnych. Narastające stłuszczenie hepatocytów oraz nasilający się stan zapalny powodują patologię charakterystyczną dla niealkoholowego stłuszczeniowego zapalenia, a w efekcie do zwłóknienia i marskości wątroby (NASH). Proces ten obserwuje się zarówno u ludzi (Friedman i in., 2018; Morsiani i in., 2019), jak i u myszy (Tojima i in., 2012; Liang i in., 2014). W niniejszej pracy znakowanie H&E wykazało normalne komórki wątrobowe, z których każda miała dobrze zdefiniowaną cytoplazmę, wyraźne jądro i dobrze wyprowadzoną żyłę centralną w wątrobach myszy kontrolnych (**Rycina 12**). Natomiast zaobserwowano, że już po trzech tygodniach karmienia u młodych, cztero-miesięcznych myszy (4M), dieta zachodnia spowodowała wyraźne odkładanie się kropli lipidowych i mikro-pęcherzykowe stłuszczenie obserwowane jako dyskretne okrągłe wakuole lipidowe w obrębie hepatocytów. Na tym etapie obserwowane wakuole nie zmieniały jeszcze kształtu komórek (**Rycina 12a A**, kropkowane strzałki), ale gdzieśgdzie były zasocjowane z hipertrofią hepatocytów (**Rycina 12a A**, strzałki), bez jeszcze widocznego procentowego wzrostu zawartości tłuszczu (**Rycina 12b D**, panel CTR vs. WD: 4M oraz CTR vs. WD+LPS: 4M). U starszych myszy (8M i 12M) długotrwałe karmienie dietą zachodnią skutkowało drastyczną progresją uszkodzenia wątroby manifestując się głównie jako wakuolizacja mikropęcherzykowa w obrębie cytoplazmy hepatocytów powodując drastyczne zwiększenie ciała komórkowego (**Rycina 12b B i C**, strzałki) oraz makropęcherzykowe stłuszczenie powodujące całkowite zniszczenie hepatocytów (**Rycina 12a B i C**, #). Ponadto, WD wywołała zapalenie zrazików wątrobowych, ujawnione jako silne nacieki komórek zapalnych (**Rycina 12a B i C**, *), wskazując na rozwój NASH. Opisanym zmianom morfologicznym hepatocytów u myszy w grupach 8M i 12M towarzyszył drastyczny wzrost procentowej zawartości tłuszczu w wątrobie (**Rycina 12b D**, panel CTR vs. WD: 8M i 12M oraz CTR vs. WD+LPS: 8M i 12M). Wyniki te pokazują indukowany dietą zachodnią rozwój rozległego stłuszczenia wątroby z głęboką degradacją hepatocytów, charakterystyczną dla późnych etapów ciężkiej NAFLD i NASH (Lindenmeyer i McCullough, 2018). Uszkodzenie wątroby narastało stopniowo w miarę karmienia dietą WD i w sposób zależny od WD, co obserwowano od 4 miesiąca życia myszy, zarówno w grupach WD, jak i WD+LPS. U myszy, które otrzymały LPS nie obserwowano uszkodzenia wątroby w odniesieniu do analizowanych parametrów (**Tabela 13**). W wątrobach zwierząt z iniekcją LPS, zaobserwowano natomiast lekki wzrost procentowy stłuszczenia wątroby z wiekiem, nie odbiegający od wyników uzyskanych w grupach zwierząt kontrolnych (CTR) karmionych dietą standardową (**Rycina 12b D**: panel CTR vs. LPS; **Tabela 13**).



Rycina 12a. Wpływ WD i iniekcji LPS na rozwój niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (NAFLD) i niealkoholowego stłuszczeniowego zapalenia wątroby (NASH) w grupach myszy APPswe: (A) czteromiesięcznych (4M); (B) ośmiomiesięcznych (8M) i (C) dwunastomiesięcznych (12M); barwienia H&E; skala = 50 μ m; powiększenie: x20; strzałki kropkowane - stłuszczenie mikropęcherzykowe (dyskretne okrągłe wakuole lipidowe w obrębie hepatocytów), strzałki - hepatocyty przerostowe, # - balonowanie komórek wątrobowych i stłuszczenie makropęcherzykowe, * - zapalenie zrazikowe.

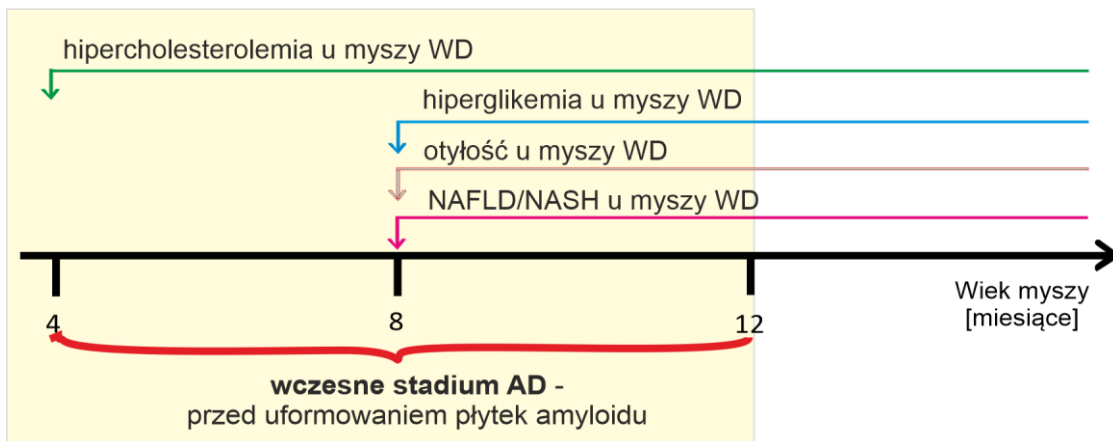


Rycina 12b. Wpływ WD i iniekcji LPS na niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (NAFLD) i niealkoholowego stłuszczeniowego zapalenia wątroby (NASH) w grupach myszy APPswe: **(D)** Wpływ WD i iniekcji LPS na procentową zawartości tłuszczu w wątrobie myszy APPswe w grupach WD, LPS, WD+LPS w wieku 4, 8 i 12 miesięcy (4M, 8M, 12M) w porównaniu do kontroli (CTR) bez iniekcji LPS utrzymywanych na diecie standardowej. Dane liczbowe przedstawiono za pomocą średniej arytmetycznej \pm odchylenie standardowe (n = od 4 do 8 zwierząt na grupę doświadczalną; kropki i kwadraty przedstawiają wartości dla pojedynczych osobników). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego. Wartości $p < 0,05$ uznano za z górny próg dla istotności statystycznej (pogrubiona czcionka), natomiast wartości p mieszczące się w przedziale $0,1 < p \leq 0,05$ uznano jako tendencję (czcionka bez pogrubienia).

Tabela 13. Wyniki analizy ANOVA dwuczynnikowa, będące uzupełnieniem Ryciny 12.

Parametr	CTR vs. WD			CTR vs. LPS			CTR vs. WD+LPS		
	wiek	WD	interakcja	wiek	LPS	interakcja	wiek	WD+LPS	interakcja
Stłuszczenie wątroby	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p = 0,002$	$p < 0,001$	NS	NS	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$

NS – brak istotnych różnic



Rycina 13. Chronologia występowania zaburzeń metabolicznych pod wpływem diety zachodniej (WD), skutkujących rozwinięciem zespołu metabolicznego.

Analiza biochemiczna krwi wykazała, że dieta WD, w przeciwieństwie do LPS przyczyniła się do wywołania zespołu metabolicznego u myszy APPswe. Zaobserwowano silną indukcję hipercholesterolemii, już po trzech tygodniach WD, oraz indukcję hiperglikemii, otyłości i NAFLD/NASH po pięciu miesiącach WD (**Rycina 13**).

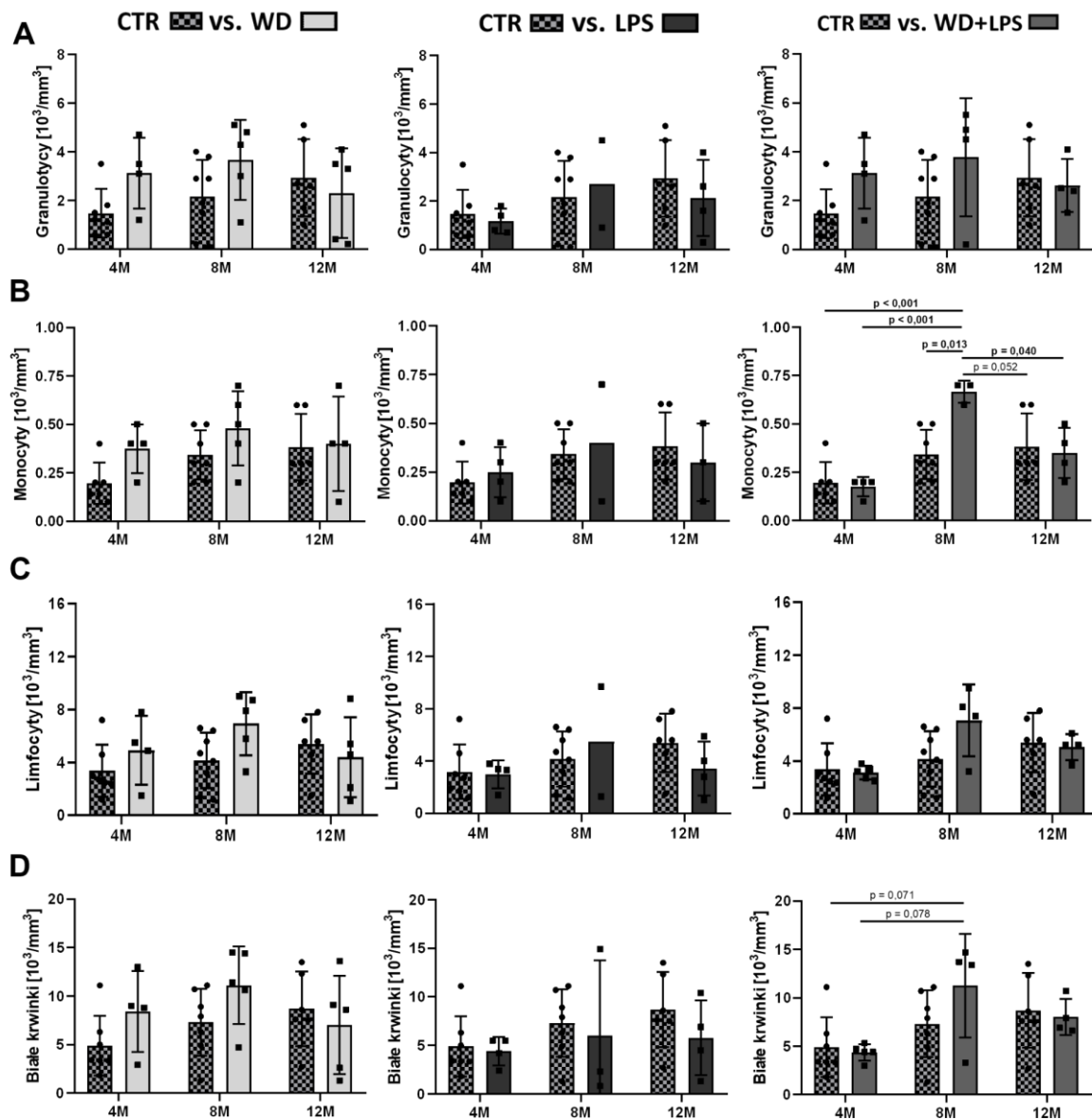
4.3. Wpływ WD i LPS na rozwinięcie ogólnoustrojowego stanu zapalnego

W celu oceny, czy markery stanu zapalnego wywołanego dietą WD w tkankach narządów obwodowych mają swoje odzwierciedlenie we krwi krążącej, przeprowadziliśmy analizę hematologiczną krwi. Wrodzony układ odpornościowy jest pierwszą linią obrony przed początkowymi wyzwaniami środowiska i jest aktywowany znacznie szybciej niż adaptacyjny układ odpornościowy, który rozwija się w miarę kontaktu organizmu z czynnikami niepożądanymi. Komórki krwi wchodzące w skład układu odpornościowego to białe krwinki, inaczej leukocyty, które dzielą się na następujące populacje: granulocyty (neutrofile, bazofile i eozynofile), monocyty oraz limfocyty. Granulocyty stanowią 60-70% leukocytów krwi, a ponad 90% granulocytów to neutrofile, stanowiące największą frakcję białych krwinek. Neutrofile są zwykle pierwszymi komórkami odpornościowymi, które odpowiadają na zapalenie i mogą zaostrzyć przewlekły stan zapalny, pomagając w rekrutacji makrofagów i wchodząc w interakcje z komórkami prezentującymi antygen (Talukdar i in., 2012). Zgodnie z tymi danymi zaobserwowaliśmy, że już 3 tygodnie karmienia dietą WD spowodowały pewną tendencję wzrostową stężenia granulocytów we krwi u myszy 4M w grupach WD i WD+LPS (**Rycina 14 A**, panel CTR vs. WD: 4M oraz CTR vs. WD+LPS: 4M; **Tabela 14**). Ten sam trend wzrostowy poziomów granulocytów utrzymywał się po 5 miesiącach karmienia WD zarówno w grupach WD, jak i WD+LPS (**Rycina 14 A**, panel CTR vs. WD: 8M oraz CTR vs. WD+LPS: 8M; **Tabela 14**). Podobnie, 3 tygodnie stosowania WD wywołały nieistotny wzrost stężenia monocytów we krwi, (**Rycina 4W B**, panele CTR vs. WD: 4M; **Tabela 14**). Wzrost ten utrzymywał się u myszy 8M z WD (**Rycina 14 B**, panel CTR vs. WD: 8M; **Tabela 14**). W przypadku grupy z podwójnym traktowaniem WD+LPS zaobserwowano istotny wzrost poziomu monocytów w grupie wiekowej 8M po czym w wieku 12M poziom ten ulegał normalizacji (**Rycina 14 B**, panel CTR vs. WD+LPS: 8M i 12M). Zaobserwowano również tendencję do wzrostu stężenia limfocytów we krwi (**Rycina 14 C**, panele CTR vs. WD: 8M oraz CTR vs. WD+LPS: 8M; **Tabela 14**), co sugeruje, że dieta WD wywołała aktywację adaptacyjnego układu odpornościowego. Wzrost całkowitego stężenia białych krwinek we krwi, obejmującego różne subpopulacje komórek pojawił się głównie u myszy 8M, w grupach WD i WD+LPS (**Rycina 14 C**, panel CTR vs. WD: 8M oraz CTR vs. WD+LPS: 8M; **Tabela 14**), natomiast zmiany te nie były statystycznie istotne. Z kolei u myszy 12M zaobserwowano stopniowy powrót do prawidłowego stężenia wszystkich analizowanych populacji białych krwinek (granulocytów, monocytów, limfocytów) (**Rycina 14**, panele CTR vs. WD: 12M A, B, C, D oraz CTR vs. WD+LPS: 12M A, B, C, D). W świetle pokazanych wcześniej obwodowych zaburzeń metabolicznych wywołanych przez WD (**Rycina 12**), ta redukcja mogła być wywołana infiltracją komórek odpornościowych do tkanki tłuszczowej, wątroby i mózgu, gdzie komórki odpornościowe wydzielają szereg cytokin prozapalnych i chemokin, w celu przywrócenia homeostazy (Liu i in., 2020; Xu i in., 2014; Shukla i in., 2019). Natomiast analiza grup z dootrzewnową iniekcją LPS nie wykazała żadnych różnic ani tendencji w stężeniu analizowanych populacji białych krwinek (**Rycina 14**, panele CTR vs. LPS A, B, C, D) co świadczy, że ostry stan zapalny wywołany poprzez dootrzewnową iniekcję LPS daje silną, ale krótkotrwałą reakcję komórek immunokompetentnych bezpośrednio po podaniu czynnika infekcyjnego, a następnie dość szybko komórki układu odpornościowego prowadzą do redukcji tej reakcji w celu obrony przed jej negatywnymi konsekwencjami. Otrzymane dane wskazują, że dieta WD jako chroniczny

Wyniki

czynnik prozapalny o niskim nasileniu wywołuje długotrwałą reakcję układu odpornościowego, czego nie obserwuje się w wyniku kontaktu z bakteryjnym czynnikiem infekcyjnym.

W przeciwieństwie do parametrów leukocytów (**Rycina 14**), analiza podstawowych parametrów erytrocytów jak liczba krwinek czerwonych, wskaźnik anizocytozy i średnia objętość komórek nie wykazała zmian pomiędzy badanymi grupami (dane nie pokazane).

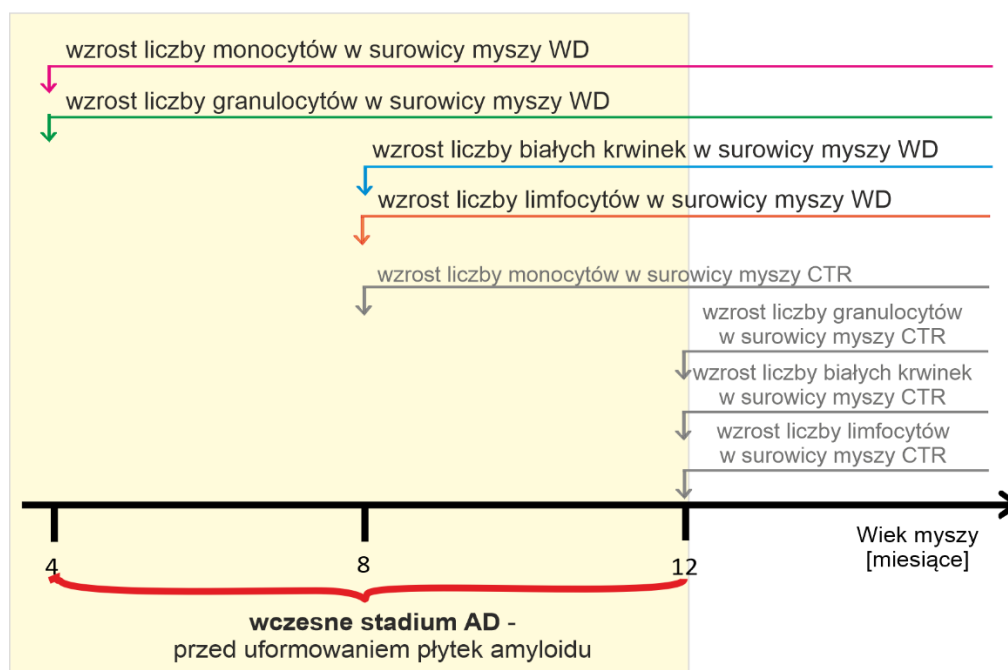


Rycina 14. Wpływ WD oraz iniekcji LPS na rozwinięcie i utrzymywanie się ogólnoustrojowego stanu zapalnego o niskim nasileniu u myszy APPswe w wieku 4, 8 i 12 miesięcy (4M, 8M, 12M) w grupach WD, LPS i WD+LPS w porównaniu do kontroli bez iniekcji LPS utrzymywanych na diecie standardowej CTR. Wykresy przedstawiają stężenie: (A) granulocytów (B) monocytów, (C) limfocytów i (D) łącznie wszystkich białych krwinek. Wszystkie dane przedstawione zostały za pomocą średniej arytmetycznej \pm odchylenie standardowe ($n =$ od 3 do 8 zwierząt na grupę doświadczalną z wyjątkiem grup 8M LPS, gdzie średnie obliczono na podstawie $n = 2$, a wartości te nie zostały uwzględnione w analizie statystycznej; kropki i kwadraty przedstawiają wartości dla pojedynczych osobników). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego. Wartości $p < 0,05$ uznano za z górny próg dla istotności statystycznej (pogrubiona czcionka), natomiast wartości p mieszczące się w przedziale $0,1 < p \leq 0,05$ uznano jako tendencję (czcionka bez pogrubienia).

Tabela 14. Wyniki analizy ANOVA dwuczynnikowa, będące uzupełnieniem **Ryciny 14**.

Parametr	CTR vs. WD			CTR vs. LPS			CTR vs. WD+LPS		
	wiek	WD	interakcja	wiek	LPS	interakcja	wiek	WD+LPS	interakcja
Białe krwinki	NS	NS	NS	brak	brak	brak	p = 0,007	NS	NS
Granulocyty	NS	NS	NS	brak	brak	brak	NS	NS	NS
Monocyty	NS	p = 0,069	NS	brak	brak	brak	p < 0,001	NS	p = 0,008
Limfocyty	NS	NS	NS	NS	NS	NS	p = 0,016	NS	NS

NS – brak istotnych różnic

**Rycina 15.** Chronologia zmian poziomów parametrów hematologicznych indukowanych dietą zachodnią u myszy APPsw skutkujących rozwinięciem ogólnoustrojowego stanu zapalnego o niskim nasileniu. CTR - myszy kontrolne karmione dieta standardową. Na szaro zaznaczono kolejność procesów przebiegających w CTR.

Podsumowując, analiza hematologiczna krwi wykazała nieistotny wzrost poziomu białych krwinek, zwłaszcza granulocytów i monocytów, już po 3 tygodniach karmienia myszy dietą WD. Zmian takich nie zauważono w grupach traktowanych przy użyciu LPS. Wzrost poziomu limfocytów zaobserwowano po pięciu miesiącach stosowania diety WD (**Rycina 15**). Tendencje do wzrostu obserwowane w poszczególnych populacjach białych krwinek nie mogą być ignorowane pomimo braku istotności statystycznej, ale powinny być oceniane w kontekście procesów zapalnych wykrywanych w tkankach metabolicznych, gdzie następuje naciek leukocytów pod wpływem zmian metabolicznych co ma miejsce np. w wątrobie czy tkance tłuszczowej. Ponadto, biorąc pod uwagę fakt, że nie ma jednoznacznych kryteriów definiujących zapalenie ogólnoustrojowe o niskim stopniu nasilenia, jego wykrycie nie może opierać się jedynie na istotnych różnicach w parametrach morfologii krwi, ale powinno uwzględniać również przesunięcia analizowanych parametrów do górnych granic norm, co wykazano w tym badaniu. Biorąc to pod uwagę, wywołane przez WD tendencje do podwyższonego poziomu leukocytów w kontekście współwystępowania z hipercholesterolemią, hiperglikemią, otyłością czy NAFLD/NASH, przemawiają za stwierdzeniem wywołanego przez WD chronicznego zapalenia ogólnoustrojowego o niskim nasileniu.

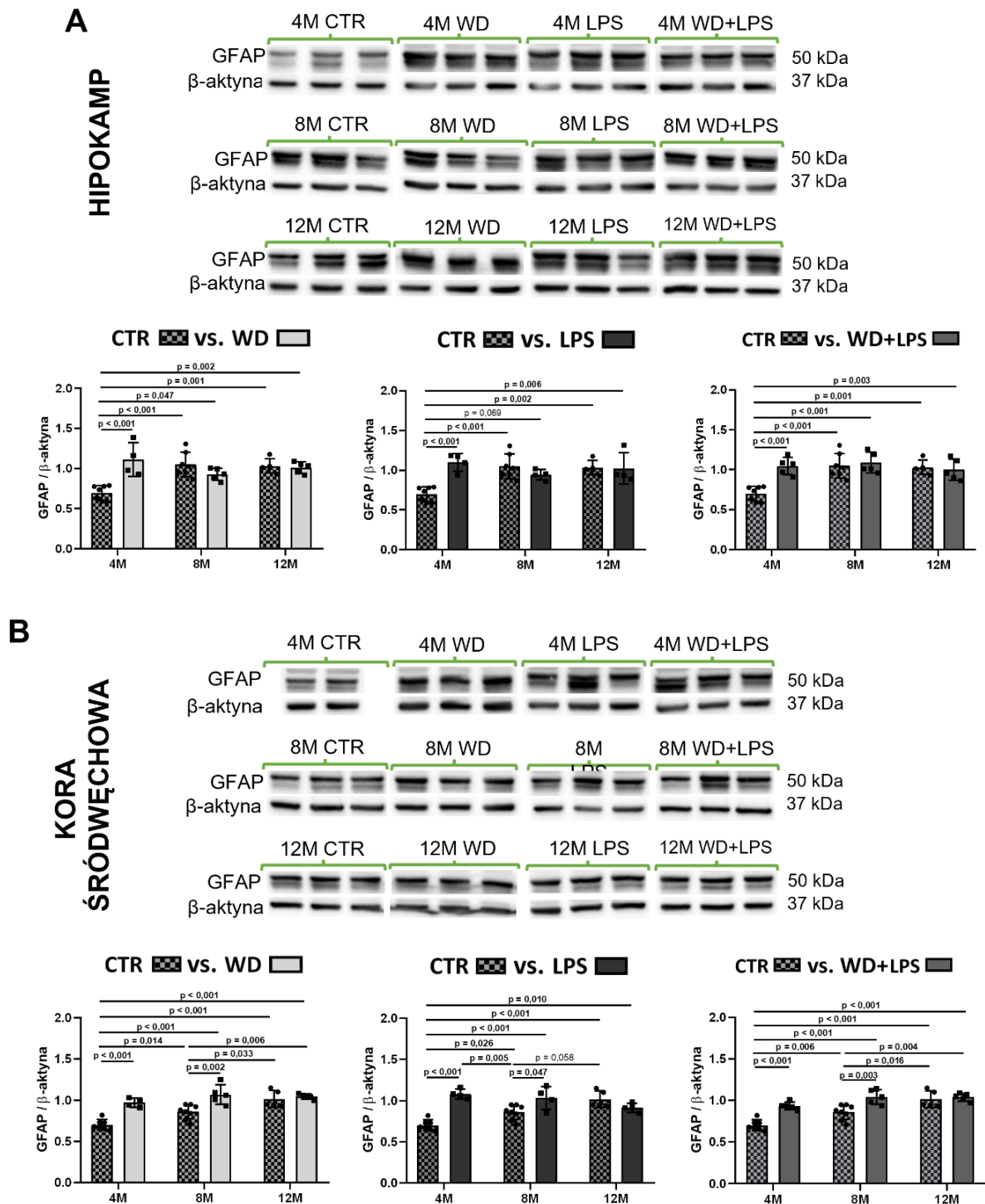
4.4. Wpływ WD i LPS na aktywację komórek astrogleju i mikrogleju

4.4.1. Aktywacja astrocytów

Trzy tygodnie karmienia dietą zachodnią skutkowało aktywacją komórek astrogleju zarówno w regionie hipokampa, jak i kory śródwęchowej, co ujawniło się poprzez zwiększony poziom markera astrocytów - glejowego białka fibrylarnego (GFAP) (**Rycina 16 A i B**, panele CTR vs WD: 4M oraz WD+LPS: 4M, **Tabela 15**).

W hipokampie poziom GFAP był najwyższy u młodych, czteromiesięcznych myszy karmionych WD (**Rycina 16 A**, panel CTR vs. WD: 4M). Poziom ten był porównywalny z poziomem indukowanym przez mutację APP u starszych myszy, tj. myszy kontrolnych w wieku 8M i 12M. Oznacza to, że pod wpływem WD nastąpiło przyśpieszenie aktywacji astrocytów o 4 miesiące. Ponadto dane z analizy metodą Western blotting przedstawione na **Rycinie 16**, nie wykazały różnic między grupami eksperymentalnymi, a kontrolnymi w poziomie GFAP w tkance hipokampa u myszy 8M i 12M. Sugeruje to, że aktywowany astroglej u myszy 8M i 12M osiągnął stały poziom i przeszedł w stan adaptacyjny (**Rycina 16 A**, panel CTR vs. WD: 8M i 12M). Zwiększony poziom GFAP obserwowano również w hipokampie czteromiesięcznych myszy APP^{sw} 3 tygodnie po iniekcji LPS. Znakowanie GFAP następnie także osiągnęło stały poziom, podobnie jest u myszy karmionych WD (**Rycina 16 A i B**, panele CTR vs. LPS: 4M, 8M, 12M).

Podobnie w korze śródwęchowej pod wpływem WD poziom GFAP wzrastał u młodych czteromiesięcznych myszy (**Rycina 16 B**, panel CTR vs. WD: 4M, **Tabela 15**). Poziom ten był porównywalny z poziomem indukowanym przez mutację APP u 8M myszy kontrolnych, natomiast w tej strukturze pod wpływem transgeny i wieku (grupy CTR) poziom GFAP rósł nieco wolniej niż w hipokampie. Pod wpływem LPS wzrost GFAP u czteromiesięcznych myszy był silniejszy w porównaniu do 8M CTR i osiągnął poziom porównywalny do poziomu w grupie 12M CTR (**Rycina 16 B**, panel CTR vs. LPS: 4M, 8M, 12M).

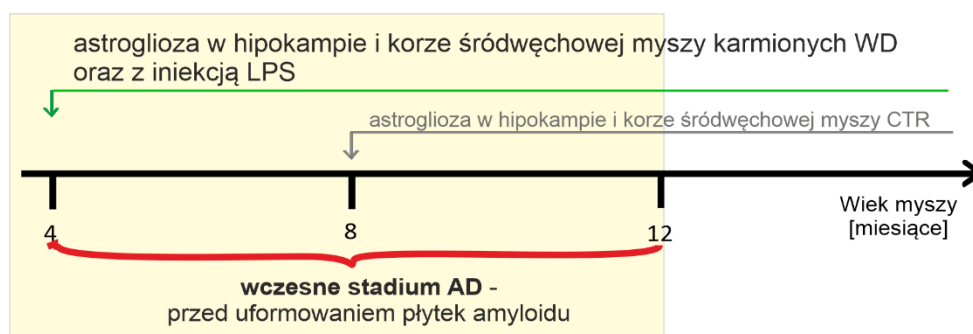


Rycina 16. Wpływ WD oraz iniekcji LPS na poziom markera astrocytów – białka GFAP wykrytego metodą immunoblottingu w tkance mózgu z obszarów: (A) hipokampa oraz (B) kory śródwęchowej myszy APPswe z grup WD, LPS i WD+LPS w wieku 4, 8 i 12 miesięcy (4M, 8M, 12M) w porównaniu do kontroli (CTR) bez iniekcji LPS utrzymywanych na diecie standardowej. Dane liczbowe przedstawiono za pomocą za pomocą średniej arytmetycznej GFAP/aktyna \pm odchylenie standardowe (n = od 4 do 8 zwierząt na grupę doświadczalną; kropki i kwadraty przedstawiają wartości dla pojedynczych osobników). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego. Wartości $p < 0,05$ uznano za z górny próg dla istotności statystycznej (pogrubiona czcionka), natomiast wartości p mieszczące się w przedziale $0,1 < p \leq 0,05$ uznano jako tendencję (czcionka bez pogrubienia).

Tabela 15. Wyniki analizy ANOVA dwuczynnikowa, będące uzupełnieniem **Ryciny 16**.

GFAP	CTR vs. WD			CTR vs. LPS			CTR vs. WD+LPS		
	wiek	WD	interakcja	wiek	LPS	interakcja	wiek	WD+LPS	interakcja
Struktura mózgu									
Hipokamp	NS	p = 0,045	p < 0,001	p = 0,081	p = 0,054	p < 0,001	p = 0,002	p = 0,009	p = 0,002
Kora śródwęchowa	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,008	NS	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,009

NS – brak istotnych różnic

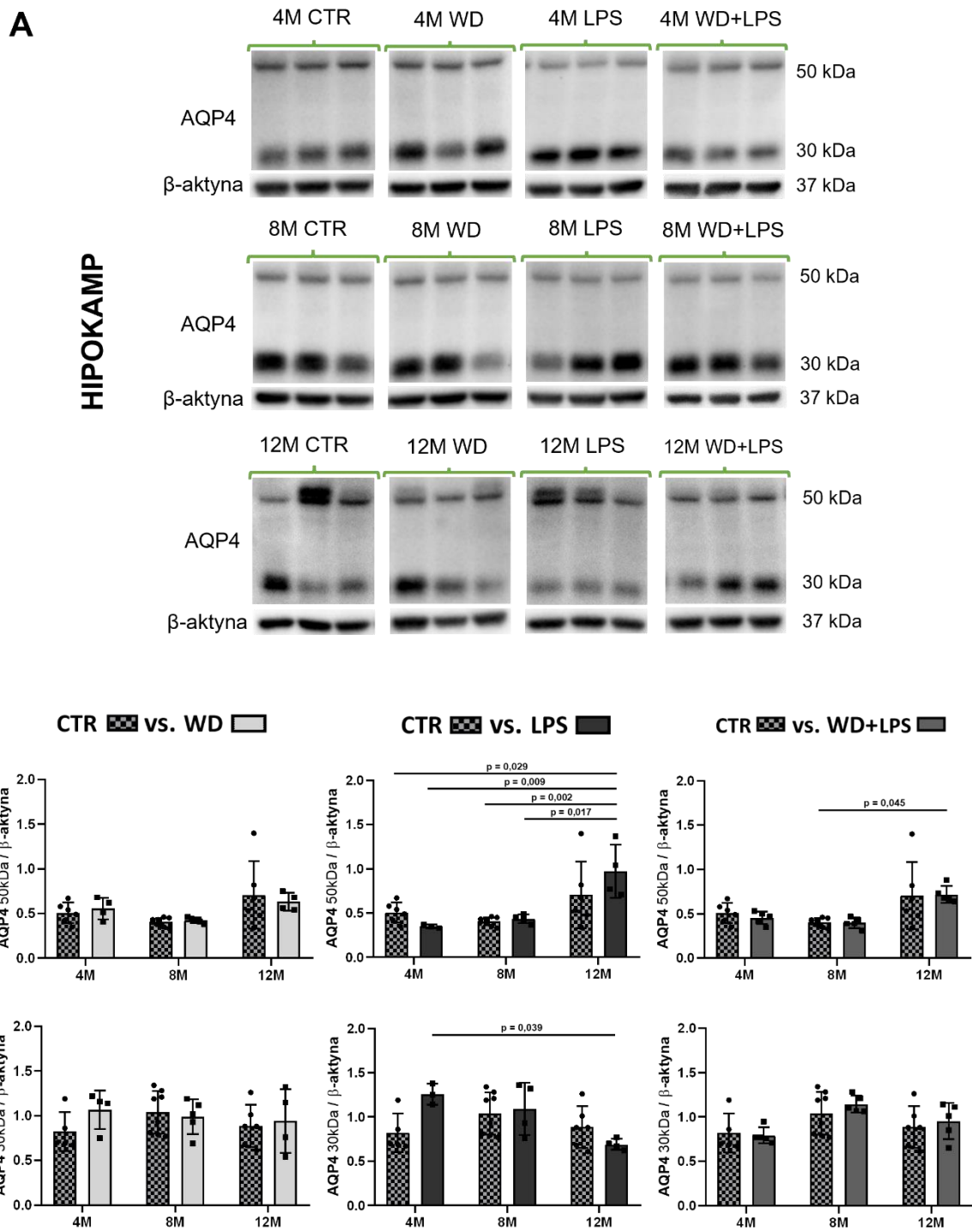
**Rycina 17.** Schemat przedstawiający przyspieszenie aktywacji astrocytów pod wpływem zastosowanych czynników (WD i LPS) w hipokampie i korze śródwęchowej myszy APPswe. CTR - myszy kontrolne APPswe karmione dietą standardową bez iniekcji LPS. Na szaro zaznaczono kolejność procesów, przebiegających w CTR.

Podsumowując, krótkotrwałe karmienie dietą WD spowodowało reakcję komórek astrogleju na poziomie porównywalnym do reakcji na bakteryjny czynnik infekcyjny LPS. Otrzymane wyniki sugerują, że zarówno WD jak i LPS, który jest dobrze scharakteryzowanym czynnikiem wywołującym w mózgu stan zapalny o wysokim nasileniu, działają porównywalnie w zakresie aktywacji astrocytów, przyspieszając w ten sposób postępujący proces neurozapalenia w obu badanych strukturach mózgu w zastosowanym modelu APPswe (**Rycina 17**).

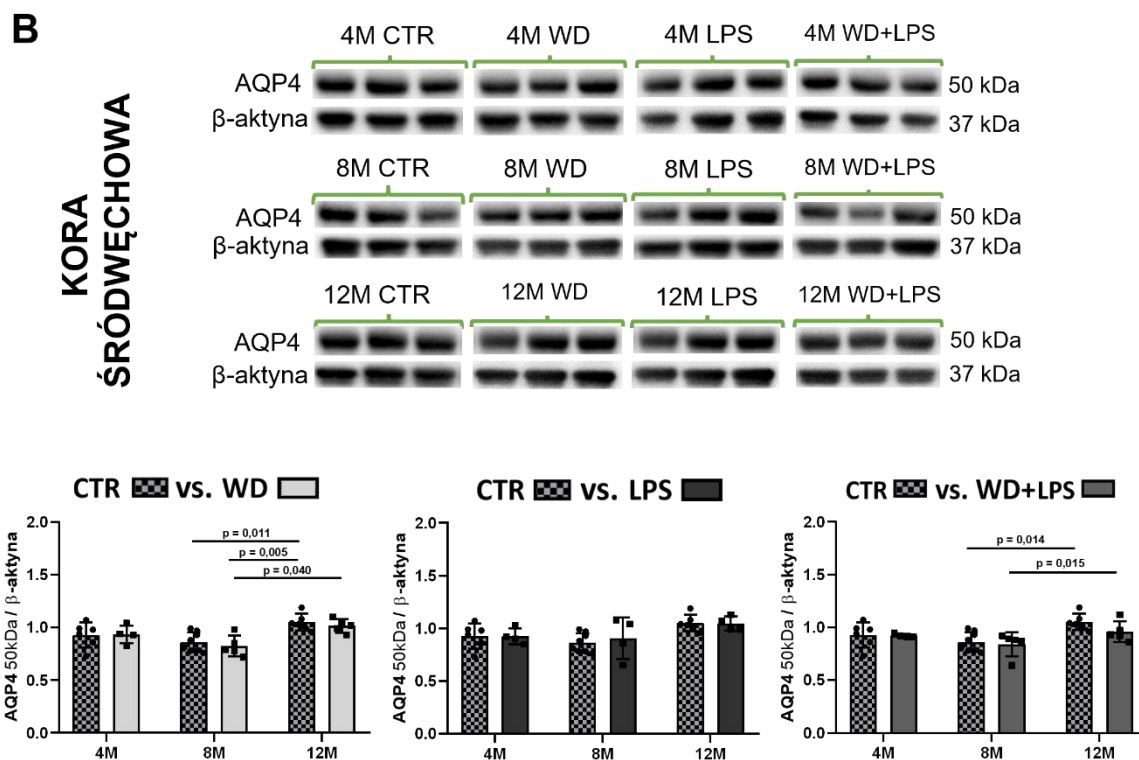
4.4.2. Zmiana sposobu proteolizy izoform białka akwaporyny-4

Ze względu na brak układu limfatycznego, ośrodkowy układ nerwowy wymaga alternatywnych systemów oczyszczania, który wspomaga *klirens* śródmiąższowych substancji rozpuszczonych. Dzieje się to przy pomocy układu glimfatycznego (Silva i in., 2021). Kanały wodne akwaporyny-4 (AQP4) są integralną częścią tego systemu i są związane z występowaniem wielu neuropatologii, jak np. AD. *Klirens* takich białek jak amyloid- β czy tau, jest zmniejszony przez upośledzenie wydajności pracy układu glimfatycznego z powodu np. braku AQP4, czy zaburzeń lokalizacji tego białka, czy poziomu lub dostępności izoform. AQP4 o masie cząsteczkowej 30 kDa i strukturze tetrameru jest najpowszechniej występującym kanałem wodnym w mózgu. Białko to działa jako selektywny przepuszczalny kanał wodny, przyczyniając się do homeostazy jonowej i osmotycznej poprzez ułatwienie dyfuzji wody przez mózg (Silva et al., 2021).

Analiza białka AQP4 za pomocą techniki Western blotting wykazała zależne od struktury mózgu występowanie izoform AQP4 o różnych wielkościach (**Rycina 18 A i B**). W hipokampie wykazano obecność dwóch izoform tego białka o wielkości 50 i 30 kDa, z czego prążek o wielkości 30 kDa był prążkiem dominującym (**Rycina 18a A**). W korze śródwęchowej obecna była tylko forma o wielkości 50 kDa (**Rycina 18b B**). Analiza wykazała też, że na fluktuacje poziomów izoform 30 i 50 kDa w hipokampie w grupach utrzymywanych na diecie zachodniej wpływa dodatkowo czynnik wieku (**Rycina 18a A**, panel CTR vs. WD oraz CTR vs. WD+LPS, **Tabela 16**). Natomiast w grupie myszy poddanej serii iniekcji LPS wykazano istotny wzrost poziomu izoformy 50 kDa przy równoczesnym spadku poziomu izoformy 30 kDa w wieku 12 miesięcy (**Rycina 18a A**, panel CTR vs. LPS). Natomiast, w korze śródwęchowej na fluktuacje poziomów 50 kDa wpływał tylko czynnik wieku, we wszystkich grupach eksperymentalnych (**Rycina 18b B**, panel CTR vs. WD, CTR vs. LPS oraz CTR vs. WD+LPS, **Tabela 16**).



Rycina 18a. Wykresy przedstawiają średnie poziomy AQP4 wykryte metodą immunoblottingu w tkance mózgu w obszarach: (A) hipokampa u myszy APPswe z grup WD, LPS, i WD+LPS w porównaniu do CTR, w wieku 4, 8 i 12 miesięcy (4M, 8M, 12M). A) w hipokampie wykazano, obecność dwóch izoform AQP4 o wielkości 50 i 30 kDa. Dane liczbowe przedstawiono za pomocą za pomocą średniej arytmetycznej ± odchylenie standardowe (n = od 3 do 8 zwierząt na grupę doświadczalną; kropki i kwadraty przedstawiają wartości dla pojedynczych osobników). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy ANOVA z testem post-hoc Bonferroni. Wartości $p < 0,05$ uznano za z górny próg dla istotności statystycznej (pogrubiona czcionka), natomiast wartości p mieszczące się w przedziale $0,1 < p \leq 0,05$ uznano jako tendencję (czcionka bez pogrubienia).



Rycina 18b. Wykresy przedstawiają średnie poziomy AQP4 wykryte metodą immunoblottingu w tkance mózgu w obszarach: **B)** kory śródwęchowej u myszy APPswe z grup WD, LPS, i WD+LPS w porównaniu do CTR, w wieku 4, 8 i 12 miesięcy (4M, 8M, 12M). **B)** w korze śródwęchowej wykazano obecność prążka o wielkości 50 kDa. Dane liczbowe przedstawiono za pomocą za pomocą średniej arytmetycznej \pm odchylenie standardowe (n = od 3 do 8 zwierząt na grupę doświadczalną; kropki i kwadraty przedstawiają wartości dla pojedynczych osobników). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego. Wartości $p < 0,05$ uznano za z górny próg dla istotności statystycznej (pogrubiona czcionka), natomiast wartości p mieszczące się w przedziale $0,1 < p \leq 0,05$ uznano jako tendencję (czcionka bez pogrubienia).

Tabela 16. Wyniki analizy ANOVA dwuczynnikowa, będące uzupełnieniem **Ryciny 18.**

AQP4	CTR vs. WD			CTR vs. LPS			CTR vs. WD+LPS		
	wiek	WD	interakcja	wiek	LPS	interakcja	wiek	WD+LPS	interakcja
Struktura mózgu									
Hipokamp (50kDa)	$p < 0,010$	NS	NS	$p < 0,001$	NS	$p = 0,012$	$p < 0,001$	NS	NS
Hipokamp (30kDa)	$p < 0,020$	NS	NS	$p = 0,022$	NS	$p = 0,027$	$p = 0,005$	NS	NS
Kora śródwęchowa (50kDa)	$p < 0,001$	NS	NS	$p = 0,007$	NS	NS	$p = 0,002$	NS	NS

NS – brak istotnych różnic

4.4.3. Aktywacja mikrogleju, napływ obwodowych makrofagów oraz zaburzenie zdolności fagocytozy

Tkankę mózgu myszy APP^{sw}e poddano analizie immunofluorescencyjnego znakowania białka Iba1 (zjonizowanej cząsteczki adaptera wiążącego wapń 1), będącego markerem uważanym za charakterystyczny dla mikrogleju i makrofagów w stanie aktywacji. Uzyskane wyniki przedstawiają **Ryciny 19 i 20**. Zaobserwowano, że w hipokampie 5 miesięcy karmienia WD spowodowało istotnie zwiększoną aktywację komórek mikrogleju, utrzymującą się także po 9 miesiącach WD. Wskazuje na to zwiększony obszar barwienia immunofluorescencyjnego dla Iba1 u myszy 8M i 12M z grup WD i WD+LPS w porównaniu z grupami kontrolnymi (**Rycina 19 A i A'**, panel CTR vs. WD: 8M i 12M oraz CTR vs WD+LPS: 8M i 12M). Co ważne, w porównaniu z młodymi zwierzętami 4M, u myszy 12M obszar pozytywnie wybarwiony Iba1 zwiększył się w tkance hipokampa również w grupie CTR, demonstrując związaną ze starzeniem aktywację mikrogleju. Nie zaobserwowano istotnych zmian w obszarze znakowania Iba1 w hipokampie po 3 tygodniach karmienia WD (**Rycina 19 A'**, panel CTR vs. WD: 4M oraz WD+LPS: 4M). Rycina 9W A i A' pokazuje, że w porównaniu ze standardową dietą, karmienie WD wzmocniło i przyspieszyło aktywację mikrogleju o 4 miesiące, powodując najbardziej znaczące powiększenie obszaru znakowania Iba1 po 5. miesiącu utrzymywania zwierząt na diecie WD i utrzymanie tego efektu w starszych grupach zwierząt (**Rycina 19 A'**). Rycina 9W A' pokazuje również, że dootrzewnowe wstrzyknięcie LPS nie wywołało istotnego wpływu na aktywację komórek mikrogleju, natomiast kluczowy w odpowiedzi mikrogleju jest czynnik wieku oraz interakcja pomiędzy LPS a starzeniem (**Tabela 17**: Iba1 CTR vs. LPS). Analiza post-hoc wykazała, że w grupie otrzymującej LPS z wiekiem dochodzi do nieznacznego powiększenia obszaru znakowania Iba1 w hipokampie myszy 8M w porównaniu z grupami CTR 4M i 8M (**Rycina 19 A'**, panel CTR vs. LPS: 4M, 8M). Poza tym, we wszystkich grupach doświadczalnych (WD, LPS, WD+LPS) w wieku 8M i 12M oprócz zwiększonego obszaru znakowania Iba1 zaobserwowano również istotne zmiany w morfologii komórek mikrogleju. Komórki zwiększyły swój rozmiar i zaczęły przyjmować charakterystyczny dla stanu aktywacji kształt ameboidalny (**Rycina 19 A**, strzałki).

Analiza obszaru znakowania Iba1 w korze śródwęchowej wykazała, że czynnikiem istotnie wpływającym na aktywację komórek mikrogleju jest wiek (**Tabela 18**: Iba1, **Rycina 20 A i A'**, panele CTR vs. WD oraz CTR vs. WD+LPS). 3 tygodnie i 5 miesięcy karmienia WD spowodowały nieznaczące powiększenie wyznakowanego obszaru Iba1 u myszy w wieku 4M i 8M względem dopasowanych wiekowo kontroli (**Rycina 20 A i A'**, panele CTR vs. WD: 4M, 8M oraz CTR vs. WD+LPS: 4M, 8M). 9 miesięcy stosowania diety WD spowodowało znaczny wzrost aktywacji mikrogleju, natomiast poziom ten nie różnił się istotnie od dopasowanej wiekowo kontroli (**Rycina 20 A i A'**, panele CTR vs. WD: 12M oraz CTR vs. WD+LPS: 12M). W przypadku analizy wpływu LPS na aktywację mikrogleju w korze śródwęchowej, analiza statystyczna wykazała istotny wpływ jedynie czynnika wieku, a wzrost zaobserwowano dopiero u myszy w wieku 12M (**Rycina 20 A i A'**, panele CTR vs. LPS: 12M).

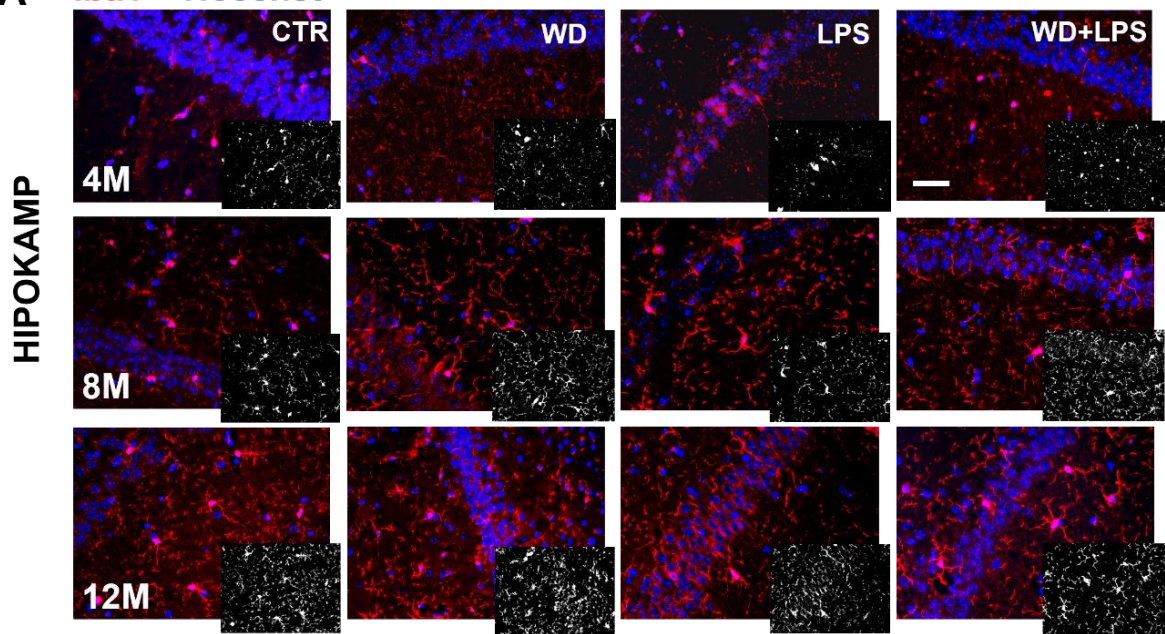
Chociaż marker Iba1 jest szeroko stosowany do wykrywania aktywacji mikrogleju, nie jest on wystarczający do wskazania stanu polaryzacji tych komórek, ponieważ Iba1 ulega ekspresji zarówno w stanie polaryzacji prozapalnej, jak i przeciwzapalnej (odpowiednio M1 i M2). Co więcej, trudno jest znaleźć marker unikalny dla prozapalnego mikrogleju ze względu na bardzo duże podobieństwo markerów prozapalnych na komórkach mikrogleju i tych na

aktywowanych makrofagach pochodzących z monocytów, które infiltrują mózg z peryferii stanów procesach patologicznych (Walker i Lue, 2015; Orihuela i in., 2016). W niniejszej pracy obok Iba1 przeanalizowano dodatkowo marker przeciwwzapalny: P2RY12 (purynergiczny receptor P2Y12), o którym wiadomo, że jest wysoce specyficzny dla mikrogleju mózgowego będącego w stanie homeostazy, oraz CX3CR1 (receptor chemokinowy 1 z motywem CX3C, inaczej receptor dla fraktalkiny), będącego markerem specyficznym znakującym wyłącznie komórki mikrogleju mózgowego. P2RY12 i CX3CR1 w literaturze zostały zdefiniowane jako selektywne markery do rozróżnienia mikrogleju, z wysokim poziomem ekspresji od makrofagów (Butovsky i in., 2014; Mildner i in., 2017).

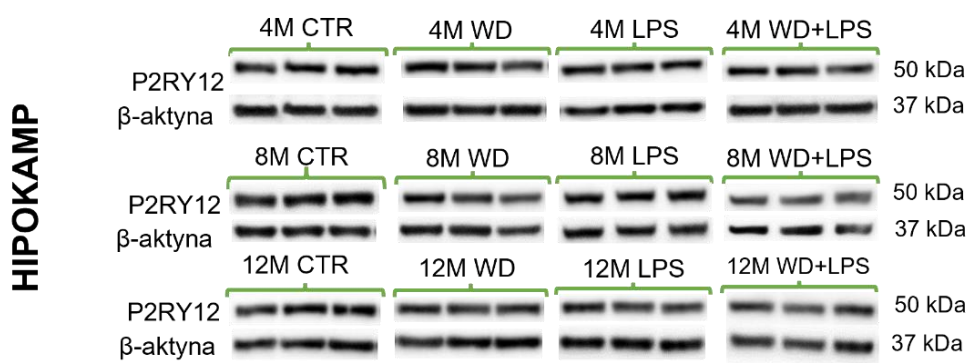
W badaniu wykazano istotny wpływ diety WD na poziom białka P2RY12, przy czym po 5 i 9 miesiącach diety nastąpiło znaczące obniżenie jego poziomu w hipokampie myszy APPswe w wieku 8M i 12M (**Rycina 19 B i B'**, panele CTR vs. WD: 8M i 12M oraz CTR vs. WD+LPS: 8M i 12M, **Tabela 17**: P2RY12). Zestawienie otrzymanych wyników sugeruje, że indukowana przez WD aktywacja mikrogleju (\uparrow Iba1) jest związana z polaryzacją prozapalną. Co więcej, zaobserwowano brak różnic w poziomie białka CX3CR1 w hipokampie myszy APPswe pod wpływem WD d (**Rycina 19 B i B'**, panel CTR vs. WD oraz CTR vs. WD+LPS), co świadczy o tym, że liczba komórek mikrogleju nie uległa zmianie. Obserwacja ta, razem z obserwowanym wzrostem poziomu Iba1 oraz spadkiem P2RY12, sugeruje dodatkowo możliwy napływ pro-zapalnych makrofagów z obwodu do mózgu. Podobny schemat zmian zaobserwowano w grupie myszy po iniekcji LPS, gdzie do spadku poziomu P2RY12 w hipokampie doszło nieco później, tj. w wieku 12M (**Rycina 19 B i B'**, panel CTR vs. LPS) i nie wykazano różnic w poziomie CX3CR1 (**Rycina 19 C i C'**). Natomiast w korze śródwęchowej nie zaobserwowano istotnego wpływu ani WD, ani LPS na poziomy P2RY12 (**Rycina 20 B i B'**, panel CTR vs. LPS, **Tabela 18**: P2RY12) oraz CX3CR1 (**Rycina 20 C i C'**, panel CTR vs. LPS, **Tabela 18**: CX3CR1).

Następnie zbadano, czy indukowana przez WD aktywacja mikrogleju wpływa na jego podstawowe funkcje fagocytarne. W tym celu przeanalizowano poziom białka CD68, wskaźnika aktywności fagocytarnej mikrogleju obecnego zarówno w mikrogleju i makrofagach M1, jak i M2 (Walker i Lue, 2015; Martinez i in., 2013). Fagocytarne funkcje mikrogleju jest kluczowa dla oczyszczania nagromadzonych nieprawidłowych białek i produktów metabolizmu, w tym peptydów i agregatów A β u ludzi (Zotova i in., 2013). Jak wykazuje **Rycina 19 D i D'**, długotrwałe karmienie WD doprowadziło do zmniejszenia poziomu CD68 w hipokampie u zwierząt 8M i 12M w porównaniu do kontroli karmionych standardową dietą (**Rycina 19 D i D'**, panele CTR vs. WD 8M i 12M, **Tabela 17**: CD68). Dodatkowo zaobserwowano obniżenie poziomu CD68 w grupie z iniekcją LPS w wieku 12M, natomiast za tę zmianę odpowiadały procesy związane z wiekiem (**Rycina 19 D i D'**, panel CTR vs. LPS, **Tabela 17**: CD68). Natomiast w korze śródwęchowej nie zaobserwowano istotnego wpływu ani WD, ani LPS, na poziom CD68 (**Rycina 20 D i D'**, **Tabela 18**: CD68).

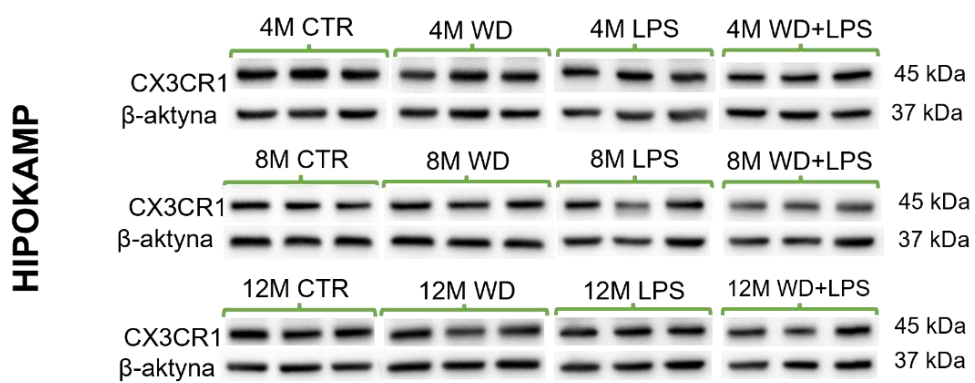
A Iba1 + Hoechst



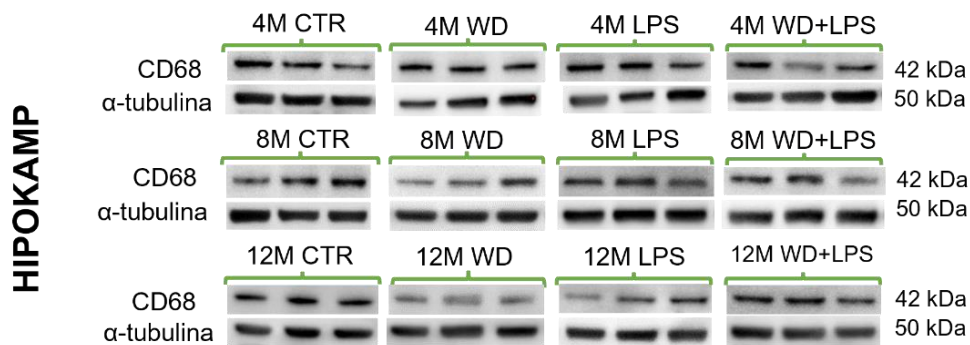
B



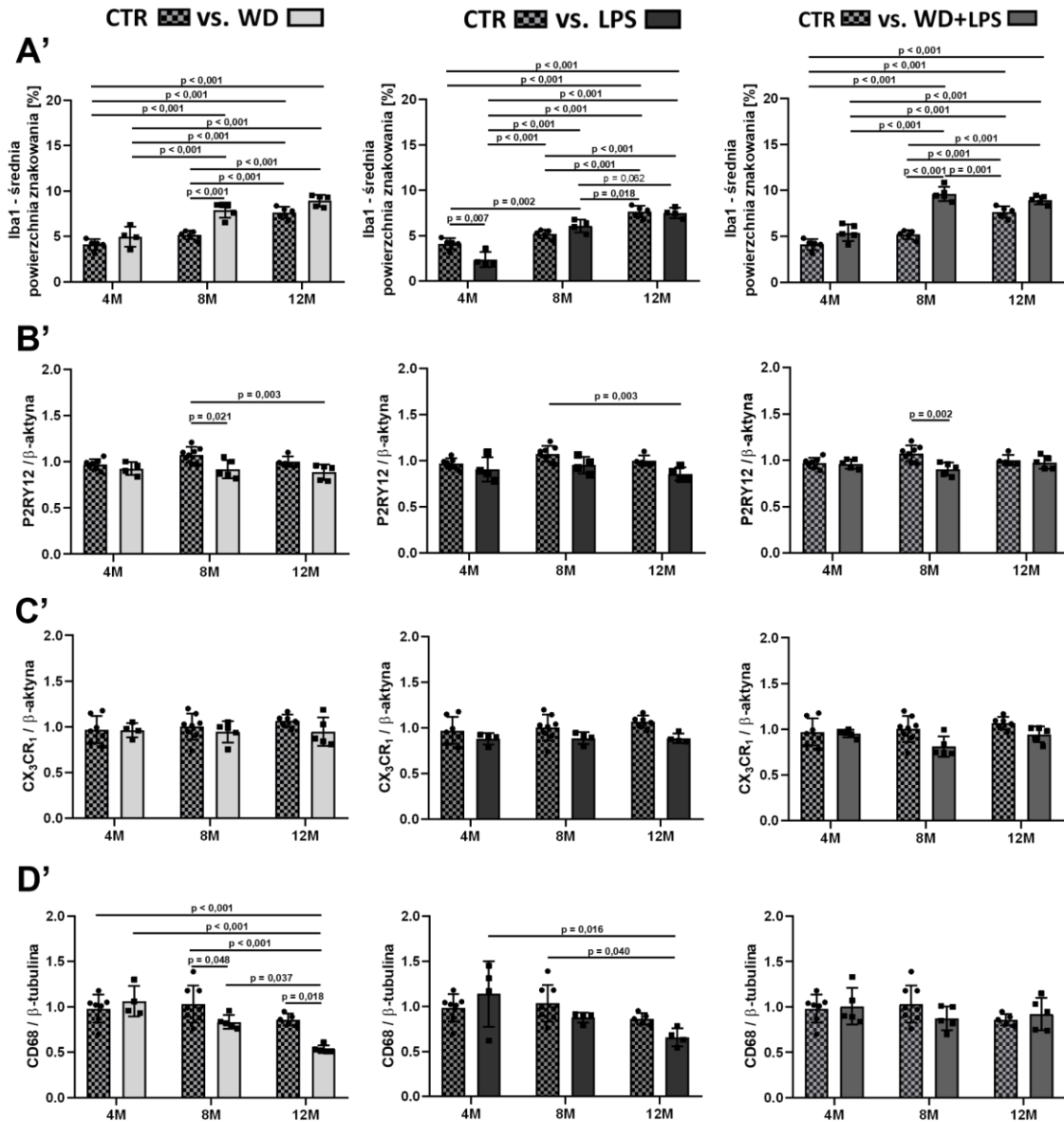
C



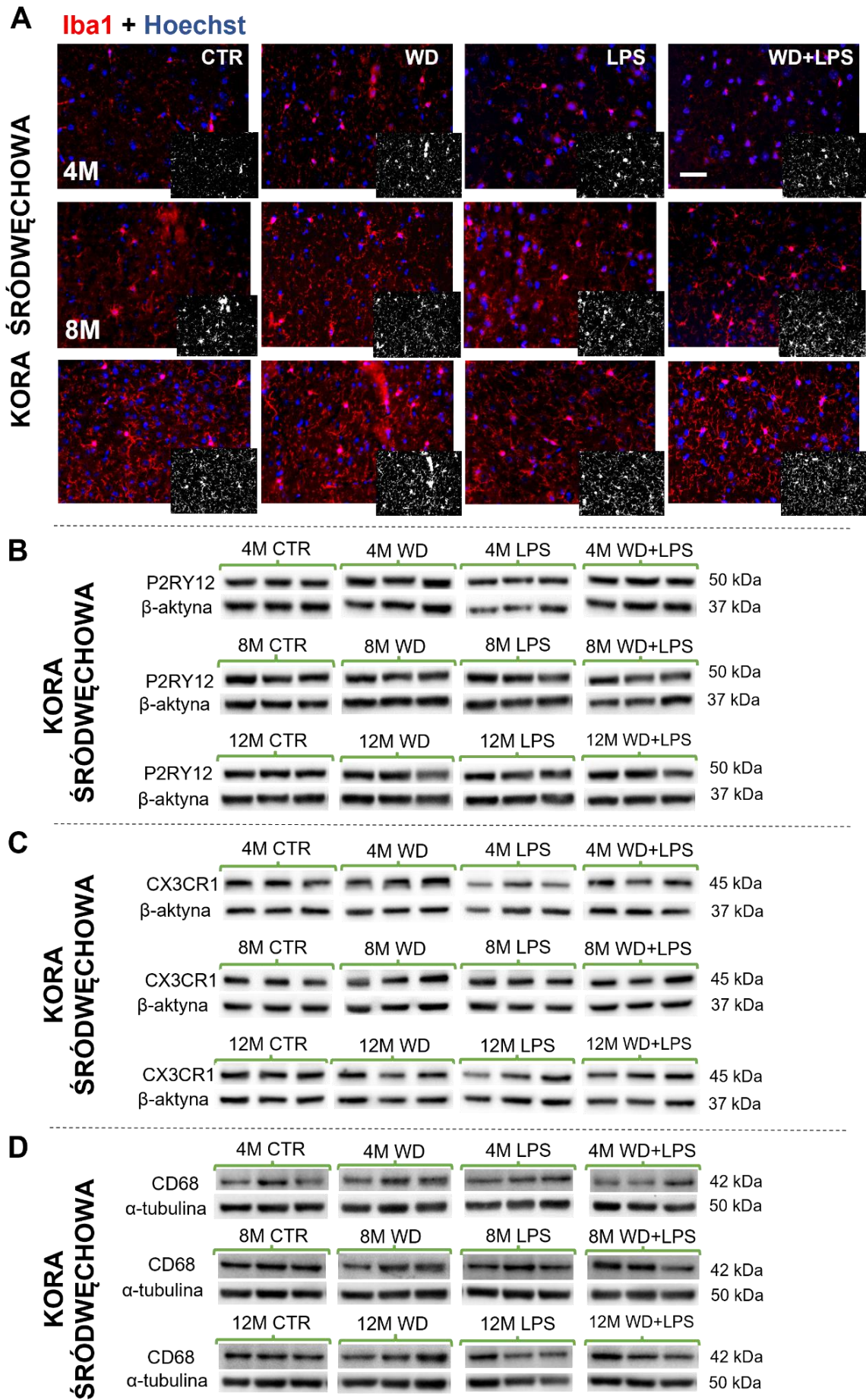
D

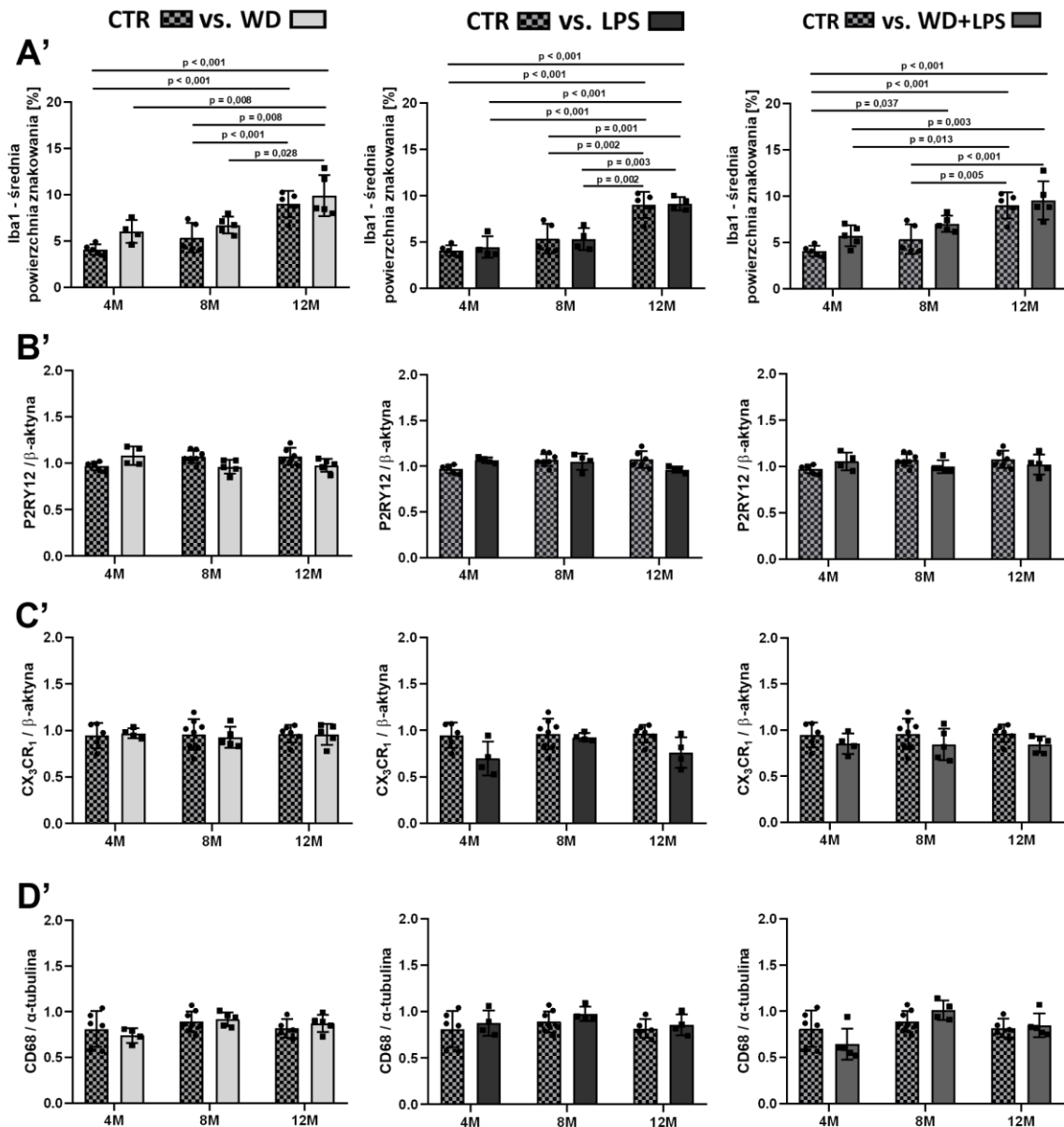


Wyniki



Rycina 19. Wpływ WD i iniekcji LPS na (A, A') średnią powierzchnię obszaru znakowania markera aktywacji mikrogleju – Iba1 w hipokampie za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej w grupach WD, LPS, i WD+LPS myszy APPswe w wieku 4, 8 i 12 miesięcy (4M, 8M, 12M) w porównaniu do kontroli (CTR) bez iniekcji LPS utrzymywanych na diecie standardowej. Wszystkie dane przedstawione zostały za pomocą średniej arytmetycznej \pm odchylenie standardowe dla Iba1-dodatniego obszaru barwienia z wielu różnych obszarów i przekrojów hipokampa (DG, CA1, CA2, CA3, n = od 4 do 5 zwierząt na doświadczenie). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego. (A) Reprezentatywne obrazy immunofluorescencyjnego znakowania Iba1 dla danych przedstawionych w A'; skala = 50 μ m; powiększenie: x20; fluorescencja czerwona - Iba1, fluorescencja niebieska - hoechst (jądra). Wpływ WD i iniekcji LPS na poziom (B, B') homeostaticznego markera przeciwzapalnego mikrogleju - P2RY12, (C i C') receptora dla fraktalkiny - CX₃CR₁, będącego selektywnym białkiem mikrogleju oraz (D i D') markera fagocytozy - CD68 w hipokampie myszy z grup WD, LPS i WD+LPS, w wieku 4, 8 i 12 miesięcy (4M, 8M, 12M) porównanych do kontroli (CTR) bez iniekcji LPS utrzymywanych na diecie standardowej wykrytych za pomocą metody immunoblottingu. Dane liczbowe przedstawiono za pomocą średniej arytmetycznej \pm odchylenie standardowe (n = od 4 do 8 zwierząt na grupę doświadczalną; kropki i kwadraty przedstawiają wartości dla pojedynczych osobników). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego. Wartości $p < 0,05$ uznano za z górny próg dla istotności statystycznej (pogrubiona czcionka), natomiast wartości p mieszczące się w przedziale $0,1 < p \leq 0,05$ uznano jako tendencję (czcionka bez pogrubienia).





Rycina 20. Wpływ WD i iniekcji LPS na (A, A') średnią powierzchnię obszaru znakowania markera aktywacji mikrogleju – Iba1 w korze śródwęchowej za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej w grupach WD, LPS, i WD+LPS myszy APP^{sw} w wieku 4, 8 i 12 miesięcy (4M, 8M, 12M) w porównaniu do kontroli (CTR) bez iniekcji LPS utrzymywanych na diecie standardowej. Wszystkie dane przedstawione zostały za pomocą średniej arytmetycznej \pm odchylenie standardowe dla Iba1-dodatniego obszaru barwienia z wielu różnych obszarów i przekrojów hipokampa (DG, CA1, CA2, CA3, n = od 4 do 5 zwierząt na doświadczenie). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego. (A) Reprezentatywne obrazy znakowania immuno-fluorescencyjnego Iba1 dla danych przedstawionych w A'; skala = 50 μ m; powiększenie: x20; fluorescencja czerwona - Iba1, fluorescencja niebieska - hoechst (jądra). Wpływ WD i iniekcji LPS na poziom (B, B') homeostatycznego markera przeciwzapalnego mikrogleju – P2RY12, (C i C') receptora dla fraktalkiny – CX₃CR₁, będącego selektywnym białkiem mikrogleju oraz (D i D') markera fagocytozy – CD68 w korze śródwęchowej myszy z grup WD, LPS i WD+LPS, w wieku 4, 8 i 12 miesięcy (4M, 8M, 12M) w porównanych do kontroli (CTR) bez iniekcji LPS utrzymywanych na diecie standardowej wykrytych za pomocą metody immunoblottingu. Dane liczbowe przedstawiono za pomocą średniej arytmetycznej \pm odchylenie standardowe (n = od 4 do 8 zwierząt na grupę doświadczalną; kropki i kwadraty przedstawiają wartości dla pojedynczych osobników). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego. Wartości p < 0,05 uznano za z górny próg dla istotności statystycznej (pogrubiona czcionka), natomiast wartości p mieszczące się w przedziale 0,1 < p ≤ 0,05 uznano jako tendencję (czcionka bez pogrubienia).

Tabela 17. Wyniki analizy ANOVA dwuczynnikowa, będące uzupełnieniem **Ryciny 19**.

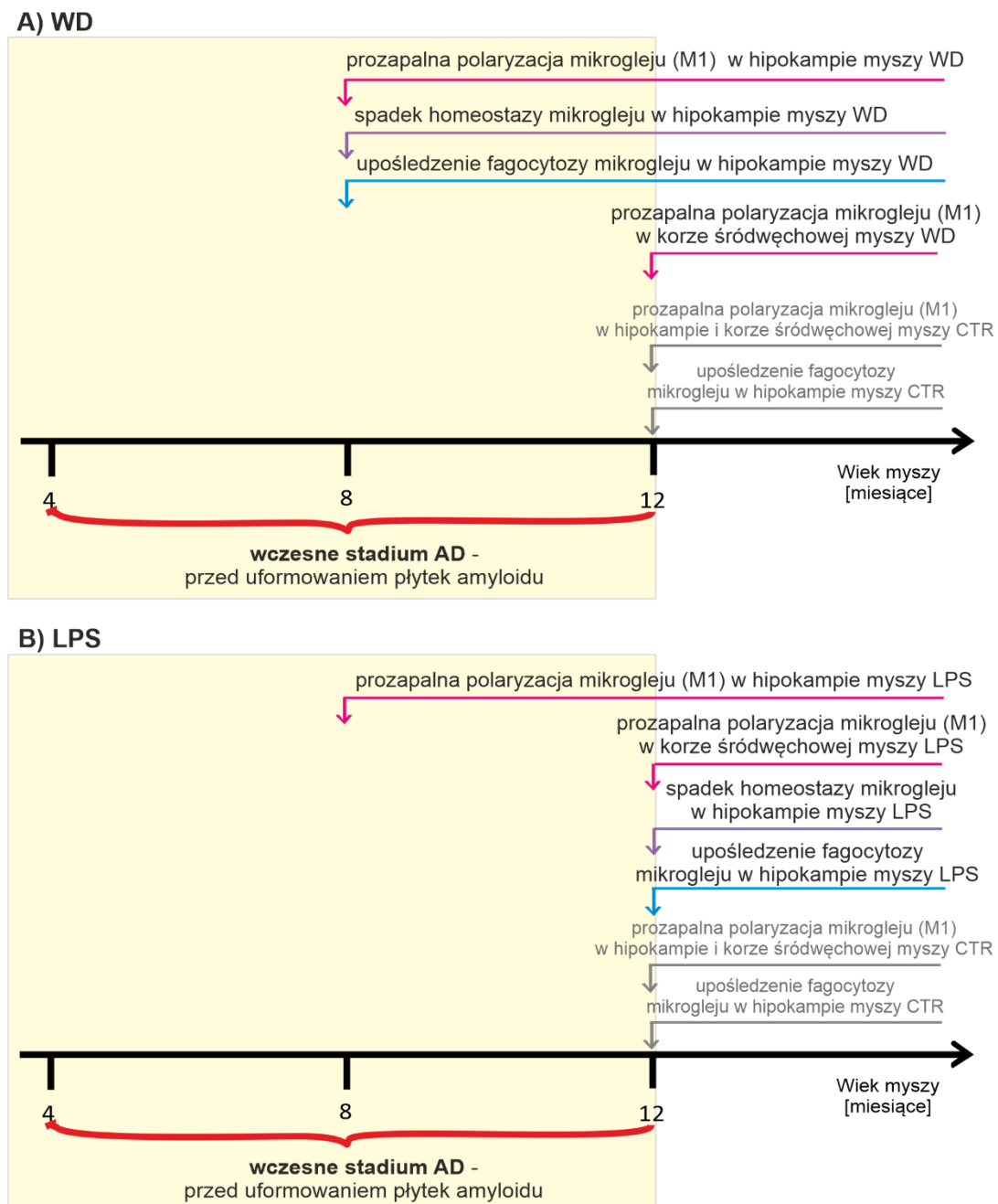
Hipokamp Marker	CTR vs. WD			CTR vs. LPS			CTR vs. WD+LPS		
	wiek	WD	interakcja	wiek	LPS	interakcja	wiek	WD+LPS	interakcja
Iba1	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,026	p < 0,001	NS	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
P2RY12	NS	p < 0,001	NS	NS	p = 0,001	NS	NS	p = 0,008	p = 0,011
CX3CR1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD68	p < 0,001	p = 0,006	p = 0,010	p = 0,005	NS	NS	p = 0,038	NS	NS

NS – brak istotnych różnic

Tabela 18. Wyniki analizy ANOVA dwuczynnikowa, będące uzupełnieniem **Ryciny 20**.

Kora śródwęchowa Marker	CTR vs. WD			CTR vs. LPS			CTR vs. WD+LPS		
	wiek	WD	interakcja	wiek	LPS	interakcja	wiek	WD+LPS	interakcja
Iba1	p < 0,001	p = 0,015	NS	p < 0,001	NS	NS	p < 0,001	p = 0,017	NS
P2RY12	NS	NS	p = 0,003	NS	NS	p = 0,008	NS	NS	p = 0,063
CX3CR1	NS	NS	NS	NS	p = 0,005	NS	NS	p = 0,032	NS
CD68	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS – brak istotnych różnic



Rycina 21. Schemat przedstawiający przyśpieszenie aktywacji mikrogleju pod wpływem zastosowanych czynników (A) WD i (B) LPS w hipokampie i korze śródwęchowej myszy APPSwe. CTR - myszy kontrolne APPSwe karmione dietą standardową bez iniekcji LPS. Na szaro zaznaczono kolejność procesów przebiegających w CTR.

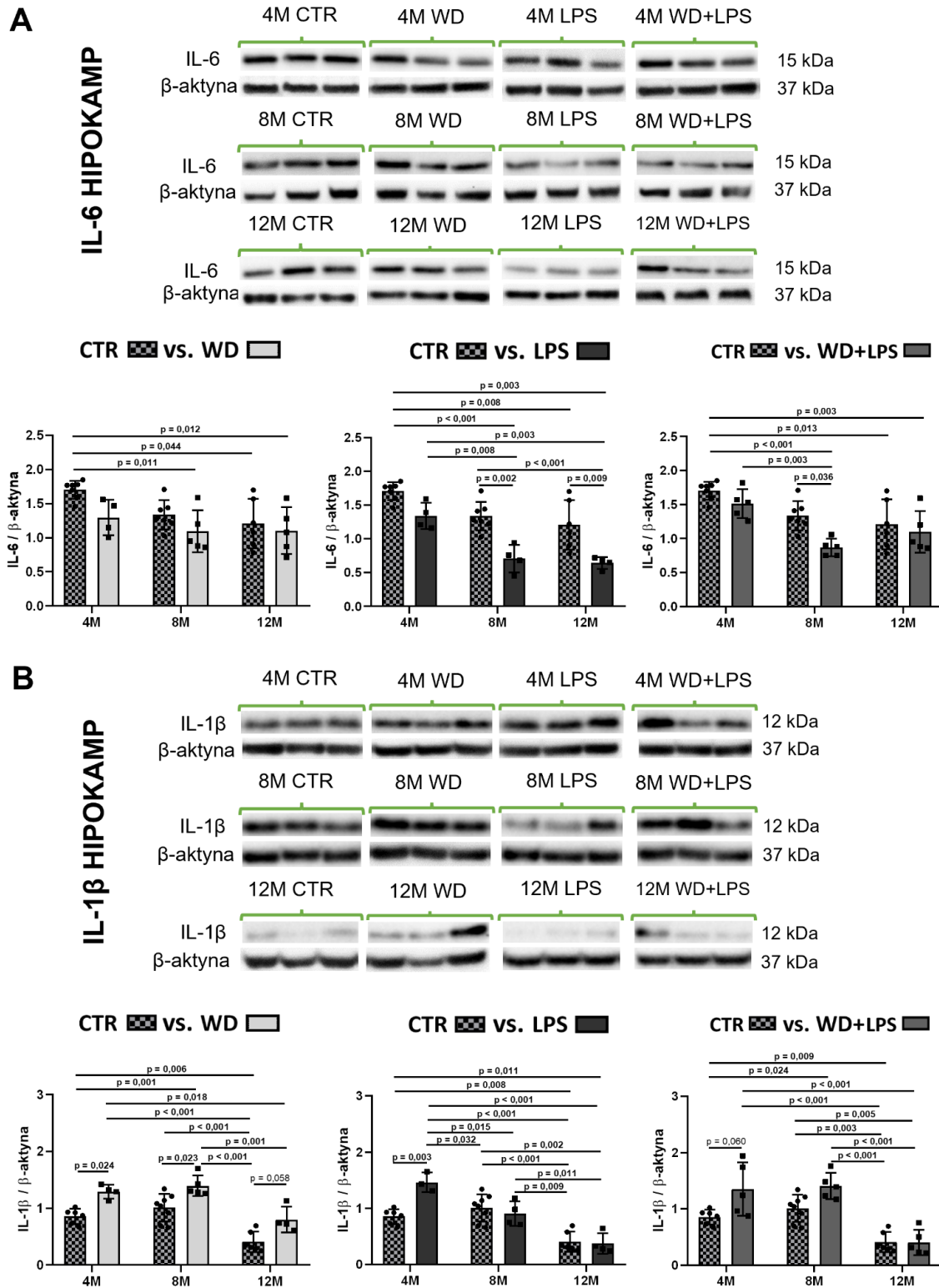
Otrzymane dane sugerują, że mikroglej w hipokampie jest szczególnie wrażliwy na działanie WD. W hipokampie w przeciwieństwie do kory śródwęchowej, WD wywołało istotny wzrost powierzchni obszaru znakowania Iba1, spadek poziomu P2RY12 oraz CD68, co sugeruje zaburzenia homeostazy, aktywację mikrogleju z przyspieszeniem jego polaryzacji prozapalnej M1 o 4 miesiące oraz zaburzenia zdolność fagocytozy (**Rycina 21 A**). Ponadto porównanie zmian w obrębie mikrogleju pod wpływem WD do tych wywołanych przez LPS pokazuje, że WD w przeciwieństwie do LPS przyspiesza procesy związane z zaburzeniem homeostazy i fagocytozy mikrogleju o 4 miesiące (**Rycina 21A vs. B**).

4.5. Wpływ WD i LPS na poziom cytokin prozapalnych oraz szlak TLR4 - IL-6/IL1- β

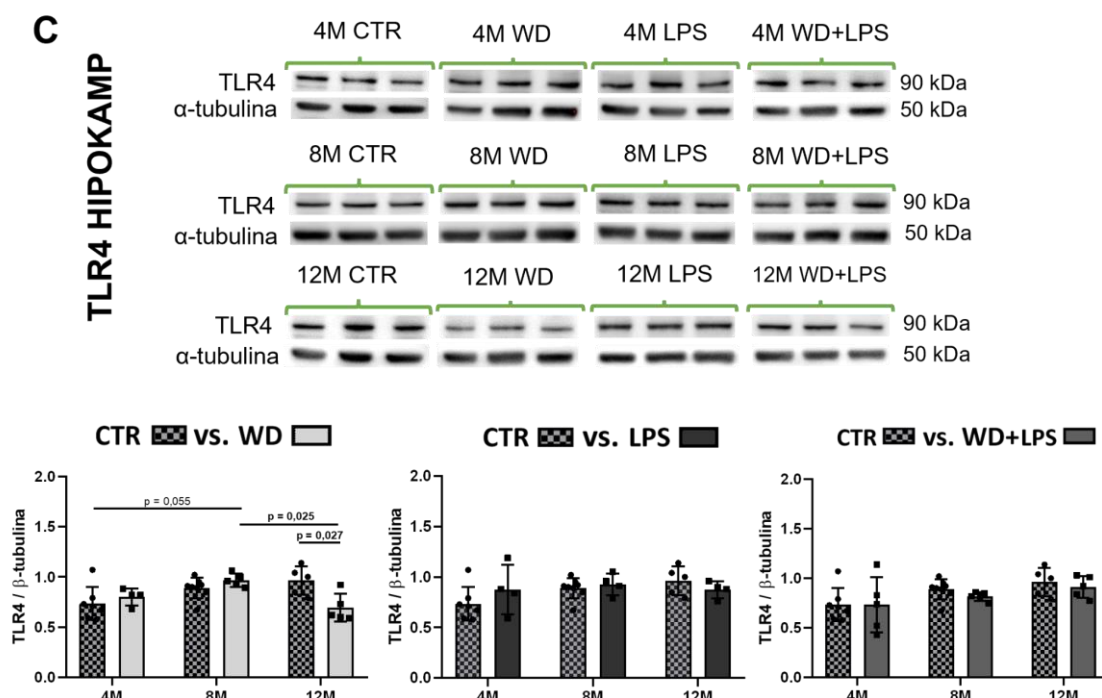
Wiedząc, że zastosowane w tym badaniu dwa różne sposoby traktowania, karmienie WD oraz dootrzewnowa iniekcja LPS, wykazują wpływ na aktywację komórek glejowych w mysim modelu AD (myszy APPswe), w kolejnym etapie badań przeanalizowano profil cytokin prozapalnych IL-6 oraz IL-1 β w mózgu. Dodatkowo w kolejnym etapie przeanalizowano poziom receptora TLR4, agonisty zarówno dla LPS, jak i dla nasyconych kwasów tłuszczowych, aktywującego w ten sposób ścieżkę zapalną skutkującą wzrostem wydzielania IL-6 oraz IL-1 β .

Analiza tkanki hipokampa wykazała dynamiczne zmiany w poziomach IL-6 i IL-1 β przebiegające w czasie zarówno pod wpływem diety zachodniej, iniekcji LPS, jak i wieku. Zaobserwowano, że w grupach CTR wiek prowadzi do istotnego obniżenia poziomu IL-6 w hipokampie myszy w wieku 12M (**Rycina 22a A, Tabela 19**: IL-6). Natomiast zauważono, że pod wpływem WD dochodzi do istotnego przyspieszenia spadku poziomu IL-6 obserwowanego w hipokampie u myszy w wieku 8M. Obniżony poziom IL-6 utrzymywał się w wieku 12M uzyskując fazę plateau (**Rycina 22a A**, panel CTR vs WD: 8M, 12M, oraz CTR vs. WD+LPS: 8M, 12M). W wyniku iniekcji LPS także doszło do istotnego przyspieszenia spadku poziomu IL-6 w hipokampie myszy obserwowanego już w wieku 8M, jednak spadek ten był silniejszy, niż pod wpływem diety i dalej spadał osiągając lepiej: najniższy poziom w wieku 12M (**Rycina 22a A**, panel CTR vs. LPS: 8M, 12M). W przeciwieństwie do łagodnego obniżenia poziomów IL-6, analiza poziomu cytokiny IL-1 β w hipokampie wykazała, że czynnik wieku prowadzi do drastycznego spadku jej poziomu z wiekiem, co szczególnie wyraźnie widać było u dwunastomiesięcznych kontrolnych myszy APPswe (**Rycina 22a B, Tabela 19**). Następnie wykazano, że dieta zachodnia powoduje istotny wzrost IL-1 β we wszystkich grupach wiekowych w porównaniu do dopasowanych wiekowo kontroli, natomiast poziom w grupie WD w wieku 12M jest obniżony w stosunku do 4M i 8M myszy karmionych WD (**Rycina 22a B**, panel CTR vs WD, **Tabela 19**), ale wciąż wyższy od poziomu obserwowanego u 12M myszy kontrolnych. Obserwacja ta wskazuje na utrzymywanie się stanu zapalnego w wyniku chronicznego karmienia zwierząt WD. W wyniku iniekcji LPS także doszło do wzrostu poziomu IL-1 β w hipokampie myszy w wieku 4M, natomiast poziom ten był obniżony u myszy 8M i 12M (**Rycina 22a B**, panel CTR vs. LPS: 4M, 8M, 12M). Sugeruje to, że LPS jako czynnik prozapalny działa gwałtownie, powodując wyrzut cytokiny IL-1 β , której poziom stopniowo stabilizuje się w miarę upływu czasu od ekspozycji na czynnik infekcyjny.

Analiza poziomu receptora TLR4 w hipokampie nie wykazała istotnych zmian u myszy CTR pod wpływem wieku (**Tabela 19**: TLR4). Natomiast stwierdzono interakcje pomiędzy czynnikami wieku i WD: zaobserwowano istotny wzrost poziomu receptora TLR4 w hipokampie myszy 8M WD względem 4M CTR (**Rycina 22b C**, panel CTR vs WD: 4M i 8M), natomiast w wieku 12M doszło do spadku tego poziomu i jego normalizacji do poziomu obserwowanego u myszy CTR 4M (**Rycina 22b C**, panel CTR vs WD: 12M). W hipokampie myszy z iniekcją LPS nie zaobserwowano różnic w poziomie TLR4 (**Rycina 22b C**, panel CTR vs LPS: 4M, 8M, 12M).



Rycina 22a. Wpływ WD i iniekcji LPS na poziom (A) interleukiny – 6 (IL-6), (B) interleukiny – 1β (IL-1β) w hipokampie myszy z grup WD, LPS i WD+LPS, w wieku 4, 8 i 12 miesięcy (4M, 8M, 12M) w porównanych do kontroli (CTR) bez iniekcji LPS utrzymywanych na diecie standardowej, wykrytych za pomocą metody immunoblottingu. Dane liczbowe przedstawiono za pomocą średniej arytmetycznej ± odchylenie standardowe (n = od 3 do 8 zwierząt na grupę doświadczalną; kropki i kwadraty przedstawiają wartości dla pojedynczych osobników). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego. Wartości $p < 0,05$ uznano za z górny próg dla istotności statystycznej (pogrubiona czcionka), natomiast wartości p mieszczące się w przedziale $0,1 < p \leq 0,05$ uznano jako tendencję (czcionka bez pogrubienia).



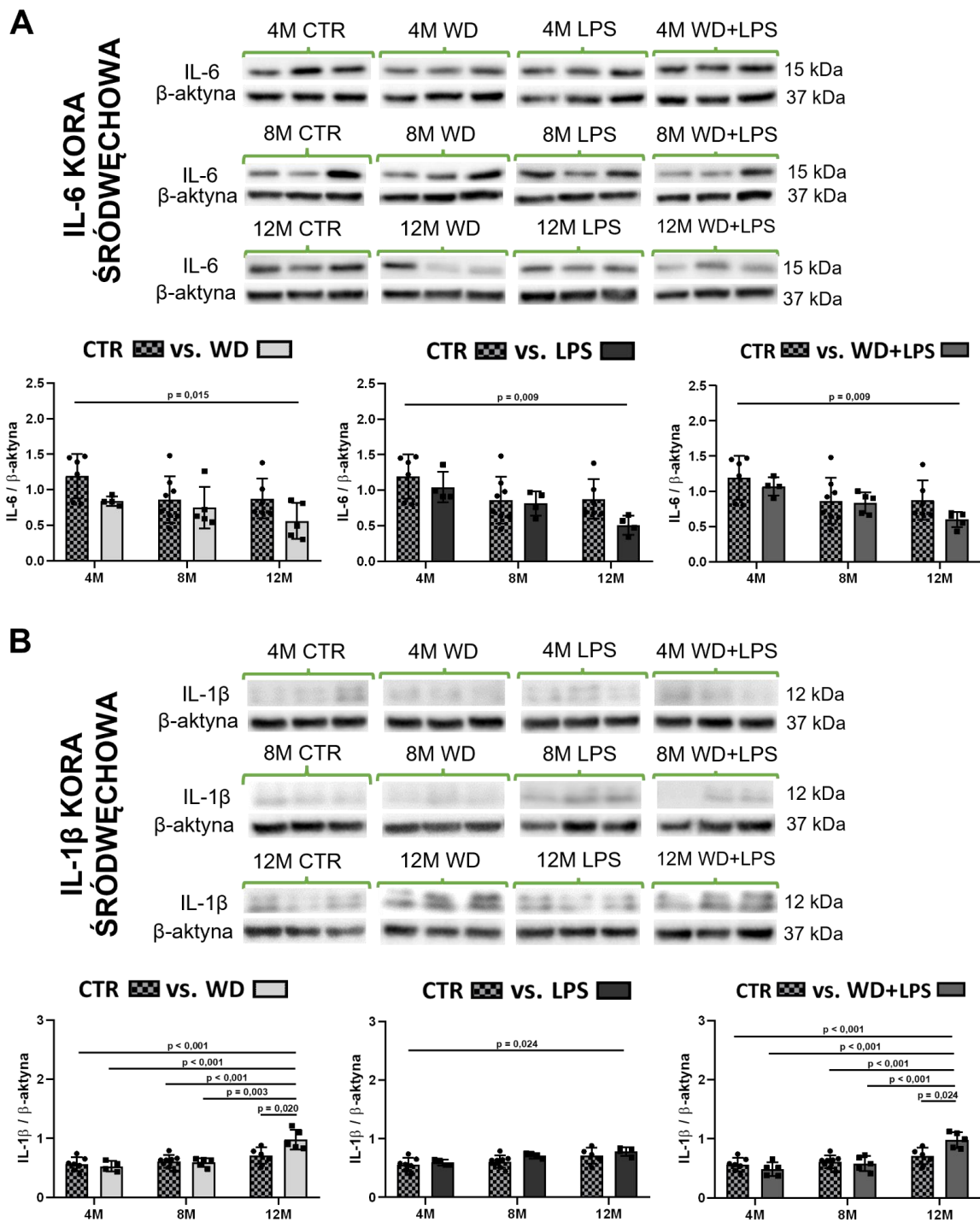
Rycina 22b. Wpływ WD i iniekcji LPS na poziom (C) receptora TLR4 w hipokampie myszy z grup WD, LPS i WD+LPS, w wieku 4, 8 i 12 miesięcy (4M, 8M, 12M) w porównanych do kontroli (CTR) bez iniekcji LPS utrzymywanych na diecie standardowej, wykrytych za pomocą metody immunoblottingu. Dane liczbowe przedstawiono za pomocą średniej arytmetycznej \pm odchylenie standardowe (n = od 3 do 8 zwierząt na grupę doświadczalną; kropki i kwadraty przedstawiają wartości dla pojedynczych osobników). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego. Wartości $p < 0,05$ uznano za z górny próg dla istotności statystycznej (pogrubiona czcionka), natomiast wartości p mieszczące się w przedziale $0,1 < p \leq 0,05$ uznano jako tendencję (czcionka bez pogrubienia).

Tabela 19. Wyniki analizy ANOVA dwuczynnikowa, będące uzupełnieniem **Ryciny 22**.

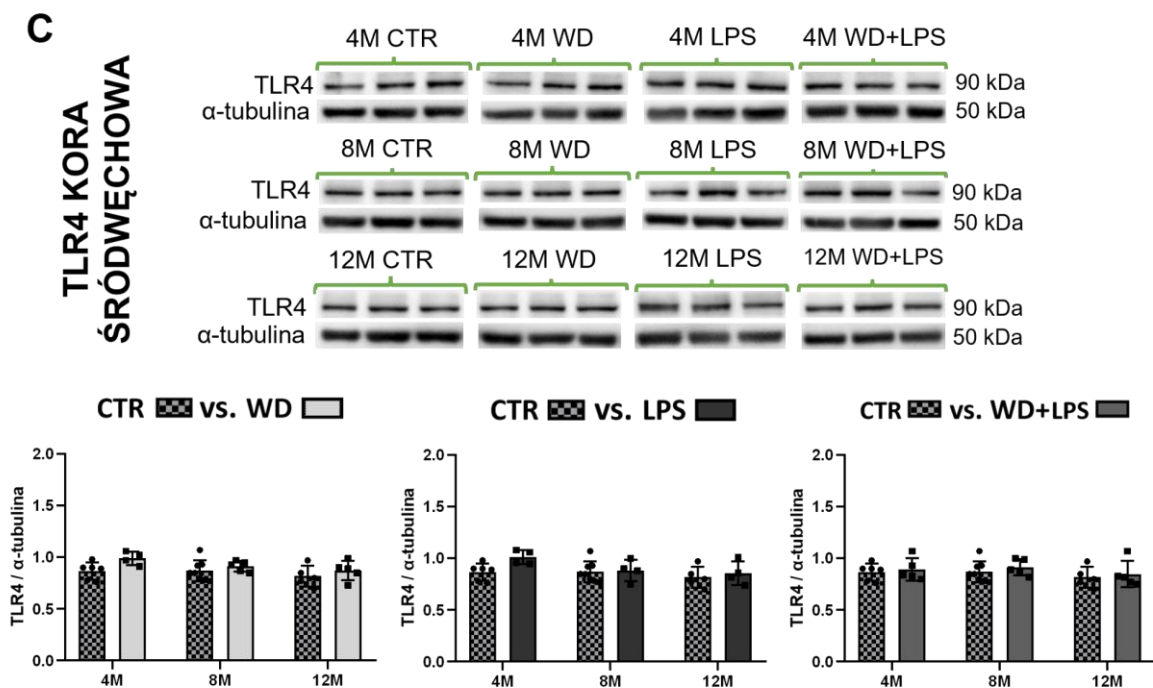
Hipokamp	CTR vs. WD			CTR vs. LPS			CTR vs. WD+LPS		
	wiek	WD	interakcja	wiek	LPS	interakcja	wiek	WD+LPS	interakcja
IL-6	p = 0,017	p = 0,014	NS	p < 0,001	NS	p < 0,001	p < 0,001	NS	p = 0,004
IL-1 β	p < 0,001	p < 0,001	NS	p < 0,001	p = 0,047	p = 0,001	p < 0,001	p = 0,003	NS
TLR4	NS	NS	p = 0,036	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS – brak istotnych różnic

Analiza kory śródwęchowej wykazała nieistotny spadek poziomu IL-6 w grupie WD w wieku 4M oraz spadek w grupach LPS i WD+LPS w wieku 12M względem grupy 4M CTR będące skutkiem wpływu czynnika wieku (**Rycina 23a A**, panel CTR vs. WD, CTR vs. LPS, CTR vs. WD+LPS, **Tabela 20**) oraz wieku i WD u 12M myszy (**Rycina 23a A**, panel CTR vs. WD, **Tabela 20**: IL-6). Analiza IL-1 β w korze śródwęchowej myszy APPswe wykazała wzrost poziomu tej cytokiny wyłącznie w grupach karmionych dietą WD (WD i WD+LPS) w wieku 12M (**Rycina 23a B**, panel CTR vs. LPS, oraz CTR vs. WD+LPS, **Tabela 20**: IL-1 β), jak i interakcji pomiędzy traktowaniem i wiekiem (**Rycina 23a B**, panel CTR vs. WD, **Tabela 20**: IL-1 β). Otrzymane wyniki wskazują, że dieta WD osłabia procesy przeciwzapalne w korze, przejawiające się podniesionym poziomem cytokiny IL-1 β z wiekiem. Przy tym obserwuje się nałożenie efektów dwóch czynników, WD i wieku, co nie występuje u zwierząt młodszych. Analiza poziomu receptora TLR4 w korze śródwęchowej nie wykazała żadnych zmian (**Rycina 23b C**).



Rycina 23a. Wpływ WD i iniekcji LPS na poziom (A) interleukiny 6 – IL-6, (B) interleukiny 1β – IL-1β w korze śródwełchowej myszy z grup WD, LPS i WD+LPS, w wieku 4, 8 i 12 miesięcy (4M, 8M, 12M) w porównanych do kontroli (CTR) bez iniekcji LPS utrzymywanych na diecie standardowej, wykrytych za pomocą metody immunoblottingu. Dane liczbowe przedstawiono za pomocą średniej arytmetycznej ± odchylenie standardowe (n = od 4 do 8 zwierząt na grupę doświadczalną; kropki i kwadraty przedstawiają wartości dla pojedynczych osobników). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego. Wartości $p < 0,05$ uznano za z górny próg dla istotności statystycznej (pogrubiona czcionka), natomiast wartości p mieszczące się w przedziale $0,1 < p \leq 0,05$ uznano jako tendencję (czcionka bez pogrubienia).



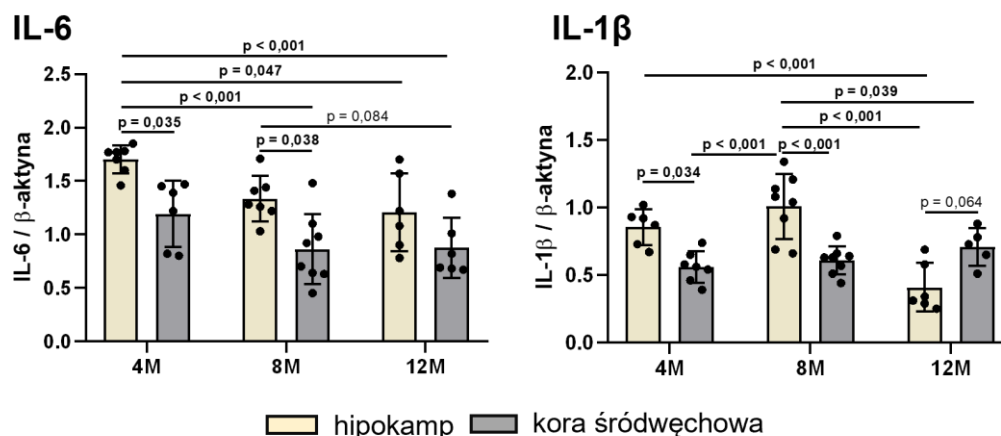
Rycina 23b. Wpływ WD i iniekcji LPS na poziom (C) receptora TLR4 w korze śródwęchowej myszy z grup WD, LPS i WD+LPS, w wieku 4, 8 i 12 miesięcy (4M, 8M, 12M) w porównanych do kontroli (CTR) bez iniekcji LPS utrzymywanych na diecie standardowej, wykrytych za pomocą metody immunoblottingu. Dane liczbowe przedstawiono za pomocą średniej arytmetycznej \pm odchylenie standardowe ($n =$ od 4 do 8 zwierząt na grupę doświadczalną; kropki i kwadraty przedstawiają wartości dla pojedynczych osobników). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy ANOVA z testem post-hoc Bonferroni. Wartości $p < 0,05$ uznano za z górny próg dla istotności statystycznej (pogrubiona czcionka), natomiast wartości p mieszczące się w przedziale $0,1 < p \leq 0,05$ uznano jako tendencję (czcionka bez pogrubienia).

Tabela 20. Wyniki analizy ANOVA dwuczynnikowa, będące uzupełnieniem **Ryciny 23**.

Kora śródwęchowa	CTR vs. WD			CTR vs. LPS			CTR vs. WD+LPS		
	wiek	WD	interakcja	wiek	LPS	interakcja	wiek	WD+LPS	interakcja
IL-6	p = 0,043	p = 0,021	NS	p = 0,007	NS	NS	p = 0,020	NS	NS
IL-1 β	p < 0,001	NS	p = 0,011	p = 0,004	$p = 0,075$	NS	p < 0,001	NS	p = 0,006
TLR4	NS	p = 0,026	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

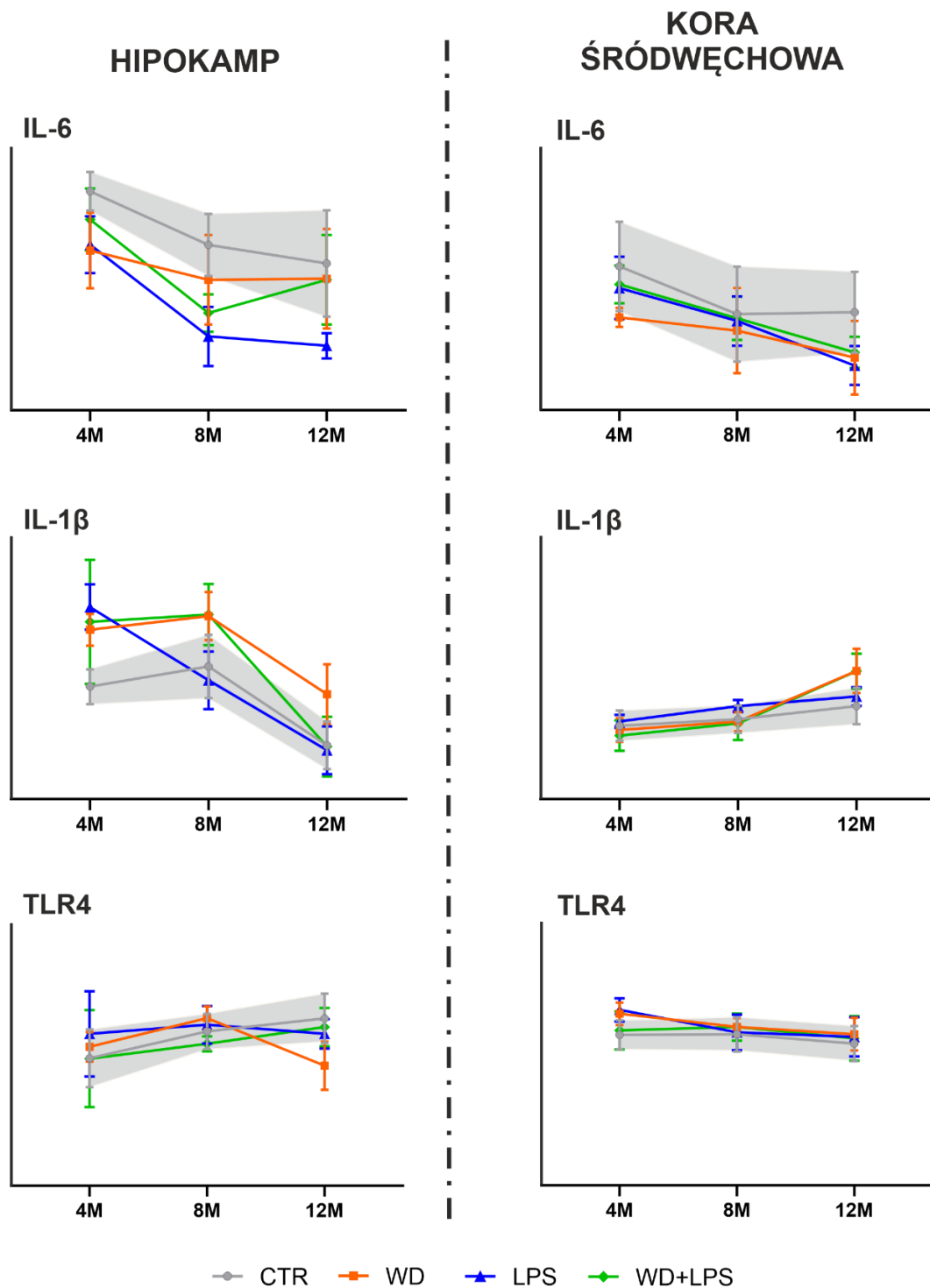
NS – brak istotnych różnic

Co więcej, zauważono także znaczące różnice w poziomach cytokin prozapalnych pomiędzy badanymi strukturami u kontrolnych, nietraktowanych myszy APP^{swE} (CTR) (**Rycina 24**). Zaobserwowano, że w hipokampie poziomy IL-6 i IL-1 β były wyższe niż w korze śródwęchowej w grupach wiekowych 4M i 8M. Następnie w wieku 12M poziom IL-6 w hipokampie obniżył się do poziomu odpowiadającego korze śródwęchowej, a poziom IL-1 β w 12M spadł poniżej poziomu obserwowanego w korze śródwęchowej w tej grupie wiekowej. W korze śródwęchowej poziomy IL-6 i IL-1 β utrzymywały się na stałym poziomie przez cały okres eksperymentu.



Rycina 24. Poziomy cytokin prozapalnych IL-6 i IL-1 β w hipokampie oraz w korze śródwęchowej kontrolnych (CTR) myszy APP^{swE} utrzymywanych na diecie standardowej, bez iniekcji LPS. Dane liczbowe przedstawiono za pomocą średniej arytmetycznej \pm odchylenie standardowe (n = od 5 do 8 zwierząt na grupę doświadczalną; kropki przedstawiają wartości dla pojedynczych osobników). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego. Wartości $p < 0,05$ uznano za z górny próg dla istotności statystycznej (pogrubiona czcionka), natomiast wartości p mieszczące się w przedziale $0,1 < p \leq 0,05$ uznano jako tendencję (czcionka bez pogrubienia).

Analiza poziomów cytokin prozapalnych IL-6 i IL-1 β oraz receptora TLR4 wykazała, że zarówno WD jak i LPS modyfikują ich poziomy zarówno w hipokampie jak i korze śródwęchowej, natomiast dzieje się to w nieco odmienny sposób (**Rycina 25**). Przede wszystkim zaobserwowano silniejszą odpowiedź zapalną w hipokampie w porównaniu do odpowiedzi w korze śródwęchowej, zarówno pod wpływem WD, jak i iniekcji LPS. Wykazano też, że w hipokampie WD, jako czynnik działający chronicznie, indukuje dłużej utrzymujący się stan zapalny (wzrost IL-1 β w 4M, a spadek w 12M, oraz spadek IL-6 w 4M, który dalej utrzymywał się na stałym poziomie) niż po podaniu LPS (wzrost IL-1 β w 4M, spadek IL-1 β w 8M, spadek IL-6 w 4M, oraz pogłębiający się spadek IL-6 w 8M). Co więcej, obniżony poziom IL-1 β w 12M WD był nadal wyższy względem dopasowanej wiekowo kontroli niż obniżony poziom IL-1 β w grupie 12M LPS, który wyrównał się z poziomem tej cytokiny w kontroli dopasowanej wiekowo. Co więcej, w grupie zwierząt utrzymywanych na diecie zachodniej w wieku 12M zaobserwowano spadek poziomu TLR4, co może świadczyć o włączeniu się mechanizmów obronnych przed chronicznie utrzymującym się stanem zapalnym, gdyż wyłączenie możliwości aktywacji receptora TLR4 skutkuje zahamowaniem syntezy IL-1 β . Natomiast analizując wpływ badanych czynników na poziom cytokin w korze śródwęchowej, zaobserwowano spadek IL-6 oraz wzrost IL-1 β w wieku 12M pod wpływem zarówno WD jak i LPS, natomiast wzrost IL-1 β pod wpływem WD był zdecydowanie wyższy niż wywołany iniekcją LPS.



Rycina 25. Wykresy przedstawiające liniową zależność zmian poziomów IL-6, IL-1 β i TLR4 w hipokampie i korze śródwęchowej myszy APPsw w grupach WD (pomarańczowy), LPS (niebieski) i WD+LPS (zielony) względem CTR (szary). Za pomocą szarych obszarów zaznaczono zakresy norm dla grup CTR, wyznaczone za pomocą odchyłeń standardowych dla średnich arytmetycznych (użyto tych samych danych co na Rycinach 12 i 13W).

4.6. Wpływ WD i LPS na markery charakterystyczne dla AD

4.6.1. Gromadzenie się amyloidu β i tworzenie blaszek starczych w mózgu

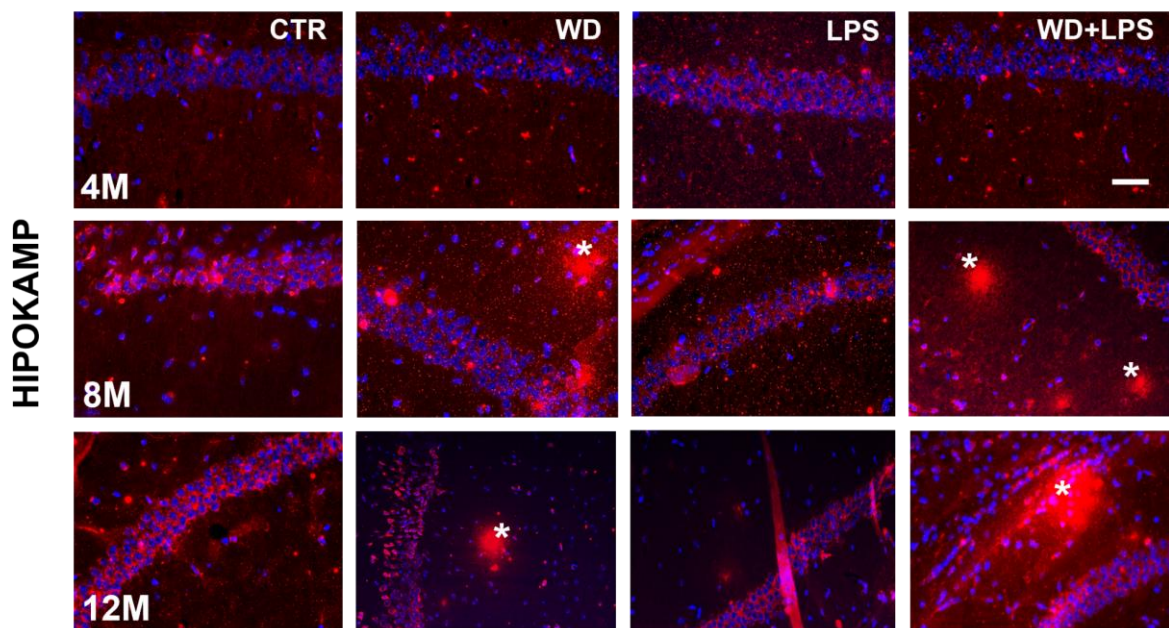
Następnie zbadano, jaki jest wpływ WD oraz LPS na tworzenie się blaszek amyloidu β ($A\beta$). W tym celu przeprowadzono jakościową analizę tkanki mózgu myszy APPswe metodą immunofluorescencyjnego znakowania $A\beta$ (6E10) w hipokampie oraz korze śródwęchowej.

Analiza znakowania tkanki mózgowej kontrolnych myszy APPswe utrzymywanych na diecie standardowej i nie otrzymujących iniekcji LPS wykazała, że typowe płytki amyloidowe pojawiają się u tych myszy w wieku 16 miesięcy i są obecne zarówno w hipokampie, jak i w korze śródwęchowej (**Rycina 26a B: CTR** oraz **Rycina 26b D: CTR**).

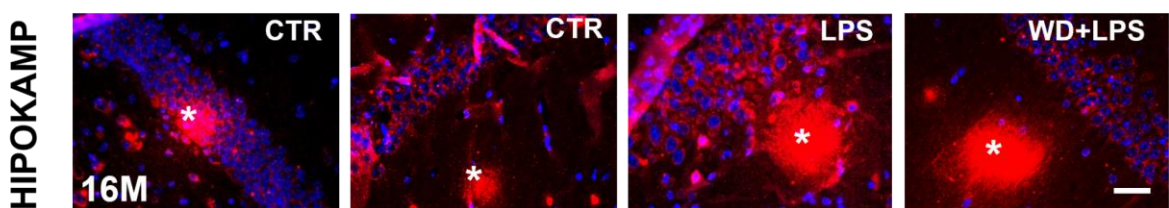
Analiza jakościowa znakowania 6E10 w hipokampie myszy karmionych WD wykazała tworzenie się blaszek $A\beta$ już po 5 miesiącach od wprowadzenia diety. Płytki $A\beta$ zostały wykryte w hipokampie myszy WD i WD+LPS w wieku 8M i 12M (**Rycina 26a A: 8M, 12M**). U myszy z iniekcją LPS blaszki $A\beta$ wykryto dopiero po osiągnięciu przez zwierzęta wieku 16 miesięcy, tak jak u zwierząt nietraktowanych (**Rycina 26a B: LPS**). Z powodu szczególnie wysokiej śmiertelności wśród starych zwierząt karmionych WD, żadne zwierzę w grupie WD nie osiągnęło 16 miesiąca życia, ale niektóre myszy w grupie WD+LPS przeżyły, prezentując akumulację blaszek $A\beta$ w hipokampie (**Rycina 26a A: WD+LPS**). W porównaniu z kontrolnymi myszami APPswe utrzymywanymi na diecie standardowej, u których blaszki amyloidowe zaczęły być wykrywane w wieku 16 miesięcy, WD przyspieszyło akumulację $A\beta$ i tworzenie blaszek w hipokampie o 8 miesięcy.

Analiza jakościowa znakowania 6E10 w korze śródwęchowej myszy karmionych dietą zachodnią wykazała tworzenie się blaszek $A\beta$ po 9 miesiącach od wprowadzenia diety. Płytki $A\beta$ zostały wykryte w hipokampie myszy APPswe w grupach WD i WD+LPS w wieku 12M (**Rycina 26b C: 12M**). U myszy z iniekcją LPS blaszki $A\beta$ wykryto dopiero po osiągnięciu przez zwierzęta wieku 16 miesięcy, tak jak u zwierząt nietraktowanych (**Rycina 26b D: LPS**). Jak opisano wcześniej, z powodu szczególnie wysokiej śmiertelności wśród starych zwierząt karmionych WD, żadne zwierzę w grupie WD nie osiągnęło 16 miesiąca życia, natomiast niektóre myszy w grupie WD+LPS przeżyły, prezentując akumulację blaszek $A\beta$ w korze śródwęchowej (**Rycina 26b D: WD+LPS**). W porównaniu z myszami APPswe kontrolnymi, u których w korze śródwęchowej blaszki amyloidowe zaczęły być wykrywane w wieku 16 miesięcy, WD przyspieszyło akumulację $A\beta$ i tworzenie blaszek w korze śródwęchowej o 4 miesiące.

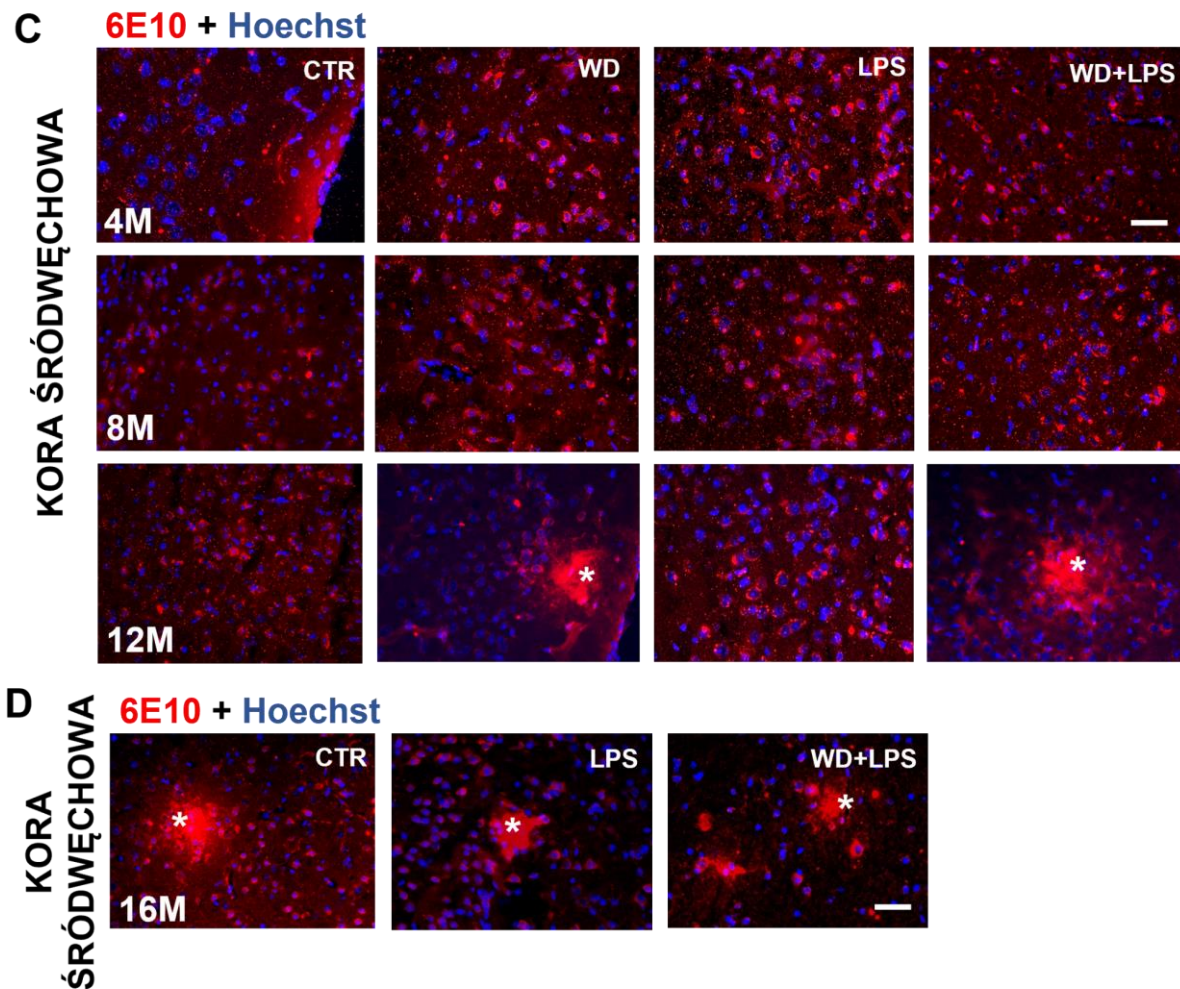
A 6E10 + Hoechst



B 6E10 + Hoechst



Rycina 26a. Wpływ WD i iniekcji LPS na tworzenie się płytek A β . Rycina przedstawia mikrofotografie immunofluorescencyjnego znakowania przeciwciałem anti-A β 6E10 tkanki hipokampa cztero-, ośmio- i dwunastomiesięcznych myszy APPswe (4M, 8M, 12M) znakowanych przeciwciałem anti-A β 6E10. (A) Mikrofotografie pokazują tworzenie się płytek A β (*) w hipokampie już u ośmiomiesięcznych myszy APPswe karmionych dietą zachodnią (grupy WD i WD+LPS). W hipokampie myszy kontrolnych (CTR) i z iniekcją LPS (LPS) płytek A β nie obserwowano nawet w wieku 12 miesięcy (A), natomiast wykrywano je dopiero w grupie myszy w wieku 16 miesięcy (B).

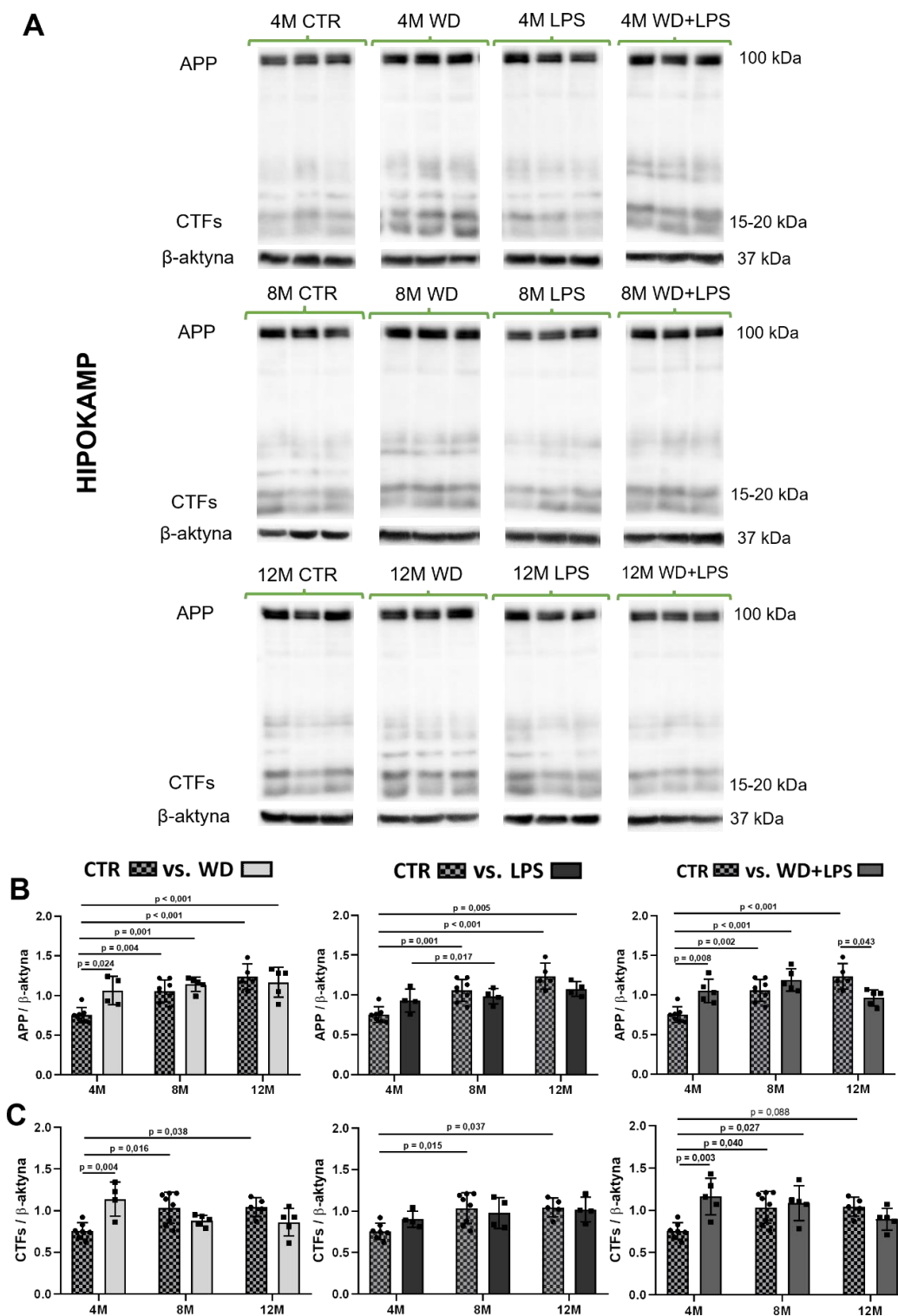


Rycina 26b. Wpływ WD i iniekcji LPS na tworzenie się płytek A β . Rycina przedstawia mikrofotografie immunofluorescencyjnego znakowania przeciwciałem anti-A β 6E10 tkanki kory śródwęchowej cztero-, ośmio- i dwunastomiesięcznych myszy APP sw (4M, 8M, 12M). (C) Mikrofotografie pokazują tworzenie się płytek A β (*) w korze śródwęchowej u dwunastomiesięcznych myszy APP sw karmionych dietą zachodnią (grupy WD i WD+LPS). (C) W korze śródwęchowej myszy kontrolnych (CTR) i z iniekcją LPS (LPS) płytek A β nie obserwowano nawet w wieku 12 miesięcy (C), natomiast wykrywano je dopiero w grupie myszy w wieku 16 miesięcy (D). Pasek skali odpowiada 50 μ m, powiększenie obiektywu x20; czerwona fluorescencja - 6E10 (barwienie amyloidem- β), niebieska fluorescencja - Hoechst (jądra).

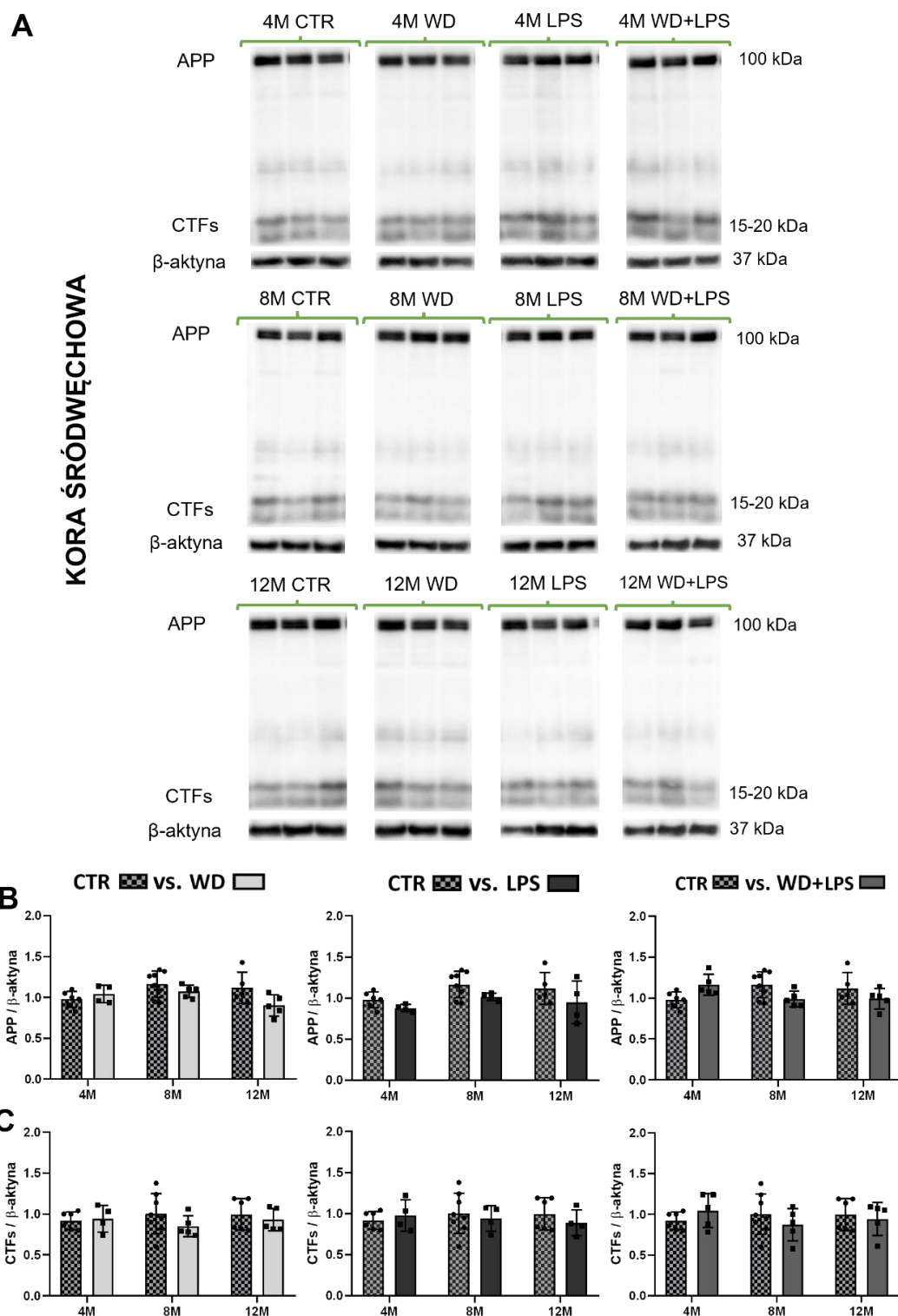
Następnie, biorąc pod uwagę zaobserwowane przyspieszenie powstawania płytek A β zarówno w hipokampie jak i korze śródwęchowej pod wpływem WD, dokonano analizy poziomu białka prekursorowego amyloidu (APP), z którego są generowane peptydy A β w szlaku amyloidogennym i odkładane w postaci blaszek (Sasaguri i in., 2017). Jak opisano to we Wstępie (Rycina 4), u osób zdrowych większość APP jest konstytutywnie rozszczepiana przez α -sekretazę, tworząc rozpuszczalną ektodomenę APP (sAPP α) oraz skrócony C-końcowy peptyd (CTF- α /C-83). W szlaku amyloidogennym w AD APP jest proteolizowany przez β -sekretazę (BACE-1) tworząc związany z błoną fragment C-terminalny (CTF- β /C-99), który jest dalej rozszczepiany przez γ -sekretazę prowadząc do produkcji A β i tworzenia blaszek amyloidowych (Rycina 4).

Analiza APP i CTFs (CTF- α + CTF- β) za pomocą metody Western blotting wykazała, że 3 tygodnie karmienia WD istotnie zwiększyły w hipokampie poziom białka APP (**Rycina 27**, panel CTR vs. WD APP oraz CTR vs. WD+LPS, forma długa 4M, **Tabela 21**), oraz jego CTFs (**Rycina 27**, panel CTR vs. WD APP pełna forma oraz CTR vs. WD+LPS CTFs 4M, **Tabela 21**), wskazując na zwiększony poziom proteolizy APP. U myszy karmionych dietą zachodnią procesy te obserwowano 4 miesiące wcześniej niż u myszy karmionych standardową dietą. W przypadku grup z iniekcją LPS w żadnej z grup wiekowych nie zaobserwowano istotnego wpływu traktowania na zwiększenie poziomów zarówno APP pełnej formy, jak i CTFs w hipokampie (**Rycina 27**, panel CTR vs. LPS APP pełna forma oraz panel CTR vs. LPS CTFs).

Analiza poziomu APP i jego C-końcowych fragmentów CTFs w korze śródwęchowej nie wykazała istotnego wpływu ani WD, ani iniekcji LPS na zwiększenie poziomów zarówno APP pełnej formy jak i CTFs w żadnej z grup wiekowych (**Rycina 28**, **Tabela 22**). Natomiast zauważono różnice w poziomach APP i jego C-końcowych fragmentów CTFs pomiędzy hipokampem i korą śródwęchową u młodych czteromiesięcznych nietraktowanych myszy APPsw: zaobserwowano bowiem, że w 4M CTR poziom zarówno długiej formy APP jak i CTFs były większe w korze śródwęchowej w porównaniu do hipokampa (**Rycina 29**). Sugeruje to, że pod wpływem obecności transgeny procesy związane ze zwiększoną ekspresją APP i proteolizą tego białka zaczynają się wcześniej w korze śródwęchowej, niż w hipokampie, a WD prowadzi do wyrównania progresji tych procesów w czasie życia zwierząt.



Rycina 27. (A) Przykładowe immunobloty analizy densytometrycznej białka prekursorowego amyloidu – APP (100 kDa) oraz jego krótkich fragmentów odciętych od strony C-końca – CTFs (15-20 kDa) w hipokampie. Wpływ WD i iniekcji LPS na poziom (B) APP i (C) CTFs w hipokampie myszy z grup WD, LPS i WD+LPS, w wieku 4, 8 i 12 miesięcy (4M, 8M, 12M) w porównanych do kontroli (CTR) bez iniekcji LPS utrzymywanych na diecie standardowej, wykrytych za pomocą metody immunoblottingu. Dane liczbowe przedstawiono za pomocą średniej arytmetycznej ± odchylenie standardowe (n = od 4 do 8 zwierząt na grupę doświadczalną; kropki i kwadraty przedstawiają wartości dla pojedynczych osobników). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego. Wartości $p < 0,05$ uznano za z górny próg dla istotności statystycznej (pogrubiona czcionka), natomiast wartości p mieszczące się w przedziale $0,1 < p \leq 0,05$ uznano jako tendencję (czcionka bez pogrubienia).



Rycina 28. (A) Przykładowe immunobloty analizy densytometrycznej białka prekursorowego amyloidu – APP (100 kDa) oraz jego krótkich fragmentów odciętych od strony C-końca – CTFs (15-20 kDa) w korze śródwęchowej. Wpływ WD i iniekcji LPS na poziom (B) APP i (C) CTFs w korze śródwęchowej myszy z grup WD, LPS i WD+LPS, w wieku 4, 8 i 12 miesięcy (4M, 8M, 12M) w porównanych do kontroli (CTR) bez iniekcji LPS utrzymywanych na diecie standardowej, wykrytych za pomocą metody immunoblottingu. Dane liczbowe przedstawiono za pomocą średniej arytmetycznej \pm odchylenie standardowe ($n =$ od 4 do 8 zwierząt na grupę doświadczalną; kropki i kwadraty przedstawiają wartości dla pojedynczych osobników). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego. Wartości $p < 0,05$ uznano za z górny próg dla istotności statystycznej (pogrubiona czcionka), natomiast wartości p mieszczące się w przedziale $0,1 < p \leq 0,05$ uznano jako tendencję (czcionka bez pogrubienia).

Tabela 21. Wyniki analizy ANOVA dwuczynnikowa, będące uzupełnieniem **Ryciny 27**.

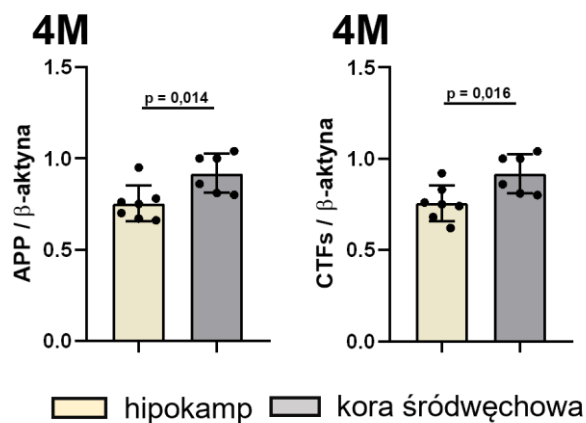
Hipokamp	CTR vs. WD			CTR vs. LPS			CTR vs. WD+LPS		
	wiek	WD	interakcja	wiek	LPS	interakcja	wiek	WD+LPS	interakcja
Marker									
APP	p < 0,001	p = 0,039	p = 0,019	p < 0,001	NS	p = 0,016	p < 0,001	NS	p < 0,001
CTFs	NS	NS	p < 0,001	p = 0,009	NS	NS	NS	NS	p = 0,002

NS – brak istotnych różnic

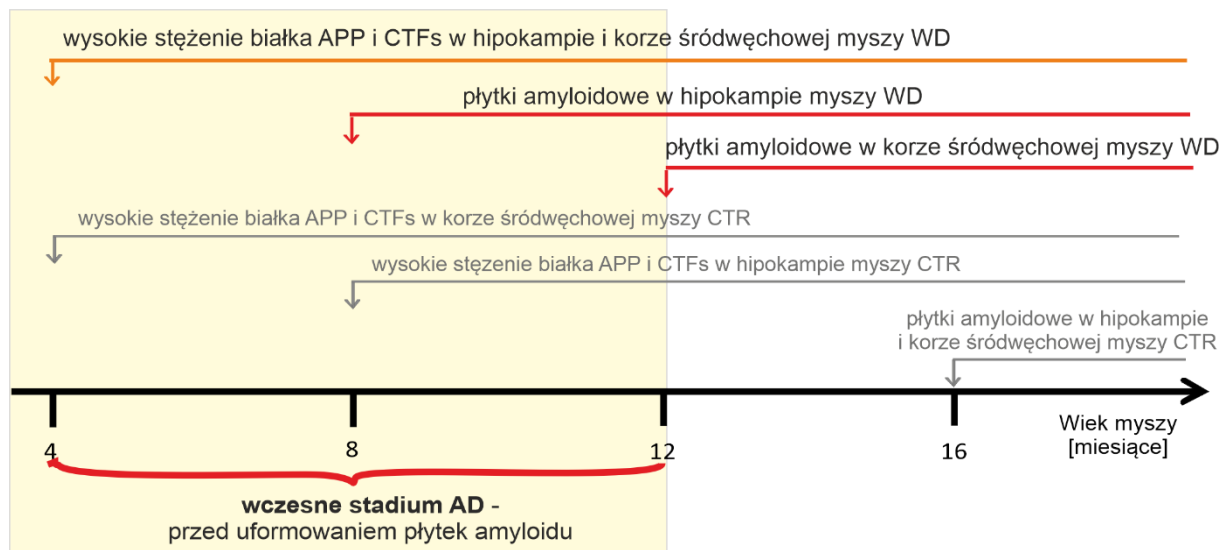
Tabela 22. Wyniki analizy ANOVA dwuczynnikowa, będące uzupełnieniem **Ryciny 28**.

Kora śródwęchowa	CTR vs. WD			CTR vs. LPS			CTR vs. WD+LPS		
	wiek	WD	interakcja	wiek	LPS	interakcja	wiek	WD+LPS	interakcja
Marker									
APP	NS	NS	NS	NS	p = 0,021	NS	NS	NS	p = 0,010
CTFs	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS – brak istotnych różnic



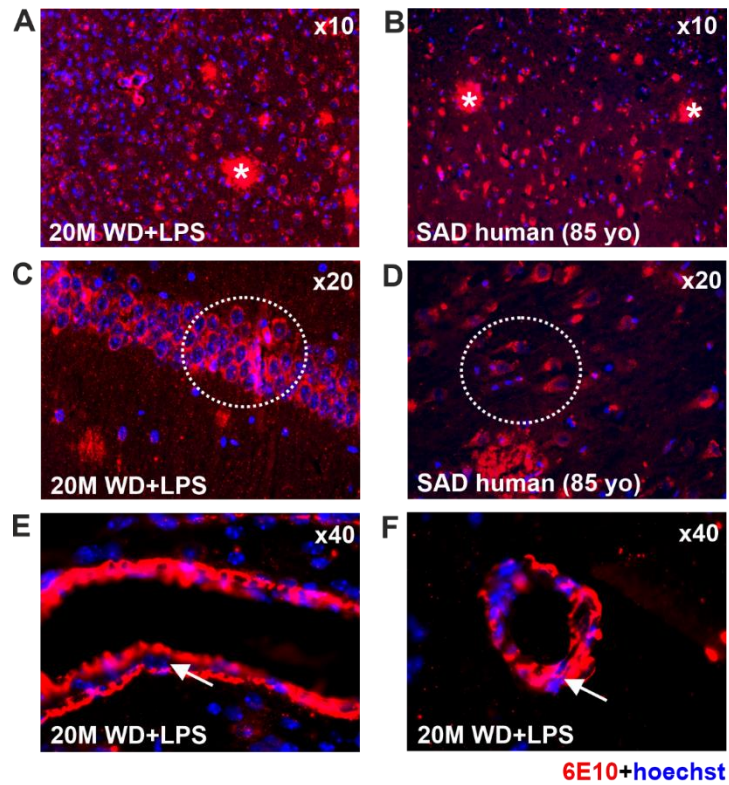
Rycina 29. Różnice w poziomach białka prekursora amyloidu - APP oraz produktów jego proteolizy od C-końca - CTFs pomiędzy hipokampem, a korą śródwęchową u młodych, czteromiesięcznych myszy APPswe (4M). Dane liczbowe przedstawiono za pomocą średniej arytmetycznej ± odchylenie standardowe (n = od 6 do 7 zwierząt na grupę doświadczalną; kropki przedstawiają wartości dla pojedynczych osobników). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu Studenta z testem post-hoc Bonferroniego.



Rycina 30. Schemat przedstawiający przyspieszenie procesów amyloidogenezy pod wpływem WD w hipokampie i korze śródwęchowej w modelu myszy APPswe. CTR - myszy kontrolne APPswe karmione dietą standardową bez iniekcji LPS. Na szaro zaznaczono kolejność procesów przebiegających w CTR.

Uzyskane dane sugerują, że karmienie dietą zachodnią może wpływać na transkrypcję genu *APP* i oddziałuje na aktywność sekretaz odcinających C-końcowe fragmenty APP. Poza tym WD rozregulowuje także aktywność komórek glejowych prowadząc do zaburzenia efektywnego oczyszczania tkanki (*klirens*) z $A\beta$. W konsekwencji prowadzi to do jego akumulacji, co skutkuje przyspieszonym o 8 miesięcy tworzeniem się blaszki amyloidowej względem kontroli w hipokampie, a o 4 miesiące w korze śródwęchowej (**Rycina 30**).

W kolejnym etapie porównano wzór znakowania przeciwciałem 6E10 w tkance hipokampa myszy APPswe karmionej WD (WD+LPS 20M) ze wzorem znakowania tego samego przeciwciała w tkance mózgowej *post mortem* 85-letniego ludzkiego pacjenta, u którego zdiagnozowano SAD (**Rycina 31**). Zaobserwowano, że długotrwałe karmienie WD (17 miesięcy) doprowadziło do rozwoju zmian neuropatologicznych związanych z wysoce zaawansowaną amyloidopatią, wyglądającą analogicznie do obserwowanej w mózgu pacjenta z SAD. Wykazano bowiem obecność analogicznie wyglądające rozległe płytki $A\beta$ (**Rycina 31 A vs. B** linia kropkowana), nie zagregowany $A\beta$ w cytoplazmie neuronów hipokampa (**Rycina 31 C vs. D** *) zarówno w hipokampie myszy APPswe jak i hipokampie pacjenta SAD, oraz obecność mózgowej angiopatii amyloidowej w hipokampie myszy APPswe (**Rycina 31 E, F** strzałki). Obserwacje te sugerują, że zastosowany w badaniu model patologii amyloidu zintensyfikowanej pod wpływem WD może być użytecznym narzędziem do przyszłych badań nad udziałem czynników metabolicznych i procesów obwodowych w rozwoju i progresji AD.



Rycina 31. Amyloidopatia w hipokampie myszy APP^{swE} karmionych WD (grupa WD+LPS) porównana do hipokampa pacjenta ze sporadyczną AD (SAD). Mikrofotografie pokazują znakowanie immunofluorescencyjne A β (6E10) w tkance hipokampa: (A, C, E, F) dwudziestomiesięcznych myszy APP z grupy WD+LPS (karmionych WD i traktowanych LPS) w porównaniu z (B, D) tkanką hipokampa pacjenta ze sporadyczną chorobą Alzheimera (SAD). (A, B) - powiększenie obiektywu x10, (C, D) - powiększenie obiektywu x20, (E, F) - powiększenie obiektywu x40. W (A, B) występowanie blaszek A β zaznaczono *, w (C, D) linią kropkowaną zaznaczono nie zagregowany A β w cytoplazmie neuronów hipokampa. Dodatkowo, w (E, F) mózgową angiopatię amyloidową w mózgu myszy jest wskazana strzałkami; fluorescencja czerwona - 6E10 (A β), fluorescencja niebieska - hoechst (jądra).

4.6.2. Fosforylacja białka Tau oraz morfologia cytoszkieletu neuronów

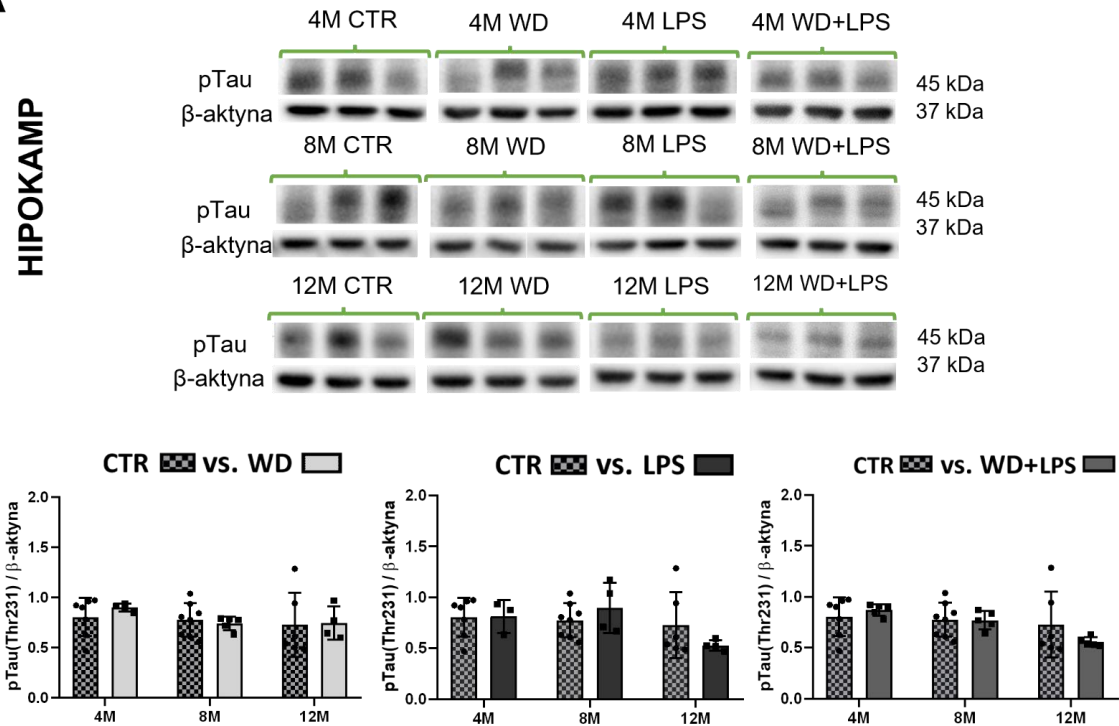
W kolejnym etapie przeprowadzono analizę białka tau, które obok amyloidu jest drugim charakterystycznym markerem dla rozwoju patologii AD. W stanie fizjologicznym tau należy do grupy białek związanych z mikrotubulami i bierze udział w stabilizacji cytoszkieletu komórkowego. Modyfikacje potranslacyjne białka tau, w tym szczególnie nadmierna fosforylacja, powodują utratę jego funkcji. Nadmiernie fosforylowane tau oddysocjowuje od kompleksu białek związanych z tubuliną, co prowadzi do destabilizacji cytoszkieletu komórkowego, do upośledzenia procesów transportu wewnątrzkomórkowego i stopniowego zamierania neuronu, a w konsekwencji - upośledzenia funkcji poznawczych. Nadmiernie fosforylowane cząsteczki białka tau mają silną skłonność do agregacji, tworząc charakterystyczne złoże wewnątrzkomórkowe, tzw. sploty neurofibrylarne (NTF). Cząsteczka białka tau posiada 441 aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym i posiada wiele miejsc, do których wiążą się grupy fosforanowe w procesie fosforylacji. Wiele z tych miejsc fosforylacji jest opisywanych jako typowe dla tauopatii w procesie AD. W niniejszej pracy analizowano wpływ dieto-pochodnych zaburzeń metabolicznych na poziom fosforylacji białka tau w miejscu treoniny 231 - pTau(Thr231). To miejsce fosforylacji jest jednym z powszechnie uznanych markerów diagnostycznych dla AD, a poziomy pTau(Thr231) zmieniają się zarówno w mózgu jak i płynie mózgowo-rdzeniowym w zależności od stadium choroby (Ashton i in., 2021). Stosowany przez nas myszy model AD – myszy APP^{swe} posiadają podwójną mutację w genie kodującym białko prekursorowe amyloidu (APP) i dostępne obecnie dane na temat charakterystyki tego modelu nie uwzględniają informacji, o czy w przebiegu patologii zaindukowanej nadekspresją ludzkiego APP zachodzą jakiegokolwiek zmiany w zakresie patologii białka tau. Dostępna na stronie internetowej hodowli źródłowej myszy APP^{swe} (Taconic Biosciences), schematycznie przedstawiona charakterystyka fenotypowa opracowana na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań z wykorzystaniem tego modelu (Tg2576, APP^{swe}, #1349) określa jedynie, że nie stwierdzono w tym modelu występowania splątków neurofibrylarnych (linki źródłowe do charakterystyki modelu znajdują się w rozdziale “Materiały i Metody”).

Na potrzeby niniejszej pracy w celu właściwego odniesienia wyników otrzymanych z zastosowaniem diety WD i czynnika infekcyjnego – LPS, przeprowadzono fenotypowanie tego modelu pod względem fosforylacji pTau(Thr231). Zarówno w hipokampie, jak i korze śródwęchowej nie wykazano istotnych zmian w poziomie izoformy pTau(Thr231) u kontrolnych myszy APP^{swe} (CTR) (**Tabela 23**). Co więcej, analiza post-hoc wykazała brak różnic w poziomie tego białka w hipokampie bez względu na zastosowany czynnik doświadczalny (**Rycina 32a A**, panel CTR vs. WD, CTR vs. LPS, CTR vs. WD+LPS). W przypadku analizy pTau(Thr231) w korze śródwęchowej analiza post-hoc ujawniła tendencję wzrostową poziomu pTau(Thr231) zarówno pod wpływem WD, jak i LPS u czteromiesięcznych myszy (**Rycina 33 A**, panel CTR vs. WD: 4M, CTR vs. LPS: 4M, CTR vs. WD+LPS: 4M). Co ciekawe, w grupach wiekowych 8M i 12M utrzymywanych na diecie WD poziom pTau(Thr231) istotnie spadał w porównaniu do grupy 4M (**Rycina 33 A**, panel CTR vs. WD: 8M, 12M, CTR vs. WD+LPS: 8M, 12M). W grupach otrzymujących LPS, w wieku 8M i 12M także zaobserwowano spadek poziomu pTau(Thr231) względem grupy 4M, natomiast w tym przypadku różnice wartości nie wykazały znamienności statystycznej (**Rycina 33 A**, panel CTR vs. LPS: 8M

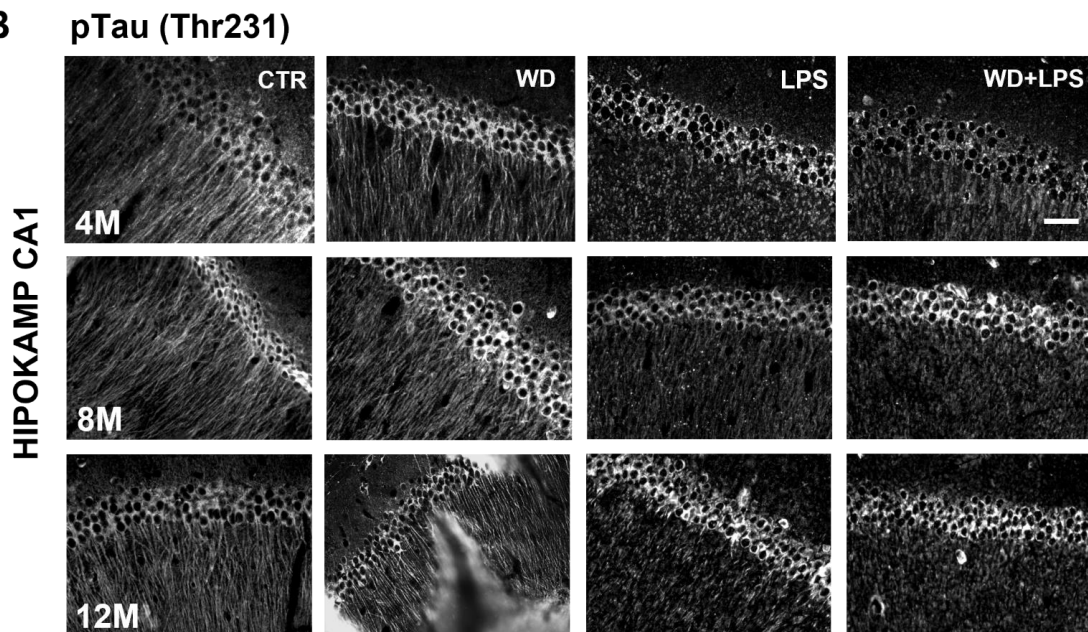
i 12M). Natomiast wyniki analizy ANOVA przypisują obserwowane zmiany wpływowi czynnika wieku, nie traktowania (**Tabela 23**: kora śródwęchowa).

Biorąc pod uwagę dużą zmienność osobniczą w poziomie pTau(Thr231) oraz brak znamienności statystycznych w analizie wpływu zastosowanego czynnika, w kolejnym kroku zdecydowano się przyjrzeć wzorcowi znakowania immunofluorescencyjnego pTau(Thr231) w preparatach mikroskopowych tkanki mózgu. Analizę jakościową przeprowadzono w różnych obszarach hipokampa oraz korze śródwęchowej. Analiza wykazała zmiany w poziomie intensywności znakowania pTau(Thr231) w zależności od analizowanego obszaru. Po 3 tygodniach WD spowodowała wzrost intensywności fluorescencji w neuronach formacji CA3 oraz zakrętu zębatego (DG) u czteromiesięcznych myszy APPswe (4M WD w porównaniu do grupy kontrolnej (4M CTR) bez widocznych zmian w morfologii cytoszkieletu neuronów (**Rycina 32a B i 32b C, D** 4M: WD i WD+LPS). Wzorzec ten utrzymywał się wraz z wydłużającym się okresem karmienia (**Rycina 32a B i 32b C, D** 8M: WD oraz 12M: WD). Iniekcja LPS, oprócz wzrostu intensywności fluorescencji w neuronach formacji CA3 oraz zakrętu zębatego (DG), powodowała widoczną w obrazie mikroskopowym destabilizację aparatu mikrotubularnego i uszkodzenie cytoszkieletu komórkowego, widoczne na przebiegu wypustek nerwowych neuronów piramidalnych hipokampa formacji CA1, już w najmłodszej grupie wiekowej 4M LPS (**Rycina 32a B i 32b C, D** LPS: 4M, 8M, 12M). Zmiany wskazujące na destabilizację aparatu mikrotubularnego zaobserwowano także w obszarze CA1 w grupach myszy WD+LPS w wieku 4M, 8M i 12M (**Rycina 32a B**, WD+LPS: 8M, 12M). Analiza kory śródwęchowej wykazała wzrost intensywności fluorescencji w neuronach czteromiesięcznych myszy pod wpływem WD w porównaniu do odpowiedniej grupy kontrolnej CTR, również bez widocznych zmian w morfologii cytoszkieletu neuronów (**Rycina 33 B**, 4M: WD). Co ciekawe, w korze wraz z wydłużającym się okresem karmienia obserwowano spadek intensywności znakowania pTau(Thr231) (**Rycina 33 B**, 8M: WD oraz 12M: WD). Iniekcja LPS wywołała zarówno wzrost intensywności znakowania pTau(Thr231), jak i uszkodzenie cytoszkieletu w korze śródwęchowej myszy 4M (**Rycina 33 B**, 4M: LPS, WD+LPS), natomiast w grupie LPS 12M nie zaobserwowano zaburzenia aparatu mikrotubularnego, co może świadczyć o zróżnicowanej wrażliwości osobniczej na poddane traktowanie (**Rycina 33 B**, 12M: LPS). Natomiast w grupach wiekowych 8M i 12M z iniekcją LPS intensywność fluorescencji znakowania pTau(Thr231) spadała (**Rycina 33 B**, 8M: LPS, WD+LPS, 12M: LPS, WD+LPS).

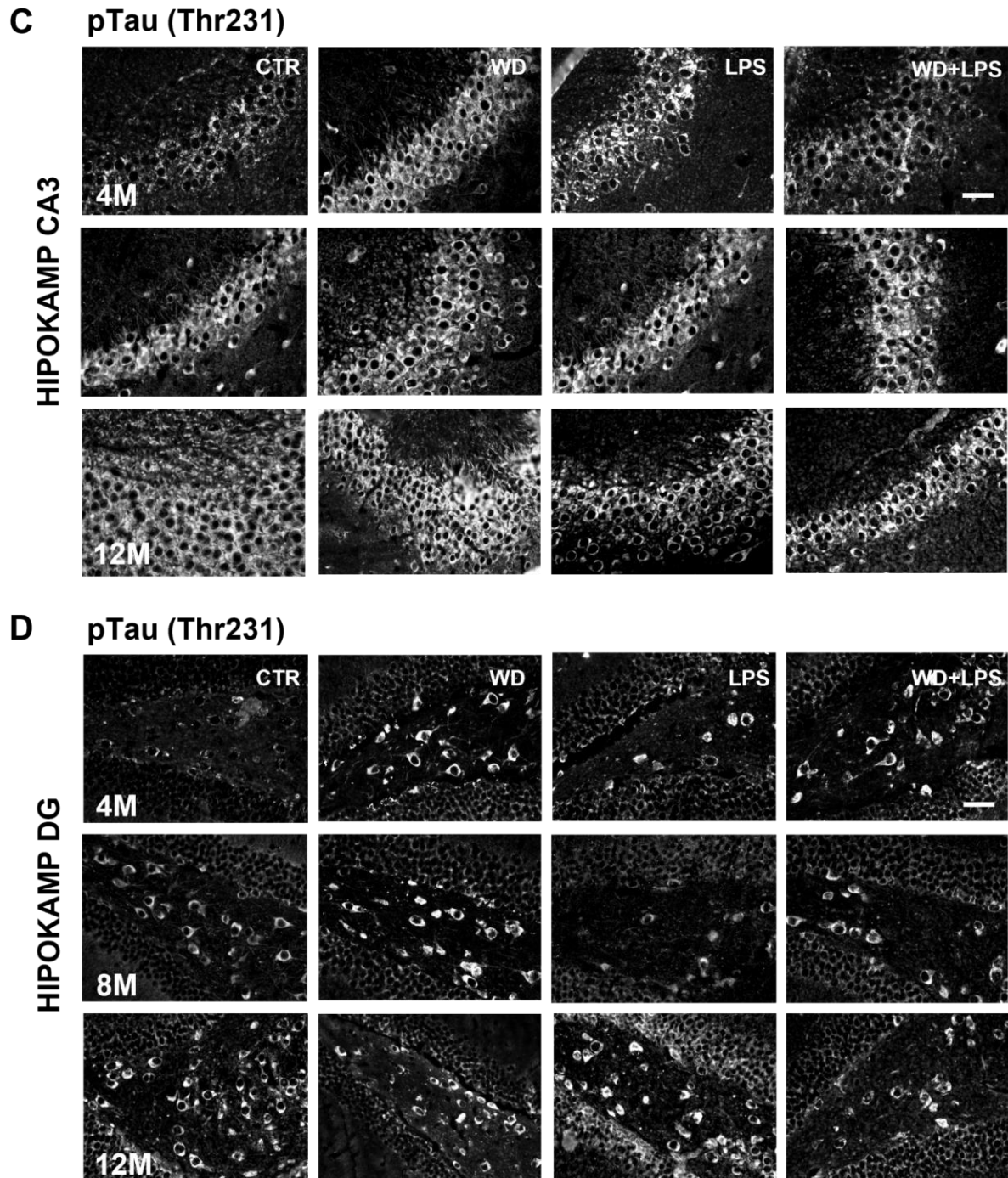
A



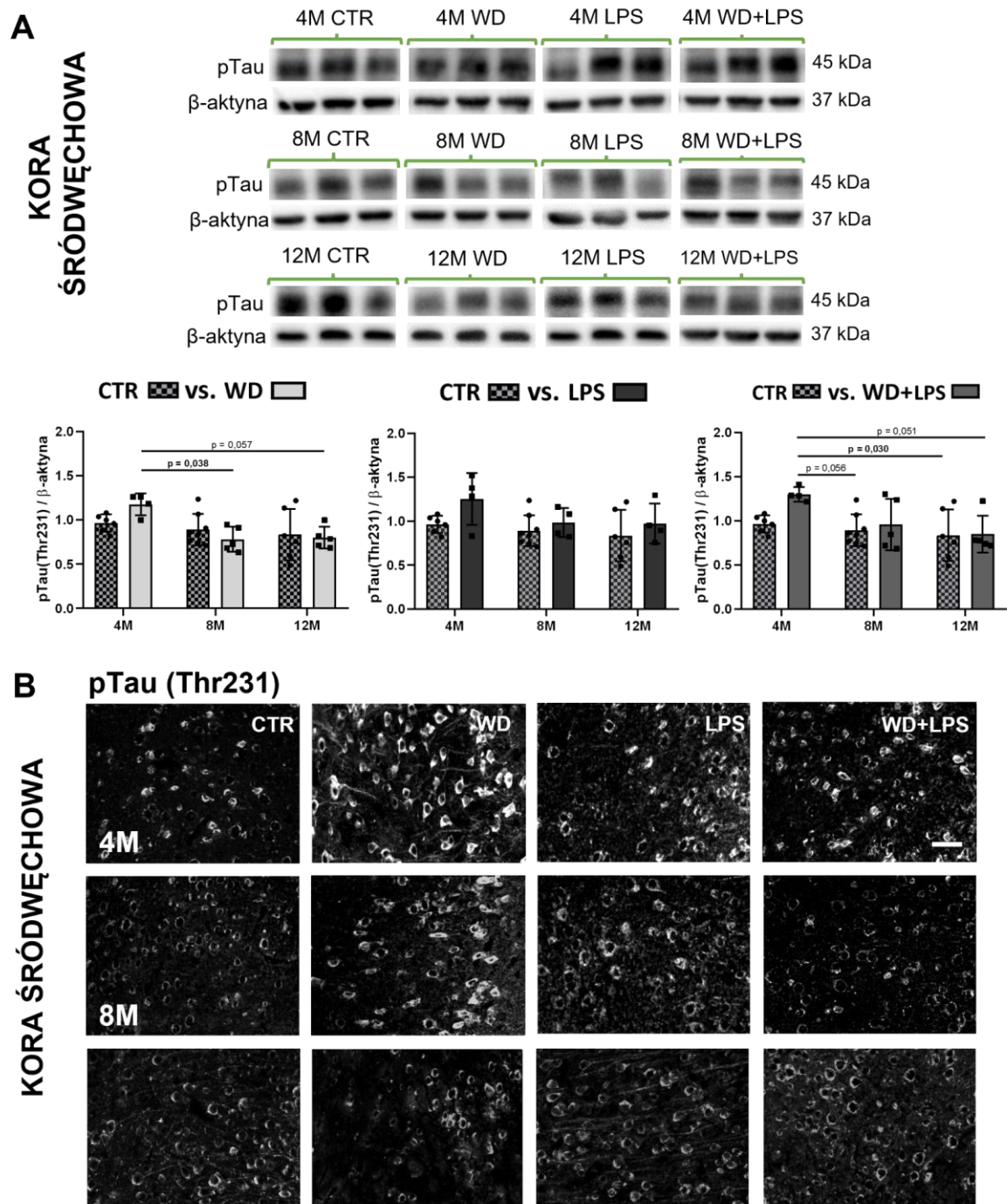
B



Rycina 32a. (A) Wpływ WD oraz iniekcji LPS na poziom fosforylowanej formy białka tau pTau(Thr231) w hipokampie myszy z grup WD, LPS i WD+LPS, w wieku 4, 8 i 12 miesięcy (4M, 8M, 12M) w porównanych do kontroli (CTR) bez iniekcji LPS utrzymywanych na diecie standardowej, wykrytych za pomocą metody immunoblottingu. Dane liczbowe przedstawiono za pomocą średniej arytmetycznej \pm odchylenie standardowe ($n =$ od 4 do 8 zwierząt na grupę doświadczalną; kropki i kwadraty przedstawiają wartości dla pojedynczych osobników). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego.



Rycina 32b. (B-D). Mikrofotografie przedstawiające znakowanie immunofluorescencyjne białka pTau(Thr231) w poszczególnych obszarach hipokampa: pole CA1 (B), pole CA3 (C), zakręt zębaty – DG (D) myszy APPswe w grupach CTR, WD, LPS oraz WD+LPS w wieku 4M, 8M, 12M. Skala = 50 μ m; powiększenie x20; czerwona fluorescencja -pTau(Thr231), niebieska fluorescencja – hoechst (jądra).

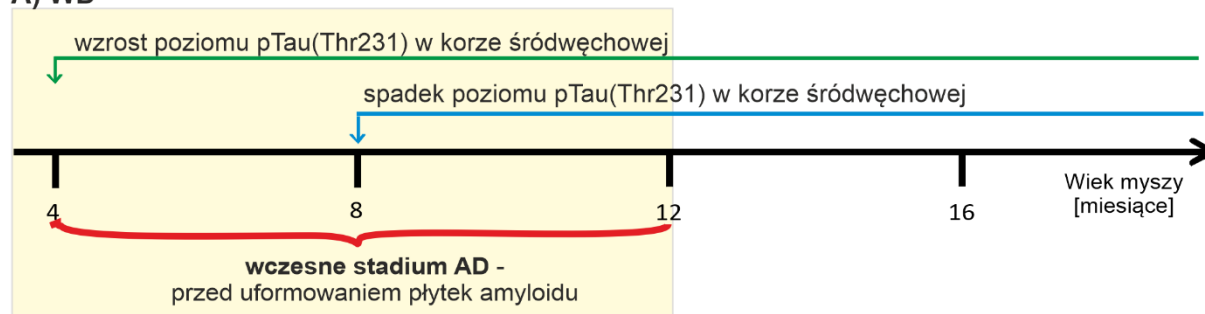
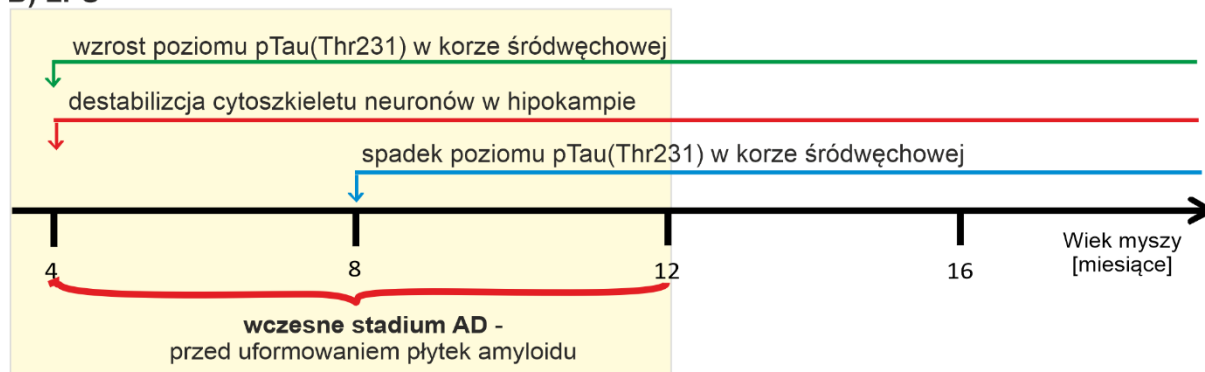


Rycina 33. (A) Wpływ WD oraz iniekcji LPS na poziom fosforylowanej formy białka tau pTau(Thr231) w korze śródwęchowej myszy z grup WD, LPS i WD+LPS, w wieku 4, 8 i 12 miesięcy (4M, 8M, 12M) w porównanych do kontroli (CTR) bez iniekcji LPS utrzymywanych na diecie standardowej, wykrytych za pomocą metody immunoblottingu. Dane liczbowe przedstawiono za pomocą średniej arytmetycznej \pm odchylenie standardowe (n = od 4 do 8 zwierząt na grupę doświadczalną; kropki i kwadraty przedstawiają wartości dla pojedynczych osobników). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy ANOVA z testem post-hoc Bonferroni. Wartości $p < 0,05$ uznano za z górny próg dla istotności statystycznej (pogrubiona czcionka), natomiast wartości p mieszczące się w przedziale $0,1 < p \leq 0,05$ uznano jako tendencję (czcionka bez pogrubienia). **(B)** Mikrofotografie przedstawiające znakowanie immunofluorescencyjne białka pTau(Thr231) w korze śródwęchowej myszy APP^{sw}e w grupach CTR, WD, LPS oraz WD+LPS w wieku 4M, 8M, 12M. Skala = 50 μ m; powiększenie x20; czerwona fluorescencja -pTau(Thr231), niebieska fluorescencja – hoechst (jądra).

Tabela 23. Wyniki analizy ANOVA dwuczynnikowa, będące uzupełnieniem **Rycin 32 i 33**.

pTau(Thr231)	CTR vs. WD			CTR vs. LPS			CTR vs. WD+LPS		
Marker	wiek	WD	interakcja	wiek	LPS	interakcja	wiek	WD+LPS	interakcja
Hipokamp	NS	NS	NS	p = 0,038	NS	NS	p = 0,005	NS	NS
Kora śródwęchowa	p = 0,005	NS	NS	p = 0,037	NS	NS	p = 0,013	NS	NS

NS – brak istotnych różnic

A) WD**B) LPS****Rycina 34.** Chronologia zaobserwowanych zmian związanych z białkiem tau fosforylowanym na Thr231 wywołanych A) stosowaniem WD i B) podaniem LPS w hipokampie i korze śródwęchowej myszy APPswe.

Podsumowując uzyskane wyniki półilościowej analizy białka tau fosforylowanego na treoninie 231 u myszy APPswe karmionych dietą standardową wykazały, że poziom tego białka nie zmienia się istotnie zarówno w korze śródwęchowej, jak i hipokampie, natomiast, w korze śródwęchowej zaobserwowano wraz z wiekiem przesunięcie wartości dla poziomu tego białka w dolną granicę zakresu kontrolnego (**Ryciny 32a A i 33 A, Tabela 23**). Ponadto analiza jakościowa w preparatach z hipokampa w obszarze CA1 wykazała zaburzenia cytoszkieletu neuronów pod wpływem działania LPS już po 3 tygodniach od iniekcji, czego nie obserwowano w korze śródwęchowej (**Rycina 34 B**). Zmian takich nie obserwowano także pod wpływem działania WD w obu analizowanych strukturach (**Rycina 34A**), co sugeruje istotną rolę neurozapalenia indukowanego LPS w patogenezie tauopatii i zaburzeniem morfologii neuronów. Zaobserwowano również, że kora śródwęchowa w porównaniu do hipokampa charakteryzuje się wzrostem poziomu fosforylacji białka tau na treoninie 231 pod wpływem obydwu zastosowanych czynników, WD i LPS, 3 tygodnie od rozpoczęcia ekspozycji na te czynniki (**Rycina 34 A i B**). Co ciekawe, z czasem, w starszych grupach poziom ten ulegał normalizacji (**Rycina 33A**), niezależnie od zachowania ciągłości karmienia dietą WD.

4.7. Wpływ WD i LPS na markery neurodegeneracji

4.7.1. Związane z wiekiem zaburzenia parametrów charakteryzujących synapsy i neurony

W kolejnym etapie sprawdzono, jaki wpływ ma dieta zachodnia oraz dootrzewnowa iniekcja LPS na markery neuronalne myszy APPswe. W pierwszej kolejności za pomocą metody Western blotting przeprowadzono analizę białka charakteryzującego gęstość postsynaptyczną - PSD95, które określa strukturalną i funkcjonalną integralność synaps pobudzających (Shao i in., 2011). Dane literaturowe pokazują, że neurotoksyczność wywołana przez A β i p-tau może ostatecznie uszkodzić zakończenia postsynaptyczne powodując zmniejszenie poziomu **PSD95**, i prowadząc w ten sposób do dysfunkcji synaps i zaburzenia przekaźnictwa synaptycznego (Shao i in., 2011). Następnie przeanalizowano marker NeuN, znakujący jądra neuronalne, wykrywalny jedynie w prawidłowych post-mitotycznych neuronach (Choi i in., 2023). Wiadomo, że liczba neuronów hipokampa wybarwionych **NeuN** spada w przebiegu AD zarówno w wyniku procesu neurodegeneracji, jak i zahamowania procesów neurogenyzy (Gonzalez-Rodriguez i in., 2021; Choi i in., 2023). Dodatkowo przeanalizowano także chemokinę **CX3CL1**, znaną także pod nazwą fraktalkina, która jest wytwarzana w neuronach. CX3CL1 początkowo ulega translacji jako białko transbłonowe, ale może być przetwarzana proteolitycznie w celu wytworzenia rozpuszczalnej chemokiny. Wykazano, że CX3CL1 oddziałuje na komórki poprzez swój jedyny receptor CX3CR1, który znajduje się na komórkach mikrogleju w ośrodkowym układzie nerwowym. Chociaż wydaje się, że zarówno związane z błoną, jak i rozpuszczalne formy CX3CL1 wchodzi w interakcje z CX3CR1, różne izoformy CXCL1 wydają się mieć różne zdolności sygnalizacyjne. Uważa się, że dominującą funkcją CX3CL1 w OUN jest zmniejszenie odpowiedzi prozapalnej, a wiele badań wykazało również jej działanie neuroprotektcyjne. Jednak w niektórych przypadkach wydaje się, że CX3CL1 sprzyja neurodegeneracji (Subbarayan i in., 2022).

Analiza lizatów tkankowych z hipokampa kontrolnych myszy APPswe (CTR) wykazała, że pod wpływem starzenia dochodzi do istotnego spadku poziomu PSD95 u myszy w wieku 8M, a obserwowany obniżony poziom utrzymywał się u zwierząt w wieku 12M (**Rycina 35 A, Tabela 24: PSD95**). Dieta zachodnia sama nie wywoływała istotnego wpływu na obniżenie poziomu PSD95 w hipokampie, natomiast zaobserwowano, że wpływ interakcji pomiędzy czynnikiem wieku i karmienia WD utrzymuje się na granicy istotności ($p = 0,085$), co w porównaniach pomiędzy grupami ujawniło się jako obniżony poziom tego białka w grupie WD 12M w porównaniu do grup CTR 4M, WD 4M i WD 8M (**Tabela 24: PSD95, Rycina 35 A, panel CTR vs. WD**). Natomiast zaobserwowano istotny wpływ iniekcji LPS na obniżenie poziomu PSD95 w hipokampie myszy w wieku 8M i 12M (**Tabela 13W: PSD95, Rycina 35 A, panel CTR vs. LPS**).

Analiza hipokampa kontrolnych myszy APPswe wykazała, że pod wpływem starzenia dochodzi również do istotnego spadku poziomu NeuN u myszy w wieku 12M (**Rycina 35 B, Tabela 24: NeuN**). Może to sugerować spadek liczby zdrowych neuronów. Wykazano, że żaden z badanych czynników (ani WD, ani LPS) zastosowany oddzielnie nie wywoływał istotnego wpływu na obniżenie poziomu NeuN w hipokampie (**Tabela 24: NeuN, Rycina 35 B, panel CTR vs. WD, oraz CTR vs. LPS**). Natomiast zaobserwowano istotny wpływ współdziałania obu czynników (WD+LPS) na istotne obniżenie poziomu NeuN w hipokampie u myszy w wieku 8M i 12M (**Tabela 13W: NeuN, Rycina 35 B, panel CTR vs. WD+LPS**).

Wyniki

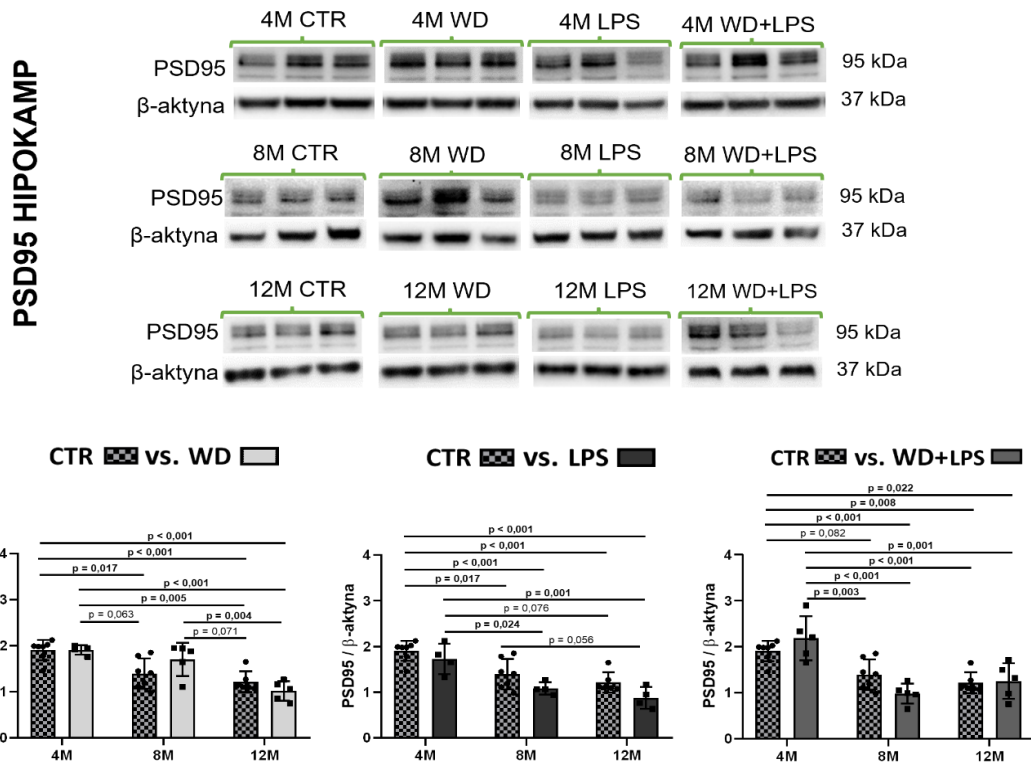
Analiza CX3CL1 w hipokampie wykazała zmianę w składzie izoform CX3CL1 pod wpływem wieku (**Rycina 36**). Zaobserwowano, że w wieku 12M na immunoblotach nie wykrywalne są już izoformy białka CX3CL1 o wielkości 100, 60, 35 i 12 kDa, a wyodrębniła się jeden główny prążek ze zwiększoną siłą sygnału o wielkości 42 kDa w grupach CTR, WD oraz WD+LPS (**Rycina 36 A, B, C, D**). Natomiast w grupie 12M LPS wyodrębniły się dwa prążki odpowiadające masie molekularnej 100 i 42 kDa, o mniejszej sile sygnału (**Rycina 36 D: LPS**).

Analiza kory śródwęchowej u kontrolnych myszy APP^{swe} (CTR) wykazała, że tak samo jak to obserwowano w hipokampie, wraz z wiekiem dochodzi do istotnego spadku poziomu PSD95 u myszy w wieku 8M (**Rycina 37**), a obserwowany obniżony poziom utrzymywał się u zwierząt w wieku 12M (**Rycina 37 A, Tabel 14W: PSD95**). Zastosowanie diety zachodniej w grupach WD i WD+LPS nie wywołało istotnego obniżenia poziomu PSD95 względem wiekowo dobranych kontroli (8M CTR), natomiast WD spowodowała przesunięcie poziomu PSD95 w kierunku dolnej granicy obserwowanej w grupie CTR 8M oraz spadek poziomu PSD95 względem grupy 4M WD (**Rycina 37 A, panel CTR vs. WD, CTR vs. WD+LPS**). W przeciwieństwie do wyników otrzymanych z analizy tkanki hipokampa, zmian takich nie zaobserwowano pod wpływem LPS. W korze śródwęchowej czynnikiem odpowiedzialnym za obserwowane spadki poziomu PSD95 był proces starzenia organizmu (**Rycina 37 A, panel CTR vs. LPS**).

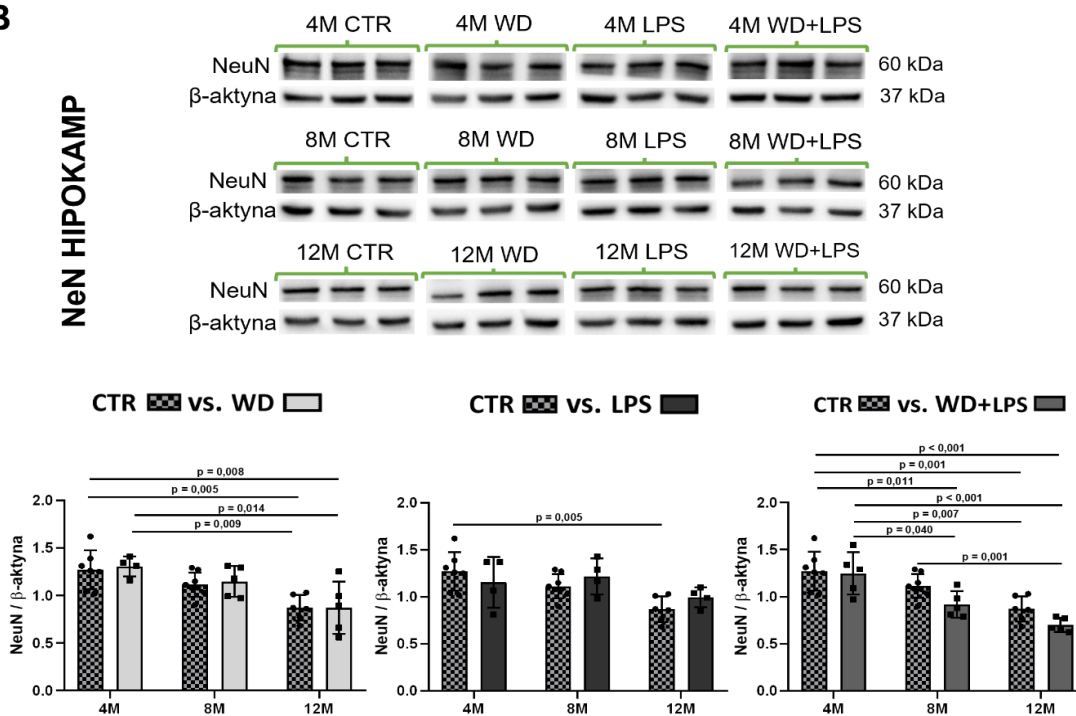
Analiza grup kontrolnych wykazała, że pod wpływem starzenia nie dochodzi do zmian poziomu NeuN w korze śródwęchowej u myszy w wieku APP^{swe} (**Rycina 37 B, Tabela 25: NeuN**), co może sugerować, że w wyniku fizjologicznego procesu starzenia w korze śródwęchowej nie dochodzi do zmian liczby zdrowych neuronów. Co więcej, wykazano, że żaden z zastosowanych czynników (WD oraz LPS) zastosowany oddzielnie, ani też razem (WD+LPS), nie wywołały istotnego wpływu na obniżenie poziomu NeuN w korze śródwęchowej (**Tabela 25: NeuN, Rycina 37 B, panel CTR vs. WD, CTR vs. LPS, oraz CTR vs. WD+LPS**).

Dodatkowo nie zaobserwowano zmian we wzorze prążków CX3CL1 ani ich intensywności, ani pod wpływem wieku, ani pod wpływem żadnego z zastosowanych badanych czynników doświadczalnych (**Rycina 37 A, B, C**).

A



B

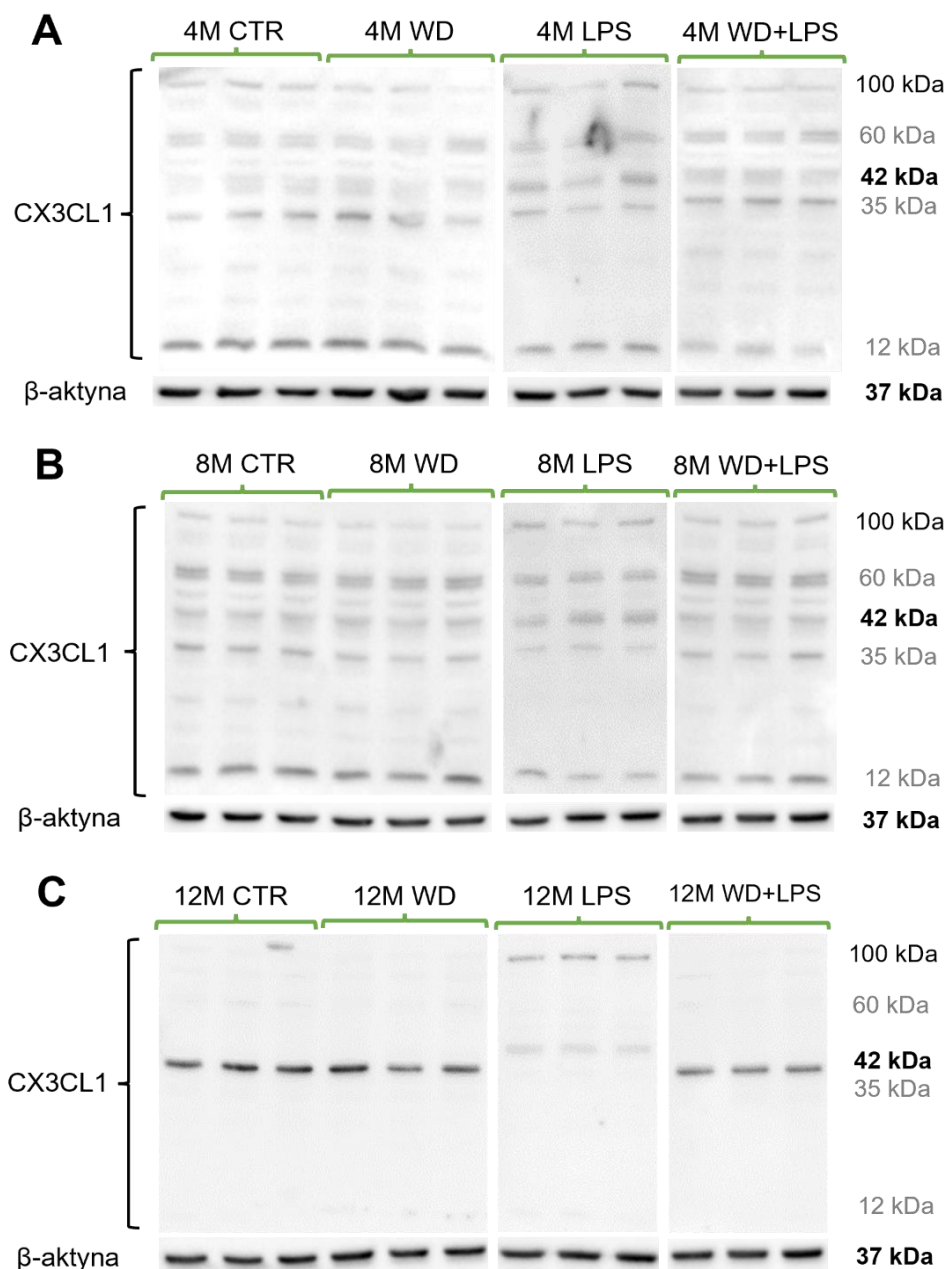


Rycina 35. Wpływ WD i iniekcji LPS na poziom (A) białka charakteryzującego gęstość postsynaptyczną - PSD95 oraz markera NeuN, znakującego jądra neuronalne (B) w hipokampie myszy z grup WD, LPS i WD+LPS, w wieku 4, 8 i 12 miesięcy (4M, 8M, 12M) w porównanych do kontroli (CTR) bez iniekcji LPS utrzymywanych na diecie standardowej, wykrytych za pomocą metody immunoblottingu. Dane liczbowe przedstawiono za pomocą średniej arytmetycznej ± odchylenie standardowe (n = od 4 do 8 zwierząt na grupę doświadczalną; kropki i kwadraty przedstawiają wartości dla pojedynczych osobników). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego. Wartości $p < 0,05$ uznano za z góry próg dla istotności statystycznej (pogrubiona czcionka), natomiast wartości p mieszczące się w przedziale $0,1 < p \leq 0,05$ uznano jako tendencję (czcionka bez pogrubienia).

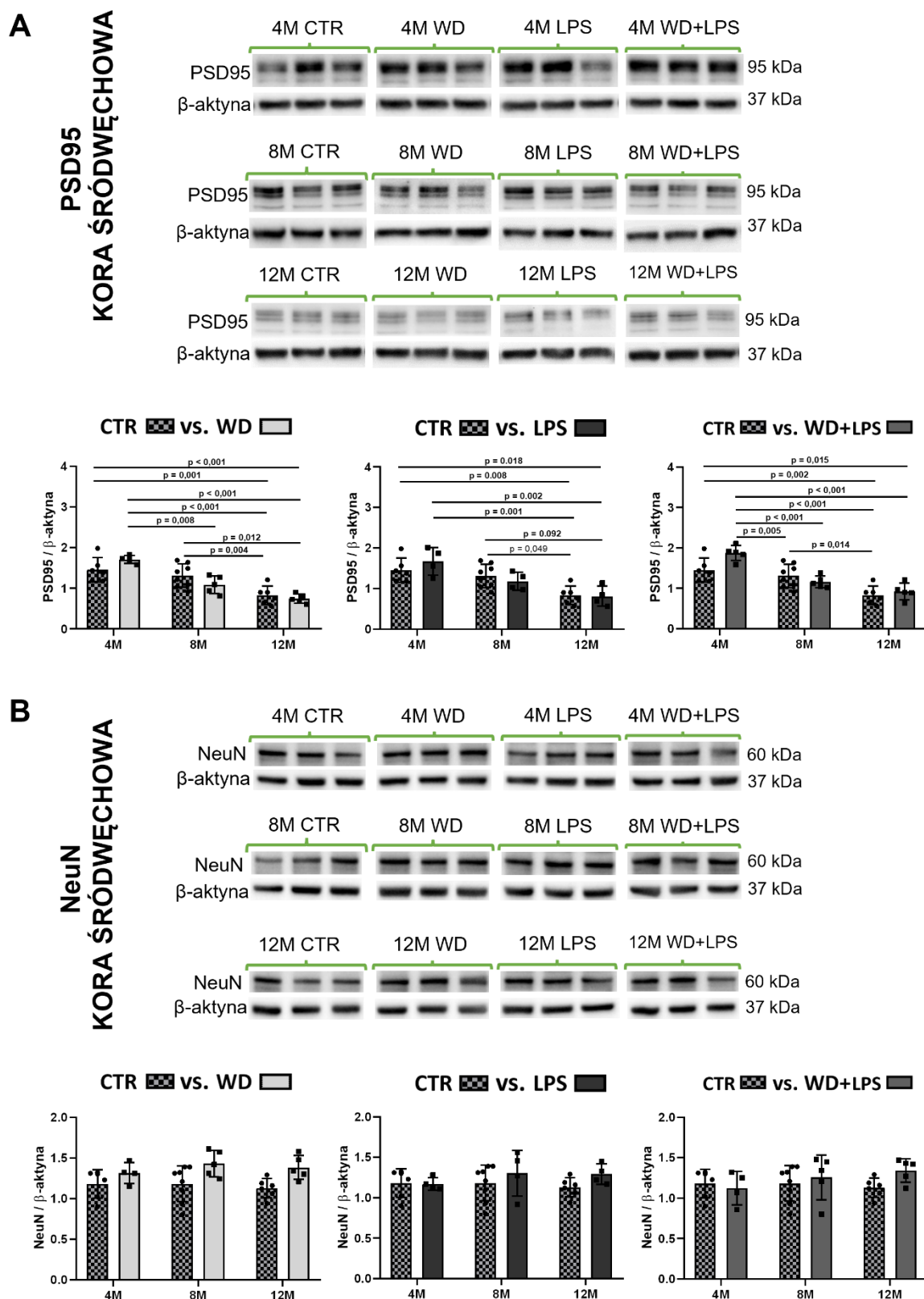
Tabela 24. Wyniki analizy ANOVA dwuczynnikowa, będące uzupełnieniem **Ryciny 35**.

Hipokamp	CTR vs. WD			CTR vs. LPS			CTR vs. WD+LPS		
	wiek	WD	interakcja	wiek	LPS	interakcja	wiek	WD+LPS	interakcja
PSD95	p < 0,001	NS	p = 0,085	p < 0,001	p = 0,007	NS	p < 0,001	NS	p = 0,038
NeuN	p < 0,001	NS	NS	p = 0,003	NS	NS	p < 0,001	p = 0,024	NS

NS – brak istotnych różnic

CX3CL1 HIPOKAMP

Rycina 36. Analiza chemokiny CX3CL1 w hipokampie wykonana techniką immunoblotting wykazała zmianę we wzorze prążków CX3CL1 pod wpływem wieku. U myszy w wieku (A) 4M i (B) 8M na immunoblotach widać prążki o wielkościach 100, 60, 42, 35 i 12 kDa, tzw. *multibanding*; w grupie 12M (C) nie wykryto izoformy białka o wielkości 100, 60, 35 i 12 kDa, a wyodrębnił się jeden główny prążek ze zwiększoną siłą sygnału o wielkości 42 kDa w grupach CTR, WD oraz WD+LPS; w grupie 12M LPS wyodrębniły się dwa prążki 100 i 42 kDa o mniejszej sile sygnału.



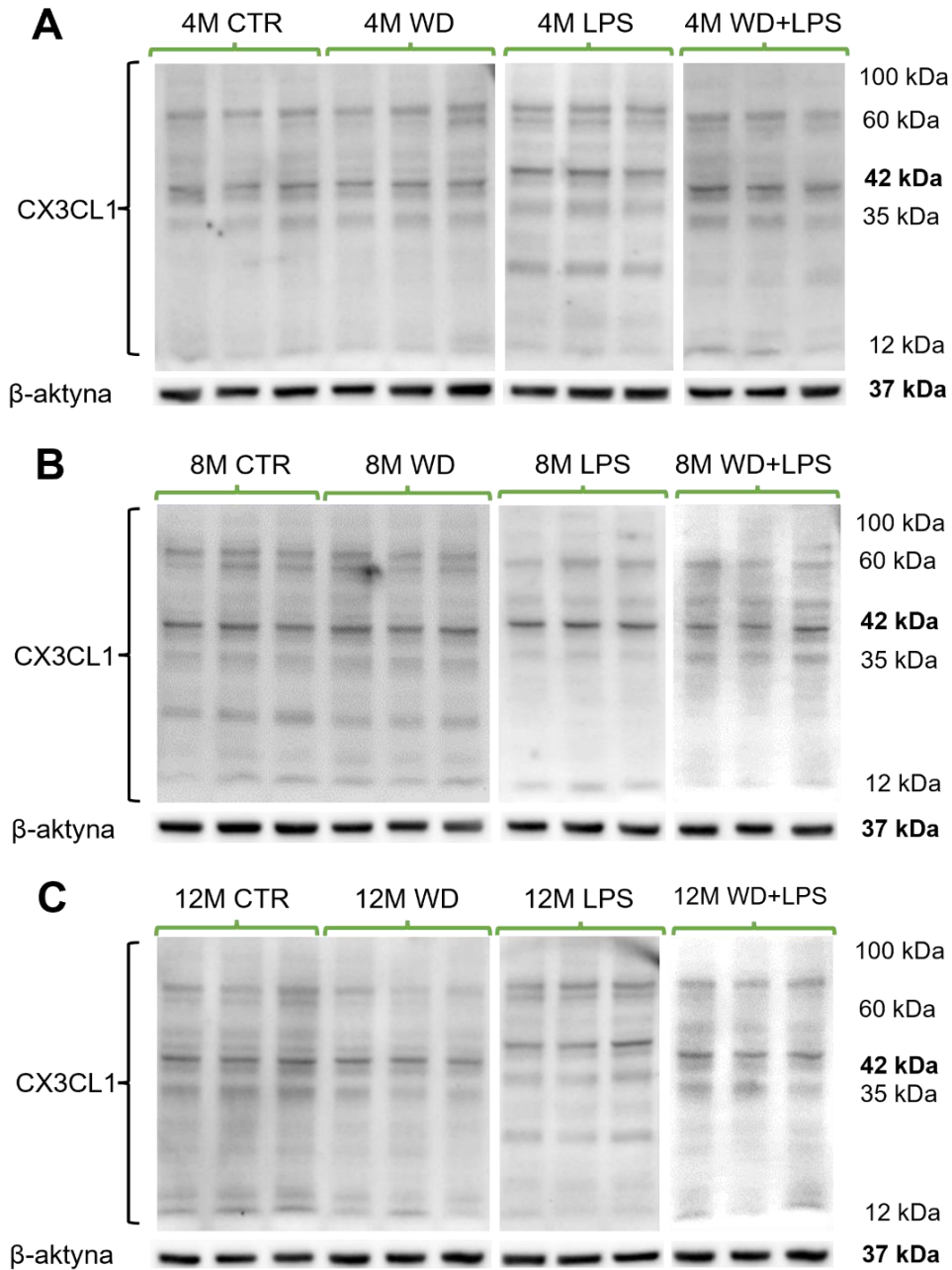
Rycina 37. Wpływ WD i iniekcji LPS na poziom (A) białka charakteryzującego gęstość postsynaptyczną - PSD95 oraz markera NeuN, znakującego jądra neuronalne (B) w korze śródwełchowej myszy z grup WD, LPS i WD+LPS, w wieku 4, 8 i 12 miesięcy (4M, 8M, 12M) w porównanych do kontroli (CTR) bez iniekcji LPS utrzymywanych na diecie standardowej, wykrytych za pomocą metody immunoblottingu. Dane liczbowe przedstawiono za pomocą średniej arytmetycznej \pm odchylenie standardowe ($n =$ od 4 do 8 zwierząt na grupę doświadczalną; kropki i kwadraty przedstawiają wartości dla pojedynczych osobników). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego.

Tabela 25. Wyniki analiza ANOVA dwuczynnikowa, będące uzupełnieniem **Ryciny 37**.

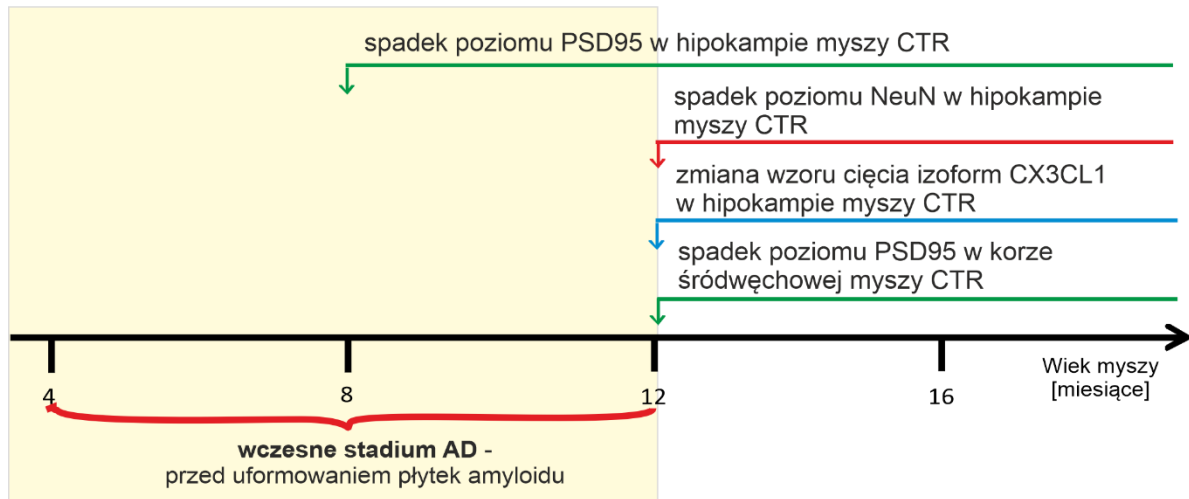
Kora śródwęchowa	CTR vs. WD			CTR vs. LPS			CTR vs. WD+LPS		
	wiek	WD	interakcja	wiek	LPS	interakcja	wiek	WD+LPS	interakcja
PSD95	p < 0,001	NS	NS	p = 0,001	NS	NS	p = 0,001	NS	NS
NeuN	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS – brak istotnych różnic

CX3CL1 KORA ŚRÓDWĘCHOWA



Rycina 38. Analiza chemokiny CX3CL1 w korze śródwęchowej wykonana techniką immunoblotingu wykazała brak zmian w sposobie cięcia oraz intensywności prążków CX3CL1 we wszystkich przeanalizowanych grupach eksperymentalnych (CTR, WD, LPS, WD+LPS) i wiekowych 4M, 8M, 12M (**A**, **B**, **C**). Na membranach widać wzorec prążków o wielkościach 100, 60, 42, 35 i 12 kDa, tzw. *multibanding*.



Rycina 39. Chronologia zmian parametrów związanych z funkcją synaps i neuronów w hipokampie oraz korze śródwęchowej u kontrolnych myszy APPswe bez iniekcji LPS utrzymywanych na diecie standardowej (CTR).

Analiza markerów charakteryzujących zakończenia synaptyczne i neurony wykazała, że procesy związane z neurodegeneracją zachodzą w pierwszej kolejności w hipokampie, a dopiero później w korze śródwęchowej (**Rycina 39**). Zmiany te były głównie związane z wiekiem i obecnością transgenu w zastosowanym modelu myszy APPswe, a badane obszary mózgu nie wykazywały wrażliwości na żaden z badanych czynników (WD i LPS). W hipokampie zaobserwowano spadek poziomu białka gęstości postsynaptycznej (PSD95) 4 miesiące wcześniej niż w korze śródwęchowej. Następnie w hipokampie w wieku 12 miesięcy nastąpił spadek poziomu NeuN, sugerujący spadek liczby neuronów z wiekiem. Ponadto zaobserwowano nietypową zmianę proteolizy chemokiny CX3CL1 wydzielanej przez neurony. Zmian tych nie zaobserwowano w korze śródwęchowej u dwunastomiesięcznych myszy. W neuronach kory śródwęchowej również nie wykazano istotnego wpływu na przyspieszenie opisanej sekwencji zdarzeń pod wpływem diety zachodniej oraz iniekcji LPS.

4.7.2. Porównanie zmian morfologicznych neuronów w hipokampie oraz w korze śródwęchowej

Analiza metodą immunoblottingu markerów neuronalnych PSD95, NeuN oraz CX3CL1 u myszy APP^{sw}e wykazała, że głównym czynnikiem powodującym zmiany poziomów tych markerów jest postępujący wiek myszy. Prawdopodobnie obserwujemy w tym przypadku wpływ wieku i procesu starzenia na procesy związane z nadekspresją zmutowanego genu kodującego białko prekursorowe amyloidu (APP), warunkujące stopniowe, od początku życia tych zwierząt, uwalnianie peptydów A β na drodze amyloidogennej proteolizy. Obecność i ciągłe wytwarzanie toksycznych form A β wraz z wiekiem może powodować upośledzenie funkcji synaps i stopniowe zamieranie neuronów. Istnieje prawdopodobieństwo, że efekt wieku na tle transgeny APP maskuje wpływ badanych czynników WD i LPS u tych myszy.

W celu weryfikacji obserwacji z analizy ilościowej poziomów badanych markerów neuronalnych w lizatach tkankowych uzyskanych z wyizolowanego hipokampa oraz obszaru kory śródwęchowej, wykonano analizę jakościową techniką barwienia histologicznego. Do barwienia skrawków przekrojów całych półkul mózgow pobranych od myszy APP^{sw}e wykorzystano metodę topograficznego barwienia przeglądowego hematoksyliną i eozyną (H&E), pozwalającego ocenić całość struktury tkanki, poprzez kontrastowe zabarwienie cytoplazmy i jąder komórkowych. Hematoksylina jest substancją zasadową, która barwi jądra komórkowe na kolor fioletowy/niebieski. Eozyna to kwaśna pochodna fluoresceiny, barwiąca cytoplazmę na różowo/czerwono.

Analizę barwienia H&E przeprowadzono w korze śródwęchowej i hipokampie z uwzględnieniem jego trzech kluczowych obszarów: DG - zakręt zębaty, pole CA3 i CA1. Rozdzielenie hipokampa na trzy obszary jest ściśle związane z przebiegiem projekcji pomiędzy hipokampem, a korą śródwęchową, gdzie kolejność pojawiania się oznak uszkodzenia neuronów ma kluczowe znaczenie w kontekście przebiegu patologii AD, co zostało szczegółowo opisane w Dyskusji.

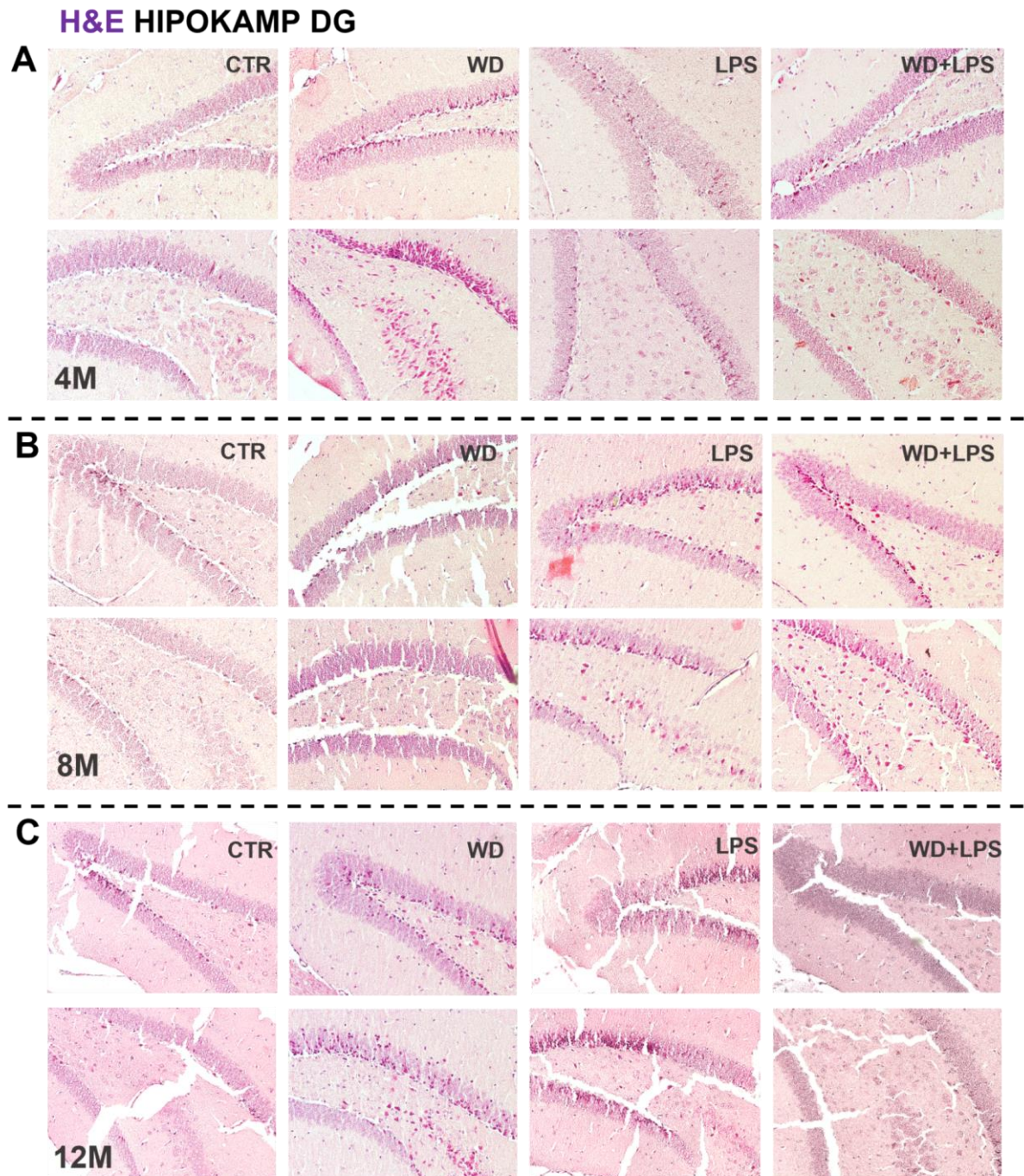
Analiza obrazowa przekrojów hipokampa ujawniła zmiany morfologii neuronów pod wpływem badanych czynników (WD, LPS, WD+LPS) w stosunku do dopasowanych wiekiem grup kontrolnych myszy APP^{sw}e (CTR) w obrębie poszczególnych obszarów hipokampa: DG (**Rycina 40 A – 4M, B – 8M, C – 12M**), CA3 (**Rycina 41 A – 4M, B – 8M, C – 12M**) oraz CA1 (**Rycina 42 A – 4M, B – 8M, C – 12M**). Co ciekawe, wyniki ujawniły, że zarówno WD jak i LPS mogą wpływać negatywnie na morfologię neuronów. Zaobserwowano nieprawidłową morfologię neuronów w obrazie, typową dla komórek zamierających, w obszarze DG pod wpływem WD w wieku 4 miesięcy (4M WD), a pod wpływem LPS nieco później, bo w wieku 8 miesięcy (8M LPS). Neurony prawidłowe charakteryzują się obłym kształtem i niską chłonnością eozyny w cytoplazmie, co wskazuje na prawidłowe pH środowiska wewnątrzkomórkowego, dzięki czemu wyraźnie widoczne są jądra komórkowe i jąderka wybarwione hematoksyliną. Neurony nieprawidłowe mają wyraźnie zmienioną morfologię, są obkurczone przez co przybierają kształt wrzecionowaty, ich cytoplazma jest wyraźnie wypełniona eozyną i nie są widoczne jądra komórkowe. Taki obraz komórki jest oceniany jako komórka w stanie patologicznym, prawdopodobnie prowadzącym do zwyrodnienia (degeneracji). Analiza obrazowa wykazała, że poszczególne obszary hipokampa są odmiennie wrażliwe na badane czynniki (WD, LPS), a także na ich współwystępowanie (WD+LPS).

Zakręt zębaty (DG) hipokampa

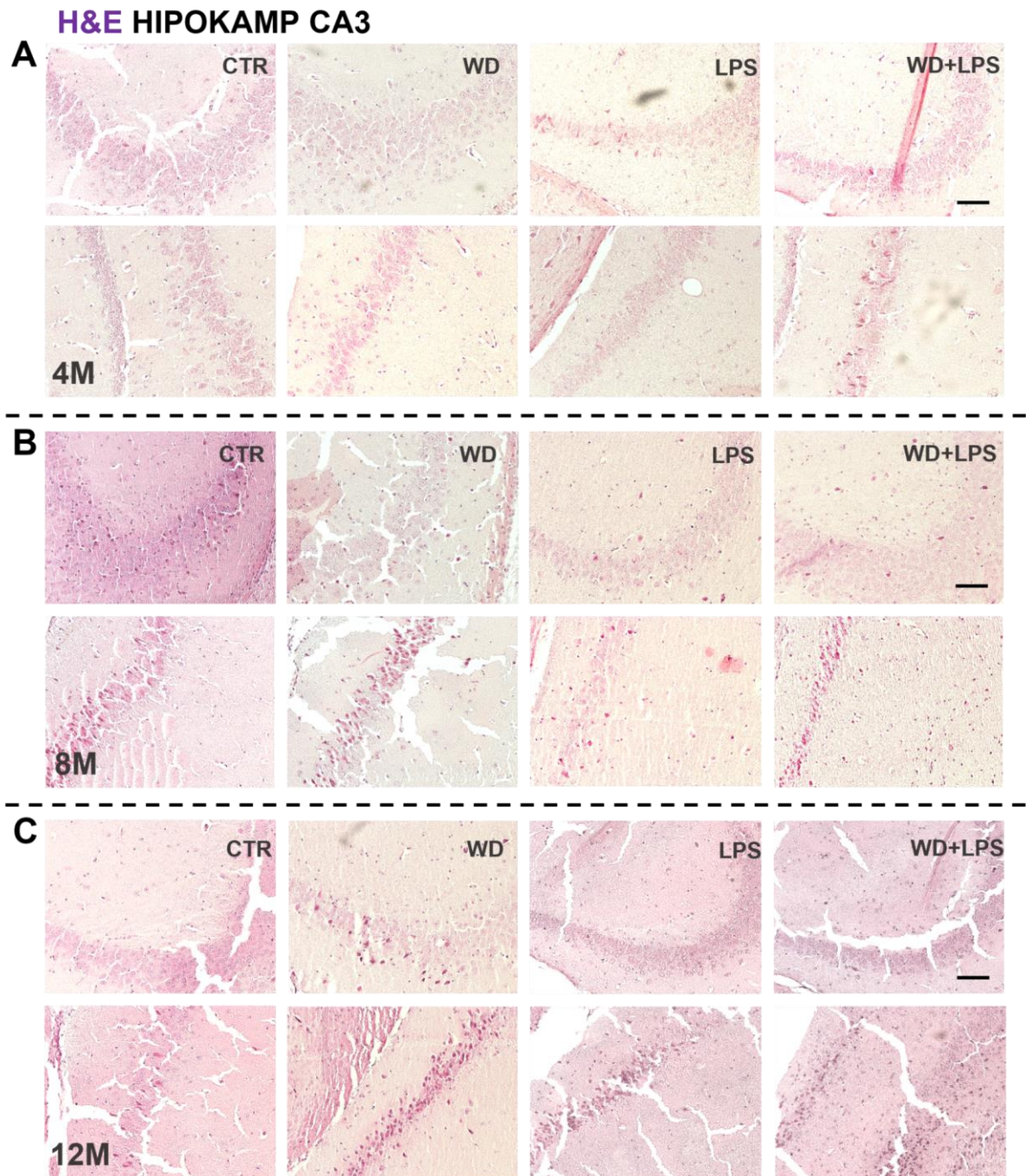
W obszarze zakrętu zębatego (DG) hipokampa zaobserwowano znaczące upośledzenie morfologii neuronów, zarówno warstwy ziarnistej, jak i neuronów wielokształtnych we wnęcie (*hilus*) pod wpływem diety WD już po 3 tygodniach karmienia u 4M myszy (**Rycina 40 A: 4M WD**). W pozostałych grupach doświadczalnych czteromiesięcznych myszy wygląd neuronów w obrębie DG nie odbiega znacząco od obrazu u myszy kontrolnych (CTR 4M). Również w grupie otrzymującej oba badane czynniki (**Rycina 40 A: 4M WD+LPS**) nie są widoczne istotne zmiany podobne do tych obserwowanych u myszy jedynie karmionych dietą WD, co sugeruje, że sama dieta WD oddziałuje silniej negatywnie. Być może dzieje się tak w wyniku uruchomienia przez podanie LPS mechanizmów obronnych układu odpornościowego, które na tym etapie znoszą również wpływ diety WD, podobnie jak to obserwowano w grupie otrzymującej tylko iniekcję LPS. U myszy w wieku 8 miesięcy, zarówno dieta WD, jak i LPS osobno, ale też podane razem nieznacznie zmieniają neurony w obrębie DG (**Rycina 40 B: 8M WD+LPS**). W grupie myszy dwunastomiesięcznych widać pogłębienie zakresu uszkodzenia neuro-nów w obszarze DG pod wpływem diety WD (**Rycina 40 B: 12M WD**) i pod wpływem LPS (**Rycina 40 B: 12M LPS**) w stosunku do myszy kontrolnych (CTR 12M), u których zgodnie z wcześniej prezentowanymi wynikami, proces ten rozpoczyna się z wiekiem u zwierząt nie eksponowanych na żaden z badanych czynników (CTR 12M), a jedynie w wyniku nałożenia czynnika wieku i transgenu APP.

Pole CA3 hipokampa

W polu CA3 hipokampa zmiany morfologii neuronów piramidalnych mają nieco odmienny wzorec niż w DG (**Rycina 41**). W grupie zwierząt 4M pojedyncze neurony o zmienionej morfologii zaobserwowano tylko w grupie myszy otrzymujących oba czynniki badane (**Rycina 41 A: 4M WD+LPS**). W grupie myszy ośmiomiesięcznych, już u myszy kontrolnych w obszarze CA3 były widoczne pojedyncze komórki o zmienionej morfologii, natomiast w grupach badanych efekt ten był istotnie silniejszy tylko w grupach karmionych dietą WD (**Rycina 41 B: 8M WD i WD+LPS**). Podobnie w grupie dwunastomiesięcznych myszy widoczny jest tylko uszkadzający wpływ diety WD na neurony w polu CA3 (**Rycina 41 C: 12M WD i WD+LPS**). Wpływ LPS na morfologię neuronów zaobserwowano jedynie w brzusznej części hipokampa w grupie myszy 12M (LPS 12M). Co ciekawe, wszystkie zaobserwowane zmiany, niezależnie od grupy doświadczalnej, były obecne w brzusznej części hipokampa, w obszarze płata skroniowego obejmującym korę śródwęchową (**Rycina 41: A, B, C, panele dolne**), która funkcjonalnie wysyła projekcje zarówno do zakrętu zębatego, jak i pola CA3 hipokampa. W części grzbietowej hipokampa (**Rycina 43: A, B, C panele górne**) nie zidentyfikowano typowych zmian w polu CA3, poza nielicznymi zmienionymi neuronami w grupie dwunastomiesięcznych myszy tylko karmionych dietą WD (**Rycina 41 C: 12M WD**).



Rycina 40. Mikrofotografie przedstawiające wzór barwienia H&E w obszarze zakrętu zębatego (DG) hipokampa, wyodrębnione ze skrawków pełnych przekrojów półkulowych mózgow pobranych od myszy APP^{sw}e w grupach CTR, WD, LPS oraz WD+LPS w wieku **A**) 4M, **B**) 8M, **C**) 12M; skala = 50 μ m, powiększenie x20.



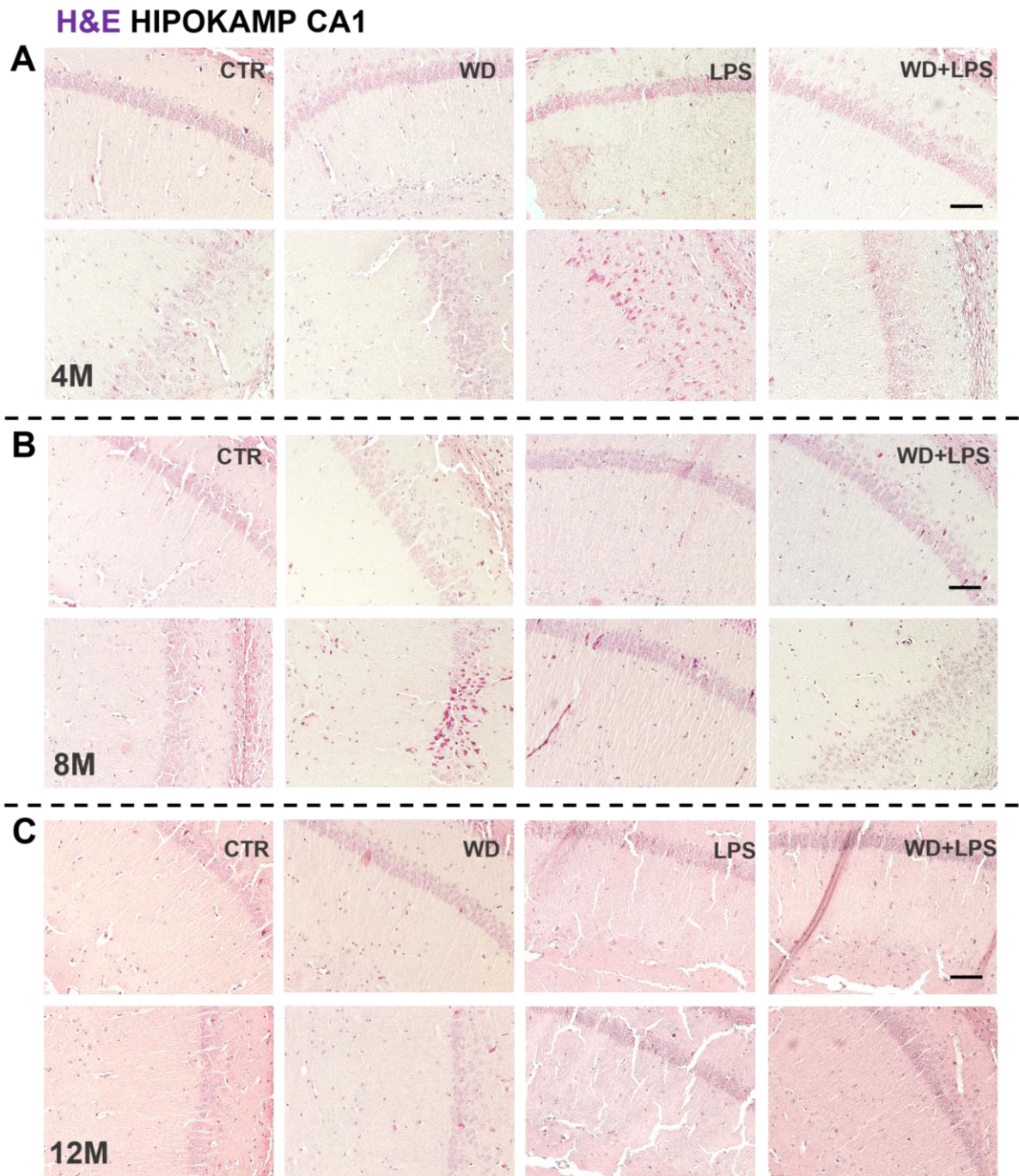
Rycina 41. Mikrofotografie przedstawiające wzór barwienia H&E w obszarze CA3 hipokampa, wyodrębnione ze skrawków pełnych przekrojów półkulowych mózgow pobranych od myszy APPswe w grupach CTR, WD, LPS oraz WD+LPS w wieku **A)** 4M, **B)** 8M, **C)** 12M; skala = 50 μ m, powiększenie x20.

Pole CA1 hipokampa

Spośród analizowanych obszarów hipokampa najmniejszą wrażliwość na badane czynniki zaobserwowano w polu CA1 hipokampa (**Rycina 42**). Jedynie u czteromiesięcznych myszy pod wpływem LPS (**Rycina 42 A: 4M LPS**) oraz u ośmiomiesięcznych myszy w grupie karmionej tylko dietą WD (**Rycina 42 B: 8M WD**) widoczne są pojedyncze obszary neuronów piramidalnych o zmienionej morfologii. Przy czym, efekt ten był znacznie silniejszy pod wpływem WD. Natomiast, w grupie najstarszej, tj. u dwunastomiesięcznych myszy nie zaobserwowano żadnych zmian w wyglądzie komórek. Obserwowane w polu CA1 nieliczne zmiany są prawdopodobnie efektem zmian osobniczych i nie dają podstaw do wnioskowania o wrażliwości komórek w tym rejonie mózgu na czynniki badane (WD, LPS). Jednocześnie, obserwowany obraz pola CA1 hipokampa nie ujawnia również wpływu wieku na stan komórek. Przedstawione wyniki mogą mieć znaczenie w kontekście funkcjonalnym poszczególnych, badanych obszarów mózgu, ponieważ z pola CA1 projekcja jest kierowana w odwrotnym kierunku, czyli do kory śródwęchowej.

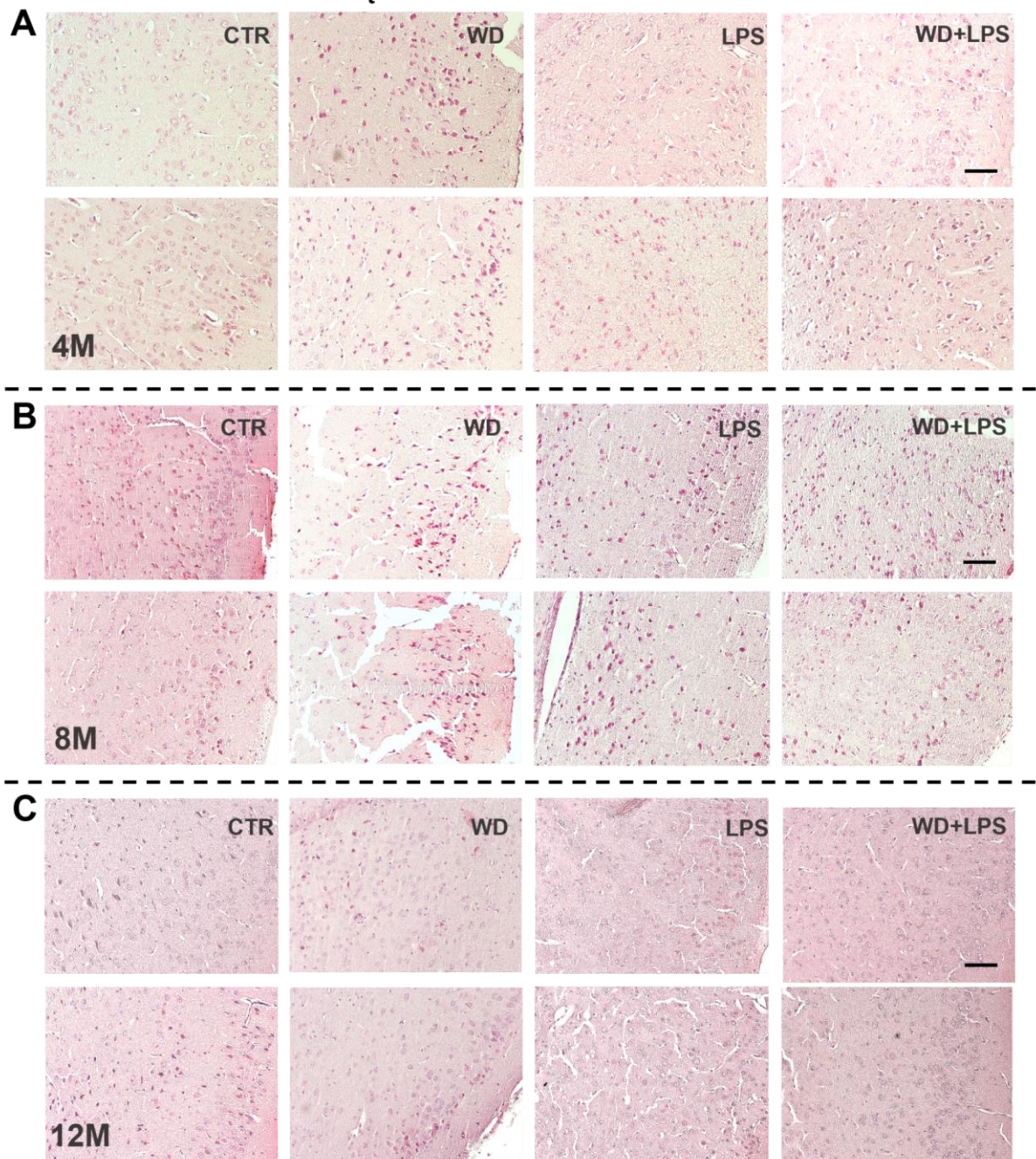
Kora śródwęchowa

W kolejnym etapie przeanalizowano wpływ badanych czynników (WD i LPS) na morfologię neuronów w obrębie kory śródwęchowej (**Rycina 43**). Analiza mikroskopowa przekrojów półkulowych wykazała znaczący efekt uszkadzający obu czynników badanych. Jednak w największym stopniu zaobserwowano zmienioną morfologię neuronów korowych pod wpływem WD już u najmłodszych myszy APPswe (**Rycina 43 A: 4M WD**). W pozostałych grupach doświadczalnych czteromiesięcznych myszy, efekt ten był również zauważalny, ale zdecydowanie słabszy (**Rycina 43 A: 4M LPS i WD+LPS**). Po 5 miesiącach od rozpoczęcia ekspozycji na czynniki doświadczalne (WD i LPS), w grupie zwierząt ośmiomiesięcznych obserwowano znaczne zintensyfikowanie zmian morfologii neuronów we wszystkich grupach eksperymentalnych (**Rycina 43 B: WD 8M, LPS 8M i WD+LPS 8M**) w porównaniu do grupy myszy kontrolnych (CTR 8M). Natomiast obraz kory śródwęchowej w grupie dwunastomiesięcznych myszy nie wykazał neuronów zmienionych w żadnej grupie doświadczalnej (**Rycina 43 C**).



Rycina 42. Mikrografie przedstawiające wzór barwienia H&E w obszarze CA1 hipokampa, wyodrębnione ze skrawków pełnych przekrojów półkulowych mózgow pobranych od myszy APPswe w grupach CTR, WD, LPS oraz WD+LPS w wieku **A)** 4M, **B)** 8M, **C)** 12M; skala = 50 μ m, powiększenie x20.

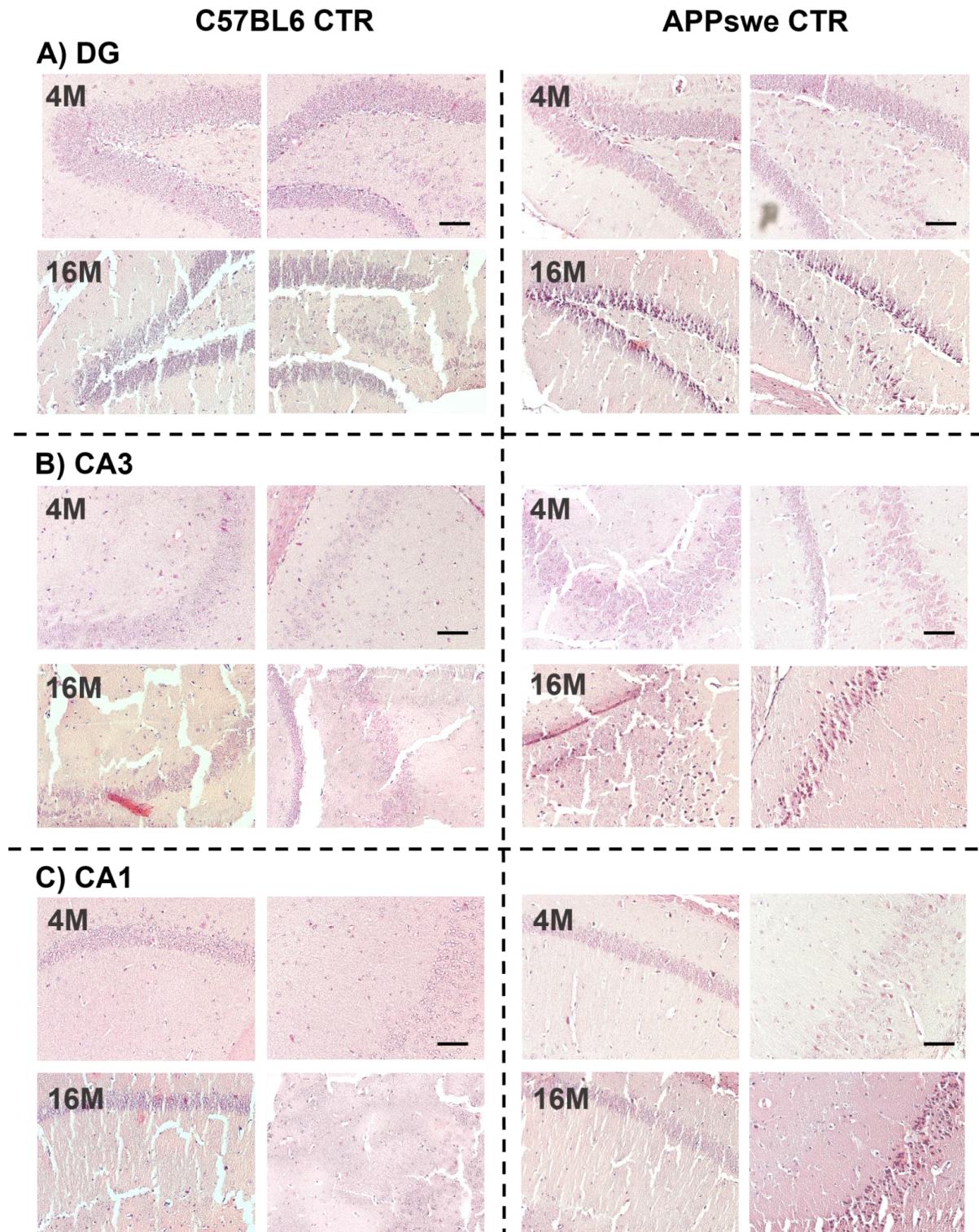
H&E KORA ŚRÓDWĘCHOWA



Rycina 43. Mikrofotografie przedstawiające wyniki barwienia H&E w obszarze kory śródwęchowej, wyodrębnione ze skrawków pełnych przekrojów półkulowych mózgów pobranych od myszy APPswe w grupach CTR, WD, LPS oraz WD+LPS w wieku **A)** 4M, **B)** 8M, **C)** 12M; skala = 50 μ m, powiększenie x20.

4.7.3. Porównanie zmian morfologicznych neuronów myszy APP^{swe} do myszy szczepu dzikiego C57BL/6

Badany w niniejszej pracy myszy model AD (APP^{swe}), dobrze odzwierciedla progresję patologii FAD w populacji ludzkiej, u nosicieli dominującej mutacji w genie *APP*. W celu wyodrębnienia wpływu samego transgenu APP^{swe} na morfologię neuronów we wszystkich analizowanych strukturach mózgu (DG, CA3, CA1 hipokampa oraz korze śród-węchowej, wykonano porównawczą analizę tkanki, wykorzystując myszy szczepu dzikiego C57BL/6, niezmienione genetycznie (**Rycina 44**). Biorąc pod uwagę wyniki analizy poziomów markerów synaptycznych i neuronalnych, przedstawionej w podrozdziale 4.7.1, która wykazała zależność poziomów tych markerów wyłącznie od wieku u myszy APP^{swe}, mikroskopową analizę porównawczą przekrojów półkulowych przeprowadzono jedynie w grupach kontrolnych obu szczepów myszy, nie otrzymujących iniekcji LPS i utrzymywanych na diecie standardowej w wieku 4 (4M) i 16 miesięcy (16M). Otrzymane wyniki wykazały, że obecność mutacji w genie *APP* ogrywa istotną rolę w kierowaniu neuronów na drogę degeneracji oraz, że zależność ta jest silnie związana z wiekiem i procesem starzenia się zwierząt. Neurony o zmienionej morfologii, wskazujące na uruchomienie mechanizmów prowadzących do śmierci komórki, obserwowane były w prezentowanych tu badaniach wyłącznie u transgenicznych myszy starzejących się (APP^{swe} CTR 16M), zarówno w porównaniu do zwierząt młodych (APP^{swe} CTR 4M), jak i do zwierząt nie zmienionych genetycznie (C57BL/6 CTR 16M).

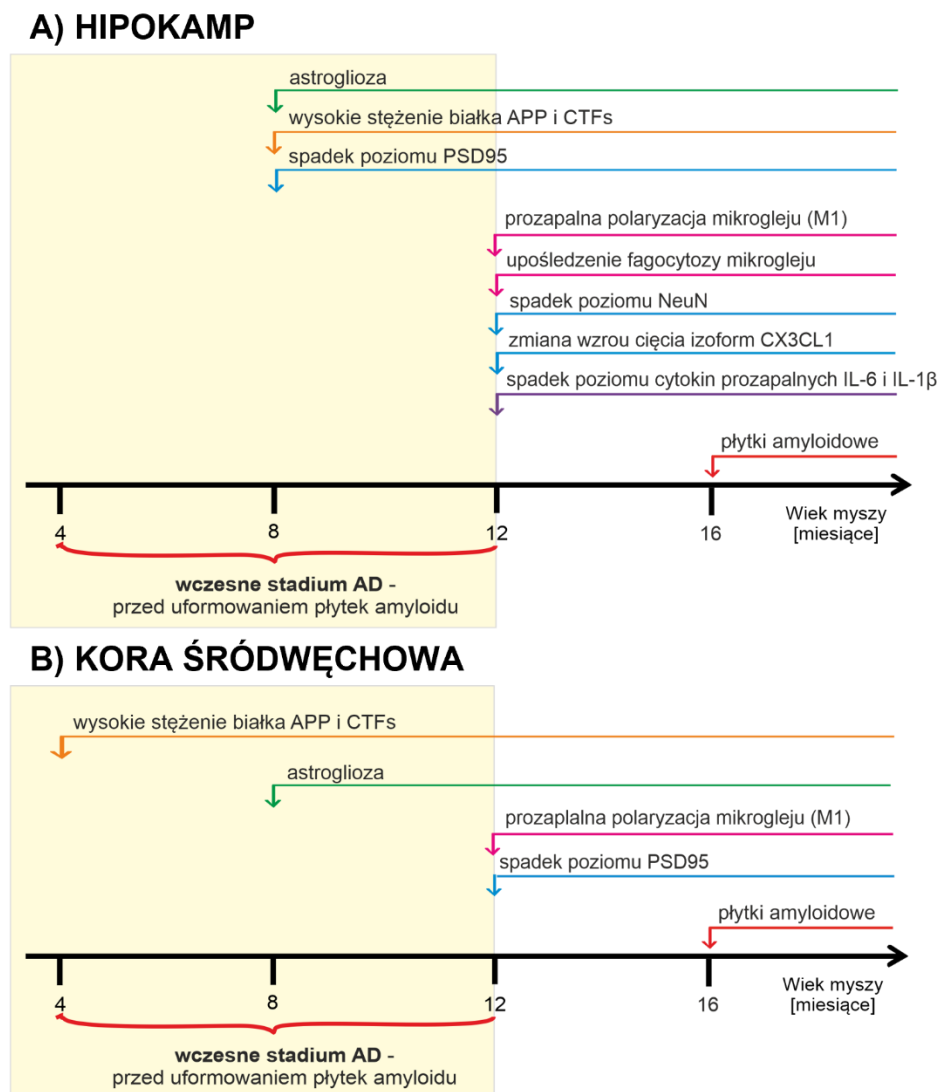


Rycina 44. Mikrofotografie przedstawiające wyniki barwienia H&E w różnych obszarach hipokampa: **A) DG**, **B) CA3**, **C) CA1** oraz **D) kory śródwęchowej**, wyodrębnione ze skrawków pełnych przekrojów półkulowych mózgow pobranych od kontrolnych myszy C57BL/6 i APPswe w wieku 4 miesięcy (4M) i 16 miesięcy (16M) w celu porównania wpływu transgenizacji na uszkodzenie neuronów; skala = 50 μ m, powiększenie x20.

5. Dyskusja

5.1. Sekwencja procesów neuropatologicznych jest odmienna w hipokampie w porównaniu z korą śródwęchową u myszy APP^{swe}

W pierwszym etapie badań scharakteryzowano sekwencję patologicznych zdarzeń wywołanych obecnością ludzkiego transgenu *APP* (niosącego podwójną mutację K670N, M671L, tzw. szwedzką (swe)) w hipokampie (**Rycina 45 A**) oraz korze śródwęchowej (**Rycina 45 B**) u kontrolnych myszy APP^{swe}. Grupy wiekowe analizowane w tym badaniu (4M, 8M, 12M, 16M i 20M) odzwierciedlały następujące przedziały wiekowe u ludzi: odpowiednio 20, 35, 50, 65, 80 lat (zmodyfikowano na podstawie Flurkey i in., 2007). Jak wykazano w niniejszym badaniu, myszy kontrolne APP^{swe} (CTR) w wieku od 4M do 12M odpowiadają wczesnym stadiom AD, bez płytek A β w mózgu, u których obserwowaliśmy różne procesy patologiczne znane jako prowadzące do agregacji A β . Zastosowany model APP^{swe} pozwolił na dość precyzyjne przełożenie osi czasu rozwoju zmian patologicznych u myszy na postępujące stadia AD u człowieka.



Rycina 45. Schemat przedstawiający sekwencję zdarzeń neuropatologicznych stwierdzonych na podstawie wyników badań niniejszej rozprawy, wynikających z obecności transgenu *APP* w (A) hipokampie oraz (B) korze śródwęchowej w czasie życia myszy APP^{swe}.

W niniejszej pracy po raz pierwszy szczegółowo scharakteryzowano sekwencję patologicznych zdarzeń charakterystycznych dla początkowych stadiów patogenezы AD rozwijających się w dwóch kluczowych dla tej choroby strukturach mózgu, w obrębie płata skroniowego - w hipokampie i korze śródwęchowej. W tym celu analizy przeprowadzono w kilku punktach czasowych przed-płytkowego stadium patologii AD w modelu myszy APPswe. Mysi model AD APPswe (Tg2576) jest powszechnie stosowany i jest odpowiedni do badań przedklinicznego stadium AD z uwagi na długi czas rozwoju zmian neuropatologicznych typowych dla AD, odpowiadający długoletniemu okresowi utajonego rozwoju tej choroby u ludzi. W świetle braku skutecznej terapii objawowej, określenie przyczyn i mechanizmów molekularnych prowadzących do odkładania się złoǳów amyloidowych i powstawania form zwyrodniałych neuronów mózgu w postaci NFT, jest kluczowe dla opracowania skutecznej strategii spowalniania lub przeciwdziałania rozwojowi objawowego stadium AD, silnie upośledzającego życie pacjenta i jego rodziny oraz generującego znaczne koszty związane z opieką nad pacjentem w czasie relatywnie długiej fazy klinicznej.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy potwierdziły, że obecność zmutowanego genu *APP* indukuje zwiększenie poziomu zarówno białka APP, jak i też produktów jego amyloidogennej proteolizy C-końcowych fragmentów (CTFs). Zależność tę zaobserwowano najpierw w korze śródwęchowej, u myszy w wieku 4 miesięcy (**Rycina 45 B**), a dopiero później w hipokampie, w wieku 8 miesięcy (**Rycina 45 A**). Natomiast depozyty A β w postaci blaszek w obu badanych strukturach obserwowano dopiero w wieku 16 miesięcy (**Rycina 45 A i B**). Większe stężenie APP i CTFs w korze śródwęchowej w porównaniu do hipokampa młodych myszy sugeruje, że w tej strukturze mogą rozpoczynać się procesy prowadzące do rozwinięcia amyloidopatii charakterystycznej dla AD w modelu APPswe.

Natomiast, to w hipokampie zaobserwowano większą liczbę patologicznych zdarzeń prowadzących do stanu neurozapalenia. Co więcej, część obserwowanych procesów patologicznych, powtarzających się w obu badanych strukturach, wcześniej występowała w hipokampie niż w korze śródwęchowej. Zaobserwowano, że obecność transgenu *APP* zaburza aktywność komórek glejowych, co objawia się znaczną aktywacją astrocytów (\uparrow GFAP) w hipokampie i korze śródwęchowej u ośmiomiesięcznych myszy APPswe. W obu strukturach zidentyfikowano także prozapalną polaryzację mikrogleju, ale dopiero u myszy dwunastomiesięcznych (\uparrow Iba1). W hipokampie dodatkowo wykazano spadek właściwości fagocytarnych mikrogleju (\downarrow CD68) (**Rycina 45A**). Ponadto, zauważono silniejszą odpowiedź prozapalną w hipokampie, gdzie cytokiny IL-6 i IL-1 β utrzymywały się na wyższym poziomie w porównaniu do kory śródwęchowej do ósmego miesiąca życia.

Hipokamp charakteryzował się także wcześniejszym spadkiem poziomów markera gęstości synaptycznej (\downarrow PSD95) (w wieku 8 miesięcy) oraz markera neuronów (\downarrow NeuN) (w wieku 12 miesięcy). Wynik ten wyraźnie wskazuje, że degeneracja neuronów i upośledzenie funkcji synaps rozpoczyna się właśnie w tej strukturze mózgu. Jest to zgodne z sekwencją późniejszego występowania objawów klinicznych, związanych z upośledzeniem funkcji mózgu zależnych od hipokampa, tj. przetwarzaniem pamięci krótkotrwałej w długotrwałą. Ponadto, w hipokampie, w przeciwieństwie do kory śródwęchowej, wystąpiła zmiana we wzorze proteolitycznego trawienia wydzielanej przez neurony chemokiny CX3CL1, polegająca na wyodrębnieniu jednej głównej izoformy o wielkości 43 kDa oraz wzrostu jej poziomu (**Rycina 36**). CX3CL1 jest produkowana przez neurony i występuje w dwóch postaciach: jako białko trans-

błonowe, które działa jako cząsteczka adhezyjna, oddziałując ze swoim unikalnym receptorem CX3CR1 oraz jako postać rozpuszczalna, która jest generowana w procesie proteolitycznym i działa jako cząsteczka sygnałowa pełniąc rolę neuroprotektoryjną i neurotroficzną (Iemmolo i in., 2023). Neuroprotektoryjna rola CX3CL1 polega głównie na hamowaniu aktywacji mikrogleju i hamowaniu ekspresji genów prozapalnych oraz syntezy cytokin (IL-1 β , IL-6, TNF- α) (Bivona i in., 2023). Postać rozpuszczalna powstaje w wyniku proteolizy przeprowadzanej przez szereg enzymów pełniących również kluczową rolę w patogenezie AD takich jak dezintegryna A, katepsyna A, metaloproteazy (ADAM-10, -17), czy sekretazy (α -, β - i γ -sekre-tazę) (Iemmolo i in., 2023). Obserwowana tak drastyczna zmiana sposobu proteolizy CX3CL1 w hipokampie myszy APPswe w wieku 12 miesięcy sugeruje, że w tej strukturze mogło dojść do nagłej zmiany aktywności/poziomu wspomnianych enzymów, które odgrywają istotną rolę w procesach związanych z patologią AD. Występowanie tych zmian wraz z obniżeniem gęstości synaptycznej i upośledzeniem znakowania markerów neuronalnych (\downarrow PSD95, \downarrow NeuN i zmiana proteolizy CX3CL1) sugeruje uruchomienie mechanizmów molekularnych, prowadzących do neurodegeneracji, co również wcześniej zaobserwowano w hipokampie w przeciwieństwie do kory śródwęchowej.

Natomiast w korze śródwęchowej w przeciwieństwie do hipokampa, występuje tylko jedna izoforma białka AQP4 o wielkości 50 kDa, odpowiedzialnego za prawidłowe funkcjonowanie systemu glimfatycznego, a brak jest izoformy o wielkości 30 kDa (**Rycina 18**). Uważa się, że prawidłowy poziom izoformy 30 kDa odpowiedzialny jest za prawidłowy przepływ (*klirens*) płynów i substancji przez barierę krew-mózg (Moe i in., 2008; Silva i in., 2021). Ta obserwacja sugeruje upośledzenie systemu oczyszczania mózgu w zastosowanym modelu zwierzęcym właśnie w korze śródwęchowej, w przeciwieństwie do hipokampa.

Na podstawie uzyskanych danych można stwierdzić, że około 5 miesięcy od rozpoczęcia doświadczenia, stan zapalny wzbudzany przez ciągłą produkcję peptydów A β , przejawiający się burzą cytokinową w mózgu zaczyna słabnąć, a procesy naprawcze związane z funkcją komórek immunokompetentnych mózgu (astrocytów i mikrogleju) stają się coraz mniej wydolne, co prowadzi do postępującej agregacji amyloidu i wpływa na zwiększenie stopnia uszkodzenia neuronów. Wynik ten jest również spójny z danymi z analizy półilościowej metodą WB, gdzie wybija się wpływ wieku na poziom markerów neuronalnych, oraz z analizą jakościową tkanki mózgowej metodą H&E pokazującej, że procesy związane z neurodegeneracją neuronów postępują z wiekiem również u zwierząt z mutacją w genie *APP* nie ekspozowanych na żaden z badanych czynników, wykazując najsilniejszy stopień uszkodzenia neuronów u myszy w wieku 16 miesięcy (**Rycina 44**). Co więcej, znamiona intensywnego obumierania neuronów w obrębie hipokampa nie obejmują całej struktury w równym stopniu i są zmienne w poszczególnych obszarach. Pojawiają się przede wszystkim w obrębie zakrętu zębatego (DG) i pola CA3 hipokampa myszy APPswe w przedziale wieku 12-16 miesięcy (**Rycina 44**). Obserwacja ta wyłoniona została w analizie histopatologicznej i immunohistochemicznej skrawków z pełnych przekrojów półkulowych mózgu myszy APPswe i wskazuje na istotne znaczenie obserwowanych zmian w kontekście kierunku projekcji sygnalizacji neuronalnej pomiędzy strukturą hipokampa i korą śródwęchową. Dane te, razem z obserwowanym spadkiem poziomu NeuN w wieku 12 miesięcy, dodatkowo sugerują zahamowanie procesów neurogenezy wieku dorosłego (z ang. *adult neurogenesis*), która zachodzi w mózgu właśnie w obszarze DG (Poulose i in., 2017), a do jej zahamowania dochodzi we wczesnej fazie

przebiegu AD (Choi i in., 2023). Otrzymane wyniki wykazały, że w modelu APPswe obecność mutacji w genie *APP* ogrywa istotną rolę w kierowaniu neuronów na drogę degeneracji i ewentualnego zahamowania neurogenezy oraz, że zależność ta jest silnie związana z wiekiem i procesem starzenia się myszy linii APPswe.

Z uzyskanych danych wynika, że hipokamp jest strukturą szczególnie wrażliwą na procesy związane z aktywacją komórek glejowych, zaburzeniem procesów fagocytozy, rozwinięciem stanu zapalnego oraz indukcją procesów związanych z neurodegeneracją w porównaniu do kory śródwęchowej. Zmiany obserwowane w obrębie hipokampa wskazują na związek z patologią wewnątrzkomórkowego białka tau, która jest bezpośrednio związana z obumieraniem neuronów, w wyniku destabilizacji cytoszkieletu komórkowego, transportu wewnątrz-neuronalnego i upośledzenia sygnalizacji synaptycznej. Jednak to kora śródwęchowa okazała się miejscem inicjacji postępującej patologii amyloidu charakterystycznej dla AD w modelu APPswe. W porównaniu do hipokampa, to w korze śródwęchowej w pierwszej kolejności zaobserwowano zwiększone poziomy białka APP i CTFs, oraz niewydolny system “oczyszczania” odpowiedzialny za usuwanie z mózgu m.in. gromadzącego się amyloidu β . Mogłoby to sugerować, że właśnie w tej strukturze nastąpi silniejsza odpowiedź zapalna w odpowiedzi na wspomniane różnice. Mimo to, w zastosowanym modelu, silniejszą odpowiedź zapalną zaobserwowano w hipokampie. Zaobserwowane patologiczne zmiany zarówno w hipokampie, jak też w korze śródwęchowej skutkują pojawieniem się płytek amyloidowych u myszy w tym samym wieku, mianowicie w wieku 16 miesięcy.

Uzyskane wyniki fenotypowania modelu APPswe jednoznacznie pokazują, że wszystkie obserwowane patologiczne zmiany związane z neurozapaleniem oraz neurozwyrodnieniem rozpoczynają się długo przed pojawieniem się pozakomórkowych złogów amyloidu β , potwierdzając szczególną rolę toksycznych oligomerów $A\beta$ w patologii AD (Tolar i in., 2021), a nie już uformowanych płytek (Tolar i in., 2021). Małe rozpuszczalne oligomery $A\beta$ składają się z agregatów od dwóch (dimery) do dwunastu (dodekamery) kopii monomerów $A\beta$ i są wysoce neurotoksyczne. Mogą one dalej agregować, tworząc rozpuszczalne protofibryle $A\beta$ (duże oligomery), a następnie nierozpuszczalne fibryle o strukturze β -kartki, które dalej agregując tworzą blaszki/płytki amyloidowe. Tworzenie nierozpuszczalnych fibryli i blaszek w przestrzeni pozakomórkowej wydaje się być mechanizmem ochronnym, który ma na celu gromadzić usunięte z neuronów oraz wypływające z naczyń peptydy $A\beta$ i chronić neurony przed ich toksycznym wpływem (Yuan i in. 2016; Gaspar i in., 2010; Huang i in., 2021).

Oligomery $A\beta$ są wysoce heterogenne i występują w różnych rozmiarach, konformacjach, formach zagregowania. Istnieje też kilka etapów ich pojawiania się w mózgu w trakcie AD. Wykazano, że różne typy oligomerów wywołują odmienne mechanizmy uszkodzenia neuronów (Huang i in., 2020). Literatura pokazuje, że istnieje kilka mechanizmów patogenetycznych odpowiedzialnych za neurodegenerację wywołaną przez oligomery $A\beta$. Oligomery $A\beta$ bezpośrednio indukują dysfunkcję mitochondriów i stres oksydacyjny, co prowadzi do masywnego napływu wapnia do komórek mózgu i wynikającej z tego toksyczności (Canevari i in., 2004; Bode i in., 2017). W badaniach na wycinkach tkanki hipokampa stwierdzono, że oligomery wpływają na pamięć i uczenie się poprzez bezpośrednie blokowanie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP) w hipokampie, pierwszego etapu tworzenia pamięci (Li i in., 2011). Ponadto oligomery $A\beta$ powodują redystrybucję krytycznych białek synaptycznych i indukują nadaktywność metabotropowych i jonotropowych receptorów

glutaminianu, co skutkuje przeciążeniem wapniowym, nadmierną fosforylacją białka tau, stresem oksydacyjnym i utratą synaps (Zott i in., 2019). Co ciekawe, ta zależna od oligomerów A β nadaktywność poprzedza tworzenie się blaszki amyloidowej i jest obecna we wczesnych stadiach choroby, na długo przed pojawieniem się objawów klinicznych, co dodatkowo potwierdza przyczynową rolę oligomerów w patogenezie AD (Mroczko i in., 2018).

Aktywacja astrocytów poprzedza udział komórek mikrogleju w początkowej fazie rozwoju AD u myszy APP^{swE}.

Dane uzyskane w niniejszej pracy wyraźnie wskazują na uruchomienie reakcji astrocytów znacznie wcześniej niż występowanie zaburzeń funkcji mikrogleju, zarówno w hipokampie, jak i korze śródwęchowej. Astrocyty bezpośrednio aktywują receptory neuronalne poprzez uwalnianie gliotransmiterów, takich jak glutaminian, D-seryna i ATP (Jung i in., 2012). Wiadomo, że glutaminian uwalniany z astrocytów wywiera liczne efekty na pobudliwość neuronów, podczas gdy pochodząca z astrocytów D-seryna przyczynia się do modulacji plastyczności synaptycznej pod wpływem postsynaptycznych receptorów NMDA (Jung i in., 2012). Z kolei ATP pochodzący z astrocytów jest znaczącą pozakomórkową cząsteczką sygnalizacyjną i endogennym ligandem dla receptora purynergicznego, który moduluje przekaznictwo synaptyczne, bezpośrednio lub poprzez produkt metabolizmu ATP - adenozyne (Jung i in., 2012). Ponieważ astrocyty, jako istotna część trójdzielnej synapsy, odgrywają ważną rolę w tworzeniu, utrzymaniu i eliminacji synaps, nie można pominąć ich roli w procesach związanych z utratą synaps i neuronów w AD. Już w 1995 roku stwierdzono korelację między zmniejszeniem gęstości synaps a wzrostem liczby GFAP-dodatnich astrocytów zarówno w płacie czołowym, jak i ciemieniowym pacjentów z AD, co sugeruje rolę astrocytów w tych procesach (Brun i in., 1995). Inne badania wykazały zmniejszoną interakcję astrocytów z synapsami w modelu mysim 5xFAD, co potwierdza wnioskowanie, że prawidłowa interakcja pomiędzy astrocytami i synapsami jest niezbędna do zachowania prawidłowo funkcjonujących synaps (Choi et al., 2021). Co więcej, reaktywne astrocyty wydzielają substancje prozapalne jak np. lipokalina-2 (Lcn2), która jest białkiem ostrej fazy o kilku rolach (Naude i in., 2012; Bi i in 2013; Jha i in., 2015). Lcn2 m.in. wywiera działanie toksyczne dla synaps i neuronów, obniżając poziom markerów synaptycznych jak PSD95 i synapsyna (Staurenghi i in., 2021) oraz wpływając na żywotność neuronów, zagęszczenie kolców dendrytycznych i zmiany ich morfologii, a ostatecznie funkcji poznawczych (Mucha i in., 2011; Lee i in., 2012; Bi i in 2013; Kim i in., 2017).

Otrzymane wyniki sugerują, że dotychczas zbyt małe znaczenie przypisywano roli astrocytów w patogenezie AD. Niniejsza praca jako jedna z nielicznych wskazuje na istotną rolę astrocytów w przebiegu AD. Jako jedni z pierwszych wykazujemy rolę astrogleju w najwcześniejszej fazie rozwoju AD i znacząco wcześniej, niż zachodzi uruchomienie aktywności komórek mikrogleju. Dotychczas większość literatury naukowej przypisuje kluczową i początkową funkcję w patogenezie AD komórkom mikrogleju. Otrzymane wyniki wskazują, że rola astrocytów w przebiegu AD jest szczególnie skorelowana z procesami prowadzącymi do utraty synaps i mechanizmami molekularnymi postępującej degeneracji neuronów.

Mikroglej natomiast odgrywa kluczową rolę głównie w procesach fagocytozy peptydów i oligomerów A β . Ponadto, zaobserwowane w hipokampie procesy związane z zaburzeniem

funkcji mikrogleju, takie jak spadek wydajności fagocytozy, sugerują, że fagocytoza przeprowadzana przez mikroglej może mieć większe znaczenie w procesach związanych z dezaktywacją i usuwaniem toksycznych oligomerów A β , niż proces oczyszczania tkanki z A β za pomocą układu glimfatycznego. Może to tłumaczyć silniejszą odpowiedź prozapalną obserwowaną w hipokampie w porównaniu do kory śródwęchowej. Mikroglej odgrywa ważną rolę w wychwycie rozpuszczalnego amyloidu, w tym oligomerów, i tworzeniu zwartych β -warstw, które stają się rdzeniowymi gęstymi blaszkami. Wykazano, że proces ten chroni sąsiadujące neurony, a poprzez sekwestrację toksycznych oligomerów w blaszkach, mikroglej może odgrywać rolę ochronną w mózgach chorych na AD (Yuan i in 2016; Huang i in., 2021). Dane uzyskane w niniejszej pracy, jako pierwsze pokazują korelację pomiędzy występowaniem zaburzeń funkcji mikrogleju, rozwinięciem stanu zapalnego oraz występowaniem zaburzeń poziomów markerów charakterystycznych dla synaps i neuronów (PSD95 i NeuN) z okresem gromadzenia się oligomerów A β na długo przed uformowaniem się płytek.

5.2. WD wywołuje zespół metaboliczny i ogólnoustrojowy stan zapalny

Badania przedstawione w niniejszej rozprawie pokazały szczegółową sekwencję procesów zachodzących w organizmie pod wpływem WD. Zaobserwowano, że żywienie WD indukuje rozwinięcie zespołu metabolicznego u myszy APPPSwe, co objawia się hipercholesterolemią, hiperglikemią, otyłością oraz niealkoholowym stłuszczeniem wątroby. Co więcej, rozwinięciu zespołu metabolicznego towarzyszyło pojawienie się ogólnoustrojowego stanu zapalnego o niskim nasileniu objawiającego się wzrostem stężenia poszczególnych subpopulacji białych krwinek w surowicy krwi.

Hipercholesterolemia indukowana przez WD w rozwoju AD

W ciągu 3 tygodni karmienia WD zaobserwowano hipercholesterolemię (HChol) ujawnioną jako intensywny wzrost poziomu cholesterolu w osoczu krwi. HChol jest znanym czynnikiem ryzyka dla AD i innych chorób neurodegeneracyjnych (Kosari i in., 2012; Xue-Shan i in., 2016). Nasze dane wspierają obserwację, że obwodowa HChol w połowie życia jest zwykle związana z wcześniejszym początkiem AD u ludzi (De Oliveira i in., 2014), szczególnie w odniesieniu do wyższych poziomów LDL, indukujących korową depozycję amyloidu (Rodriguez i in., 2006). Cholesterol mózgowy jest jednym z kluczowych elementów utrzymania homeostazy mózgu i funkcji neuronów (Dietschy i Turley, 2001; Vance, 2012), głównie jako składnik osłonek mielinowych oligodendrocytów, astrocytów i aksonów neuronów (Puglielli i in., 2003; Canevari i Clark, 2007; Mahley i in., 2000). W prawidłowych warunkach sprawnie funkcjonująca BBB skutecznie przeciwdziała napływowi obwodowego cholesterolu do mózgu, jednak pod wpływem zaburzeń metabolicznych i związanych z nimi czynników zapalnych przepuszczalność BBB jest zwiększona (Chakraborty i in., 2017). Cholesterol może przechodzić przez BBB w obu kierunkach, a jego ostateczne stężenie w surowicy jest wypadkową tych procesów (Umeda, et al., 2012).

Wysokie stężenie cholesterolu pochodzącego z diety w surowicy powoduje jego konwersję do 27-hydroksycholesterolu, formy cholesterolu zdolnej do swobodnego przepływu przez BBB do mózgu. Pośredniczy w tym zwiększony poziom izoform cytochromu P450 CYP27A1 i CYP7A1 w hepatocytach w przebiegu NAFLD (Testa i in., 2016; Zhang i in., 2018;

Gamba i in., 2019; Chen i in., 2020). Zwiększony napływ 27-hydroksycholesterolu do mózgu przyczynia się do indukcji stresu oksydacyjnego mózgu i rozwoju AD (Testa i in., 2016; Ioannou i in., 2017; Mast i in., 2017; Loera-Valencia i in., 2019; Chew i in., 2020; Wong i in., 2020). Patologiczne konsekwencje HChol w mózgu związane są również z funkcją cholesterolu jako ważnego składnika tratw lipidowych błon komórkowych, w których zlokalizowany jest APP oraz β - i γ -sekretazy zaangażowane w jego amyloidogenną proteolizę. Dowody wskazują, że HChol i podwyższony poziom cholesterolu w mózgu są związane ze zwiększonym stężeniem cholesterolu w błonowych tratwach lipidowych, nasilając amyloidogenezę APP i produkcję $A\beta$ w neuronach (Allinquant i in., 2014) i astrocytach (Xiu i in., 2006; Avila-Muñoz i Arias, 2015), co zostało opisane w dalszej części pracy.

Otyłość indukowana przez WD w rozwoju AD

Otrzymane wyniki wykazują rozwój otyłości pod wpływem żywienia WD u myszy APP^{swe}. Co więcej dane wykazały także wywołany WD istotny wzrost zawartości tkanki tłuszczowej w wątrobie. W takich warunkach mechaniczne zdolności magazynowe tkanki tłuszczowej są przekroczone i wolne kwasy tłuszczowe "rozlewają się" i gromadzą w tkankach metabolicznych, takich jak mięśnie szkieletowe, wątroba i trzustka (van Herpen i Schrauwen-Hinderling, 2008). Nadmierna ekspozycja komórek tłuszczowych i komórek odpornościowych rezydujących w tkance tłuszczowej na FFA prowadzi do aktywacji prozapalnych szlaków sygnalizacyjnych (Lyons i in., 2016). Skutkuje to wydzielaniem czynników prozapalnych z adipocytów i komórek odpornościowych rezydujących, co prowadzi do lipotoksyczności i insulinooporności (Hotamisligil, 2017; Burhans i in., 2019).

Nasycone kwasy tłuszczowe (SFA) aktywują prozapalne geny w makrofagach rezydujących w tkance tłuszczowej, jak geny kodujące cytokiny prozapalne TNF- α , oraz IL-6, (Chan i in., 2015; Zatterale i in., 2020). Zwiększone poziomy krążących SFA spowodowane otyłością wywołują stan zapalny w tkance tłuszczowej poprzez aktywację inflammasomu makrofagów, cytozolowego kompleksu wielobiałkowego odpowiedzialnego za aktywację odpowiedzi zapalnej (Korbecki i Bajdak-Rusinek, 2019).

Nasze dane jednoznacznie wskazują na występowanie ogólnoustrojowego stanu zapalnego o niskim nasileniu. Analiza hematologiczna krwi wykazała wzrost stężenia białych krwinek, zwłaszcza frakcji granulocytów i monocytów już po 3 tygodniach karmienia WD, a następnie po pięciu miesiącach WD dodatkowo wzrost stężenia limfocytów. Wskazuje to na niemal natychmiastową, indukowaną przez WD, aktywację mechanizmów układu odpornościowego, zarówno tych wrodzonych, jak i adaptacyjnych, w celu obrony przed szkodliwym działaniem niezdrowych składników diety.

Po 5 miesiącach karmienia WD dalszemu wzrostowi stężenia białych krwinek towarzyszył wyraźny wzrost masy ciała. Wiadomo, że za korelację pomiędzy stężeniem białych krwinek, a masą ciała odpowiada leptyna uwalniana z tkanki tłuszczowej, która stymuluje hematopoezę (Wilson i in., 1997). Obecność receptorów leptyny na hematopoetycznych komórkach macierzystych (zarówno u myszy, jak i u ludzi) oraz obserwacja, że leptyna stymuluje mielopoezę i limfopoezę, dodatkowo wskazuje na związek między tkanką tłuszczową, a stężeniem białych krwinek (Laharrague i in., 2000). Ponadto, biorąc pod uwagę, że dieta wysokotłuszczowa u myszy powoduje napływ neutrofilów z krwi do tkanki tłuszczowej

(Elgazar-Carmon i in., 2008), wydaje się prawdopodobne, że neutrofile odgrywają rolę w inicjowaniu kaskady zapalnej w odpowiedzi na otyłość. Neutrofile z tkanki tłuszczowej produkują chemokiny i cytokiny, ułatwiając infiltrację monocytów, co może przyczyniać się w szczególności do przewlekłego zapalenia o niskim nasileniu wywołanego dietą.

Spadek masy ciała wykryty w grupie karmionej WD w 12 miesiącu życia można wyjaśnić utratą masy ciała w związku z pojawieniem się objawów AD i rozwojem poważnych zaburzeń metabolicznych prawdopodobnie skutkujących zmniejszonym spożyciem pokarmu. Ponadto, wysoka zawartość cholesterolu w diecie WD w tym badaniu może stanowić kolejny czynnik przyczyniający się do utraty masy ciała u zwierząt długo karmionych. Obserwacja ta jest spójna z wynikami innych badań, gdzie również wykazano, że dieta wysoko cholesterolowa w modelu 3xTg-AD spowodowała niespodziewaną utratę masy ciała u myszy po 12 miesiącach karmienia (Hohsfield i wsp. 2014). Wydaje się, że transgeny związane z AD i związane z nimi genotypy mogą modyfikować metabolizm cholesterolu na obwodzie i jego późniejszą kumulację w tkankach tłuszczowych, co skutkuje zaburzeniem regulacji mechanizmów odpowiedzialnych za odczuwanie głodu i sytości, podwyższonym stresem i niepokojem, a w efekcie utratą masy ciała.

Patologia wątroby wywołana przez WD w rozwoju AD

Wśród narządów reagujących na zaburzenia metabolizmu i czynniki prozapalne znajduje się wątroba. Odpowiedź układu odpornościowego w wątrobie odgrywa kluczową rolę w rozwoju NAFLD, ale dokładna regulacja odpowiedzi odpornościowej jest niejasna, a wątrobowa aktywacja neutrofilów i makrofagów jest uważana za miecz obosieczny (Xu i in., 2014). Zgodnie z tą wiedzą, w naszym badaniu obserwowaliśmy wzrost poziomu granulocytów i monocytów we krwi podczas karmienia WD, obok zwiększonej infiltracji komórek prozapalnych do tkanki wątrobowej w przebiegu NASH. Wykazaliśmy, że zaledwie 3 tygodnie karmienia myszy WD spowodowały przerost hepatocytów i powstanie w ich obrębie wakuoli lipidowych. Te zmiany morfologiczne w tkance wątrobowej pogłębiały się z wiekiem i przy dalszym podawaniu WD, doprowadziły ostatecznie do balonowatości hepatocytów i makropęcherzykowego stłuszczenia, które są cechami charakterystycznymi rozwijającego się NASH u starszych myszy (8M, 12M). Zaawansowane uszkodzenie wątroby wywołane WD wraz z towarzyszącą infiltracją komórek zapalnych potwierdza rozwój NAFLD.

Otrzymane wyniki są zgodne z wiedzą, że typowe składniki WD są odpowiedzialne za takie upośledzenie wątroby (Berná i Romero-Gomez, 2020). WD również moduluje gromadzenie triglicerydów i antyoksydantów w wątrobie, co wpływa na wrażliwość na insulinę i poposiłkowy metabolizm triglicerydów (Musso i in., 2003). Nasycone kwasy tłuszczowe (SFA) w WD znacząco zwiększają stłuszczenie wątroby z powodu indukcji lipogenezy w wątrobie i lipolizy w tkance tłuszczowej. Ponadto SFA wpływają na metabolizm glutationu prowadzący do stresu oksydacyjnego (Franko i in., 2018; Rosqvist i in., 2019). Monosacharydy i disacharydy, obficie występujące w posiłkach typu WD, również wpływają na funkcjonowanie wątroby. Istnieje silny związek pomiędzy ryzykiem wystąpienia NAFLD, a produktami zawierającymi duże ilości sacharozy lub fruktozy, takimi jak syrop kukurydziany, ciastka, napoje bezalkoholowe i słodkie przekąski. Podobnie jak SFA, fruktoza z pożywienia stymuluje lipogenezę w wątrobie i prowadzi do stłuszczenia, ale również objawia się podwyższonym pozio-

mem aminotransferaz alaninowych w osoczu, wskaźnikiem upośledzenia czynnościowego wątroby (Chiu i in., 2018; Berná i Romero-Gomez, 2020).

Fizjologiczna rola wątroby obejmuje wiele procesów, które są zaangażowane w mechanizmy związane z rozwojem i progresją AD. Strukturalne i/lub funkcjonalne uszkodzenie wątroby zmniejsza jej zdolność do efektywnego usuwania i degradacji A β . U pacjentów z chorobami wątroby obserwuje się niską wątrobową ekspresję LRP-1 i wysokie poziomy krążącego A β , ponieważ *klirens* A β zmniejsza się z powodu niskiej aktywności wątrobowego LRP-1 (Wang i in., 2017). W niedawno przeprowadzonym badaniu epidemiologicznym wykazano, że choroby współistniejące związane z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi i otępieniem w wyniku AD były, w przeważającej mierze, zaburzeniami spowodowanymi dietą, takimi jak: NAFLD, marskość wątroby, choroby naczyniowe z uwzględnieniem naczyń mózgowych, czy cukrzyca typu 2, z których wszystkie charakteryzują się zmniejszeniem usuwania A β (Bassendine i in., 2020). NAFLD jest silnie związana z indukowaną dietą wątrobową insulinoopornością (Kumashiro i in., 2011). W zdrowych warunkach insulina promuje translokację LRP-1 do błony komórkowej w hepatocytach i sprzyja wychytowi A β przez LRP1, ale insulinooporność czyni ten proces słabym lub niemożliwym prowadząc do ogólnego wzrostu poziomu A β (Tamaki i in., 2007).

Prezentowane w tej pracy wyniki wykazały również, że uszkodzenie wątroby jest skorelowane z odkładaniem się A β w mózgu. WD przyspieszyła akumulację i odkładanie A β o około 8 miesięcy w porównaniu z kontrolnymi myszami APPswe karmionymi dietą standardową. Należy zwrócić uwagę, że patologia wątroby, taka jak NAFLD i NASH, zwiększa poziom cholesterolu w krwiobiegu, zwłaszcza 27-hydroksycholesterolu, formy zdolnej do swobodnego przepływu przez BBB i napływu do mózgu. Wynika z tego, że nagromadzenie cholesterolu w mózgu sprzyja produkcji A β w tratwach lipidowych, przyczyniając się do progresji AD.

Uszkodzenie wątroby działa jak miecz obosieczny: brak możliwości utrzymania przez uszkodzoną wątrobę *klirensu* obwodowego A β zwiększa odkładanie się A β w mózgu. Z drugiej strony uwalnianie cytokin prozapalnych przez uszkodzoną wątrobę i zmieniona wrodzona odpowiedź immunologiczna przyczyniają się do ogólnoustrojowego zapalenia, upośledzenia BBB, a następnie do rozwoju AD.

Dane otrzymane w niniejszej pracy poszerzają wiedzę na temat wpływu WD na rozwój zespołu metabolicznego oraz jako jedne z nielicznych wykazują bezpośrednio jego powiązanie z rozwojem AD. Zaburzenia związane z rozwojem HChol, NAFLD/NASH i otyłości pod wpływem diety WD wskazują na istotną rolę cholesterolu i FFA, bogatych we frakcję SFA w patogenezie AD co szczegółowo zostało omówione w kolejnych częściach Dyskusji.

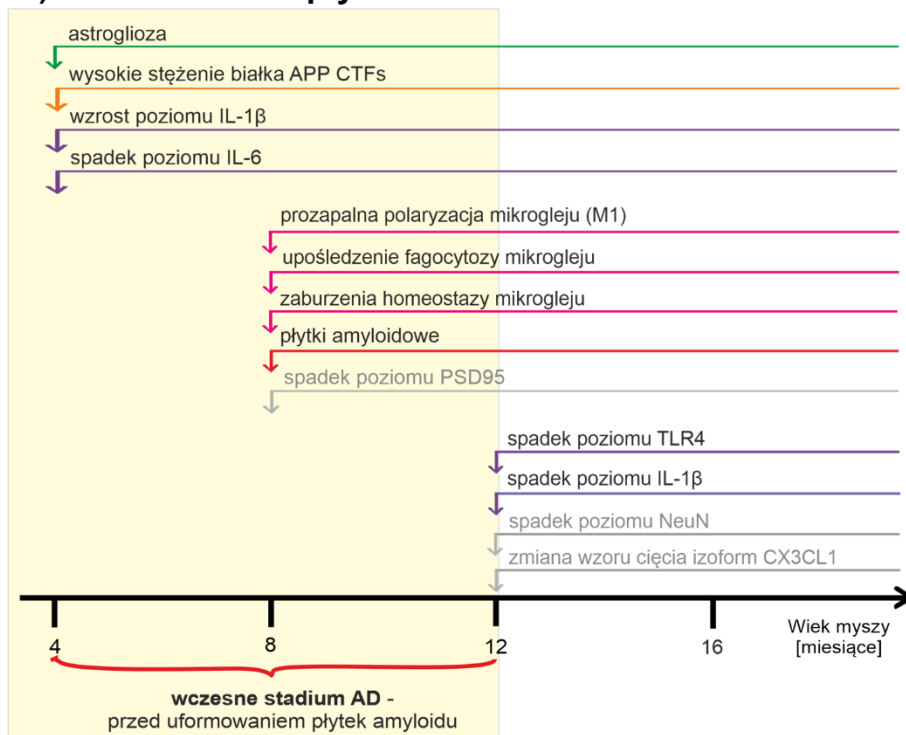
5.3. WD przyspiesza rozwinięcie neurozapalenia i neuropatologii AD: szczególna wrażliwość hipokampa w porównaniu do kory śródwęchowej

W niniejszej pracy stwierdzono, że w modelu APPswe, WD, oprócz wywołania zespołu metabolicznego i ogólnoustrojowego stanu zapalnego, przyspieszyła wystąpienie zmian patologicznych w mózgu, w tym rozwój amyloidopatii w odniesieniu do sekwencji zmian określonych u myszy APPswe karmionych standardową paszą, omówionych w punkcie 5.1. Najstarsze myszy APPswe utrzymywane na WD przez ponad 16 miesięcy (w grupie 20M WD+LPS)

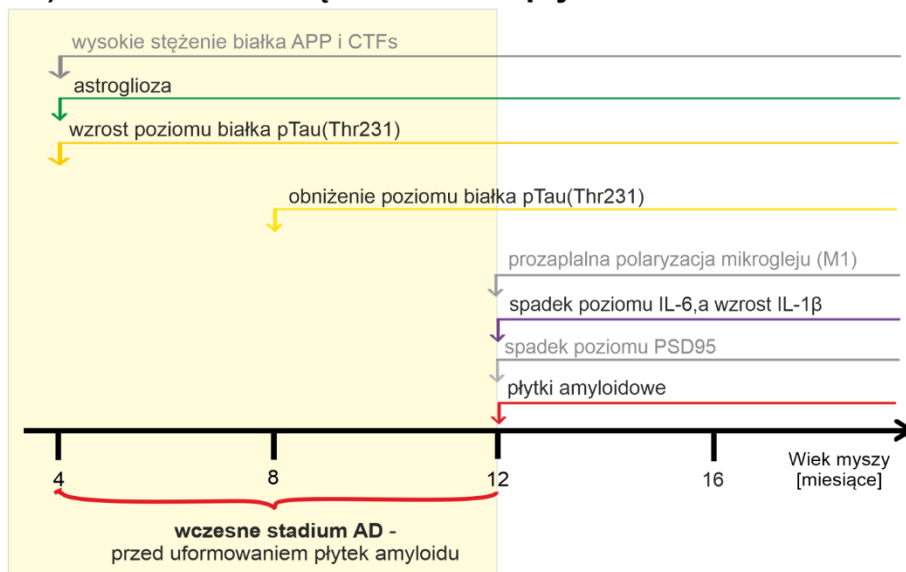
wykazywały charakterystyczne cechy późnego zaawansowanego stadium rozwoju AD z silnie rozwiniętymi zmianami neuropatologicznymi. Obserwacje te wskazują, że opracowany model myszy APP^{sw}e utrzymywany na diecie WD dobrze odpowiada patologii ludzkiej AD (**Ryc. 31**). W odniesieniu do innych badań oceniających zmiany na poziomie behawioralnym, ustalenia przedstawione w niniejszej pracy również wskazują, że WD może upośledzać funkcje poznawcze, uczenie się i pamięć oraz wzmacniać lub indukować cechy patologiczne w mózgu, zarówno u gryzoni (Kanoski i Davidson 2011; Leigh i Morris, 2020), jak i u ludzi (Francis i Stevenson, 2011; Attuquayefio i in., 2017).

Natomiast analiza tkanki hipokampa pobranej w stadium przed- płytkowym od myszy APP^{sw}e karmionych WD wykazała, że procesy związane z rozwinięciem neurozapalenia i patologii A β wystąpiły znacznie wcześniej niż u kontrolnych myszy APP^{sw}e karmionych dietą standardową (**Rycina 46 A**). W hipokampie dieta WD wywołała astrogliozę już po 3 tygodniach karmienia, w najmłodszej analizowanej grupie myszy 4M, a więc 4 miesiące wcześniej niż w grupie kontrolnej. Ponadto, dane wskazują na aktywację prozapalnego fenotypu mikrogleju (\uparrow Iba1), zaburzenie utrzymania fenotypu przeciwzapalnego M2 (\downarrow P2RY12) i upośledzenie zdolności fagocytarnych w hipokampie po 5 miesiącach karmienia WD u myszy 8M, a więc 4 miesiące wcześniej, niż u myszy kontrolnych APP^{sw}e. Ponadto utrzymujący się stały poziom receptora dla fraktalkiny – CX3CR1, łącznie ze wzrostem poziomu Iba1 (\uparrow Iba1) oraz spadkiem poziomu P2RY12 (\downarrow P2RY12), sugeruje napływ do hipokampa monocytów/makrofagów z obwodu przez uszkodzoną barierę krew-mózg. Dodatkowo w hipokampie myszy karmionych WD w porównaniu do dopasowanych wiekowo kontroli CTR zaobserwowano utrzymujący się wysoki poziom cytokiny prozapalnej IL-1 β przez cały badany okres, czyli od 4 aż do 12 miesiąca życia, jak opisano w punkcie 5.1. Natomiast porównując myszy karmione WD w wieku 12 miesięcy i 8 miesięcy stwierdzono, że poziom IL-1 β był niższy, co korelowało w czasie ze spadkiem poziomu receptora TLR4 u myszy dwunastomiesięcznych. Obserwacja ta sugeruje włączenie mechanizmów obronnych mózgu zabezpieczających przed utrzymującym się przewlekłym stanem zapalnym. Zauważono także szybszy spadek poziomu cytokiny IL-6 u myszy karmionych WD w wieku 8 miesięcy w porównaniu do tych na diecie standardowej, gdzie spadek obserwowano dopiero w wieku 12 miesięcy. Obserwacja ta sugeruje, że poziom analizowanych cytokin prozapalnych zmienia się w czasie, przy czym poziom IL-6 mógł wzrastać jako efekt procesów związanych z indukcją stanu zapalnego w oknie czasowym, który nie był badany w eksperymencie, czyli w okresie krótszym niż 3 tygodnie od wprowadzenia WD. Następnie, wraz z rozwijającymi się kolejnymi zaburzeniami mechanizmów molekularnych obserwowano wzrost poziomu IL-1 β i jednoczesny spadek poziomu IL-6 w mózgu. Wynik ten może świadczyć o indukcji nowych ścieżek prozapalnych, których efektem jest produkcja IL-1 β i wyciszenie procesów związanych z produkcją IL-6. Hipotezę tę potwierdza wzrost poziomu receptora TLR4 w grupie myszy karmionych WD w wieku 8M, a następnie spadek jego poziomu w wieku 12M, czemu towarzyszył spadek poziomu IL-1 β . Dodatkowo w hipokampie obserwowano zwiększenie poziomu białka APP i CTFs po 3 tygodniach karmienia WD u czteromiesięcznych myszy, 4 miesiące wcześniej niż u myszy kontrolnych. Co więcej, pozakomórkowa akumulacja A β w postaci blaszek nastąpiła po 5 miesiącach karmienia u myszy 8M, czyli aż 8 miesięcy wcześniej, niż u myszy kontrolnych, gdzie blaszki amyloidowe obserwowano dopiero u myszy w wieku 16 miesięcy.

A) HIPOKAMP – wpływ WD



B) KORA ŚRÓDWĘCHOWA – wpływ WD



Rycina 46. Schemat przedstawiający sekwencję zdarzeń neuropatologicznych w hipokampie (A) oraz korze śródwęchowej (B) myszy APPSwe wywołanych karmieniem dietą zachodnią (WD). Na szaro zaznaczono procesy, które nie ulegają zmianie względem kontroli (CTR).

W korze śródwęchowej myszy APPSwe karmionych dietą zachodnią procesy związane z rozwinięciem neurozapalenia i patologii A β także występowały wcześniej, niż u kontrolnych myszy APPSwe karmionych dietą standardową, natomiast zjawiska te przebiegały w nieco inny sposób niż w hipokampie (Rycina 36W B). W korze śródwęchowej dieta WD także wywołała nadaktywność astrocytów już po 3 tygodniach karmienia, w najmłodszej analizowanej grupie myszy 4M, a więc 4 miesiące wcześniej niż w grupie kontrolnej. Otrzymane dane wskazują także na aktywację prozapalnego fenotypu mikrogleju (\uparrow Iba1), bez upośledzenia zdolno-

ści fagocytarnych (w przeciwieństwie do hipokampa), po 5 miesiącach karmienia WD u myszy 8M, czyli 4 miesiące wcześniej niż u myszy kontrolnych. Zauważono, że w korze śródwęchowej dieta podnosi poziom cytokiny IL-1 β dopiero po 9 miesiącach karmienia, czyli w wieku 12M. Również akumulacja blaszek A β nastąpiła po 9 miesiącach karmienia u myszy 12M, czyli 4 miesiące później niż w hipokampie i 4 miesiące wcześniej niż u myszy kontrolnych (w wieku 16 miesięcy). Dodatkowo wykazano, że pod wpływem WD w korze śródwęchowej dochodzi do nieistotnego wzrostu poziomu fosforylowanej formy białka pTau(Thr231), już po 3 tygodniach karmienia WD, czyli w najmłodszej analizowanej grupie myszy 4M. Co ciekawe, poziom pTau(Thr231) spadł do poziomu kontrolnego wraz z wydłużającym się czasem ekspozycji na dietę WD w grupach 8M i 12M. Nie zaobserwowano również zmian w komórkowej lokalizacji p-Tau(Thr231) i w organizacji cytoszkieletu neuronów.

W niniejszym badaniu w analizie ilościowej nie zaobserwowano istotnego wpływu WD na obniżenie poziomu markera synaptycznego PSD95 i neuronalnego NeuN, zarówno w hipokampie, jak i w korze śródwęchowej. Natomiast w obrazie mikroskopowym z analizy skrawków półkulowych mózgu myszy, w obszarze zakrętu zębatego (DG) hipokampa zaobserwowano znaczące upośledzenie morfologii neuronów, zarówno warstwy ziarnistej, jak i neuronów wielokształtnych we wnęce (*hilus*) pod wpływem WD już po 3 tygodniach karmienia, u czteromiesięcznych myszy. U myszy w wieku 8 miesięcy zmiany te były widoczne już też w obszarze CA3 hipokampa. Otrzymane wyniki są nieco odmienne od niektórych danych dostępnych w literaturze, w których wykazano spadek poziomu markerów synaptycznych (PSD95 i synapsyny), neurotrofiny BDNF oraz markera NeuN w hipokampie oraz atrofię neuronów hipokampa w mózgach myszy C57BL/6 karmionych dietą wysokotłuszczową bogatą w tłuszcze nasycone i cukier przez 2 i 4 miesiące (Liu i in., 2014; Hong i in., 2020). Ponadto wykazano także, że HFD wpływa na hipokampalny poziom ekspresji białka związanego z syntosomami (z ang. *synaptosomal-associated protein 25* – SNAP-25), składnika rozpuszczalnego receptora białka przyłączającego czynnik wrażliwy na N-etylomaleimid (SNARE), który jest bezpośrednio zaangażowany w uwalnianie neuroprzekaźników (Lizarbe i in., 2019). Co ciekawe, synteza tego białka jest wymagana do prawidłowego tworzenia synaps i uwalniania pęcherzyków synaptycznych z terminala presynaptycznego podczas rozwoju i neurogenety (Batista i in., 2017). Natomiast różnice wyników tej pracy z zacytowanymi doniesieniami mogą wynikać z różnych składów stosowanych diet oraz zastosowanych różnych modeli zwierzęcych. Obserwowany w tym badaniu brak istotnego wpływu WD na markery synaptyczne i neuronalne może być spowodowany obecnością nadekspresji *APP*, która jako czynnik nadrzędny działa od początku życia zwierząt, warunkując molekularne zmiany prowadzące do stopniowego, stałego uwalniania peptydów A β na drodze amyloidogennej proteolizy, ale może również wpływać na wiele innych mechanizmów i sygnalizację wewnątrzkomórkową, prowadząc do upośledzenia innych procesów, np. synaptogenezy. Obecność i ciągle wytwarzanie toksycznych form A β wraz z wiekiem wywołuje upośledzenie funkcji synaps i stopniowe zamieranie neuronów prawdopodobnie maskując wpływ diety. Wniosek ten potwierdza analiza porównawcza stopnia degeneracji neuronów pomiędzy transgeniczną linią myszy APP^{sw} z myszami szczepu dzikiego C57BL/6. Prezentowane wyniki potwierdziły, że obecność mutacji w genie *APP* ogrywa kluczową rolę w kierowaniu neuronów na drogę degeneracji oraz, że zależność ta jest silnie związana z wiekiem i procesem starzenia się zwierząt. Neurony o zmienionej morfologii, sugerujące uruchomienie mechanizmów prowadzących do śmierci

komórki, były widoczne w hipokampie i korze śródwęchowej głównie u starzejących się myszy APP^{swe} (16M), w porównaniu do młodych myszy APP^{swe} (4M), jak i do starzejących się myszy C57BL/6 (16M).

Jednym z kluczowych odkryć tej pracy było scharakteryzowanie, po raz pierwszy, szczegółowej chronologii systemowych zmian metabolicznych wywołanych przez WD, zmian neurozapalnych w mózgu, oraz określenie ich współwystępowania w różnych etapach przed- i wczesnej fazy rozwoju AD. Wyniki otrzymane w niniejszej pracy wskazują, że WD przyspiesza i nasila procesy związane z patogenezą AD, pierwotnie wywołane mutacją w genie kodującym białko APP w modelu mysim APP^{swe} zarówno w hipokampie, jak i korze śródwęchowej. W tej pracy pierwszy raz wykazano, że spośród struktur mózgu w obszarze płata skroniowego, w których dochodzi do inicjacji patogenezы AD, to hipokamp w porównaniu do kory śródwęchowej jest strukturą silnie podatną na intensyfikację stanu zapalnego pod wpływem działania WD. Co więcej niniejsza praca jako jedna z pierwszych wykazała przyspieszone tworzenie się płytek amyloidowych o 4 miesiące wcześniej w hipokampie, niż ma to miejsce w korze śródwęchowej pod wpływem działania WD. Wyniki te jednoznacznie sugerują, że WD wpływa szczególnie na procesy związane z amyloidogenezą, a w mniejszym stopniu na tauopatię związaną z fosforylacją tau na treoninie 231, będącą jednym z uznanych markerów AD (Ashton i in., 2021). Korelacja tych zmian ze współwystępowaniem HChol, otyłości i NAFLD/NASH sugeruje szczególną rolę cholesterolu i SFA pochodzących z WD w patogenezie AD, co zostało szczegółowo omówione w kolejnych podrozdziałach Dyskusji. Ponadto istotnym odkryciem niniejszej pracy jest też wykazanie, że przyspieszona aktywacja astrocytów wywołana WD poprzedza aktywację mikrogleju i patologię A β w mózgu (**Ryc. 45 i 46**).

Wrażliwość neuronów hipokampa na intensyfikację stanu zapalnego pod wpływem WD

Obserwowana wrażliwość hipokampa na działanie WD skutkująca niemal natychmiastową intensyfikacją stanu zapalnego (już po trzech tygodniach karmienia WD) w porównaniu do kory śródwęchowej jest bardzo istotnym wynikiem z uwagi na przebieg patogenezы AD. Kliniczne objawy AD zaczynają się od upośledzenia pamięci, a jak wiadomo procesy związane z tworzeniem się pamięci długotrwałej zachodzą głównie przy udziale hipokampa. Dodatkowo w pracy pokazano także, że krótka ekspozycja na WD (3 tygodnie) wpływa na zmiany neurodegeneracyjne w neuronach obszarów zakrętu zębatego - DG oraz CA3. Obserwowana wrażliwość hipokampa na procesy zapalne może wynikać z faktu, że duże neurony piramidalne prezentują wysokie zapotrzebowanie energetyczne i posiadają unikalny profil metaboliczny, przez co mogą być podatne na zaburzenia, wynikające ze zmiany zawartości składników odżywczych dostarczanych do organizmu wraz z pożywieniem (Hargrave i in., 2016). Najsilniejsze znamiona obumierania neuronów obserwowane w obrębie DG i CA3 pod wpływem WD wykazują, że dieta może oddziaływać na patologię AD już na jej wczesnych etapach. W DG pod warstwą ziarnistą znajduje się warstwa komórek wielokształtnych, zwana też wnęką zakrętu zębatego, gdzie występuje wiele rodzajów interneuronów modulujących aktywność komórek ziarnistych zakrętu zębatego, jak i innych interneuronów. W skład tej populacji wchodzi zarówno interneurony GABAergiczne (hamujące), jak i interneurony glutaminergiczne (pobudzające) (Jonas i Lisman, 2014), których zaburzenia są dobrze udokumentowane w przebiegu AD (Czapski i in., 2021; Andersen i in., 2022). Natomiast obserwo-

wany w niniejszej pracy brak istotnych znamion degeneracji neuronów w polu CA1 hipokampa, zarówno pod wpływem wieku, jak i WD do 12 miesiąca życia myszy APP^{swe}, sugeruje, że obserwowane zmiany morfologii komórek mogące świadczyć o postępującej degeneracji w poszczególnych obszarach hipokampa, następują relatywnie wolno, pomimo wystąpienia silnego neurozapalenia, co daje duże okno czasowe na zastosowanie różnych metod zahamowania procesu obumierania neuronów. Jest to istotne spostrzeżenie w kontekście możliwości prewencji czy terapii na etapie przed-objawowej patogenezy AD.

Obserwowana wrażliwość hipokampa na intensyfikację stanu zapalnego pod wpływem WD może być spowodowana m.in. zwiększoną przepuszczalnością BBB w obrębie tego obszaru. Badania wykazały zwiększoną przepuszczalność bariery krew-mózg w obszarze hipokampa i podwzgórza pod wpływem diety wysokotłuszczowej i bogatej w cholesterol (Salameh i in., 2019). Dalsze poparcie dla związku między czynnikami dietetycznymi i metabolicznymi, BBB i AD pochodzi z badań przeprowadzonych przez Banks'a i współpracowników, w których upośledzony aktywny transport/przejście różnych sygnałów neuroendokrynych przez BBB w obszarze hipokampa, w tym leptyny i greliny, zaobserwowano u otyłych gryzoni, które spożywały dietę wysokotłuszczową (Banks i in., 2004, 2008). Ponadto wykazano, że dieta bogata w SFA koreluje z wystąpieniem zmian w morfologii dendrytów (Granhölm i in., 2008), oraz struktury naczyń krwionośnych (Freeman et al., 2011). Podsumowując, wyniki te sugerują, że uszkodzenia BBB i spowodowane przez składniki diety zachodniej są jednym z mechanizmów, które mogą ostatecznie doprowadzić do silnej odpowiedzi zapalnej, uszkodzenia hipokampa, pogorszenia funkcji poznawczych i wystąpienia demencji.

Co więcej indukowana przez WD silna odpowiedź zapalna w hipokampie w porównaniu z korą śródwęczową oraz wystąpienie zmian neurodegeneracyjnych w morfologii neuronów DG, a później dopiero w obszarze CA3 ma szczególne implikacje w przebiegu neuropatologii w AD. Budowa DG jest trójwarstwowa, z jedną wyraźną warstwą neuronów ziarnistych. Ich szczytowe dendryty tworzą warstwę drobinową, która jest głównym odbiornikiem połączeń z kory śródwęczowej oraz z leżącego w drugiej półkuli mózgu zakrętu zębatego (Jonas i Lisman, 2014). Głównym celem połączeń wychodzących z zakrętu zębatego jest pole CA3 hipokampa, co jest realizowane za pomocą aksonów neuronów ziarnistych. Aksony te tworzą tzw. drogę mszystą, która dociera do komórek piramidalnych pola CA3, tworząc z nimi połączenia synaptyczne. Poza polem CA3 zakręty zębate obu półkul tworzą ściśle wzajemne połączenia (Amaral i in., 2007). Dane te sugeruje, że zakręt zębaty działa jako wstępny procesor przychodzących informacji, przygotowując je do późniejszego przetwarzania w CA3. Komórki ziarniste zakrętu zębatego otrzymują pobudzające neurony wejściowe z kory śródwęczowej i wysyłają pobudzające sygnały wyjściowe do regionu CA3 hipokampa za pośrednictwem włókien mszystych (Jonas i Lisman, 2014). Natomiast *subiculum* otrzymuje dane wejściowe z neuronów piramidowych CA1 i warstwy III kory śródwęczowej oraz jest głównym wyjściem hipokampa. Neurony piramidowe wysyłają projekcje do jądra półleżącego, jąder przegrody, kory przedczołowej, podwzgórza bocznego, jądra ponownego, jąder sutkowych, ciała migdałowatego i z powrotem do kory śródwęczowej, czyli kolejnych kluczowych obszarów związanych z patologią AD (Ding i in., 2013). W tej sytuacji wykazana w niniejszej pracy szczególna wrażliwość hipokampa, w tym neuronów zakrętu zębatego na działanie WD, podkreśla szczególną rolę WD w intensyfikacji procesów związanych z przebiegiem patologii AD i potwierdza, że WD jest modyfikowalnym czynnikiem ryzyka AD.

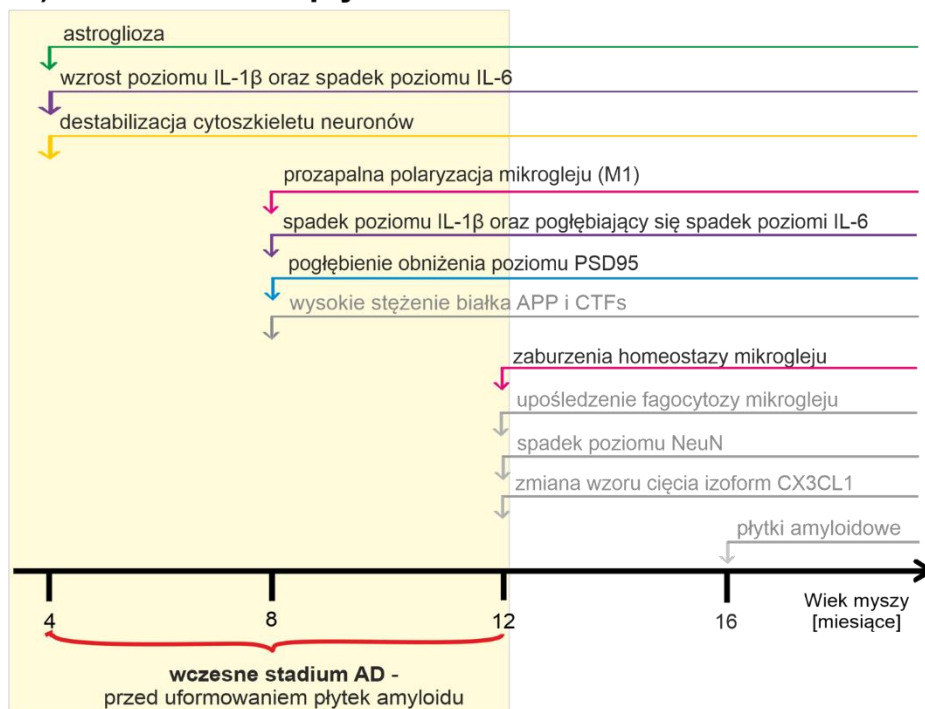
5.4. LPS przyspiesza neurozapalenie, ale nie patologię amyloidu

W pierwszej kolejności zaobserwowano, że dootrzewnowa iniekcja LPS nie wywołuje zaburzeń metabolicznych w analizie biochemicznej surowicy krwi pobranej od myszy APP^{swE}. Podobnie, analiza hematologiczna nie ujawniła różnic w poziomach poszczególnych subpopulacji białych krwinek w analizowanych grupach z iniekcją LPS w wieku 4M, 8M i 12M. Obserwacja ta świadczy o tym, że w pierwszym analizowanym punkcie czasowym (4M), czyli po 3 tygodniach od serii trzech dootrzewnowych iniekcji LPS, wywołany ogólnoustrojowy stan zapalny zdążył się już wyciszyć. Natomiast wykazano, że pomimo wyhamowania oznak zapalenia na obwodzie, w mózgu, zarówno w hipokampie, jak i korze śródwęchowej myszy APP^{swE}, iniekcja LPS przyspieszyła procesy neurozapalenia w porównaniu do kontrolnych zwierząt, natomiast procesy te nie wpłynęły na tempo przebiegu patologii A β w zastosowanym modelu (**Rycina 47**).

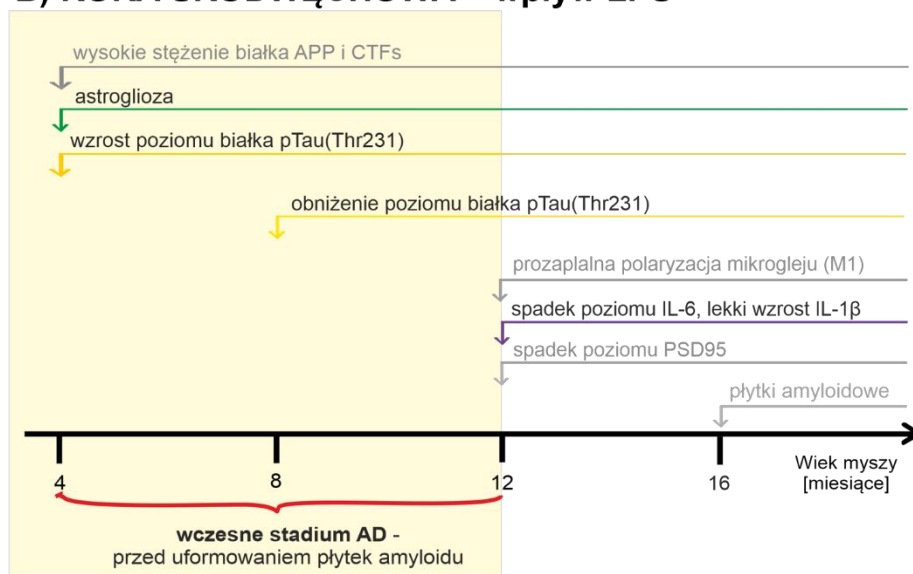
W hipokampie seria dootrzewnowych iniekcji LPS (**Rycina 47 A**) wywołała silną reakcję astrocytów już po 3 tygodniach od iniekcji LPS, w najmłodszej analizowanej grupie myszy 4M, a więc 4 miesiące wcześniej niż w grupie kontrolnej. W tym samym czasie nastąpił także silny wzrost poziomu IL-1 β , zbiegający się w czasie z postępującą destabilizacją cytoszkieletu, uwidocznioną w znakowaniu fosforylowanej formy białka tau [pTau(Thr231)] w półkulowych przekrojach mózgu. Badania pokazują, że białko tau tworzy fizjologiczne oligomery – głównie dimery i trimery – na mikrotubulach (Niewiadomska i in., 2021). Jednak w stanach patologicznych tau tworzy małe struktury oligomeryczne, zespoły fibrylarne i rozgałęzione fibryle, które różnią się od fizjologicznych oligomerów i nie tworzą połączeń z mikrotubulami, co może prowadzić do destabilizacji mikrotubul oraz uszkodzenia transportu aksonów lub dendrytów (Niewiadomska i in., 2021).

Następnie, dopiero w grupie myszy ośmiomiesięcznych, w hipokampie nastąpiła aktywacja prozapalnego fenotypu mikrogleju (\uparrow Iba1), z utratą homeostazy (\downarrow P2RY12) po 5 miesiącach od iniekcji LPS, a więc 4 miesiące wcześniej niż u myszy kontrolnych. W tym samym czasie nastąpił spadek poziomu cytokin prozapalnych IL-6 i IL-1 β u myszy 8M LPS, a więc 4 miesiące wcześniej niż u myszy kontrolnych. U myszy ośmiomiesięcznych, w hipokampie myszy poddanych iniekcji LPS, zaobserwowano także pogłębiający się spadek poziomu markera gęstości synaptycznej PSD95. Literatura pokazuje, że patologia tau jest ściśle związana z komórkami mikrogleju, gdzie jego aktywacja prowadzi do propagacji patologii tau (Bolós i in., 2017; Pera i in., 2020). Obserwowana utrata homeostazy mikrogleju, oraz aktywacja jego fenotypu zapalnego może wpływać na zaburzenia procesów przeprowadzania przez te komórki efektywnej fagocytozy toksycznych oligomerów tau, które wydostają się do szczeliny synaptycznej co w konsekwencji prowadzi do utraty synaps (Robbins i in., 2021).

A) HIPOKAMP – wpływ LPS



B) KORA ŚRÓDWĘCHOWA – wpływ LPS



Rycina 47. Schemat przedstawiający sekwencję neuropatologicznych zdarzeń w (A) hipokampie oraz (B) korze śródwęchowej myszy APPsw wywołanych dootrzewnową iniekcją LPS (LPS). Na szaro zaznaczono procesy, które nie ulegają zmianie względem kontroli (CTR).

W korze śródwęchowej seria dootrzewnowych iniekcji LPS (**Rycina 47 B**) wywołała wzrost aktywności astrocytów (\uparrow GFAP) oraz wzrost poziomu fosforylowanej formy białka pTau(Thr231) już po 3 tygodniach od iniekcji, w najmłodszej analizowanej grupie myszy 4M. W grupie myszy ośmiomiesięcznych, stwierdzono utrzymujący się spadek poziomu fosforylacji białka pTau(Thr231) w grupie LPS do poziomu kontrolnego. Dodatkowo, u myszy APPsw w wieku 12 miesięcy po podaniu LPS w korze śródwęchowej zaobserwowano wzrost poziomu cytokiny IL-1 β oraz spadek poziomu IL-6.

Pomimo wpływu LPS na nasilenie procesów zapalnych w mózgu, a także fosforylację białka tau [pTau(Thr231)] w korze śródwęchowej i destabilizację cytoszkieletu komórkowego w hipokampie, w obu tych strukturach nie obserwowano ani zwiększenia poziomu białka APP, ani CTFs względem poziomu obserwowanego u myszy kontrolnych. Dodatkowo LPS nie przyspieszył też akumulacji płytek amyloidu, których pojawienie się obserwowano w tym samym czasie co u zwierząt kontrolnych, tj. w wieku 16 miesięcy. Obserwacje te są dosyć zaskakujące, ponieważ szereg danych literaturowych pokazuje jednoznaczny wpływ dootrzewnowej iniekcji LPS na procesy związane z odkładaniem się płytek amyloidowych w mózgu (Nava Catorce i Gevorkian, 2016; Wang i in., 2018; Kirk i in., 2019). Natomiast to co różni niniejsze badanie od większości badań, w których obserwowano wpływ LPS na amyloidopatię jest zastosowany protokół. Mianowicie wywołanie lub przyspieszenie powstawania płytek A β obserwowano głównie w przypadku podania zdecydowanie większych dawek LPS (10 mg/kg), niż dawka zastosowana w omawianym badaniu (3 x 0,5 mg/kg). Brak wpływu na procesy amyloidopatii w tej pracy prawdopodobnie jest wynikiem wystąpienia zjawiska hormezy, która mówi o tym, że czynnik, który jest szkodliwy w większych dawkach, w małych dawkach może wywoływać procesy adaptacyjne bądź nawet wywoływać skutki korzystne (Mattson i Calabrese, 2010).

Pomimo tego, że LPS jest dobrze znanym czynnikiem wywołującym neurozapalenie, niniejsza praca jako pierwsza do tej pory wykazała tak szczegółową sekwencję zdarzeń indukowanych, zarówno na obwodzie, jak i w mózgu pod wpływem LPS w kilku punktach czasowych życia myszy APP^{swE}, w stadium przedobjawowym, przed wytworzeniem płytek amyloidowych. Z uzyskanych danych wynika, że przebycie ostrej infekcji bakteryjnej (jeden z czynników ryzyka AD) nie zawsze będzie wywoływało tak negatywne skutki pod kątem kondycji mózgu jak uważano do tej pory (intensyfikacja neurozapalenia, bez wpływu na amyloidogenezę), a o intensyfikacji patologicznych zmian prawdopodobnie decydować będzie stopień nasilenia infekcji oraz długość jej trwania. Poza tym uzyskane wyniki wykazały, że LPS jest czynnikiem silniej skorelowanym z patologią białka tau, niż patologią amyloidu.

5.5. Jednoczesne stosowanie WD i LPS wywołuje zmiany podobne do zmian obserwowanych pod wpływem WD, ale bez efektu addytywnego

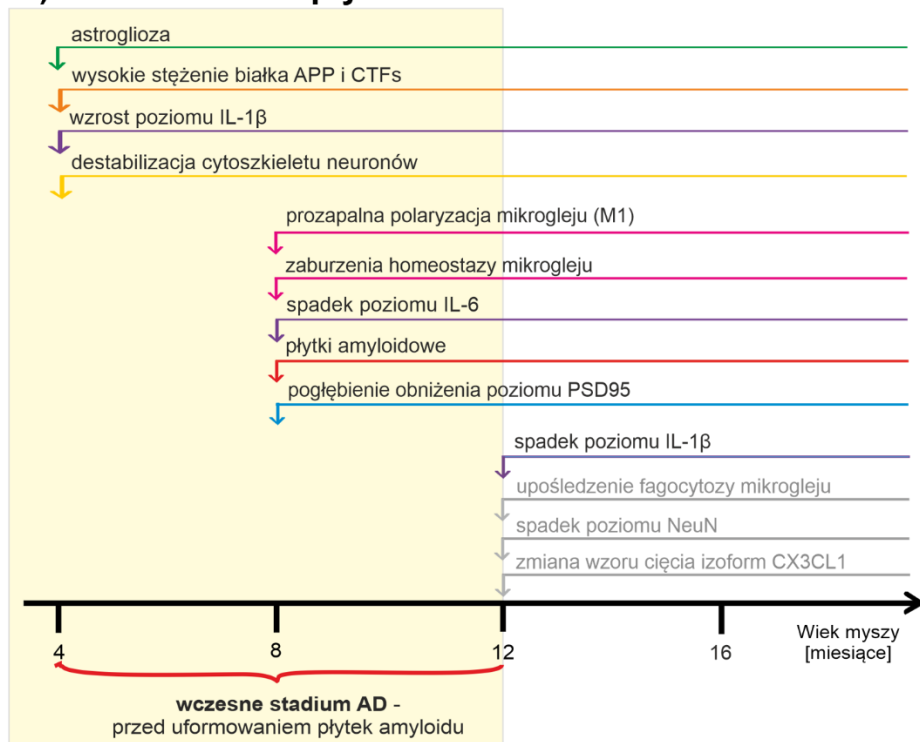
Celem zastosowania jednocześnie dwóch badanych czynników, a mianowicie utrzymywanie na diecie zachodniej myszy APPswe poddanych serii dootrzewnowych iniekcji LPS (WD+LPS), miało na celu sprawdzenie, jaki będzie efekt jednoczesnego działania dwóch sposobów indukcji stanu zapalnego: ostrego, naśladującego przejście ostrej infekcji bakteryjnej, z zapaleniem chronicznym o niskim nasileniu wynikającym z rozwoju zespołu metabolicznego wywołanego przez WD.

Grupy myszy APPswe poddane podwójnemu traktowaniu (WD+LPS) rozwinęły zespół metaboliczny, a jego przebieg był analogiczny to przebiegu zmian wywołanych dietą w grupach karmionych dietą zachodnią bez iniekcji LPS (WD). Myszy WD+LPS rozwinęły hipercholesterolemię, hiperglikemię, NAFLD, NASH oraz otyłość. Zaobserwowane zmiany metaboliczne skutkowały rozwinięciem ogólnoustrojowego stanu zapalnego o niskim nasileniu. Natomiast nie zaobserwowano występowania silniejszej obwodowej odpowiedzi zapalnej pod wpływem dwóch czynników, co świadczy o braku efektu addytywnego wpływu dwóch czynników WD i LPS jednocześnie. Z uzyskanych obserwacji wynika, że chroniczne działania WD jest bardziej uszkadzającym czynnikiem zapalnym, niż silna ale krótkotrwała reakcja na czynnik infekcyjny.

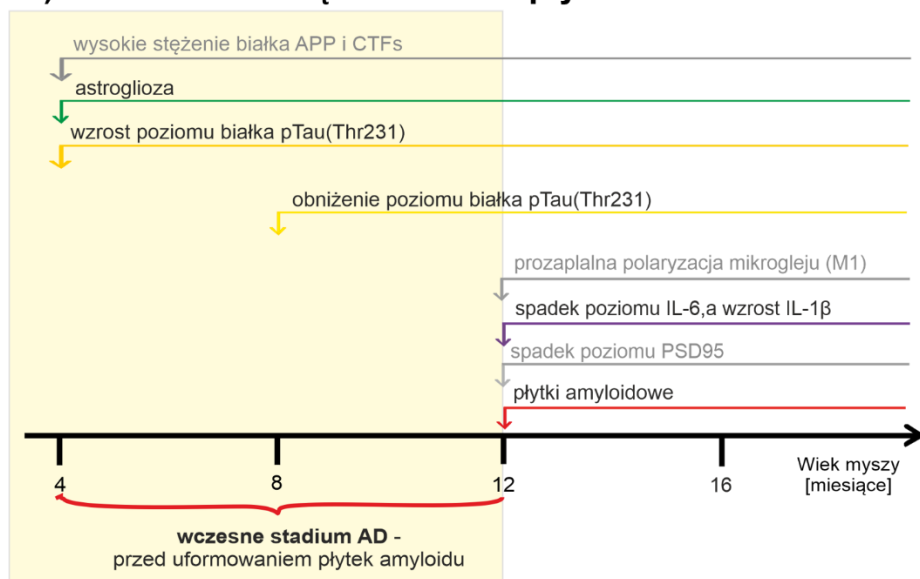
Co więcej, w hipokampie i korze śródwęchowej myszy APPswe poddanych podwójnemu traktowaniu (WD+LPS) (**Rycina 47 A i B**) procesy związane z rozwinięciem neurozapalenia i innych badanych zmian patologicznych przebiegały analogicznie do zmian w grupach karmionych WD bez iniekcji LPS (WD) (**Rycina 46**). Myszy te rozwinęły silną astrocytozę, zaburzenia mikrogleju i procesu fagocytozy oraz neurozapalenie w tym samym momencie, jak grupy WD. Tak samo jak w grupach WD, u myszy WD+LPS w hipokampie w wieku 4M nastąpiła zwiększona ekspresja APP i CTFs, a moment pojawienia się płytek amyloidowych w hipokampie przypadł na wiek 8M, natomiast w korze śródwęchowej na 12M.

Jedynie analiza czterech parametrów (IL-1 β , TLR4, pTau(Thr231), PSD95) w hipokampie myszy APPswe w grupach WD+LPS (**Rycina 48 A**) wykazała przebieg zmian zbliżony bardziej do tego zaindukowanego iniekcją LPS (**Rycina 47**). Mianowicie, poziom IL-1 β w wieku 12M spadł do poziomu kontrolnego (12M CTR vs. 12M WD+LPS), tak samo jak w grupie LPS (12M CTR vs. 12M LPS), przy tym w grupie WD w wieku 12M poziom ten był wyższy od kontroli (12M CTR vs. 12M WD). Dodatkowo w grupach WD+LPS nie obserwowano różnic w poziomie receptora TLR4, tak samo jak w grupach LPS, a w przeciwieństwie do grup WD, gdzie w 12M poziom TLR4 spadał. Wyjaśnieniem zaobserwowanego zjawiska może być fakt wystąpienia hormezy. Jednoczesne podanie dwóch silnych czynników prozapalnych z czego jednego utrzymującego swoje chroniczne działanie (WD+LPS) skutkowało prawdopodobnie włączeniem procesów adaptacyjnych mających na celu szybkie i skuteczne zahamowanie rozwijającego się stanu zapalnego i wyciszenia burzy cytokinowej w celu zapobiegnięcia śmierci neuronów.

A) HIPOKAMP – wpływ WD+LPS



B) KORA ŚRÓDWEŃCHOWA – wpływ WD+LPS



Rycina 48. Schemat przedstawiający sekwencję neuropatologicznych zdarzeń w (A) hipokampie oraz (B) korze śródwęchowej myszy APPswe wywołanych zarówno dietą zachodnią (WD) jak i dootrzewnową iniekcją LPS (WD+LPS). Na szaro zaznaczono procesy, które nie ulegają zmianie względem kontroli (CTR).

Analiza ilościowa pTau(Thr231) (**Rycina 48**) nie wykazała istotnych różnic pomiędzy analizowanymi traktowaniami, poza lekkim wzrostem jego poziomu w korze śródwęchowej w najmłodszej grupie wiekowej 4M we wszystkich kombinacjach zastosowanych czynników (WD, LPS, WD+LPS). Natomiast analiza jakościowa tkanki hipokampa (CA1) wykazała, że w grupie z podwójnym traktowaniem (WD+LPS) analogicznie do grupy LPS, zaobserwowano destabilizację aparatu mikrotubularnego i uszkodzenie cytoszkieletu komórkowego, widocznego na przebiegu wypustek nerwowych, Efekt ten zaobserwowano w wieku 4M (4M WD+LPS),

czyli w tym samym czasie co w grupie z LPS (4M LPS). Dane literaturowe pokazują ścisłą zależność pomiędzy sepsą wywołaną dootrzewnową iniekcją LPS, a wzrostem poziomu fosforylacji białka tau w mózgu. Wykazano wzrost poziomu fosforylacji pTau na treoninie 181 [pTau(Thr181)] już po 24h (Wang i in., 2018) oraz na serynie 262 [pTau(Ser262)] po 7 dniach od iniekcji LPS (Kirk i in., 2019) w jednorazowej dawce 10 mg/kg masy ciała u szczurów. Natomiast niniejsza praca stanowi pierwsze źródło informacji dotyczące poziomu pTau(Thr231) pod wpływem LPS. Różnice pomiędzy uzyskanymi wynikami, a dostępną literaturą mogą wynikać z kilku czynników, a mianowicie testowania innych miejsc fosforylacji, innego protokołu dawkowania LPS, oraz sprawdzania poziomu pTau w innych punktach czasowych. Natomiast mimo różnic w obserwowanych wynikach, jednoznacznie można stwierdzić wpływ LPS na procesy związane z prawidłową funkcją białka tau, takie jak zmiany w intensywności fosforylacji na różnych resztach aminokwasowych we fragmencie bogatym w prolinę domeny wiązania z mikrotubulami w łańcuchu białka tau, co w konsekwencji prowadzi do destabilizacji aparatu mikrotubularnego.

Dodatkowo w grupie WD+LPS zaobserwowano pogłębienie spadku poziomu PSD95 w wieku 8M (8M WD+LPS), analogiczne do tego występującego w grupie LPS (8M LPS). Obserwacja ta może być konsekwencją obserwowanego zaburzenia cytoszkieletu w neuronach hipokampa. Nadmierna fosforylacja pTau oraz uszkodzenie cytoszkieletu i zaburzenie transportu komórkowego w konsekwencji prowadzą do zaburzeń w obrębie synaps, oraz zmniejszenia gęstości zakończeń synaptycznych na dendrytach (Hall i in., 2000).

Różnice w odpowiedzi na WD i LPS

Liczne cząsteczki bakteryjne, w tym LPS, aktywują odpowiedź immunologiczną poprzez interakcję z receptorami rozpoznania wzorca, takimi jak TLR. Cząsteczki LPS wiążą się z białkiem wiążącym lipopolisacharyd (z ang. *LPS-binding protein* – LBP), a następnie przyłączają się do białka CD14 obecnego na powierzchni makrofagów, monocytów, granulocytów i limfocytów B, co powoduje wzrost ekspresji integryn i uwolnienie dużych ilości cytokin prozapalnych (IL-1 β , IL-6, TNF- α) (Wang i in., 2018; Kirk i in., 2019; Ciesielska i in., 2021). Skutkuje to aktywacją komórek śródbłonna i przekazuje sygnał do produkcji białek ostrej fazy w wątrobie prowadząc głównie do sepsy (Moshage, 1997). W ostrym okresie sepsa wiąże się z aktywacją śródbłonna, zaburzeniem bariery krew-mózg, obrzękiem mózgu, ekspresją mediatorów zapalnych, a jej kulminacją jest ostra dysfunkcja mitochondriów i uszkodzenie oksydacyjne (Wang i in., 2018).

Z drugiej strony, czynniki wyzwalające reakcję zapalną w otyłości spowodowanej WD nie są do końca jasne, a literatura dostarcza wielu hipotez (Więckowska-Gacek i in., 2021). W aktywację wrodzonej odpowiedzi immunologicznej związanej z otyłością także zaangażowane są receptory rozpoznania wzorca, w tym TLR4 (Monteiro i Azevedo, 2010). Natomiast, w mózgu, SFA (prawdopodobnie oprócz bezpośredniej interakcji z receptorem TLR4 w wyniku czego dochodzi do aktywacji ścieżki sygnalizacyjnej zależnej od NF- κ B), razem z cholesterolem wbudowują się w błonę komórkową wpływając na jej płynność i zagęszczenie obszarów tratw lipidowych, w których znajdują się kompleksy CD14-TLR4-MD2. Prowadzi to do dimeryzacji receptora TLR4 bez udziału agonisty/liganda i jego pośredniej aktywacji prowadzącej w ten sposób do uruchomienia ścieżki NF- κ B i produkcji cytokin prozapalnych m.in.

IL-1 β , IL-6 i IL-8) (Ciesielska i in., 2021; Saha i in., 2022). Co więcej, alternatywą dla szlaku TLR4 w indukcji stanu zapalnego w odpowiedzi na SFA lub kwasy trans pochodzące z diety, może być fakt, że nagromadzenie SFA wpływa na zwiększone zewnątrzkomórkowe wydzielanie ATP. Wzrost ATP może następnie powodować aktywację inflammasomu 3 (NLRP3) poprzez interakcje ATP z receptorem P2X7 prowadząc do zwiększonej aktywności kaspazy-3, co także skutkuje zwiększonym wydzielaniem cytokiny IL-1 β oraz IL-8 (Hirata i in., 2020; Sun i in., 2020).

Po przeanalizowaniu wpływu WD oraz LPS na morfologię neuronów w funkcjonalnie różnych obszarach hipokampa, w niniejszej pracy postawiono hipotezę, że wpływ badanych czynników (WD i LPS) ma głównie znaczenie czynnościowe. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wskazują na upośledzenie fizjologicznych funkcji synaps i neuronów występujące z wiekiem oraz zaburzenie struktury cytoszkieletu komórkowego w grupach zwierząt z iniekcją LPS (LPS i WD+LPS). Obserwacje dotyczące zaburzeń fosforylacji białka tau, uszkodzenia aparatu mikrotubularnego i pogłębiającego się spadku poziomu markera charakteryzującego zakończenia synaptyczne (PSD95) pod wpływem LPS (LPS i WD+LPS), sugerują że LPS w przeciwieństwie do WD wywołuje neuropatologiczne zmiany skorelowane z zaburzeniem funkcji białka tau. Ponadto, analiza obrazowa ujawniła zróżnicowanie zmian prowadzących do neurozwyrodnienia w obszarach mózgu odpowiedzialnych za pojawienie się pierwszych objawów klinicznych AD (hipokamp i kora śródwęczowa), w zależności od tego, w którym kierunku przebiega projekcja pomiędzy strukturą hipokampa, a korą śródwęczową.

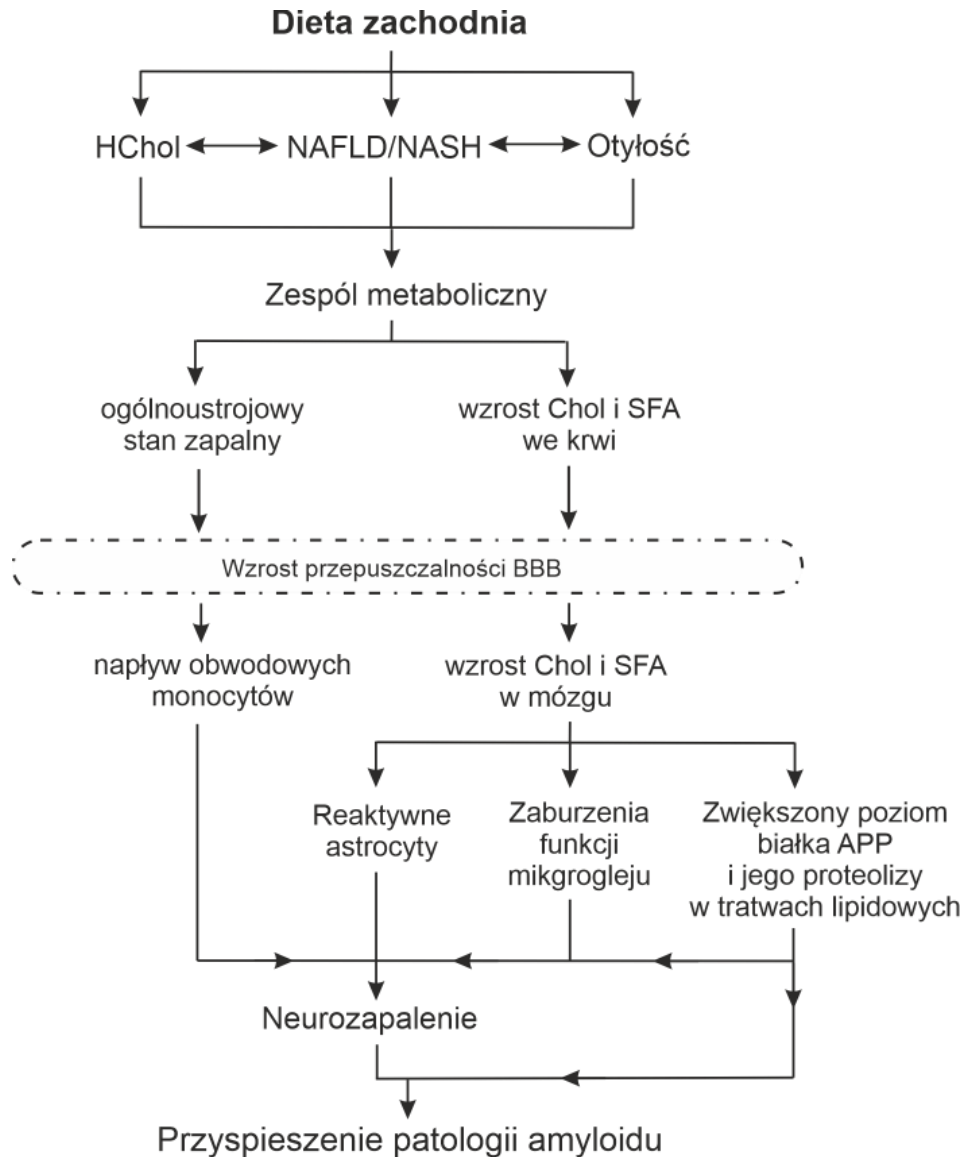
Przeprowadzona w tym badaniu analiza mikroskopowa H&E przekrojów półkulowych mózgów pobranych od myszy doświadczalnych sugeruje, że obecność mutacji w genie *APP* sama w sobie wzmaga procesy neurozwyrodnieniowe z wiekiem, ale również zwiększa wrażliwość neuronów hipokampa i kory śródwęczowej na działanie WD i, w mniejszym stopniu na LPS.

Podsumowując, z otrzymanych wyników jednoznacznie widać, że oba zastosowane w badaniu czynniki wywołujące neurozapalenie mają nieco inne mechanizmy działania. W konsekwencji obydwie prowadzą do neuropatologicznych zmian typowych dla AD, ale różniących się od siebie w przebiegu.

5.6. WD, przeciwnie niż LPS, jest czynnikiem wywołującym metaboliczny stan zapalny skutkujący silną odpowiedzią neurozapalną i neuropatologiczną w mózgu

Uzyskane wyniki potwierdzają, że AD jest chorobą ogólnoustrojową, nie ograniczającą się do mózgu, a procesy łączące zaburzenia obwodowe z patologią mózgu zostały schematycznie przedstawione na **Rycinie 49**. U myszy APPswe poddanych WD stwierdziliśmy jednoczesną obecność HChol, otyłości, NAFLD/NASH i niektórych objawów zapalenia o niskim stopniu nasilenia, które łącznie reprezentują MetS. Te obwodowe zmiany wywołane przez WD były związane z aktywacją komórek glejowych, zaburzeniem fagocytozy, wzrostem poziomu cytokiny prozapalnej IL-1 β oraz spadkiem poziomu receptora TLR4 w mózgu myszy APPswe. Co ważne, obecność neurozapalenia obserwowano już w mózgach najmłodszych myszy, po 3 tygodniach WD, w tym samym czasie, co obwodowe zaburzenia metaboliczne. Obserwacja ta wskazuje, że WD musiała spowodować niemal natychmiastowe upośledzenie bariery krew-mózg (ang *blood-brain barrier* - BBB), prowadząc do aktywacji komórek glejowych. Prawdopodobnie przyczyniło się to następnie do nasilenia szlaku rozszczepiania amyloidogenego APP, powstawania nowych peptydów A β i jednocześnie spowodowało upośledzenie procesów oczyszczania A β obwodowo w wątrobie i w mózgu poprzez fagocytozę. Dodatkowo analiza markerów znakujących mikroglej/makrofagii sugeruje możliwy napływ obwodowych monocytów do mózgu. Uzyskane wyniki potwierdzają zatem hipotezę, że żywienie WD działa jako czynnik wyzwalający indukcję MetS oraz zaburzenia aktywności układu odpornościowego, co prowadzi do silnego neurozapalenia i przyspieszenia patologii AD w modelu myszy APPswe. W dalszych podrozdziałach szczegółowo omówiono, w jaki sposób obserwowane procesy krzyżują się i oddziałują na siebie prowadząc do silnego zachwiania homeostazy obwodowej oraz do zaburzenia BBB, a następnie nasilenia neurozapalenia i odkładania A β w hipokampie i korze śródwęchowej.

Niniejsza praca jako pierwsza wykazała tak szczegółowe porównanie patologii ogólnoustrojowej i mózgowej wywołanej przez WD z wywołaną przez LPS. Przedstawione badania jednoznacznie wykazały, że na kaskadę neuropatologicznych zdarzeń wywołanych przez WD składa się więcej elementów, niż w przypadku neuropatologii wywołanej dootrzewnową iniekcją LPS, a u podstaw indukcji i nasilenia neurozapalenia i patologii amyloidowej wywołanej dietą zachodnią leżą inne mechanizmy, niż w przypadku neurozapalenia indukowanego LPS. Z otrzymanych danych jednoznacznie wynika, że obydwa zastosowane czynniki skutecznie nasilają stan zapalny w analizowanych strukturach mózgu, natomiast to WD działa bardziej destrukcyjnie, wywołując silniejszą i złożoną odpowiedź prozapalną oraz przyspieszone odkładanie się płytek amyloidowych w zastosowanym modelu AD. Za te różnice wydaje się odpowiadać głównie zwiększony poziom cholesterolu i SFA, które pełnią szczególną rolę w patologii AD (Rudge, 2022), a ich skład zmienia się drastycznie pod wpływem WD w krążeniu (Pati i in., 2018) i mózgu (Giles i in., 2016; Lee i in., 2018; Kim i in., 2023), oraz wywołane przez WD uszkodzenie wątroby, która jest odpowiedzialna za skuteczną degradację i usuwanie krążącego obwodowo amyloidu.



Rycina 49. Schemat podsumowujący proponowane mechanizmy i zależności między wywołanymi przez WD zaburzeniami metabolicznymi i ogólnoustrojowymi, a zmianami patologicznymi w mózgu prowadzącymi do przyspieszonego rozwoju AD. APP – białko prekursorowe amyloidu; BBB – bariera krew-mózg; Chol – cholesterol; SFA – nasycone kwasy tłuszczowe; HChol – hipercholesterolemia; NAFLD – niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby; NASH – niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby.

5.6.1. Zaburzenia bariery krew-mózg wywołane przez WD jako "otwarta brama" dla napływu A β do mózgu w progresji AD

Bariera krew-mózg (BBB) jest kompleksem komórek śródbłonka oddziałujących z pericytami, komórkami glejowymi i neuronami, które obejmują sieci mikronaczyniowe w obrębie OUN (Van Dyken i Lacoste, 2018). BBB służy jako kluczowy regulator transportu z krwi do mózgu składników odżywczych i innych niezbędnych związków, jednocześnie wykluczając przedostawanie się krążących komórek i potencjalnie szkodliwych makrocząstek, takich jak czynniki prozapalne i toksyny. Z kolei system transportowy BBB w przeciwnym kierunku eliminuje z mózgu cząsteczki neurotoksyczne i odpady metaboliczne (Liebner i in., 2018; Saint-

Pol i in., 2020). Liczne dowody wskazują na związek AD z uszkodzeniem/zaburzeniem przepuszczalności BBB (Montagne i in., 2017; Kurz i in., 2022). Badania pośmiertne i obrazowe mózgow dotkniętych AD (Sweeney i in., 2018) wykazują dowody na przenikanie do mózgu komórek krwi i białek osocza, które nie powinny znajdować się w mózgu, a także mikrokrwawienia mózgowe, ścieńczenie błony podstawnej i inne bezpośrednie dowody dysfunkcji układu nerwowo-naczyniowego.

Nieszczelność BBB wydaje się być także bardzo wczesnym zaburzeniem występującym jednocześnie z aktywacją odpowiedzi immunologicznej na szkodliwe czynniki żywieniowe. Nieszczelna BBB przyczynia się do akumulacji A β w mózgu (Estrada i in., 2019; Bassendine i in., 2020). Równowaga pomiędzy odpływem A β z mózgu do obwodu, a jego napływem z obwodu do mózgu jest regulowana w obrębie BBB. Podczas gdy w przechodzeniu peptydów A β z krążenia do mózgu przez BBB pośredniczy głównie receptor dla produktów końcowych zaawansowanej glikacji (RAGE) (Montagne i in., 2017), to receptory LRP1 odpowiadają za usuwanie toksycznych A β z mózgu do krążenia. Rozpuszczalna forma LRP w osoczu stanowi obwodowy rezerwuuar dla A β , który wspomaga jego sekwestrację. W AD poziom rozpuszczalnych LRP w osoczu i LRP1 w BBB jest obniżony, natomiast ekspresja RAGE w BBB jest zwiększona, co skutkuje akumulacją A β w mózgu (Kim i in., 2016; Mietelska-Porowska i Wojda, 2017; Gali i in., 2019; Sweeney i in., 2019; Spagnuolo i in., 2020).

Spożywanie diety o wysokiej zawartości SFA, cholesterolu i węglowodanów (jak ma to miejsce w WD) zwiększa poziom krążącego A β , zaburza jego obwodowy *klirens* przez wątrobę oraz upośledza usuwanie A β z mózgu poprzez zmniejszenie ekspresji lub aktywności LRP1 i zwiększenie aktywności białka RAGE (Kim i in., 2016; Gali i in., 2019). Co więcej, grupa Liao i in., 2017 wykazała zwiększoną ekspresję RAGE pod wpływem diety bogatej w tłuszcze nasycone i cukier w obszarze hipokampa (Liao i in., 2017), co sugeruje szczególną tendencję do zaburzeń procesów oczyszczania amyloidu prowadzącą do zwiększonego odkładania płytek A β w tym obszarze mózgu.

Ważnym czynnikiem wywołanym przez WD jest zmiana poziomu funkcjonalnego amyloidu bakteryjnego (FUBA) produkowanego przez bakterie w jelicie człowieka (Friedland i Chapman, 2017; Kowalski i Mulak, 2019; Friedland i in., 2020). Podczas spożywania WD, nabłonek przewodu pokarmowego staje się bardziej przepuszczalny dla małych cząsteczek, powodując przedostawanie się FUBA do krążenia i mózgu (Qian i in., 2021), gdzie FUBA może krzyżowo powodować agregację neuronalnego A β i tau oraz inicjować neuropatologię (Bostanciklioğlu, 2019; Friedland i in., 2020). Wydaje się, że równoległe WD prowadzi do niewydolności *klirensu* A β z krążenia i innych narządów, w tym też jelit, zmieniając równowagę między obwodowymi i mózgowymi pulami amyloidu, co sprzyja akumulacji A β w mózgu.

5.6.2. Istotne dla AD konsekwencje narażenia mózgu na cholesterol pochodzący z WD

Liczne badania przeprowadzone u ludzi i zwierząt wykazały, że z wyjątkiem bardzo wczesnego rozwoju płodowego, prawie cały cholesterol w OUN jest pochodzenia lokalnego i pochodzi głównie z endogennej syntezy *de novo*, a w mniejszym stopniu z dostarczania z zewnątrz, przy czym znaczna część produkcji cholesterolu dla neuronów jest delegowana do lokalnych astrocytów (Pfrieger, 2003; Dietschy i Turley, 2004; Elliott i in 2010; Orth i Bellosta, 2012). Co więcej, obrót cholesterolu w dojrzałym OUN jest bardzo niski, zwykle wynosi tylko

około 5% obrotu obserwowanego w całym organizmie (Björkhem i Meaney, 2004; Dietschy i Turley, 2004; Orth i Bellosta, 2012). Pozostały swobodnie krążący cholesterol w mózgu jest utrzymywany na niskim poziomie przez różne mechanizmy, w tym usuwanie przez BBB w postaci 24S-hydroksycholesterolu (Dietschy i Turley, 2004; Lütjohann i von Bergmann, 2003). W pozostałej części organizmu (a więc po drugiej stronie BBB) duża część cholesterolu jest albo pochodzenia pokarmowego, albo jest produkowana w wątrobie (Vance i Vance, 2008; Rang, 2012).

Jedną z dróg wnikania obwodowego cholesterolu do mózgu jest jego konwersja do form hydroksycholesterolu, takich jak 25- lub 27-hydroksycholesterol, natomiast cholesterol mózgowy może być wydalany do krążenia poprzez jego konwersję do 24S-hydroksycholesterolu. Przypuszcza się, że te transporty zachodzą przez dyfuzję ze względu na gradient stężenia każdego hydroksycholesterolu między mózgiem, a krążeniem (Björkhem, 2019; Loera-Valencia i in., 2019). Wysoki poziom cholesterolu pochodzącego z WD w surowicy powoduje wzrost jego konwersji do 27-hydroksycholesterolu poprzez zwiększony poziom izoform cytochromu P450 CYP27A1 i CYP7A1 w hepatocytach w przebiegu NAFLD oraz wpływ 27-hydroksycholesterolu z wątroby do krążenia i napływ do mózgu (Testa i in., 2016; Zhang i in., 2018; Chen i in., 2020). Ponadto progresja AD charakteryzuje się obniżonym poziomem cholesterolu w mózgu oraz izoformy cytochromu P450 CYP46A1 odpowiedzialnej za hydroksylację cholesterolu w pozycji 24S (Testa i in., 2016; Loera-Valencia i in., 2019; Spagnuolo i in., 2020). Zwiększone stężenie 27- i 25-hydroksycholesterolu w mózgu oraz obniżone stężenie 24S-hydroksycholesterolu w mózgu i surowicy obserwowano u pacjentów z AD oraz w modelach mysich AD. Zwiększony napływ form hydroksycholesterolu do mózgu przyczynia się do indukcji stresu oksydacyjnego mózgu i rozwoju AD (Testa i in., 2016; Mast i in., 2017; Loera-Valencia i in., 2019; Wong i in., 2020).

Rola nadmiaru cholesterolu w amyloidogenezie i nieprawidłowościach szlaku endosomalno-lizosomalnego

Otrzymane wyniki oraz dostępna literatura wskazują, że wywołana dietą obwodowa HChol i podwyższony poziom cholesterolu w mózgu mogą odgrywać istotną rolę w powstawaniu blaszek A β . W tym badaniu jednoznacznie wykazano, że WD, a nie LPS, wpływa na poziom APP, amyloidogenezę i przyspieszone odkładanie się płytek amyloidowych w mózgu. Zaburzenie równowagi lipidowej, a szczególnie poziomu cholesterolu w tratwach lipidowych wpływa na uwalnianie A β z APP (Colin i in., 2016; Grassi i in., 2020). Wyjaśnieniem tego zjawiska wydaje się być amyloidogenna proteoliza APP z udziałem β -sekreazy zachodząca w tratwach lipidowych bogatych w cholesterol (Nixon, 2017; Habchi i in., 2018; Grassi i in., 2020), podczas gdy przetwarzanie nieamyloidogenne z udziałem α -sekreazy zachodzi w warstwie fosfolipidowej neuronalnej błony plazmatycznej ubogiej w cholesterol (Xiong i in., 2008; Grimm i in., 2013). Wykazano, że dieta wysokocholesterolowa zwiększała poziom mózgowych form hydroksycholesterolu, aktywując zarówno β -, jak i γ -sekreazy oraz pozakomórkowe odkładanie A β w neuronach (Allinquant i in., 2014) i astrocytach (Avila-Muñoz i Arias, 2015), ostatecznie powodując upośledzenie uczenia się i pamięci w mysich modelach AD (Zhang i in., 2018). Związek cholesterolu z tworzeniem blaszek amyloidowych jest poparty także badaniami

obrazowania mózgu, które pokazują obecność cholesterolu w złogach amyloidu β w próbkach mózgu ludzi dotkniętych AD (Mori i in., 2001; Burns i in., 2003; Xiong i in., 2008).

Badania tkanki osób z AD wykazały także nieprawidłowości w układzie endosomalno-lizosomalnym, który jest ściśle związany z przebiegiem procesów amyloidogenezy (Cataldo i in., 2000; Xu i in., 2018; Rudge i in., 2022). Co więcej nadaktywność szlaku endosomalno-lizosomalnego oraz zwiększenie jego kompartmentów wydaje się być wczesnym markerem AD, zwłaszcza w neuronach piramidalnych, których patologia jest szczególnie istotna w przebiegu AD (Cataldo i in., 1996; Nixon, 2017; Rao i in., 2022). Co ciekawe, bardzo podobną patologię obserwuje się również u myszy i w innych modelach zespołu Down'a (Cataldo i in., 2000; Arriagada i in., 2007; Cataldo i in., 2008; Jiang i in., 2010), gdzie zaobserwowano, że patologia ta pojawiła się dopiero po ekspozycji na cholesterol (Arriagada i in., 2007). Tak więc cholesterol wydaje się być krytyczny elementem w kontekście indukcji zaburzeń amyloidogenezy w szlaku endosomalno-lizosomalnym. Jak już wspomniano, aktywacja szlaku nieamyloidogenego zachodzi w obszarach błony komórkowej ubogich w cholesterol, gdzie APP jest najpierw preferencyjnie rozszczepiany przez α -sekretazę w błonie komórkowej, a następnie w pęcherzykach endosomalnych przez γ -sekretazę, w wyniku czego powstają peptydy sAPP- α , CTF- α , a potem P3 i CTF- γ /AICD (Xiong i in., 2008; Grimm i in., 2013). Natomiast w regionach błony komórkowej bogatych w cholesterol zachodzi aktywacja szlaku amyloidogenego, gdzie APP jest rozszczepiany przez β -sekretazę, w wyniku czego powstają peptydy sAPP- β i CTF- β (Nixon, 2017; Habchi i in., 2018; Grassi i in., 2020; Rudge i in., 2022). Następnie w obrębie wczesnych/późnych endosomów CTF- β jest dalej cięty przez γ -sekretazę, w wyniku czego powstaje A β , jak również CTF- γ /AICD (Arriagada i in., 2007; Nixon, 2017; Rudge i in., 2022). W stanie normy, takie dalsze produkty rozszczepienia APP podążają następnie tą samą drogą co cholesterol przez późne endosomy, lizosomy, siateczkę śródplazmatyczną i/lub aparat Golgiego, wracając z powrotem do błony komórkowej. Jednak utrzymujące się nadmierne poziomy CTF- β powstałe w wyniku zaburzonej aktywności sekretaz w bogatych w cholesterol tratwach lipidowych mogą prowadzić do patologii endosomalno-lizosomalnej, charakteryzującej się licznymi nadmiernie dużymi wczesnymi endosomami (Rudge i in., 2022).

5.6.3. Istotne dla AD konsekwencje napływu do mózgu nasyconych kwasów tłuszczowych pochodzących z WD

Aktywacja komórek glejowych w odpowiedzi na WD

Otrzymane w pracy wyniki wykazały, że aktywacja astrocytów u myszy karmionych WD wystąpiła stosunkowo wcześnie, wraz z HChol, NAFLD oraz zwiększoną akumulacją mózgową APP i CTFs, a także poprzedziła aktywację mikrogleju. W zgodzie z tymi danymi, badania na próbkach ludzkich mózgow wykazały wzrost gliozy reaktywnej, która wydaje się poprzedzać rozwój zmian charakterystycznych dla AD (Sidoryk-Wegrzynowicz i in., 2011; Wharton i in., 2009). Wiadomo, że aktywowane astrocyty produkują i uwalniają cząsteczki prozapalne, które również wykazują kluczowe znaczenie dla wytwarzania A β (Avila-Muñoz i Arias, 2014). Ponadto literatura wskazuje, że mikroglej odgrywa istotną rolę w rozwoju AD. Fagocytoza mikrogleju we wczesnej fazie AD jest uważana za proces korzystny i kluczowy mechanizm zapobiegający tworzeniu, i promujący usuwanie blaszek A β (Salter i Stevens, 2017;

Richter i in., 2020). Jednak podczas progresji choroby, fagocytoza mikrogleju wydaje się być niewystarczająca i raczej szkodliwa, a w połączeniu z aktywnością prozapalną, nie przeciwdziała, ale promuje patologię (Vogels i in., 2019; Streit i in., 2020). Wyniki niniejszej pracy ujawniły przyspieszoną aktywację mikrogleju i jego profil polaryzacji prozapalnej M1 po 5 miesiącach trwania WD. Aktywację mikrogleju i jego prozapalną polaryzację obserwowano 4 miesiące później, niż zmiany w aktywacji astrocytów, co dodatkowo sugeruje, że zaburzenia mikrogleju mogą być częściowo wywołane przez odpowiedź zapalną astrocytów. Dodatkowo wywołany przez WD profil prozapalny (M1) w hipokampie może ujawniać się zarówno w postaci aktywowanego mikrogleju w mózgu, jak i w prozapalnych makrofagach pochodzących z monocytów (MDMs), infiltrujących mózg z peryferii przez uszkodzoną BBB. Ten drugi scenariusz jest zgodny z obserwowanym zwiększeniem liczby monocytów we krwi u myszy 4M i 8M APP^{sw}e karmionych WD od 3 tygodni do 5 miesięcy i normalizacją poziomu limfocytów do poziomu podstawowego u myszy 12M, co sugeruje infiltrację monocytów do tkanek, w tym do tkanek mózgu. Wynik ten wskazuje na możliwą rolę obwodowych komórek odpornościowych, takich jak MDMs, w indukcji upośledzenia funkcji mikrogleju i neurozapalenia.

Indukcja neurozapalenia za pośrednictwem SFA i A β

Mechanizmy, dzięki którym WD aktywuje glej, są wciąż przedmiotem badań, natomiast jednym z prawdopodobnych mechanizmów jest aktywacja kompleksu CD14-TLR4-MD2 i aktywacja szlaku NF- κ B. Mechanizm ten był przedmiotem badań w niniejszej pracy. Hipotezę tego mechanizmu potwierdza obecność receptora TLR4 zarówno w astrocytach jak i w mikrogleju (Gupta i in., 2012; Lee i in., 2019). Wiadomo, też że nasycone (ale nie nienasycone) FA aktywują TLR4 w makrofagach, co z kolei prowadzi do aktywacji NF- κ B i innych cząsteczek prozapalnych (Rogero i Calder, 2018; Więckowska-Gacek i in., 2021). Niektóre dane podkreślają kluczową rolę SFA pochodzących z diety w aktywacji gleju i indukcji neurozapalenia (Pistell i in., 2010; Wang i in., 2012; Gupta i in., 2012). Biorąc pod uwagę, że SFA (np. kwasy palmitynowy i stearynowy) swobodnie przekraczają BBB, zwłaszcza w warunkach diety wysokotłuszczowej (Niu i in., 2016), homeostaza SFA w mózgu jest zależna od poziomu SFA na peryferiach, a diety bogate w SFA mogą zwiększać mózgowy wychwytywanie SFA z osocza przez BBB (Wang i in., 1994), co skutkuje ich akumulacją w mózgu. Zatem SFA pochodzące z WD w mózgu mogą upośledzać funkcję zarówno astrocytów jak i mikrogleju poprzez sygnalizację z udziałem kompleksu CD14-TLR4-MD2, który indukuje sygnalizację NF κ B, wyzwalając wydzielanie cytokin prozapalnych, a następnie neurozapalenie (Wang i in., 2012; Rocha i in., 2016; Moser i in., 2018). W niniejszym badaniu wykazano, że WD powodowała duży wzrost poziomu IL-1 β już po trzech tygodniach karmienia, a poziom ten zaczął spadać dopiero po 9 miesiącach od wprowadzenia diety, co korelowało w czasie ze spadkiem poziomu receptora TLR4. Badanie to wykazało również upośledzenie zdolności fagocytozy mikrogleju, ujawnione przez obniżenie markera CD68 w hipokampie, co korelowało z inicjacją tworzenia się blaszek A β . Obserwacje te sugerują, że polaryzacja mikrogleju do stanu prozapalnego M1 prowadzi do utraty jego zdolności do oczyszczania resztek A β z mózgu, co skutkuje nagromadzeniem A β , odkładaniem się blaszek amyloidowych i pogłębianiem się stanu zapalnego mózgu. Co więcej, aktywacja receptora TLR4 w mikrogleju odbywa się także

Dyskusja

poprzez jego interakcje z oligomerami A β , czego efektem jest uruchomienie procesów fagocytozy toksycznych A β (Liu i in., 2020). Natomiast nadmierna ekspozycja na A β prowadzi do prozapalnej polaryzacji i nadmiernej aktywacji mikrogleju co w konsekwencji upośledza ich funkcje fagocytarne (Liu i in., 2020; Yang i in., 2020a). Tak więc aktywacja TLR4 przez SFA, a nie tylko oligomery A β (Rocha i in., 2016; Liu i in., 2020), jest dodatkowym motorem neurozapalenia wywołanego przez glej w AD, a synergistyczne działanie SFA i oligomerów A β może uruchamiać napędzające się koło aktywacji gleju w indukcji stanu zapalnego.

6. Podsumowanie i wnioski

Niniejsza praca dostarczyła nowych informacji na temat wpływu WD oraz LPS na mechanizmy zachodzące podczas wczesnych, bezobjawowych etapów AD. Analiza otrzymanych wyników wspiera hipotezę o istotnym wpływie WD na patogenezę i progresję AD i dostarcza kompleksowego wyjaśnienia, jak WD wpływa na szereg zmian neuropatologicznych związanych z tą chorobą, w tym przyspieszenie rozwoju stanu zapalnego i amyloidogenezy w mózgu.

W niniejszej pracy po raz pierwszy:

- 1) Przeprowadzono szczegółową analizę sekwencji patologicznych zdarzeń w mózgu wywołanych przez WD w różnych etapach przedobjawowego stadium AD, oraz wykazano szczególną wrażliwość hipokampa na działanie WD w porównaniu do kory śródwęchowej;
- 2) Wykazano korelację występowania zaburzeń metabolicznych wywołanych przez WD ze zmianami zachodzącymi w mózgu pod wpływem WD w różnych etapach przedobjawowego stadium AD;
- 3) Porównano neuropatologię AD wywołaną przez WD z wywołaną przez LPS i stwierdzono silniejszy wpływ WD niż LPS.

Przeprowadzone w pracy badania wykazały, że:

- 1) WD wywołuje hipercholesterolemię po 3 tygodniach oraz hiperglikemię, otyłość i NAFLD/NASH po 5 miesiącach stosowania; obserwowane zaburzenia wskazują na rozwój zespołu metabolicznego;
- 2) WD wywołuje ogólnoustrojowy stan zapalny o niskim stopniu nasilenia ujawniający się po 5 miesiącach stosowania diety;
- 3) WD przyspiesza procesy stanu zapalnego mózgu objawiające się zwiększonym poziomem IL-1 β oraz aktywacją astrocytów w hipokampie już po 3 tygodniach stosowania diety;
- 4) WD przyspiesza prozapalną polaryzację mikrogleju oraz wywołuje upośledzenie procesu fagocytozy w hipokampie po 5 miesiącach stosowania diety;
- 5) WD wywołuje zwiększenie poziomu białka APP i jego fragmentów CTFs w hipokampie oraz przyspiesza odkładanie płytek A β zarówno w hipokampie, jak i korze śródwęchowej;
- 6) WD nie wpływa istotnie na poziom markerów PSD95, NeuN i CX3CL1, a obserwowane zmiany neurodegeneracyjne na poziomie morfologii neuronów w poszczególnych obszarach hipokampa przebiegają relatywnie wolno;
- 7) WD w przeciwieństwie do LPS jest związana z przyspieszeniem procesów amyloidogenezy, a nie wpływa istotnie na poziom fosforylacji białka pTau(Thr231) oraz organizację cytoszkieletu neuronów;
- 8) Aktywacja astrocytów u myszy karmionych WD wystąpiła w tym samym czasie, co obserwowana obwodowo HChol oraz zwiększony poziom APP i CTFs w mózgu. Wzrost reaktywności astrocytów znacząco poprzedzał aktywację komórek mikrogleju. Przyspieszona aktywacja astrocytów prawdopodobnie jest związana z współwystępowaniem z HChol i jest reakcją na dieto-zależne wzbogacenie w cholesterolu i trójglicerydy w błonie komórkowej astrocytów, prowadząc do aktywacji amyloidogennej proteolizy białka APP;

9) Zastosowanie podwójnego traktowania WD+LPS wykazało brak efektu addytywnego pod względem przyspieszenia i liczby patologicznych zmian w przebiegu AD, a przebieg patogenezy był zbliżony do przebiegu zmian wywołanych przez WD;

10) Neurozapalenie oraz aktywacja komórek gleju wywołane przez WD występuje wcześniej, przed utworzeniem i odłożeniem w mózgu blaszek amyloidowych, a indukowane przez WD przyspieszenie amyloidogenezy w mózgu jest poprzedzone neurozapaleniem.

Wnioski końcowe w świetle analizy dostępnej literatury:

Otrzymane wyniki analizowane łącznie z dostępną literaturą wskazują, że aktywacja astrocytów i mikrogleju skutkująca zwiększeniem poziomu cytokiny prozapalnej IL-1 β może odbywać się poprzez bezpośrednią aktywację receptora TLR4 przez SFA pochodzące z diety, przedostające się do mózgu z obwodu przez uszkodzoną BBB, lub pośrednio poprzez zmianę płynności błony komórkowej w wyniku wbudowania się w jej strukturę nadmiernej liczby SFA.

AD jest zaburzeniem nie tylko mózgu, ale całego organizmu, a procesy i narządy obwodowe mogą odgrywać kluczową rolę w rozwoju choroby. W szczególności, wywołane przez WD uszkodzenie wątroby prowadzi do niepowodzenia w degradacji i usuwaniu peptydów A β , co wydaje się być jednym z głównych czynników przyspieszających rozwój AD.

WD poprzez indukcję chronicznego stanu zapalnego prawdopodobnie upośledza BBB i jej system kontroli przepływu peptydów A β w obu kierunkach, do/z mózgu, zwiększając ładunek amyloidu, a także przyspieszając procesy neurozapalne ujawniające się nadmierną aktywnością komórek glejowych i odkładaniem blaszek A β w mózgu.

Prawdopodobnie równolegle, napływ cholesterolu do mózgu przez uszkodzoną BBB wzmacnia amyloidogenezę w tratwach lipidowych w błonach komórkowych neuronów i astrocytów, co dodatkowo zaburza równowagę produkcji i usuwania amyloidu w mózgu, oraz wywołuje nieprawidłowości szlaku endosomalno-lizosomalnego.

WD pełni istotną rolę w upośledzeniu osi wątroba-mózg, a otrzymane wyniki wskazują współwystępowanie trzech głównych elementów patogenezy AD: neurozapalenia, zaburzeń lipidów i zaburzeń homeostazy A β , które rozwijają się równolegle i poprzez wzajemne interakcje napędzając „błędne koło” patogenezy AD.

Ponieważ WD istotnie wpływa na przebieg patologii AD w modelu myszy APP^{swe}, istnieje potrzeba dalszych badań wpływu WD na patologię AD w modelach myszy typu dzikiego, bez mutacji AD w genomie. Pozwoli to określić, czy WD może być również bezpośrednio przyczyną rozwoju SAD.

7. Bibliografia

2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2021 Mar;17(3):327-406. doi: 10.1002/alz.12328.

2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2023 Apr;19(4):1598-1695. doi: 10.1002/alz.13016.

A Armstrong R. Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol.* 2019;57(2):87-105. doi: 10.5114/fn.2019.85929.

Abbott KN, Arnott CK, Westbrook RF, Tran DMD. The effect of high fat, high sugar, and combined high fat-high sugar diets on spatial learning and memory in rodents: A meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev.* 2019 Dec;107:399-421. doi: 10.1016/j.neubiorev.2019.08.010.

Aisen PS, Cummings J, Jack CR Jr, Morris JC, Sperling R, Frölich L, Jones RW, Dowsett SA, Matthews BR, Raskin J, Scheltens P, Dubois B. On the path to 2025: understanding the Alzheimer's disease continuum. *Alzheimers Res Ther.* 2017 Aug 9;9(1):60. doi: 10.1186/s13195-017-0283-5.

Alawieyah Syed Mortadza S, Sim JA, Neubrand VE, Jiang LH. A critical role of TRPM2 channel in A β ₄₂ -induced microglial activation and generation of tumor necrosis factor- α . *Glia.* 2018 Mar;66(3):562-575. doi: 10.1002/glia.23265.

Alghamdi BS. The Effect of Short-Term Feeding of a High-Coconut Oil or High-Fat Diet on Neuroinflammation and the Performance of an Object-Place Task in Rats. *Neurochem Res.* 2021 Feb;46(2):287-298. doi: 10.1007/s11064-020-03163-3.

Ali A, Ali A, Ahmad W, Ahmad N, Khan S, Nuruddin SM, Husain I. Deciphering the Role of WNT Signaling in Metabolic Syndrome-Linked Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol.* 2020 Jan;57(1):302-314. doi: 10.1007/s12035-019-01700-y.

Allendorf DH, Franssen EH, Brown GC. Lipopolysaccharide activates microglia via neuraminidase 1 desialylation of Toll-like Receptor 4. *J Neurochem.* 2020 Nov;155(4):403-416. doi: 10.1111/jnc.15024.

Allinquant B, Clamagirand C, Potier MC. Role of cholesterol metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2014 Jul;17(4):319-23. doi: 10.1097/MCO.0000000000000069.

Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res.* 2007;163:3-22. doi: 10.1016/S0079-6123(07)63001-5.

Andersen JV, Schousboe A, Verkhratsky A. Astrocyte energy and neurotransmitter metabolism in Alzheimer's disease: Integration of the glutamate/GABA-glutamine cycle. *Prog Neurobiol.* 2022 Oct;217:102331. doi: 10.1016/j.pneurobio.2022.102331.

Andrews SJ, Fulton-Howard B, Goate A. Interpretation of risk loci from genome-wide association studies of Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2020 Apr;19(4):326-335. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30435-1.

Bibliografia

Arriagada C, Astorga C, Atwater I, Rojas E, Mears D, Caviedes R, Caviedes P. Endosomal abnormalities related to amyloid precursor protein in cholesterol treated cerebral cortex neuronal cells derived from trisomy 16 mice, an animal model of Down syndrome. *Neurosci Lett*. 2007 Aug 16;423(2):172-7. doi: 10.1016/j.neulet.2007.06.054.

Ashton NJ, Pascoal TA, Karikari TK, Benedet AL, Lantero-Rodriguez J, Brinkmalm G, Snellman A, Schöll M, Troakes C, Hye A, Gauthier S, Vanmechelen E, Zetterberg H, Rosa-Neto P, Blennow K. Plasma p-tau231: a new biomarker for incipient Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol*. 2021 May;141(5):709-724. doi: 10.1007/s00401-021-02275-6. Epub 2021 Feb 14.

Attuquayefio T, Stevenson RJ, Oaten MJ, Francis HM. A four-day Western-style dietary intervention causes reductions in hippocampal-dependent learning and memory and interoceptive sensitivity. *PLoS One*. 2017 Feb 23;12(2):e0172645. doi: 10.1371/journal.pone.0172645.

Avila J, Perry G. A Multilevel View of the Development of Alzheimer's Disease. *Neuroscience*. 2021 Mar 1;457:283-293. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.11.015.

Avila-Muñoz E, Arias C. When astrocytes become harmful: functional and inflammatory responses that contribute to Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*. 2014 Nov;18:29-40. doi: 10.1016/j.arr.2014.07.004.

Avila-Muñoz E, Arias C. Cholesterol-induced astrocyte activation is associated with increased amyloid precursor protein expression and processing. *Glia*. 2015 Nov;63(11):2010-2022. doi: 10.1002/glia.22874.

Baker LD, Cross DJ, Minoshima S, Belongia D, Watson GS, Craft S. Insulin resistance and Alzheimer-like reductions in regional cerebral glucose metabolism for cognitively normal adults with prediabetes or early type 2 diabetes. *Arch Neurol*. 2011 Jan;68(1):51-7. doi: 10.1001/archneurol.2010.225. Epub 2010 Sep 13.

Banks WA, Coon AB, Robinson SM, Moinuddin A, Shultz JM, Nakaoke R, Morley JE. Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. *Diabetes*. 2004 May;53(5):1253-60. doi: 10.2337/diabetes.53.5.1253.

Banks WA. The blood-brain barrier as a cause of obesity. *Curr Pharm Des*. 2008;14(16):1606-14. doi: 10.2174/138161208784705496.

Baranowski BJ, Marko DM, Fenech RK, Yang AJT, MacPherson REK. Healthy brain, healthy life: a review of diet and exercise interventions to promote brain health and reduce Alzheimer's disease risk. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2020 Oct;45(10):1055-1065. doi: 10.1139/apnm-2019-0910.

Barbosa-da-Silva S, da Silva NC, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Liver damage is not reversed during the lean period in diet-induced weight cycling in mice. *Hepatol Res*. 2014 Apr;44(4):450-9. doi: 10.1111/hepr.12138.

Barthélemy NR, Li Y, Joseph-Mathurin N, Gordon BA, Hassenstab J, Benzinger TLS, Buckles V, Fagan AM, Perrin RJ, Goate AM, Morris JC, Karch CM, Xiong C, Allegri R, Mendez PC, Berman SB, Ikeuchi T, Mori H, Shimada H, Shoji M, Suzuki K, Noble J, Farlow M, Chhatwal J, Graff-Radford NR, Salloway S, Schofield PR, Masters CL, Martins RN, O'Connor A, Fox NC, Levin J, Jucker M, Gabelle A, Lehmann S, Sato C, Bateman RJ, McDade E; Dominantly Inherited Alzheimer Network. A soluble phosphorylated tau signature links tau, amyloid and the evolution of stages of dominantly inherited

Bibliografia

Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2020 Mar;26(3):398-407. doi: 10.1038/s41591-020-0781-z. Epub 2020 Mar 11.

Bassendine MF, Taylor-Robinson SD, Fertleman M, Khan M, Neely D. Is Alzheimer's Disease a Liver Disease of the Brain? *J Alzheimers Dis.* 2020;75(1):1-14. doi: 10.3233/JAD-190848.

Batista AFR, Martínez JC, Hengst U. Intra-axonal Synthesis of SNAP25 Is Required for the Formation of Presynaptic Terminals. *Cell Rep.* 2017 Sep 26;20(13):3085-3098. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.097.

Benito-León J, Contador I, Vega S, Villarejo-Galende A, Bermejo-Pareja F. Non-steroidal anti-inflammatory drugs use in older adults decreases risk of Alzheimer's disease mortality. *PLoS One.* 2019 Sep 17;14(9):e0222505. doi: 10.1371/journal.pone.0222505.

Berná G, Romero-Gomez M. The role of nutrition in non-alcoholic fatty liver disease: Pathophysiology and management. *Liver Int.* 2020 Feb;40 Suppl 1:102-108. doi: 10.1111/liv.14360.

Bertani B, Ruiz N. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus.* 2018 Aug;8(1):10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018. doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018.

Besser LM, Gill DP, Monsell SE, Brenowitz W, Meranus DH, Kukull W, Gustafson DR. Body mass index, weight change, and clinical progression in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2014 Jan-Mar;28(1):36-43. doi: 10.1097/WAD.0000000000000005.

Bi F, Huang C, Tong J, Qiu G, Huang B, Wu Q, Li F, Xu Z, Bowser R, Xia XG, Zhou H. Reactive astrocytes secrete lcn2 to promote neuron death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Mar 5;110(10):4069-74. doi: 10.1073/pnas.1218497110.

Biesmans S, Meert TF, Bouwknecht JA, Acton PD, Davoodi N, De Haes P, Kuijlaars J, Langlois X, Matthews LJ, Ver Donck L, Hellings N, Nuydens R. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:271359. doi: 10.1155/2013/271359.

Bivona G, Iemmolo M, Ghersi G. CX3CL1 Pathway as a Molecular Target for Treatment Strategies in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2023 May 4;24(9):8230. doi: 10.3390/ijms24098230.

Björkhem I, Meaney S. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 May;24(5):806-15. doi: 10.1161/01.ATV.0000120374.59826.1b. Epub 2004 Feb 5.

Björkhem I, Leoni V, Svenningsson P. On the fluxes of side-chain oxidized oxysterols across blood-brain and blood-CSF barriers and origin of these steroids in CSF (Review). *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2019 Apr;188:86-89. doi: 10.1016/j.jsbmb.2018.12.009.

Blach-Olszewska Z, Zaczynska E, Gustaw-Rothenberg K, Avila-Rodrigues M, Barreto GE, Leszek J, Aliev G. The Innate Immunity in Alzheimer Disease- Relevance to Pathogenesis and Therapy. *Curr Pharm Des.* 2015;21(25):3582-8. doi: 10.2174/1381612821666150710144829.

Bode DC, Stanyon HF, Hirani T, Baker MD, Nield J, Viles JH. Serum Albumin's Protective Inhibition of Amyloid- β Fiber Formation Is Suppressed by Cholesterol, Fatty Acids and Warfarin. *J Mol Biol.* 2018 Mar 30;430(7):919-934. doi: 10.1016/j.jmb.2018.01.008.

Bibliografia

- Bolós M, Llorens-Martín M, Perea JR, Jurado-Arjona J, Rábano A, Hernández F, Avila J. Absence of CX3CR1 impairs the internalization of Tau by microglia. *Mol Neurodegener.* 2017 Aug 15;12(1):59. doi: 10.1186/s13024-017-0200-1.
- Bostanciklioğlu M. The role of gut microbiota in pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Appl Microbiol.* 2019 Oct;127(4):954-967. doi: 10.1111/jam.14264. Epub 2019 Apr 15.
- Brejyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules.* 2020 Dec 8;25(24):5789. doi: 10.3390/molecules25245789.
- Brett BL, Gardner RC, Godbout J, Dams-O'Connor K, Keene CD. Traumatic Brain Injury and Risk of Neurodegenerative Disorder. *Biol Psychiatry.* 2022 Mar 1;91(5):498-507. doi: 10.1016/j.biopsych.2021.05.025.
- Brito-Moreira J, Lourenco MV, Oliveira MM, Ribeiro FC, Ledo JH, Diniz LP, Vital JFS, Magdesian MH, Melo HM, Barros-Aragão F, de Souza JM, Alves-Leon SV, Gomes FCA, Clarke JR, Figueiredo CP, De Felice FG, Ferreira ST. Interaction of amyloid- β (A β) oligomers with neurexin 2 α and neuroligin 1 mediates synapse damage and memory loss in mice. *J Biol Chem.* 2017 May 5;292(18):7327-7337. doi: 10.1074/jbc.M116.761189.
- Brown GC. The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. *J Neuroinflammation.* 2019 Sep 13;16(1):180. doi: 10.1186/s12974-019-1564-7.
- Brun A, Liu X, Erikson C. Synapse loss and gliosis in the molecular layer of the cerebral cortex in Alzheimer's disease and in frontal lobe degeneration. *Neurodegeneration.* 1995 Jun;4(2):171-7. doi: 10.1006/neur.1995.0021.
- Burhans, M. S., Hagman, D. K., Kuzma, J. N., Schmidt, K. A., and Kratz, M. (2019). Contribution of adipose tissue inflammation to the development of type 2 diabetes mellitus. *Compr. Physiol.* 9, 1–58. doi:10.1002/cphy.c170040.
- Burns MP, Noble WJ, Olm V, Gaynor K, Casey E, LaFrancois J, Wang L, Duff K. Co-localization of cholesterol, apolipoprotein E and fibrillar Abeta in amyloid plaques. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003 Jan 31;110(1):119-25. doi: 10.1016/s0169-328x(02)00647-2.
- Busche MA, Hyman BT. Synergy between amyloid- β and tau in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.* 2020 Oct;23(10):1183-1193. doi: 10.1038/s41593-020-0687-6.
- Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, Koeglsperger T, Dake B, Wu PM, Doykan CE, Fanek Z, Liu L, Chen Z, Rothstein JD, Ransohoff RM, Gygi SP, Antel JP, Weiner HL. Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci.* 2014 Jan;17(1):131-43. doi: 10.1038/nn.3599. Erratum in: *Nat Neurosci.* 2014 Sep;17(9):1286.
- bot O, Weiner HL. Microglial signatures and their role in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2018 Oct;19(10):622-635. doi: 10.1038/s41583-018-0057-5.
- Calvo-Ochoa E, Hernández-Ortega K, Ferrera P, Morimoto S, Arias C. Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations accompanied by neurite and synaptic reduction and

Bibliografia

astroglial activation in the rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2014 Jun;34(6):1001-8. doi: 10.1038/jcbfm.2014.48.

Camara ML, Corrigan F, Jaehne EJ, Jawahar MC, Anscomb H, Baune BT. Effects of centrally administered etanercept on behavior, microglia, and astrocytes in mice following a peripheral immune challenge. *Neuropsychopharmacology.* 2015 Jan;40(2):502-12. doi: 10.1038/npp.2014.199.

Canevari L, Abramov AY, Duchen MR. Toxicity of amyloid beta peptide: tales of calcium, mitochondria, and oxidative stress. *Neurochem Res.* 2004 Mar;29(3):637-50. doi: 10.1023/b:nere.0000014834.06405.af.

Canevari L, Clark JB. Alzheimer's disease and cholesterol: the fat connection. *Neurochem Res.* 2007 Apr-May;32(4-5):739-50. doi: 10.1007/s11064-006-9200-1.

Carrero I, Gonzalo MR, Martin B, Sanz-Anquela JM, Arévalo-Serrano J, Gonzalo-Ruiz A. Oligomers of β -amyloid protein (A β 1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1 β , tumour necrosis factor- α , and a nuclear factor κ -B mechanism in the rat brain. *Exp Neurol.* 2012 Aug;236(2):215-27. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.05.004.

Cataldo AM, Hamilton DJ, Barnett JL, Paskevich PA, Nixon RA. Properties of the endosomal-lysosomal system in the human central nervous system: disturbances mark most neurons in populations at risk to degenerate in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 1996 Jan;16(1):186-99. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-01-00186.1996.

Cataldo AM, Mathews PM, Boiteau AB, Hassinger LC, Peterhoff CM, Jiang Y, Mullaney K, Neve RL, Gruenberg J, Nixon RA. Down syndrome fibroblast model of Alzheimer-related endosome pathology: accelerated endocytosis promotes late endocytic defects. *Am J Pathol.* 2008 Aug;173(2):370-84. doi: 10.2353/ajpath.2008.071053.

Cataldo AM, Peterhoff CM, Troncoso JC, Gomez-Isla T, Hyman BT, Nixon RA. Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *Am J Pathol.* 2000 Jul;157(1):277-86. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64538-5.

Catorce MN, Gevorkian G. LPS-induced Murine Neuroinflammation Model: Main Features and Suitability for Pre-clinical Assessment of Nutraceuticals. *Curr Neuropharmacol.* 2016;14(2):155-64. doi: 10.2174/1570159x14666151204122017.

Cattaneo A, Cattane N, Galluzzi S, Provasi S, Lopizzo N, Festari C, Ferrari C, Guerra UP, Paghera B, Muscio C, Bianchetti A, Volta GD, Turla M, Cotelli MS, Gennuso M, Prellè A, Zanetti O, Lussignoli G, Mirabile D, Bellandi D, Gentile S, Belotti G, Villani D, Harach T, Bolmont T, Padovani A, Boccardi M, Frisoni GB; INDIA-FBP Group. Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiol Aging.* 2017 Jan;49:60-68. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.08.019.

Cazareth J, Guyon A, Heurteaux C, Chabry J, Petit-Paitel A. Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: importance of CCR2/CCL2 signaling. *J Neuroinflammation.* 2014 Jul 28;11:132. doi: 10.1186/1742-2094-11-132.

Bibliografia

Chakraborty A, de Wit NM, van der Flier WM, de Vries HE. The blood brain barrier in Alzheimer's disease. *Vascul Pharmacol*. 2017 Feb;89:12-18. doi: 10.1016/j.vph.2016.11.008.

Chan KL, Pillon NJ, Sivaloganathan DM, Costford SR, Liu Z, Théret M, Chazaud B, Klip A. Palmitoleate Reverses High Fat-induced Proinflammatory Macrophage Polarization via AMP-activated Protein Kinase (AMPK). *J Biol Chem*. 2015 Jul 3;290(27):16979-88. doi: 10.1074/jbc.M115.646992.

Chen Z, Jalabi W, Shpargel KB, Farabaugh KT, Dutta R, Yin X, Kidd GJ, Bergmann CC, Stohlman SA, Trapp BD. Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent of hematogenous TLR4. *J Neurosci*. 2012 Aug 22;32(34):11706-15. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0730-12.2012.

Chen JY, Chu LW, Cheng KI, Hsieh SL, Juan YS, Wu BN. Valproate reduces neuroinflammation and neuronal death in a rat chronic constriction injury model. *Sci Rep*. 2018 Nov 7;8(1):16457. doi: 10.1038/s41598-018-34915-5.

Chen R, Zuo Z, Li Q, Wang H, Li N, Zhang H, Yu X, Liu Z. DHA substitution overcomes high-fat diet-induced disturbance in the circadian rhythm of lipid metabolism. *Food Funct*. 2020 Apr 1;11(4):3621-3631. doi: 10.1039/c9fo02606a.

Chen X, Devaraj S. Gut Microbiome in Obesity, Metabolic Syndrome, and Diabetes. *Curr Diab Rep*. 2018 Oct 18;18(12):129. doi: 10.1007/s11892-018-1104-3.

Cheng Y, Tian DY, Wang YJ. Peripheral clearance of brain-derived A β in Alzheimer's disease: pathophysiology and therapeutic perspectives. *Transl Neurodegener*. 2020 May 7;9(1):16. doi: 10.1186/s40035-020-00195-1.

Chew H, Solomon VA, Fonteh AN. Involvement of Lipids in Alzheimer's Disease Pathology and Potential Therapies. *Front Physiol*. 2020 Jun 9;11:598. doi: 10.3389/fphys.2020.00598.

Chiu S, Mulligan K, Schwarz JM. Dietary carbohydrates and fatty liver disease: de novo lipogenesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2018 Jul;21(4):277-282. doi: 10.1097/MCO.0000000000000469.

Choi M, Lee SM, Kim D, Im HI, Kim HS, Jeong YH. Disruption of the astrocyte-neuron interaction is responsible for the impairments in learning and memory in 5XFAD mice: an Alzheimer's disease animal model. *Mol Brain*. 2021 Jul 10;14(1):111. doi: 10.1186/s13041-021-00823-5.

Choi SH, Tanzi RE. Adult neurogenesis in Alzheimer's disease. *Hippocampus*. 2023 Apr;33(4):307-321. doi: 10.1002/hipo.23504.

Chong CP, Shahar S, Haron H, Din NC. Habitual sugar intake and cognitive impairment among multi-ethnic Malaysian older adults. *Clin Interv Aging*. 2019 Jul 22;14:1331-1342. doi: 10.2147/CIA.S211534.

Christ A, Lauterbach M, Latz E. Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection. *Immunity*. 2019 Nov 19;51(5):794-811. doi: 10.1016/j.immuni.2019.09.020.

Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2021 Feb;78(4):1233-1261. doi: 10.1007/s00018-020-03656-y.

Bibliografia

Colin J, Gregory-Pauron L, Lanhers MC, Claudepierre T, Corbier C, Yen FT, Malaplate-Armand C, Oster T. Membrane raft domains and remodeling in aging brain. *Biochimie*. 2016 Nov;130:178-187. doi: 10.1016/j.biochi.2016.08.014.

Coppin G, Nolan-Poupart S, Jones-Gotman M, Small DM. Working memory and reward association learning impairments in obesity. *Neuropsychologia*. 2014 Dec;65:146-55. doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2014.10.004.

Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins BA, O'Keefe JH, Brand-Miller J. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am J Clin Nutr*. 2005 Feb;81(2):341-54. doi: 10.1093/ajcn.81.2.341.

Cunningham C, Wilcockson DC, Champion S, Lunnon K, Perry VH. Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. *J Neurosci*. 2005 Oct 5;25(40):9275-84. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2614-05.2005.

Czapski GA, Strosznajder JB. Glutamate and GABA in Microglia-Neuron Cross-Talk in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 28;22(21):11677. doi: 10.3390/ijms222111677.

Dabke K, Hendrick G, Devkota S. The gut microbiome and metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2019 Oct 1;129(10):4050-4057. doi: 10.1172/JCI129194.

Daniels MJ, Rivers-Auty J, Schilling T, Spencer NG, Watremez W, Fasolino V, Booth SJ, White CS, Baldwin AG, Freeman S, Wong R, Latta C, Yu S, Jackson J, Fischer N, Koziel V, Pillot T, Bagnall J, Allan SM, Paszek P, Galea J, Harte MK, Eder C, Lawrence CB, Brough D. Fenamate NSAIDs inhibit the NLRP3 inflammasome and protect against Alzheimer's disease in rodent models. *Nat Commun*. 2016 Aug 11;7:12504. doi: 10.1038/ncomms12504.

de Oliveira FF, Bertolucci PH, Chen ES, Smith MC. Risk factors for age at onset of dementia due to Alzheimer's disease in a sample of patients with low mean schooling from São Paulo, Brazil. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2014 Oct;29(10):1033-9. doi: 10.1002/gps.4094.

Development initiatives, 2018. 2018 Global Nutrition Report:Shining a light to spur action on nutrition., Global Nutrition Report.

Díaz M, Fabelo N, Ferrer I, Marín R. "Lipid raft aging" in the human frontal cortex during nonpathological aging: gender influences and potential implications in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2018 Jul;67:42-52. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.02.022.

Dietschy JM, Turley SD. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res*. 2004 Aug;45(8):1375-97. doi: 10.1194/jlr.R400004-JLR200.

Dietschy JM, Turley SD. Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol*. 2001 Apr;12(2):105-12. doi: 10.1097/00041433-200104000-00003.

Ding SL. Comparative anatomy of the prosubiculum, subiculum, presubiculum, postsubiculum, and parasubiculum in human, monkey, and rodent. *J Comp Neurol*. 2013 Dec 15;521(18):4145-62. doi: 10.1002/cne.23416.

Bibliografia

Du X, Wang X, Geng M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Transl Neurodegener.* 2018 Jan 30;7:2. doi: 10.1186/s40035-018-0107-y.

Duvernoy HM, Risold PY. The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Res Rev.* 2007 Nov;56(1):119-47. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.06.002.

Dye L, Boyle NB, Champ C, Lawton C. The relationship between obesity and cognitive health and decline. *Proc Nutr Soc.* 2017 Nov;76(4):443-454. doi: 10.1017/S0029665117002014. Epub 2017 Sep 11.

Edwards Iii GA, Gamez N, Escobedo G Jr, Calderon O, Moreno-Gonzalez I. Modifiable Risk Factors for Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2019 Jun 24;11:146. doi: 10.3389/fnagi.2019.00146.

Elgazar-Carmon V, Rudich A, Hadad N, Levy R. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J Lipid Res.* 2008 Sep;49(9):1894-903. doi: 10.1194/jlr.M800132-JLR200.

Elliott DA, Weickert CS, Garner B. Apolipoproteins in the brain: implications for neurological and psychiatric disorders. *Clin Lipidol.* 2010 Aug 1;51(4):555-573. doi: 10.2217/CLP.10.37.

Espeland MA, Carmichael O, Hayden K, Neiberg RH, Newman AB, Keller JN, Wadden TA, Rapp SR, Hill JO, Horton ES, Johnson KC, Wagenknecht L, Wing RR; Action for Health In Diabetes Brain Magnetic Resonance Imaging (Look AHEAD Brain) and Action for Health Movement and Memory Ancillary Study Research Groups. Long-term Impact of Weight Loss Intervention on Changes in Cognitive Function: Exploratory Analyses from the Action for Health in Diabetes Randomized Controlled Clinical Trial. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2018 Mar 14;73(4):484-491. doi: 10.1093/gerona/glx165.

Espeland MA, Rapp SR, Bray GA, Houston DK, Johnson KC, Kitabchi AE, Hergenroeder AL, Williamson J, Jakicic JM, van Dorsten B, Kritchevsky SB; Action for Health In Diabetes (Look AHEAD) Movement and Memory Subgroup; Look AHEAD Research Group. Long-term impact of behavioral weight loss intervention on cognitive function. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2014 Sep;69(9):1101-8. doi: 10.1093/gerona/glu031.

Estrada LD, Ahumada P, Cabrera D, Arab JP. Liver Dysfunction as a Novel Player in Alzheimer's Progression: Looking Outside the Brain. *Front Aging Neurosci.* 2019 Jul 17;11:174. doi: 10.3389/fnagi.2019.00174.

Fink MP. Animal models of sepsis. *Virulence.* 2014 Jan 1;5(1):143-53. doi: 10.4161/viru.26083. Epub 2013 Aug 19.

Flurkey K, Curren JM, Harrison DE. Mouse models in aging research. IN: Fox JG, Barthold SW, Davisson MT, Newcomer CE, Quimby FW, Smith AL, eds. *The Mouse in Biomedical Research*, 2nd Edition. New York; Elsevier, 2007, Volume 3:637-72.

Francis HM, Stevenson RJ. Higher reported saturated fat and refined sugar intake is associated with reduced hippocampal-dependent memory and sensitivity to interoceptive signals. *Behav Neurosci.* 2011 Dec;125(6):943-55. doi: 10.1037/a0025998.

Bibliografia

- Francis H, Stevenson R. The longer-term impacts of Western diet on human cognition and the brain. *Appetite*. 2013 Apr;63:119-28. doi: 10.1016/j.appet.2012.12.018. Epub 2013 Jan 3. PMID: 23291218.
- Franko A, Merkel D, Kovarova M, Hoene M, Jaghutriz BA, Heni M, Königsrainer A, Papan C, Lehr S, Häring HU, Peter A. Dissociation of Fatty Liver and Insulin Resistance in I148M PNPLA3 Carriers: Differences in Diacylglycerol (DAG) FA18:1 Lipid Species as a Possible Explanation. *Nutrients*. 2018 Sep 17;10(9):1314. doi: 10.3390/nu10091314.
- Freeman LR, Haley-Zitlin V, Stevens C, Granholm AC. Diet-induced effects on neuronal and glial elements in the middle-aged rat hippocampus. *Nutr Neurosci*. 2011 Jan;14(1):32-44. doi: 10.1179/174313211X12966635733358.
- Friedland RP, Chapman MR. The role of microbial amyloid in neurodegeneration. *PLoS Pathog*. 2017 Dec 21;13(12):e1006654. doi: 10.1371/journal.ppat.1006654.
- Friedland RP, McMillan JD, Kurlawala Z. What Are the Molecular Mechanisms by Which Functional Bacterial Amyloids Influence Amyloid Beta Deposition and Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders? *Int J Mol Sci*. 2020 Feb 28;21(5):1652. doi: 10.3390/ijms21051652.
- Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2018 Jul;24(7):908-922. doi: 10.1038/s41591-018-0104-9.
- Gali CC, Fanaee-Danesh E, Zandl-Lang M, Albrecher NM, Tam-Amersdorfer C, Stracke A, Sachdev V, Reichmann F, Sun Y, Avdili A, Reiter M, Kratky D, Holzer P, Lass A, Kandimalla KK, Panzenboeck U. Amyloid-beta impairs insulin signaling by accelerating autophagy-lysosomal degradation of LRP-1 and IR- β in blood-brain barrier endothelial cells in vitro and in 3XTg-AD mice. *Mol Cell Neurosci*. 2019 Sep;99:103390. doi: 10.1016/j.mcn.2019.103390.
- Gamba P, Staurengi E, Testa G, Giannelli S, Sottero B, Leonarduzzi G. A Crosstalk Between Brain Cholesterol Oxidation and Glucose Metabolism in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*. 2019 May 31;13:556. doi: 10.3389/fnins.2019.00556.
- Ganz T, Fainstein N, Ben-Hur T. When the infectious environment meets the AD brain. *Mol Neurodegener*. 2022 Aug 19;17(1):53. doi: 10.1186/s13024-022-00559-3.
- Garbuz DG, Zatsepina OG, Evgen'ev MB. [Beta Amyloid, Tau Protein, and Neuroinflammation: An Attempt to Integrate Different Hypotheses of Alzheimer's Disease Pathogenesis]. *Mol Biol (Mosk)*. 2021 Sep-Oct;55(5):734-747. Russian. doi: 10.31857/S0026898421050049.
- Garcia-Vello P, Di Lorenzo F, Zucchetta D, Zamyatina A, De Castro C, Molinaro A. Lipopolysaccharide lipid A: A promising molecule for new immunity-based therapies and antibiotics. *Pharmacol Ther*. 2022 Feb;230:107970. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107970.
- Gaspar RC, Villarreal SA, Bowles N, Hepler RW, Joyce JG, Shughrue PJ. Oligomers of beta-amyloid are sequestered into and seed new plaques in the brains of an AD mouse model. *Exp Neurol*. 2010 Jun;223(2):394-400. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.09.001.
- Gasparotto J, Ribeiro CT, Bortolin RC, Somensi N, Fernandes HS, Teixeira AA, Guasselli MOR, Agani CAJO, Souza NC, Grings M, Leipnitz G, Gomes HM, de Bittencourt Pasquali MA, Dunkley PR, Dickson PW, Moreira JCF, Gelain DP. Anti-RAGE antibody selectively blocks acute systemic

Bibliografia

inflammatory responses to LPS in serum, liver, CSF and striatum. *Brain Behav Immun.* 2017 May;62:124-136. doi: 10.1016/j.bbi.2017.01.008.

Georges, J, Miller, O, Bintener, C, 2020. Dementia in Europe Yearbook 2019 Estimating the prevalence of dementia in Europe, *Dementia in Europe Yearbooks.*

Giles C, Takechi R, Mellett NA, Meikle PJ, Dhaliwal S, Mamo JC. The Effects of Long-Term Saturated Fat Enriched Diets on the Brain Lipidome. *PLoS One.* 2016 Dec 1;11(12):e0166964. doi: 10.1371/journal.pone.0166964.

Go M, Kou J, Lim JE, Yang J, Fukuchi KI. Microglial response to LPS increases in wild-type mice during aging but diminishes in an Alzheimer's mouse model: Implication of TLR4 signaling in disease progression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Oct 14;479(2):331-337. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.073.

Gomez-Nicola D, Boche D. Post-mortem analysis of neuroinflammatory changes in human Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 2015 Apr 22;7(1):42. doi: 10.1186/s13195-015-0126-1.

Gonzalez-Rodriguez M, Villar-Conde S, Astillero-Lopez V, Villanueva-Anguita P, Ubeda-Banon I, Flores-Cuadrado A, Martinez-Marcos A, Saiz-Sanchez D. Neurodegeneration and Astrogliosis in the Human CA1 Hippocampal Subfield Are Related to hsp90ab1 and bag3 in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2021 Dec 23;23(1):165. doi: 10.3390/ijms23010165.

Granholm AC, Bimonte-Nelson HA, Moore AB, Nelson ME, Freeman LR, Sambamurti K. Effects of a saturated fat and high cholesterol diet on memory and hippocampal morphology in the middle-aged rat. *J Alzheimers Dis.* 2008 Jun;14(2):133-45. doi: 10.3233/jad-2008-14202.

Grassi S, Giussani P, Mauri L, Prioni S, Sonnino S, Prinetti A. Lipid rafts and neurodegeneration: structural and functional roles in physiologic aging and neurodegenerative diseases. *J Lipid Res.* 2020 May;61(5):636-654. doi: 10.1194/jlr.TR119000427.

Gray SC, Kinghorn KJ, Woodling NS. Shifting equilibriums in Alzheimer's disease: the complex roles of microglia in neuroinflammation, neuronal survival and neurogenesis. *Neural Regen Res.* 2020 Jul;15(7):1208-1219. doi: 10.4103/1673-5374.272571.

Grimm MO, Haupenthal VJ, Rothhaar TL, Zimmer VC, Grösgen S, Hundsdörfer B, Lehmann J, Grimm HS, Hartmann T. Effect of Different Phospholipids on α -Secretase Activity in the Non-Amyloidogenic Pathway of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2013 Mar 13;14(3):5879-98. doi: 10.3390/ijms14035879.

Guillemot-Legris O, Masquelier J, Everard A, Cani PD, Alhouayek M, Muccioli GG. High-fat diet feeding differentially affects the development of inflammation in the central nervous system. *J Neuroinflammation.* 2016 Aug 26;13(1):206. doi: 10.1186/s12974-016-0666-8.

Gupta S, Knight AG, Gupta S, Keller JN, Bruce-Keller AJ. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *J Neurochem.* 2012 Mar;120(6):1060-71. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07660.x.

Habchi J, Chia S, Galvagnion C, Michaels TCT, Bellaiche MMJ, Ruggeri FS, Sanguanini M, Idini I, Kumita JR, Sparr E, Linse S, Dobson CM, Knowles TPJ, Vendruscolo M. Cholesterol catalyses A β 42

aggregation through a heterogeneous nucleation pathway in the presence of lipid membranes. *Nat Chem*. 2018 Jun;10(6):673-683. doi: 10.1038/s41557-018-0031-x.

Haleem DJ, Mahmood K. Brain serotonin in high-fat diet-induced weight gain, anxiety and spatial memory in rats. *Nutr Neurosci*. 2021 Mar;24(3):226-235. doi: 10.1080/1028415X.2019.1619983.

Hall GF, Chu B, Lee G, Yao J. Human tau filaments induce microtubule and synapse loss in an in vivo model of neurofibrillary degenerative disease. *J Cell Sci*. 2000 Apr;113 (Pt 8):1373-87. doi: 10.1242/jcs.113.8.1373.

Hanseeuw BJ, Betensky RA, Jacobs HIL, Schultz AP, Sepulcre J, Becker JA, Cosio DMO, Farrell M, Quiroz YT, Mormino EC, Buckley RF, Papp KV, Amariglio RA, Dewachter I, Ivanoiu A, Huijbers W, Hedden T, Marshall GA, Chhatwal JP, Rentz DM, Sperling RA, Johnson K. Association of Amyloid and Tau With Cognition in Preclinical Alzheimer Disease: A Longitudinal Study. *JAMA Neurol*. 2019 Aug 1;76(8):915-924. doi: 10.1001/jamaneurol.2019.1424.

Hargrave SL, Davidson TL, Zheng W, Kinzig KP. Western diets induce blood-brain barrier leakage and alter spatial strategies in rats. *Behav Neurosci*. 2016 Feb;130(1):123-35. doi: 10.1037/bne0000110.

Heverin, M., Maioli, S., Pham, T., Mateos, L., Camporesi, E., Ali, Z., Winblad, B., Cedazo-Minguez, A., Björkhem, I., 2015. 27-hydroxycholesterol mediates negative effects of dietary cholesterol on cognition in mice. *Behav. Brain Res*. 278, 356–359. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.018>.

Hirata Y, Nada Y, Yamada Y, Toyama T, Fukunaga K, Hwang GW, Noguchi T, Matsuzawa A. Elaidic Acid Potentiates Extracellular ATP-Induced Apoptosis via the P2X₇-ROS-ASK1-p38 Axis in Microglial Cell Lines. *Biol Pharm Bull*. 2020;43(10):1562-1569. doi: 10.1248/bpb.b20-00409.

Ho L, Qin W, Pompl PN, Xiang Z, Wang J, Zhao Z, Peng Y, Cambareri G, Rocher A, Mobbs CV, Hof PR, Pasinetti GM. Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2004 May;18(7):902-4. doi: 10.1096/fj.03-0978fje.

Hohsfield LA, Daschil N, Orädd G, Strömberg I, Humpel C. Vascular pathology of 20-month-old hypercholesterolemia mice in comparison to triple-transgenic and APPSwDI Alzheimer's disease mouse models. *Mol Cell Neurosci*. 2014 Nov;63:83-95. doi: 10.1016/j.mcn.2014.10.006.

Holmes C. Review: systemic inflammation and Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2013 Feb;39(1):51-68. doi: 10.1111/j.1365-2990.2012.01307.x.

Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S, Merry KM, Shi Q, Rosenthal A, Barres BA, Lemere CA, Selkoe DJ, Stevens B. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science*. 2016 May 6;352(6286):712-716. doi: 10.1126/science.aad8373. Epub 2016 Mar 31.

Hong S, Nagayach A, Lu Y, Peng H, Duong QA, Pham NB, Vuong CA, Bazan NG. A high fat, sugar, and salt Western diet induces motor-muscular and sensory dysfunctions and neurodegeneration in mice during aging: Ameliorative action of metformin. *CNS Neurosci Ther*. 2021 Dec;27(12):1458-1471. doi: 10.1111/cns.13726.

Bibliografia

- Hoozemans JJ, Veerhuis R, Rozemuller JM, Eikelenboom P. Soothing the inflamed brain: effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on Alzheimer's disease pathology. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2011 Feb;10(1):57-67. doi: 10.2174/187152711794488665.
- Hosny SS, Bahaaeldin AM, Khater MS, Bekhet MM, Hebah HA, Hasanin GA. Role of Inflammatory Markers in Elderly Type 2 Diabetic Patients with Mild Cognitive Impairment. *Curr Diabetes Rev*. 2019;15(3):247-253. doi: 10.2174/1573399814666180423113341.
- Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature*. 2017 Feb 8;542(7640):177-185. doi: 10.1038/nature21363.
- Huang Y, Happonen KE, Burrola PG, O'Connor C, Hah N, Huang L, Nimmerjahn A, Lemke G. Microglia use TAM receptors to detect and engulf amyloid β plaques. *Nat Immunol*. 2021 May;22(5):586-594. doi: 10.1038/s41590-021-00913-5.
- Huang YR, Liu RT. The Toxicity and Polymorphism of β -Amyloid Oligomers. *Int J Mol Sci*. 2020 Jun 24;21(12):4477. doi: 10.3390/ijms21124477.
- Hussain G, Wang J, Rasul A, Anwar H, Imran A, Qasim M, Zafar S, Kamran SKS, Razzaq A, Aziz N, Ahmad W, Shabbir A, Iqbal J, Baig SM, Sun T. Role of cholesterol and sphingolipids in brain development and neurological diseases. *Lipids Health Dis*. 2019 Jan 25;18(1):26. doi: 10.1186/s12944-019-0965-z.
- Ide M, Harris M, Stevens A, Sussams R, Hopkins V, Culliford D, Fuller J, Ibbett P, Raybould R, Thomas R, Puenter U, Teeling J, Perry VH, Holmes C. Periodontitis and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *PLoS One*. 2016 Mar 10;11(3):e0151081. doi: 10.1371/journal.pone.0151081.
- Iemmolo M, Ghersi G, Bivona G. The Cytokine CX3CL1 and ADAMs/MMPs in Concerted Cross-Talk Influencing Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*. 2023 Apr 28;24(9):8026. doi: 10.3390/ijms24098026.
- Ifuku M, Katafuchi T, Mawatari S, Noda M, Miake K, Sugiyama M, Fujino T. Anti-inflammatory/anti-amyloidogenic effects of plasmalogens in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in adult mice. *J Neuroinflammation*. 2012 Aug 13;9:197. doi: 10.1186/1742-2094-9-197.
- Ioannou GN, Subramanian S, Chait A, Haigh WG, Yeh MM, Farrell GC, Lee SP, Savard C. Cholesterol crystallization within hepatocyte lipid droplets and its role in murine NASH. *J Lipid Res*. 2017 Jun;58(6):1067-1079. doi: 10.1194/jlr.M072454. Epub 2017 Apr 12.
- Isaac V, Sim S, Zheng H, Zagorodnov V, Tai ES, Chee M. Adverse Associations between Visceral Adiposity, Brain Structure, and Cognitive Performance in Healthy Elderly. *Front Aging Neurosci*. 2011 Sep 13;3:12. doi: 10.3389/fnagi.2011.00012.
- Ising C, Venegas C, Zhang S, Scheiblich H, Schmidt SV, Vieira-Saecker A, Schwartz S, Albasset S, McManus RM, Tejera D, Griep A, Santarelli F, Brosseron F, Opitz S, Stunden J, Merten M, Kaye R, Golenbock DT, Blum D, Latz E, Buée L, Heneka MT. NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology. *Nature*. 2019 Nov;575(7784):669-673. doi: 10.1038/s41586-019-1769-z. Epub 2019 Nov 20.

Bibliografia

Jacka FN, Cherbuin N, Anstey KJ, Sachdev P, Butterworth P. Western diet is associated with a smaller hippocampus: a longitudinal investigation. *BMC Med.* 2015 Sep 8;13:215. doi: 10.1186/s12916-015-0461-x.

Jellinger KA (2014) Neuropathology of Dementia Disorders. *J Alzheimers Dis Parkinsonism* 4:135. doi: 10.4172/2161-0460.1000135

Jellinger, KA (2020). Neuropathology of the Alzheimer's continuum: an update. *Free Neuropathology, I*, 32. <https://doi.org/10.17879/freeneuropathology-2020-3050>

Jena PK, Sheng L, Di Lucente J, Jin LW, Maezawa I, Wan YY. Dysregulated bile acid synthesis and dysbiosis are implicated in Western diet-induced systemic inflammation, microglial activation, and reduced neuroplasticity. *FASEB J.* 2018 May;32(5):2866-2877. doi: 10.1096/fj.201700984RR.

Jha MK, Lee S, Park DH, Kook H, Park KG, Lee IK, Suk K. Diverse functional roles of lipocalin-2 in the central nervous system. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015 Feb;49:135-56. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.12.006.

Ji Y, Han J, Lee N, Yoon JH, Youn K, Ha HJ, Yoon E, Kim DH, Jun M. Neuroprotective Effects of Baicalein, Wogonin, and Oroxylin A on Amyloid Beta-Induced Toxicity via NF- κ B/MAPK Pathway Modulation. *Molecules.* 2020 Nov 2;25(21):5087. doi: 10.3390/molecules25215087.

Jiang Y, Mullaney KA, Peterhoff CM, Che S, Schmidt SD, Boyer-Boiteau A, Ginsberg SD, Cataldo AM, Mathews PM, Nixon RA. Alzheimer's-related endosome dysfunction in Down syndrome is A β -independent but requires APP and is reversed by BACE-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jan 26;107(4):1630-5. doi: 10.1073/pnas.0908953107.

Jiang P, Zheng W, Sun X, Jiang G, Wu S, Xu Y, Song S, Ai C. Sulfated polysaccharides from *Undaria pinnatifida* improved high fat diet-induced metabolic syndrome, gut microbiota dysbiosis and inflammation in BALB/c mice. *Int J Biol Macromol.* 2021 Jan 15;167:1587-1597. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.116.

Jiang P, Zheng W, Sun X, Jiang G, Wu S, Xu Y, Song S, Ai C. Sulfated polysaccharides from *Undaria pinnatifida* improved high fat diet-induced metabolic syndrome, gut microbiota dysbiosis and inflammation in BALB/c mice. *Int J Biol Macromol.* 2021 Jan 15;167:1587-1597. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.116.

Johnson ECB, Dammer EB, Duong DM, Ping L, Zhou M, Yin L, Higginbotham LA, Guajardo A, White B, Troncoso JC, Thambisetty M, Montine TJ, Lee EB, Trojanowski JQ, Beach TG, Reiman EM, Haroutunian V, Wang M, Schadt E, Zhang B, Dickson DW, Ertekin-Taner N, Golde TE, Petyuk VA, De Jager PL, Bennett DA, Wingo TS, Rangaraju S, Hajjar I, Shulman JM, Lah JJ, Levey AI, Seyfried NT. Large-scale proteomic analysis of Alzheimer's disease brain and cerebrospinal fluid reveals early changes in energy metabolism associated with microglia and astrocyte activation. *Nat Med.* 2020 May;26(5):769-780. doi: 10.1038/s41591-020-0815-6.

Jonas P, Lisman J. Structure, function, and plasticity of hippocampal dentate gyrus microcircuits. *Front Neural Circuits.* 2014 Sep 10;8:107. doi: 10.3389/fncir.2014.00107.

Bibliografia

- Julien C, Tremblay C, Phivilay A, Berthiaume L, Emond V, Julien P, Calon F. High-fat diet aggravates amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD mouse model. *Neurobiol Aging*. 2010 Sep;31(9):1516-31. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.08.022.
- Jung ES, An K, Hong HS, Kim JH, Mook-Jung I. Astrocyte-originated ATP protects A β (1-42)-induced impairment of synaptic plasticity. *J Neurosci*. 2012 Feb 29;32(9):3081-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6357-11.2012.
- Kanoski SE, Davidson TL. Different patterns of memory impairments accompany short- and longer-term maintenance on a high-energy diet. *J Exp Psychol Anim Behav Process*. 2010 Apr;36(2):313-9. doi: 10.1037/a0017228.
- Kanoski SE, Davidson TL. Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiol Behav*. 2011 Apr 18;103(1):59-68. doi: 10.1016/j.physbeh.2010.12.003.
- Karaca I, Wagner H, Ramirez A. Suche nach Risikogenen bei der Alzheimer-Erkrankung [Search for risk genes in Alzheimer's disease]. *Nervenarzt*. 2017 Jul;88(7):744-750. German. doi: 10.1007/s00115-017-0354-7.
- Kaur D, Sharma V, Deshmukh R. Activation of microglia and astrocytes: a roadway to neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology*. 2019 Aug;27(4):663-677. doi: 10.1007/s10787-019-00580-x.
- Ke X, Fu Q, Sterrett J, Hillard CJ, Lane RH, Majnik A. Adverse maternal environment and western diet impairs cognitive function and alters hippocampal glucocorticoid receptor promoter methylation in male mice. *Physiol Rep*. 2020 Apr;8(8):e14407. doi: 10.14814/phy2.14407.
- Kent SA, Spires-Jones TL, Durrant CS. The physiological roles of tau and A β : implications for Alzheimer's disease pathology and therapeutics. *Acta Neuropathol*. 2020 Oct;140(4):417-447. doi: 10.1007/s00401-020-02196-w.
- Kim JH, Ko PW, Lee HW, Jeong JY, Lee MG, Kim JH, Lee WH, Yu R, Oh WJ, Suk K. Astrocyte-derived lipocalin-2 mediates hippocampal damage and cognitive deficits in experimental models of vascular dementia. *Glia*. 2017 Sep;65(9):1471-1490. doi: 10.1002/glia.23174.
- Kim JK, Hong S, Park J, Kim S. Metabolic and Transcriptomic Changes in the Mouse Brain in Response to Short-Term High-Fat Metabolic Stress. *Metabolites*. 2023 Mar 9;13(3):407. doi: 10.3390/metabo13030407.
- Kim DG, Krenz A, Toussaint LE, Maurer KJ, Robinson SA, Yan A, Torres L, Bynoe MS. Non-alcoholic fatty liver disease induces signs of Alzheimer's disease (AD) in wild-type mice and accelerates pathological signs of AD in an AD model. *J Neuroinflammation*. 2016 Jan 5;13:1. doi: 10.1186/s12974-015-0467-5.
- Kirk RA, Kesner RP, Wang LM, Wu Q, Towner RA, Hoffman JM, Morton KA. Lipopolysaccharide exposure in a rat sepsis model results in hippocampal amyloid- β plaque and phosphorylated tau deposition and corresponding behavioral deficits. *Geroscience*. 2019 Aug;41(4):467-481. doi: 10.1007/s11357-019-00089-9. Epub 2019 Aug 31.

Bibliografia

- Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, LaFerla FM. Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2005 Sep 28;25(39):8843-53. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2868-05.2005.
- Kivipelto M, Mangialasche F, Ngandu T. Lifestyle interventions to prevent cognitive impairment, dementia and Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2018 Nov;14(11):653-666. doi: 10.1038/s41582-018-0070-3.
- Kivipelto M, Ngandu T, Fratiglioni L, Viitanen M, Kåreholt I, Winblad B, Helkala EL, Tuomilehto J, Soininen H, Nissinen A. Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2005 Oct;62(10):1556-60. doi: 10.1001/archneur.62.10.1556.
- Knirel YA, Anisimov AP, Kislichkina AA, Kondakova AN, Bystrova OV, Vagaiskaya AS, Shatalin KY, Shashkov AS, Dentovskaya SV. Lipopolysaccharide of the *Yersinia pseudotuberculosis* Complex. *Biomolecules*. 2021 Sep 26;11(10):1410. doi: 10.3390/biom11101410.
- Ko Y, Chye SM. Lifestyle intervention to prevent Alzheimer's disease. *Rev Neurosci*. 2020 Aug 17;:j/revneuro.ahead-of-print/revneuro-2020-0072/revneuro-2020-0072.xml. doi: 10.1515/revneuro-2020-0072.
- Korbecki J, Bajdak-Rusinek K. The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: an overview of molecular mechanisms. *Inflamm Res*. 2019 Nov;68(11):915-932. doi: 10.1007/s00011-019-01273-5.
- Kosari S, Badoer E, Nguyen JC, Killcross AS, Jenkins TA. Effect of western and high fat diets on memory and cholinergic measures in the rat. *Behav Brain Res*. 2012 Nov 1;235(1):98-103. doi: 10.1016/j.bbr.2012.07.017.
- Kowalski K, Mulak A. Brain-Gut-Microbiota Axis in Alzheimer's Disease. *J Neurogastroenterol Motil*. 2019 Jan 31;25(1):48-60. doi: 10.5056/jnm18087.
- Kshirsagar V, Thingore C, Gursahani M, Gawali N, Juvekar A. Hydrogen Sulfide Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Memory Impairment in Mice by Reducing Apoptosis, Oxidative, and Inflammatory Effects. *Neurotox Res*. 2021 Aug;39(4):1310-1322. doi: 10.1007/s12640-021-00374-6
- Kumashiro N, Erion DM, Zhang D, Kahn M, Beddow SA, Chu X, Still CD, Gerhard GS, Han X, Dziura J, Petersen KF, Samuel VT, Shulman GI. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Sep 27;108(39):16381-5. doi: 10.1073/pnas.1113359108.
- Kurz C, Walker L, Rauchmann BS, Pernecky R. Dysfunction of the blood-brain barrier in Alzheimer's disease: Evidence from human studies. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2022 Apr;48(3):e12782. doi: 10.1111/nan.12782.
- Lagarde J, Sarazin M, Bottlaender M. In vivo PET imaging of neuroinflammation in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 2018 May;125(5):847-867. doi: 10.1007/s00702-017-1731-x.
- Laharrague P, Oppert JM, Brousset P, Charlet JP, Campfield A, Fontanilles AM, Guy-Grand B, Corberand JX, Pénicaud L, Casteilla L. High concentration of leptin stimulates myeloid differentiation

Bibliografia

from human bone marrow CD34+ progenitors: potential involvement in leukocytosis of obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000 Sep;24(9):1212-6. doi: 10.1038/sj.ijo.0801377.

Lee JC, Park SM, Kim IY, Sung H, Seong JK, Moon MH. High-fat diet-induced lipidome perturbations in the cortex, hippocampus, hypothalamus, and olfactory bulb of mice. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2018 Sep;1863(9):980-990. doi: 10.1016/j.bbalip.2018.05.007.

Lee JW, Nam H, Kim LE, Jeon Y, Min H, Ha S, Lee Y, Kim SY, Lee SJ, Kim EK, Yu SW. TLR4 (toll-like receptor 4) activation suppresses autophagy through inhibition of FOXO3 and impairs phagocytic capacity of microglia. *Autophagy.* 2019 May;15(5):753-770. doi: 10.1080/15548627.2018.1556946. Epub 2018 Dec 13.

Leigh SJ, Morris MJ. Diet, inflammation and the gut microbiome: Mechanisms for obesity-associated cognitive impairment. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020 Jun 1;1866(6):165767. doi: 10.1016/j.bbdis.2020.165767.

Leng F, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat Rev Neurol.* 2021 Mar;17(3):157-172. doi: 10.1038/s41582-020-00435-y.

Li S, Jin M, Koeglsperger T, Shepardson NE, Shankar GM, Selkoe DJ. Soluble A β oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *J Neurosci.* 2011 May 4;31(18):6627-38. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0203-11.2011.

Li XY, Zhang M, Xu W, Li JQ, Cao XP, Yu JT, Tan L. Midlife Modifiable Risk Factors for Dementia: A Systematic Review and Meta-analysis of 34 Prospective Cohort Studies. *Curr Alzheimer Res.* 2019;16(14):1254-1268. doi: 10.2174/1567205017666200103111253.

Lian H, Litvinchuk A, Chiang AC, Aithmitti N, Jankowsky JL, Zheng H. Astrocyte-Microglia Cross Talk through Complement Activation Modulates Amyloid Pathology in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *J Neurosci.* 2016 Jan 13;36(2):577-89. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2117-15.2016.

Liang W, Menke AL, Driessen A, Koek GH, Lindeman JH, Stoop R, Havekes LM, Kleemann R, van den Hoek AM. Establishment of a general NAFLD scoring system for rodent models and comparison to human liver pathology. *PLoS One.* 2014 Dec 23;9(12):e115922. doi: 10.1371/journal.pone.0115922.

Liao H, Chou LM, Chien YW, Wu CH, Chang JS, Lin CI, Lin SH. Grape powder consumption affects the expression of neurodegeneration-related brain proteins in rats chronically fed a high-fructose-high-fat diet. *J Nutr Biochem.* 2017 May;43:132-140. doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.02.013. Epub 2017 Mar 2. PMID: 28285155.

Liebner S, Dijkhuizen RM, Reiss Y, Plate KH, Agalliu D, Constantin G. Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathol.* 2018 Mar;135(3):311-336. doi: 10.1007/s00401-018-1815-1.

Lindenmeyer CC, McCullough AJ. The Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-An Evolving View. *Clin Liver Dis.* 2018 Feb;22(1):11-21. doi: 10.1016/j.cld.2017.08.003.

Bibliografia

- Liu Y, Dai Y, Li Q, Chen C, Chen H, Song Y, Hua F, Zhang Z. Beta-amyloid activates NLRP3 inflammasome via TLR4 in mouse microglia. *Neurosci Lett.* 2020 Sep 25;736:135279. doi: 10.1016/j.neulet.2020.135279.
- Liu Y, Fu X, Lan N, Li S, Zhang J, Wang S, Li C, Shang Y, Huang T, Zhang L. Luteolin protects against high fat diet-induced cognitive deficits in obesity mice. *Behav Brain Res.* 2014 Jul 1;267:178-88. doi: 10.1016/j.bbr.2014.02.040.
- Liu PP, Xie Y, Meng XY, Kang JS. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduct Target Ther.* 2019 Aug 23;4:29. doi: 10.1038/s41392-019-0063-8. Erratum in: *Signal Transduct Target Ther.* 2019 Sep 23;4:37.
- Liu Y, Fu X, Lan N, Li S, Zhang J, Wang S, Li C, Shang Y, Huang T, Zhang L. Luteolin protects against high fat diet-induced cognitive deficits in obesity mice. *Behav Brain Res.* 2014 Jul 1;267:178-88. doi: 10.1016/j.bbr.2014.02.040.
- Liu Y, Lu X, Li X, Du P, Qin G. High-fat diet triggers obesity-related early infiltration of macrophages into adipose tissue and transient reduction of blood monocyte count. *Mol Immunol.* 2020 Jan;117:139-146. doi: 10.1016/j.molimm.2019.11.002.
- Lizarbe B, Soares AF, Larsson S, Duarte JMN. Neurochemical Modifications in the Hippocampus, Cortex and Hypothalamus of Mice Exposed to Long-Term High-Fat Diet. *Front Neurosci.* 2019 Jan 8;12:985. doi: 10.3389/fnins.2018.00985.
- Loera-Valencia R, Goikolea J, Parrado-Fernandez C, Merino-Serrais P, Maioli S. Alterations in cholesterol metabolism as a risk factor for developing Alzheimer's disease: Potential novel targets for treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2019 Jun;190:104-114. doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.03.003.
- Luo Y, Lin H. Inflammation initiates a vicious cycle between obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Immun Inflamm Dis.* 2021 Mar;9(1):59-73. doi: 10.1002/iid3.391.
- Lustig RH. Ultra-processed Food: Addictive, Toxic, and Ready for Regulation. *Nutrients.* 2020 Nov 5;12(11):3401. doi: 10.3390/nu12113401.
- Lütjohann D, von Bergmann K. 24S-hydroxycholesterol: a marker of brain cholesterol metabolism. *Pharmacopsychiatry.* 2003 Sep;36 Suppl 2:S102-6. doi: 10.1055/s-2003-43053.
- Lyons CL, Kennedy EB, Roche HM. Metabolic Inflammation-Differential Modulation by Dietary Constituents. *Nutrients.* 2016 Apr 27;8(5):247. doi: 10.3390/nu8050247.
- Ma LZ, Huang YY, Wang ZT, Li JQ, Hou XH, Shen XN, Ou YN, Dong Q, Tan L, Yu JT, Initiative ADN. Metabolically healthy obesity reduces the risk of Alzheimer's disease in elders: a longitudinal study. *Aging (Albany NY).* 2019 Dec 2;11(23):10939-10951. doi: 10.18632/aging.102496.
- Mahley RW, Rall SC Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2000;1:507-37. doi: 10.1146/annurev.genom.1.1.507.
- Malek-Ahmadi M, Perez SE, Chen K, Mufson EJ. Braak Stage, Cerebral Amyloid Angiopathy, and Cognitive Decline in Early Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2020;74(1):189-197. doi: 10.3233/JAD-191151.

Bibliografia

- Martinez FO, Helming L, Milde R, Varin A, Melgert BN, Draijer C, Thomas B, Fabbri M, Crawshaw A, Ho LP, Ten Hacken NH, Cobos Jiménez V, Kootstra NA, Hamann J, Greaves DR, Locati M, Mantovani A, Gordon S. Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood*. 2013 Feb 28;121(9):e57-69. doi: 10.1182/blood-2012-06-436212.
- Martín-Peláez S, Fito M, Castaner O. Mediterranean Diet Effects on Type 2 Diabetes Prevention, Disease Progression, and Related Mechanisms. A Review. *Nutrients*. 2020 Jul 27;12(8):2236. doi: 10.3390/nu12082236.
- Mast N, Saadane A, Valencia-Olvera A, Constans J, Maxfield E, Arakawa H, Li Y, Landreth G, Pikuleva IA. Cholesterol-metabolizing enzyme cytochrome P450 46A1 as a pharmacologic target for Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. 2017 Sep 1;123:465-476. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.06.026.
- Mattson, M. P., & Calabrese, E. J. *Hormesis: A revolution in biology, toxicology and medicine*. Humana Press 2010 Inc. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-495-1>.
- Mazgaeen L, Gurung P. Recent Advances in Lipopolysaccharide Recognition Systems. *Int J Mol Sci*. 2020 Jan 7;21(2):379. doi: 10.3390/ijms21020379.
- Mazidi M, Rezaie P, Kengne AP, Mobarhan MG, Ferns GA. Gut microbiome and metabolic syndrome. *Diabetes Metab Syndr*. 2016 Apr-Jun;10(2 Suppl 1):S150-7. doi: 10.1016/j.dsx.2016.01.024.
- Mazza E, Ferro Y, Pujia R, Mare R, Maurotti S, Montalcini T, Pujia A. Mediterranean Diet In Healthy Aging. *J Nutr Health Aging*. 2021;25(9):1076-1083. doi: 10.1007/s12603-021-1675-6.
- McLean FH, Grant C, Morris AC, Horgan GW, Polanski AJ, Allan K, Campbell FM, Langston RF, Williams LM. Rapid and reversible impairment of episodic memory by a high-fat diet in mice. *Sci Rep*. 2018 Aug 10;8(1):11976. doi: 10.1038/s41598-018-30265-4.
- Mietelska-Porowska A, Domańska J, Want A, Więckowska-Gacek A, Chutorański D, Koperski M, Wojda U. Induction of Brain Insulin Resistance and Alzheimer's Molecular Changes by Western Diet. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 25;23(9):4744. doi: 10.3390/ijms23094744.
- Mietelska-Porowska A, Wojda U. T Lymphocytes and Inflammatory Mediators in the Interplay between Brain and Blood in Alzheimer's Disease: Potential Pools of New Biomarkers. *J Immunol Res*. 2017;2017:4626540. doi: 10.1155/2017/4626540.
- Mildner A, Huang H, Radke J, Stenzel W, Priller J. P2Y₁₂ receptor is expressed on human microglia under physiological conditions throughout development and is sensitive to neuroinflammatory diseases. *Glia*. 2017 Feb;65(2):375-387. doi: 10.1002/glia.23097.
- Miyata S. Glial functions in the blood-brain communication at the circumventricular organs. *Front Neurosci*. 2022 Oct 6;16:991779. doi: 10.3389/fnins.2022.991779.
- Moe SE, Sorbo JG, Sogaard R, Zeuthen T, Petter Ottersen O, Holen T. New isoforms of rat Aquaporin-4. *Genomics*. 2008 Apr;91(4):367-77. doi: 10.1016/j.ygeno.2007.12.003.

Bibliografia

- Mohamed LA, Kaddoumi A. In vitro investigation of amyloid- β hepatobiliary disposition in sandwich-cultured primary rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2013 Oct;41(10):1787-96. doi: 10.1124/dmd.113.052514.
- Mohr AE, Crawford M, Jasbi P, Fessler S, Sweazea KL. Lipopolysaccharide and the gut microbiota: considering structural variation. *FEBS Lett.* 2022 Apr;596(7):849-875. doi: 10.1002/1873-3468.14328.
- Montagne A, Zhao Z, Zlokovic BV. Alzheimer's disease: A matter of blood-brain barrier dysfunction? *J Exp Med.* 2017 Nov 6;214(11):3151-3169. doi: 10.1084/jem.20171406. Epub 2017 Oct 23.
- Monteiro R, Azevedo I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:289645. doi: 10.1155/2010/289645.
- Montero-Odasso M, Ismail Z, Livingston G. One third of dementia cases can be prevented within the next 25 years by tackling risk factors. The case "for" and "against". *Alzheimers Res Ther.* 2020 Jul 8;12(1):81. doi: 10.1186/s13195-020-00646-x.
- Moore AH, Bigbee MJ, Boynton GE, Wakeham CM, Rosenheim HM, Staral CJ, Morrissey JL, Hund AK. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease: Reconsidering the Role of Neuroinflammation. *Pharmaceuticals (Basel).* 2010 Jun 2;3(6):1812-1841. doi: 10.3390/ph3061812.
- Mori T, Paris D, Town T, Rojiani AM, Sparks DL, Delledonne A, Crawford F, Abdullah LI, Humphrey JA, Dickson DW, Mullan MJ. Cholesterol accumulates in senile plaques of Alzheimer disease patients and in transgenic APP(SW) mice. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001 Aug;60(8):778-85. doi: 10.1093/jnen/60.8.778.
- Morsiani C, Bacalini MG, Santoro A, Garagnani P, Collura S, D'Errico A, de Eguileor M, Grazi GL, Cescon M, Franceschi C, Capri M. The peculiar aging of human liver: A geroscience perspective within transplant context. *Ageing Res Rev.* 2019 May;51:24-34. doi: 10.1016/j.arr.2019.02.002.
- Morsiani C, Bacalini MG, Santoro A, Garagnani P, Collura S, D'Errico A, de Eguileor M, Grazi GL, Cescon M, Franceschi C, Capri M. The peculiar aging of human liver: A geroscience perspective within transplant context. *Ageing Res Rev.* 2019 May;51:24-34. doi: 10.1016/j.arr.2019.02.002.
- Moser VA, Uchoa MF, Pike CJ. TLR4 inhibitor TAK-242 attenuates the adverse neural effects of diet-induced obesity. *J Neuroinflammation.* 2018 Nov 5;15(1):306. doi: 10.1186/s12974-018-1340-0.
- Moshage H. Cytokines and the hepatic acute phase response. *J Pathol.* 1997 Mar;181(3):257-66. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199703)181:3<257::AID-PATH756>3.0.CO;2-U.
- Mroczo B, Groblewska M, Litman-Zawadzka A, Kornhuber J, Lewczuk P. Cellular Receptors of Amyloid β Oligomers (A β Os) in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2018 Jun 27;19(7):1884. doi: 10.3390/ijms19071884.
- Mucha M, Skrzypiec AE, Schiavon E, Attwood BK, Kucerova E, Pawlak R. Lipocalin-2 controls neuronal excitability and anxiety by regulating dendritic spine formation and maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Nov 8;108(45):18436-41. doi: 10.1073/pnas.1107936108.

Bibliografia

Musso G, Gambino R, De Michieli F, Cassader M, Rizzetto M, Durazzo M, Fagà E, Silli B, Pagano G. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2003 Apr;37(4):909-16. doi: 10.1053/jhep.2003.50132.

Naudé PJ, Nyakas C, Eiden LE, Ait-Ali D, van der Heide R, Engelborghs S, Luiten PG, De Deyn PP, den Boer JA, Eisel UL. Lipocalin 2: novel component of proinflammatory signaling in Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2012 Jul;26(7):2811-23. doi: 10.1096/fj.11-202457.

NFZ o zdrowiu. Alzheimer. 2022.

Nier A, Brandt A, Conzelmann IB, Özel Y, Bergheim I. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Overweight Children: Role of Fructose Intake and Dietary Pattern. *Nutrients*. 2018 Sep 19;10(9):1329. doi: 10.3390/nu10091329.

Niewiadomska G, Niewiadomski W, Steczkowska M, Gasiorowska A. Tau Oligomers Neurotoxicity. *Life (Basel)*. 2021 Jan 6;11(1):28. doi: 10.3390/life11010028.

Nissankara Rao LS, Kilari EK, Kola PK. Protective effect of *Curcuma amada* acetone extract against high-fat and high-sugar diet-induced obesity and memory impairment. *Nutr Neurosci*. 2021 Mar;24(3):212-225. doi: 10.1080/1028415X.2019.1616436.

Niu L, Han DW, Xu RL, Han B, Zhou X, Wu HW, Li SH, Qu CX, Liu M. A High-sugar High-fat Diet Induced Metabolic Syndrome Shows some Symptoms of Alzheimer's Disease in Rats. *J Nutr Health Aging*. 2016;20(5):509-13. doi: 10.1007/s12603-015-0601-1.

Nixon RA. Amyloid precursor protein and endosomal-lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease: inseparable partners in a multifactorial disease. *FASEB J*. 2017 Jul;31(7):2729-2743. doi: 10.1096/fj.201700359.

Nixon RA. Niemann-Pick Type C disease and Alzheimer's disease: the APP-endosome connection fattens up. *Am J Pathol*. 2004 Mar;164(3):757-61. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63163-X.[AWG3]

Okuyama S, Makihata N, Yoshimura M, Amakura Y, Yoshida T, Nakajima M, Furukawa Y. Oenothien B suppresses lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in the mouse brain. *Int J Mol Sci*. 2013 May 7;14(5):9767-78. doi: 10.3390/ijms14059767.

Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol*. 2016 Feb;173(4):649-65. doi: 10.1111/bph.13139. Epub 2015 May 11. PMID: 25800044; PMCID: PMC4742299.

Ormerod BK, Hanft SJ, Asokan A, Haditsch U, Lee SW, Palmer TD. PPAR γ activation prevents impairments in spatial memory and neurogenesis following transient illness. *Brain Behav Immun*. 2013 Mar;29:28-38. doi: 10.1016/j.bbi.2012.10.017. Epub 2012 Oct 26.

Orth M, Bellosta S. Cholesterol: its regulation and role in central nervous system disorders. *Cholesterol*. 2012;2012:292598. doi: 10.1155/2012/292598.

Park SH, Kim JH, Choi KH, Jang YJ, Bae SS, Choi BT, Shin HK. Hypercholesterolemia accelerates amyloid β -induced cognitive deficits. *Int J Mol Med*. 2013 Mar;31(3):577-82. doi: 10.3892/ijmm.2013.1233.

Bibliografia

- Pati S, Krishna S, Lee JH, Ross MK, de La Serre CB, Harn DA Jr, Wagner JJ, Filipov NM, Cummings BS. Effects of high-fat diet and age on the blood lipidome and circulating endocannabinoids of female C57BL/6 mice. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2018 Jan;1863(1):26-39. doi: 10.1016/j.bbalip.2017.09.011.
- Perea JR, Bolós M, Avila J. Microglia in Alzheimer's Disease in the Context of Tau Pathology. *Biomolecules*. 2020 Oct 14;10(10):1439. doi: 10.3390/biom10101439.
- Pfriefer FW. Outsourcing in the brain: do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes? *Bioessays*. 2003 Jan;25(1):72-8. doi: 10.1002/bies.10195.
- Pilling D, Karhadkar TR, Gomer RH. High-Fat Diet-Induced Adipose Tissue and Liver Inflammation and Steatosis in Mice Are Reduced by Inhibiting Sialidases. *Am J Pathol*. 2021 Jan;191(1):131-143. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.09.011.
- Pistell PJ, Morrison CD, Gupta S, Knight AG, Keller JN, Ingram DK, Bruce-Keller AJ. Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *J Neuroimmunol*. 2010 Feb 26;219(1-2):25-32. doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.11.010.
- Plóciennikowska A, Hromada-Judycka A, Borzęcka K, Kwiatkowska K. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Feb;72(3):557-581. doi: 10.1007/s00018-014-1762-5.
- Poulose SM, Miller MG, Scott T, Shukitt-Hale B. Nutritional Factors Affecting Adult Neurogenesis and Cognitive Function. *Adv Nutr*. 2017 Nov 15;8(6):804-811. doi: 10.3945/an.117.016261.
- Pugazhenth S. Metabolic Syndrome and the Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;146:243-258. doi: 10.1016/bs.pmbts.2016.12.016. Epub 2017 Feb 4. PMID: 28253987.
- Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM. Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci*. 2003 Apr;6(4):345-51. doi: 10.1038/nn0403-345. PMID: 12658281.
- Qian XH, Song XX, Liu XL, Chen SD, Tang HD. Inflammatory pathways in Alzheimer's disease mediated by gut microbiota. *Ageing Res Rev*. 2021 Jul;68:101317. doi: 10.1016/j.arr.2021.101317.
- Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 2007 Apr 1;55(5):453-62. doi: 10.1002/glia.20467.
- Rang HP (2012) 23. Atherosclerosis and lipoprotein metabolism. In Rang & Dale's pharmacology, Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Rao YL, Ganaraja B, Murlimanju BV, Joy T, Krishnamurthy A, Agrawal A. Hippocampus and its involvement in Alzheimer's disease: a review. *3 Biotech*. 2022 Feb;12(2):55. doi: 10.1007/s13205-022-03123-4.
- Raskin J, Cummings J, Hardy J, Schuh K, Dean RA. Neurobiology of Alzheimer's Disease: Integrated Molecular, Physiological, Anatomical, Biomarker, and Cognitive Dimensions. *Curr Alzheimer Res*. 2015;12(8):712-22. doi: 10.2174/1567205012666150701103107.

Bibliografia

- Rasmussen Eid H, Rosness TA, Bosnes O, Salvesen Ø, Knutli M, Stordal E. Smoking and Obesity as Risk Factors in Frontotemporal Dementia and Alzheimer's Disease: The HUNT Study. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*. 2019 Jan 9;9(1):1-10. doi: 10.1159/000495607.
- Rebai R, Jasmin L, Boudah A. Agomelatine effects on fat-enriched diet induced neuroinflammation and depression-like behavior in rats. *Biomed Pharmacother*. 2021 Mar;135:111246. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111246.
- Reichardt F, Chassaing B, Nezami BG, Li G, Tabatabavakili S, Mwangi S, Uppal K, Liang B, Vijay-Kumar M, Jones D, Gewirtz AT, Srinivasan S. Western diet induces colonic nitroergic myenteric neuropathy and dysmotility in mice via saturated fatty acid- and lipopolysaccharide-induced TLR4 signalling. *J Physiol*. 2017 Mar 1;595(5):1831-1846. doi: 10.1113/JP273269.
- Richter M, Vidovic N, Biber K, Dolga A, Culmsee C, Dodel R. The neuroprotective role of microglial cells against amyloid beta-mediated toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Pathol*. 2020 May;30(3):589-602. doi: 10.1111/bpa.12807.
- Ritzel RM, Patel AR, Pan S, Crapser J, Hammond M, Jellison E, McCullough LD. Age- and location-related changes in microglial function. *Neurobiol Aging*. 2015 Jun;36(6):2153-63. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.02.016.
- Robbins M, Clayton E, Kaminski Schierle GS. Synaptic tau: A pathological or physiological phenomenon? *Acta Neuropathol Commun*. 2021 Sep 9;9(1):149. doi: 10.1186/s40478-021-01246-y.
- Robert J, Button EB, Yuen B, Gilmour M, Kang K, Bahrabadi A, Stukas S, Zhao W, Kulic I, Wellington CL. Clearance of beta-amyloid is facilitated by apolipoprotein E and circulating high-density lipoproteins in bioengineered human vessels. *Elife*. 2017 Oct 10;6:e29595. doi: 10.7554/eLife.29595.
- Rocha DM, Caldas AP, Oliveira LL, Bressan J, Hermsdorff HH. Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. *Atherosclerosis*. 2016 Jan;244:211-5. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.11.015.
- Roda AR, Serra-Mir G, Montoliu-Gaya L, Tiessler L, Villegas S. Amyloid-beta peptide and tau protein crosstalk in Alzheimer's disease. *Neural Regen Res*. 2022 Aug;17(8):1666-1674. doi: 10.4103/1673-5374.332127.
- Rodríguez E, Mateo I, Infante J, Llorca J, Berciano J, Combarros O. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) polymorphism modifies the Alzheimer's disease risk associated with APOE epsilon4 allele. *J Neurol*. 2006 Feb;253(2):181-5. doi: 10.1007/s00415-005-0945-2.
- Rogero MM, Calder PC. Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. *Nutrients*. 2018 Mar 30;10(4):432. doi: 10.3390/nu10040432. PMID: 29601492; PMCID: PMC5946217.
- Rojas-Gutierrez E, Muñoz-Arenas G, Treviño S, Espinosa B, Chavez R, Rojas K, Flores G, Díaz A, Guevara J. Alzheimer's disease and metabolic syndrome: A link from oxidative stress and inflammation to neurodegeneration. *Synapse*. 2017 Oct;71(10):e21990. doi: 10.1002/syn.21990.
- Rosqvist F, Kullberg J, Ståhlman M, Cedernaes J, Heurling K, Johansson HE, Iggman D, Wilking H, Larsson A, Eriksson O, Johansson L, Straniero S, Rudling M, Antoni G, Lubberink M, Orho-Melander M, Borén J, Ahlström H, Risérus U. Overeating Saturated Fat Promotes Fatty Liver and Ceramides

Bibliografia

Compared With Polyunsaturated Fat: A Randomized Trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019 Dec 1;104(12):6207-6219. doi: 10.1210/jc.2019-00160.

Roubaud Baudron C, Letenneur L, Langlais A, Buissonnière A, Mégraud F, Dartigues JF, Salles N; Personnes Agées QUID Study. Does *Helicobacter pylori* infection increase incidence of dementia? The Personnes Agées QUID Study. *J Am Geriatr Soc.* 2013 Jan;61(1):74-8. doi: 10.1111/jgs.12065.

Rudge JD. A New Hypothesis for Alzheimer's Disease: The Lipid Invasion Model. *J Alzheimers Dis Rep.* 2022 Mar 25;6(1):129-161. doi: 10.3233/ADR-210299.

Rutkowsky JM, Lee LL, Puchowicz M, Golub MS, Befroy DE, Wilson DW, Anderson S, Cline G, Bini J, Borkowski K, Knotts TA, Rutledge JC; Mouse Metabolic Phenotyping Center Imaging Working Group. Reduced cognitive function, increased blood-brain-barrier transport and inflammatory responses, and altered brain metabolites in LDLr ^{-/-} and C57BL/6 mice fed a western diet. *PLoS One.* 2018 Feb 14;13(2):e0191909. doi: 10.1371/journal.pone.0191909.

Sagare A, Deane R, Bell RD, Johnson B, Hamm K, Pendu R, Marky A, Lenting PJ, Wu Z, Zarcone T, Goate A, Mayo K, Perlmutter D, Coma M, Zhong Z, Zlokovic BV. Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors. *Nat Med.* 2007 Sep;13(9):1029-31. doi: 10.1038/nm1635. Epub 2007 Aug 12.

Saha M, Manna K, Das Saha K. Melatonin Suppresses NLRP3 Inflammasome Activation via TLR4/NF- κ B and P2X7R Signaling in High-Fat Diet-Induced Murine NASH Model. *J Inflamm Res.* 2022 May 31;15:3235-3258. doi: 10.2147/JIR.S343236.

Saint-Pol J, Gosselet F, Duban-Deweere S, Pottiez G, Karamanos Y. Targeting and Crossing the Blood-Brain Barrier with Extracellular Vesicles. *Cells.* 2020 Apr 1;9(4):851. doi: 10.3390/cells9040851.

Salameh TS, Mortell WG, Logsdon AF, Butterfield DA, Banks WA. Disruption of the hippocampal and hypothalamic blood-brain barrier in a diet-induced obese model of type II diabetes: prevention and treatment by the mitochondrial carbonic anhydrase inhibitor, topiramate. *Fluids Barriers CNS.* 2019 Jan 8;16(1):1. doi: 10.1186/s12987-018-0121-6.

Salter MW, Stevens B. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med.* 2017 Sep 8;23(9):1018-1027. doi: 10.1038/nm.4397.

Sasaguri H, Nilsson P, Hashimoto S, Nagata K, Saito T, De Strooper B, Hardy J, Vassar R, Winblad B, Saido TC. APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *EMBO J.* 2017 Sep 1;36(17):2473-2487. doi: 10.15252/embj.201797397.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012 Jul;9(7):671-5. doi: 10.1038/nmeth.2089. PMID: 22930834; PMCID: PMC5554542.

Schreurs MP, Hubel CA, Bernstein IM, Jeyabalan A, Cipolla MJ. Increased oxidized low-density lipoprotein causes blood-brain barrier disruption in early-onset preeclampsia through LOX-1. *FASEB J.* 2013 Mar;27(3):1254-63. doi: 10.1096/fj.12-222216.

Schwabe T, Srinivasan K, Rhinn H. Shifting paradigms: The central role of microglia in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 2020 Sep;143:104962. doi: 10.1016/j.nbd.2020.104962.

Bibliografia

Schwartzentruber J, Cooper S, Liu JZ, Barrio-Hernandez I, Bello E, Kumasaka N, Young AMH, Franklin RJM, Johnson T, Estrada K, Gaffney DJ, Beltrao P, Bassett A. Genome-wide meta-analysis, fine-mapping and integrative prioritization implicate new Alzheimer's disease risk genes. *Nat Genet.* 2021 Mar;53(3):392-402. doi: 10.1038/s41588-020-00776-w. Erratum in: *Nat Genet.* 2021 Feb 26.

Shao CY, Mirra SS, Sait HB, Sacktor TC, Sigurdsson EM. Postsynaptic degeneration as revealed by PSD-95 reduction occurs after advanced A β and tau pathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2011 Sep;122(3):285-92. doi: 10.1007/s00401-011-0843-x.

Sharma VK, Mehta V, Singh TG. Alzheimer's Disorder: Epigenetic Connection and Associated Risk Factors. *Curr Neuropharmacol.* 2020;18(8):740-753. doi: 10.2174/1570159X18666200128125641.

Shefer G, Marcus Y, Stern N. Is obesity a brain disease? *Neurosci Biobehav Rev.* 2013 Dec;37(10 Pt 2):2489-503. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.07.015.

Sheng JG, Bora SH, Xu G, Borchelt DR, Price DL, Koliatsos VE. Lipopolysaccharide-induced-neuroinflammation increases intracellular accumulation of amyloid precursor protein and amyloid beta peptide in APP^{sw} transgenic mice. *Neurobiol Dis.* 2003 Oct;14(1):133-45. doi: 10.1016/s0969-9961(03)00069-x.

Shukla AK, McIntyre LL, Marsh SE, Schneider CA, Hoover EM, Walsh CM, Lodoen MB, Blurton-Jones M, Inlay MA. CD11a expression distinguishes infiltrating myeloid cells from plaque-associated microglia in Alzheimer's disease. *Glia.* 2019 May;67(5):844-856. doi: 10.1002/glia.23575.

Sidoryk-Wegrzynowicz M, Wegrzynowicz M, Lee E, Bowman AB, Aschner M. Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicol Pathol.* 2011 Jan;39(1):115-23. doi: 10.1177/0192623310385254.

Silva I, Silva J, Ferreira R, Trigo D. Glymphatic system, AQP4, and their implications in Alzheimer's disease. *Neurol Res Pract.* 2021 Jan 19;3(1):5. doi: 10.1186/s42466-021-00102-7.

Skrzypczak-Wierciach A, Sałat K. Lipopolysaccharide-Induced Model of Neuroinflammation: Mechanisms of Action, Research Application and Future Directions for Its Use. *Molecules.* 2022 Aug 26;27(17):5481. doi: 10.3390/molecules27175481.

Small SA, Duff K. Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron.* 2008 Nov 26;60(4):534-42. doi: 10.1016/j.neuron.2008.11.007.

Spagnuolo MS, Pallottini V, Mazzoli A, Iannotta L, Tonini C, Morone B, Ståhlman M, Crescenzo R, Strazzullo M, Iossa S, Cigliano L. A Short-Term Western Diet Impairs Cholesterol Homeostasis and Key Players of Beta Amyloid Metabolism in Brain of Middle Aged Rats. *Mol Nutr Food Res.* 2020 Aug;64(16):e2000541. doi: 10.1002/mnfr.202000541. Epub 2020 Jul 20. PMID: 32579784.

Španić E, Langer Horvat L, Hof PR, Šimić G. Role of Microglial Cells in Alzheimer's Disease Tau Propagation. *Front Aging Neurosci.* 2019 Oct 4;11:271. doi: 10.3389/fnagi.2019.00271.

Sparkman NL, Buchanan JB, Heyen JR, Chen J, Beverly JL, Johnson RW. Interleukin-6 facilitates lipopolysaccharide-induced disruption in working memory and expression of other proinflammatory cytokines in hippocampal neuronal cell layers. *J Neurosci.* 2006 Oct 18;26(42):10709-16. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3376-06.2006.

Bibliografia

Sparkman NL, Martin LA, Calvert WS, Boehm GW. Effects of intraperitoneal lipopolysaccharide on Morris maze performance in year-old and 2-month-old female C57BL/6J mice. *Behav Brain Res.* 2005 Apr 15;159(1):145-51. doi: 10.1016/j.bbr.2004.10.011.[AWG4]

Staurengi E, Cerrato V, Gamba P, Testa G, Giannelli S, Leoni V, Caccia C, Buffo A, Noble W, Perez-Nievas BG, Leonarduzzi G. Oxysterols present in Alzheimer's disease brain induce synaptotoxicity by activating astrocytes: A major role for lipocalin-2. *Redox Biol.* 2021 Feb;39:101837. doi: 10.1016/j.redox.2020.101837.

Stevenson RJ, Francis HM, Attuquayefio T, Gupta D, Yeomans MR, Oaten MJ, Davidson T. Hippocampal-dependent appetitive control is impaired by experimental exposure to a Western-style diet. *R Soc Open Sci.* 2020 Feb 19;7(2):191338. doi: 10.1098/rsos.191338.

Stewart KL, Radford SE. Amyloid plaques beyond A β : a survey of the diverse modulators of amyloid aggregation. *Biophys Rev.* 2017 Aug;9(4):405-419. doi: 10.1007/s12551-017-0271-9. Epub 2017 Jun 19.

Streit WJ, Khoshbouei H, Bechmann I. Dystrophic microglia in late-onset Alzheimer's disease. *Glia.* 2020 Apr;68(4):845-854. doi: 10.1002/glia.23782.

Subbarayan MS, Joly-Amado A, Bickford PC, Nash KR. CX3CL1/CX3CR1 signaling targets for the treatment of neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther.* 2022 Mar;231:107989. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107989.

Sun H, Sun Z, Varghese Z, Guo Y, Moorhead JF, Unwin RJ, Ruan XZ. Nonesterified free fatty acids enhance the inflammatory response in renal tubules by inducing extracellular ATP release. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2020 Aug 1;319(2):F292-F303. doi: 10.1152/ajprenal.00098.2020.

Sun Z, Wang ZT, Sun FR, Shen XN, Xu W, Ma YH, Dong Q, Tan L, Yu JT; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Late-life obesity is a protective factor for prodromal Alzheimer's disease: a longitudinal study. *Aging (Albany NY).* 2020 Jan 25;12(2):2005-2017. doi: 10.18632/aging.102738.

Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol.* 2018 Mar;14(3):133-150. doi: 10.1038/nrneurol.2017.188. Epub 2018 Jan 29.

Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, Nelson AR, Zlokovic BV. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev.* 2019 Jan 1;99(1):21-78. doi: 10.1152/physrev.00050.2017.

Sytuacja demograficzna Polski do roku 2021 ; Data publikacji: 30.11.2022

Szczechowiak K, Diniz BS, Leszek J. Diet and Alzheimer's dementia - Nutritional approach to modulate inflammation. *Pharmacol Biochem Behav.* 2019 Sep;184:172743. doi: 10.1016/j.pbb.2019.172743.

Talukdar S, Oh DY, Bandyopadhyay G, Li D, Xu J, McNelis J, Lu M, Li P, Yan Q, Zhu Y, Ofrecio J, Lin M, Brenner MB, Olefsky JM. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat Med.* 2012 Sep;18(9):1407-12. doi: 10.1038/nm.2885.

Tamaki C, Ohtsuki S, Terasaki T. Insulin facilitates the hepatic clearance of plasma amyloid beta-peptide (1-40) by intracellular translocation of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-

Bibliografia

1) to the plasma membrane in hepatocytes. *Mol Pharmacol.* 2007 Oct;72(4):850-5. doi: 10.1124/mol.107.036913.

Tamaki C, Ohtsuki S, Iwatsubo T, Hashimoto T, Yamada K, Yabuki C, Terasaki T. Major involvement of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in the clearance of plasma free amyloid beta-peptide by the liver. *Pharm Res.* 2006 Jul;23(7):1407-16. doi: 10.1007/s11095-006-0208-7.

Testa G, Staurenghi E, Zerbinati C, Gargiulo S, Iuliano L, Giaccone G, Fantò F, Poli G, Leonarduzzi G, Gamba P. Changes in brain oxysterols at different stages of Alzheimer's disease: Their involvement in neuroinflammation. *Redox Biol.* 2016 Dec;10:24-33. doi: 10.1016/j.redox.2016.09.001. Epub 2016 Sep 16.

Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology.* 2002 Jun 25;58(12):1791-800. doi: 10.1212/wnl.58.12.1791.

Tojima H, Kakizaki S, Kosone T, Horiguchi N, Yamazaki Y, Sato K, Takagi H, Mori M. Hepatocyte growth factor overexpression ameliorates liver inflammation and fibrosis in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology Int.* 2012 Jun;6(3):620-30. doi: 10.1007/s12072-011-9301-z.

Tolar M, Hey J, Power A, Abushakra S. Neurotoxic Soluble Amyloid Oligomers Drive Alzheimer's Pathogenesis and Represent a Clinically Validated Target for Slowing Disease Progression. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 14;22(12):6355. doi: 10.3390/ijms22126355.

Umeda T, Tomiyama T, Kitajima E, Idomoto T, Nomura S, Lambert MP, Klein WL, Mori H. Hypercholesterolemia accelerates intraneuronal accumulation of A β oligomers resulting in memory impairment in Alzheimer's disease model mice. *Life Sci.* 2012 Dec 10;91(23-24):1169-76. doi: 10.1016/j.lfs.2011.12.022.

Van Dyken P, Lacoste B. Impact of Metabolic Syndrome on Neuroinflammation and the Blood-Brain Barrier. *Front Neurosci.* 2018 Dec 11;12:930. doi: 10.3389/fnins.2018.00930.

van Herpen NA, Schrauwen-Hinderling VB. Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. *Physiol Behav.* 2008 May 23;94(2):231-41. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.11.049. Epub 2007 Dec 5.

Vance DE, Vance JE. *Biochemistry of lipids, lipoproteins, and membranes*, Elsevier 2008.

Vance JE. Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Dis Model Mech.* 2012 Nov;5(6):746-55. doi: 10.1242/dmm.010124.

Vandal M, White PJ, Tremblay C, St-Amour I, Chevrier G, Emond V, Lefrançois D, Virgili J, Planel E, Giguere Y, Marette A, Calon F. Insulin reverses the high-fat diet-induced increase in brain A β and improves memory in an animal model of Alzheimer disease. *Diabetes.* 2014 Dec;63(12):4291-301. doi: 10.2337/db14-0375.

Verkhatsky A, Arranz AM, Ciuba K, Pękowska A. Evolution of neuroglia. *Ann N Y Acad Sci.* 2022 Dec;1518(1):120-130. doi: 10.1111/nyas.14917.

Vogels T, Murgoci AN, Hromádka T. Intersection of pathological tau and microglia at the synapse. *Acta Neuropathol Commun.* 2019 Jul 5;7(1):109. doi: 10.1186/s40478-019-0754-y.

Bibliografia

Wade NJ. Alzheimer's memory. Perception. 2007;36(8):1111-4. doi: 10.1068/p3608ed.

Walker DG, Lue LF. Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. Alzheimers Res Ther. 2015 Aug 19;7(1):56. doi: 10.1186/s13195-015-0139-9.

Walsh DM, Selkoe DJ. Amyloid β -protein and beyond: the path forward in Alzheimer's disease. Curr Opin Neurobiol. 2020 Apr;61:116-124. doi: 10.1016/j.conb.2020.02.003.

Wang LM, Wu Q, Kirk RA, Horn KP, Ebada Salem AH, Hoffman JM, Yap JT, Sonnen JA, Towner RA, Bozza FA, Rodrigues RS, Morton KA. Lipopolysaccharide endotoxemia induces amyloid- β and p-tau formation in the rat brain. Am J Nucl Med Mol Imaging. 2018 Apr 25;8(2):86-99.

Wang SW, Wang M, Grossman BM, Martin RJ. Effects of dietary fat on food intake and brain uptake and oxidation of fatty acids. Physiol Behav. 1994 Sep;56(3):517-22. doi: 10.1016/0031-9384(94)90295-x.

Wang YR, Wang QH, Zhang T, Liu YH, Yao XQ, Zeng F, Li J, Zhou FY, Wang L, Yan JC, Zhou HD, Wang YJ. Associations Between Hepatic Functions and Plasma Amyloid-Beta Levels-Implications for the Capacity of Liver in Peripheral Amyloid-Beta Clearance. Mol Neurobiol. 2017 Apr;54(3):2338-2344. doi: 10.1007/s12035-016-9826-1.

Wang Z, Liu D, Wang F, Liu S, Zhao S, Ling EA, Hao A. Saturated fatty acids activate microglia via Toll-like receptor 4/NF- κ B signalling. Br J Nutr. 2012 Jan;107(2):229-41. doi: 10.1017/S0007114511002868.

Wenk GL. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease: potential targets for treatment. J Clin Psychiatry. 2006;67 Suppl 3:3-7; quiz 23.

Wharton SB, O'Callaghan JP, Savva GM, Nicoll JA, Matthews F, Simpson JE, Forster G, Shaw PJ, Brayne C, Ince PG; MRC Cognitive Function and Ageing Neuropathology Study Group. Population variation in glial fibrillary acidic protein levels in brain ageing: relationship to Alzheimer-type pathology and dementia. Dement Geriatr Cogn Disord. 2009;27(5):465-73. doi: 10.1159/000217729.

WHO Global status report, 2021, <https://www.alzint.org/about/dementia-facts-figures/dementia-statistics/>

Wierucki Ł, Kujawska-Danecka H, Mossakowska M, Grodzicki T, Błędowski P, Chudek J, Kostka T, Więcek A, Hajduk A, Bandosz P, Zagożdżon P, Wojtyniak B, Zdrojewski T. Health status and its socio-economic covariates in the older population in Poland - the assumptions and methods of the nationwide, cross-sectional PolSenior2 survey. Arch Med Sci. 2020 Nov 13;18(1):92-102. doi: 10.5114/aoms.2020.100898. PMID: 35154530; PMCID: PMC8826695.

Więckowska-Gacek A, Mietelska-Porowska A, Wydrych M, Wojda U. Western diet as a trigger of Alzheimer's disease: From metabolic syndrome and systemic inflammation to neuroinflammation and neurodegeneration. Ageing Res Rev. 2021 Sep;70:101397. doi: 10.1016/j.arr.2021.101397.

Wijenayake S, Rahman MF, Lum CMW, De Vega WC, Sasaki A, McGowan PO. Maternal high-fat diet induces sex-specific changes to glucocorticoid and inflammatory signaling in response to corticosterone

Bibliografia

and lipopolysaccharide challenge in adult rat offspring. *J Neuroinflammation*. 2020 Apr 15;17(1):116. doi: 10.1186/s12974-020-01798-1.

Wilson CA, Bekele G, Nicolson M, Ravussin E, Pratley RE. Relationship of the white blood cell count to body fat: role of leptin. *Br J Haematol*. 1997 Nov;99(2):447-51. doi: 10.1046/j.1365-2141.1997.3873201.x.

Wong MY, Lewis M, Doherty JJ, Shi Y, Cashikar AG, Amelianchik A, Tymchuk S, Sullivan PM, Qian M, Covey DF, Petsko GA, Holtzman DM, Paul SM, Luo W. 25-Hydroxycholesterol amplifies microglial IL-1 β production in an apoE isoform-dependent manner. *J Neuroinflammation*. 2020 Jun 17;17(1):192. doi: 10.1186/s12974-020-01869-3.

Xiong H, Callaghan D, Jones A, Walker DG, Lue LF, Beach TG, Sue LI, Woulfe J, Xu H, Stanimirovic DB, Zhang W. Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and A β production. *Neurobiol Dis*. 2008 Mar;29(3):422-37. doi: 10.1016/j.nbd.2007.10.005.

Xiu J, Nordberg A, Qi X, Guan ZZ. Influence of cholesterol and lovastatin on alpha-form of secreted amyloid precursor protein and expression of alpha7 nicotinic receptor on astrocytes. *Neurochem Int*. 2006 Oct;49(5):459-65. doi: 10.1016/j.neuint.2006.03.007.

Xu W, Fang F, Ding J, Wu C. Dysregulation of Rab5-mediated endocytic pathways in Alzheimer's disease. *Traffic*. 2018 Apr;19(4):253-262. doi: 10.1111/tra.12547.

Xu R, Huang H, Zhang Z, Wang FS. The role of neutrophils in the development of liver diseases. *Cell Mol Immunol*. 2014 May;11(3):224-31. doi: 10.1038/cmi.2014.2.

Xu W, Liu J, Ma D, Yuan G, Lu Y, Yang Y. Capsaicin reduces Alzheimer-associated tau changes in the hippocampus of type 2 diabetes rats. *PLoS One*. 2017 Feb 22;12(2):e0172477. doi: 10.1371/journal.pone.0172477.

Xue-Shan Z, Juan P, Qi W, Zhong R, Li-Hong P, Zhi-Han T, Zhi-Sheng J, Gui-Xue W, Lu-Shan L. Imbalanced cholesterol metabolism in Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta*. 2016 May 1;456:107-114. doi: 10.1016/j.cca.2016.02.024.

Yang J, Wise L, Fukuchi KI. TLR4 Cross-Talk With NLRP3 Inflammasome and Complement Signaling Pathways in Alzheimer's Disease. *Front Immunol*. 2020a Apr 23;11:724. doi: 10.3389/fimmu.2020.00724.

Yang L, Zhou R, Tong Y, Chen P, Shen Y, Miao S, Liu X. Neuroprotection by dihydrotestosterone in LPS-induced neuroinflammation. *Neurobiol Dis*. 2020b Jul;140:104814. doi: 10.1016/j.nbd.2020.104814.

Yang P, Wang Y, Tang W, Sun W, Ma Y, Lin S, Jing J, Jiang L, Shi H, Song Z, Yu L. Western diet induces severe nonalcoholic steatohepatitis, ductular reaction, and hepatic fibrosis in liver CGI-58 knockout mice. *Sci Rep*. 2020c Mar 13;10(1):4701. doi: 10.1038/s41598-020-61473-6.

Yassine HN, Finch CE. *APOE* Alleles and Diet in Brain Aging and Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2020 Jun 10;12:150. doi: 10.3389/fnagi.2020.00150.

Bibliografia

Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang SM, Iwata N, Saido TC, Maeda J, Suhara T, Trojanowski JQ, Lee VM. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron*. 2007 Feb 1;53(3):337-51. doi: 10.1016/j.neuron.2007.01.010.

Yuan P, Condello C, Keene CD, Wang Y, Bird TD, Paul SM, Luo W, Colonna M, Baddeley D, Grutzendler J. TREM2 Haplodeficiency in Mice and Humans Impairs the Microglia Barrier Function Leading to Decreased Amyloid Compaction and Severe Axonal Dystrophy. *Neuron*. 2016 May 18;90(4):724-39. doi: 10.1016/j.neuron.2016.05.003.

Yuan C, Aierken A, Xie Z, Li N, Zhao J, Qing H. The age-related microglial transformation in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiol Aging*. 2020 Aug;92:82-91. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2020.03.024.

Zatterale F, Longo M, Naderi J, Raciti GA, Desiderio A, Miele C, Beguinot F. Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Front Physiol*. 2020 Jan 29;10:1607. doi: 10.3389/fphys.2019.01607.

Zhan X, Stamova B, Jin LW, DeCarli C, Phinney B, Sharp FR. Gram-negative bacterial molecules associate with Alzheimer disease pathology. *Neurology*. 2016 Nov 29;87(22):2324-2332. doi: 10.1212/WNL.0000000000003391.

Zhan X, Stamova B, Sharp FR. Lipopolysaccharide Associates with Amyloid Plaques, Neurons and Oligodendrocytes in Alzheimer's Disease Brain: A Review. *Front Aging Neurosci*. 2018 Feb 22;10:42. doi: 10.3389/fnagi.2018.00042.

Zhang J, Liu Q. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell*. 2015 Apr;6(4):254-64. doi: 10.1007/s13238-014-0131-3.

Zhang, X., Lv, C., An, Y., Liu, Q., Rong, H., Tao, L., et al. (2018). Increased Levels of 27-Hydroxycholesterol Induced by Dietary Cholesterol in Brain Contribute to Learning and Memory Impairment in Rats. *Mol. Nutr. Food Res*. 62:1700531. doi:10.1002/mnfr.201700531.

Zhao Y, Jaber VR, Pogue AI, Sharfman NM, Taylor C, Lukiw WJ. Lipopolysaccharides (LPSs) as Potent Neurotoxic Glycolipids in Alzheimer's Disease (AD). *Int J Mol Sci*. 2022 Oct 21;23(20):12671. doi: 10.3390/ijms232012671.

Zhou H, Urso CJ, Jadeja V. Saturated Fatty Acids in Obesity-Associated Inflammation. *J Inflamm Res*. 2020 Jan 6;13:1-14. doi: 10.2147/JIR.S229691.

Zotova E, Bharambe V, Cheaveau M, Morgan W, Holmes C, Harris S, Neal JW, Love S, Nicoll JA, Boche D. Inflammatory components in human Alzheimer's disease and after active amyloid- β 42 immunization. *Brain*. 2013 Sep;136(Pt 9):2677-96. doi: 10.1093/brain/awt210.

Zott B, Simon MM, Hong W, Unger F, Chen-Engerer HJ, Frosch MP, Sakmann B, Walsh DM, Konnerth A. A vicious cycle of β amyloid-dependent neuronal hyperactivation. *Science*. 2019 Aug 9;365(6453):559-565. doi: 10.1126/science.aay0198.

8. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

1. **Więckowska-Gacek A**, Mietelska-Porowska A, Wydrych M, Wojda U (2021). *Western diet as a trigger of Alzheimer's disease: From metabolic syndrome and systemic inflammation to neuroinflammation and neurodegeneration*. Ageing Res Rev. 2021 Sep;70:101397. doi: 10.1016/j.arr.2021.101397.

Impact Factor = 10,616

2. **Więckowska-Gacek A**, Mietelska-Porowska A, Chutorański D, Wydrych M, Długosz J, Wojda U (2021). *Western Diet Induces Impairment of Liver-Brain Axis Accelerating Neuroinflammation and Amyloid Pathology in Alzheimer's Disease*. Front Aging Neurosci. 2021 Apr 1;13:654509. doi: 10.3389/fnagi.2021.654509.

Impact Factor = 5,750

9. Publikacje dodatkowe

1. Mietelska-Porowska A, Domańska J, Want A, **Więckowska-Gacek A**, Chutorański D, Koperski M, Wojda U (2022). *Induction of Brain Insulin Resistance and Alzheimer's Molecular Changes by Western Diet*. Int J Mol Sci. 2022 Apr 25;23(9):4744. doi: 10.3390/ijms23094744.

Impact Factor = 5,924

2. Płatek R, Grycz K, **Więckowska A**, Czarkowska-Bauch J, Skup M (2020). *L1 Cell Adhesion Molecule Overexpression Down Regulates Phosphacan and Up Regulates Structural Plasticity-Related Genes Rostral and Caudal to the Complete Spinal Cord Transection*. J Neurotrauma. 2020;37(3):534-554. doi:10.1089/neu.2018.6103.

Impact Factor = 5,269

3. **Więckowska A**, Gajewska-Woźniak O, Głowacka A, Ji B, Grycz K, Czarkowska-Bauch J, Skup M (2018). *Spinalization and locomotor training differentially affect muscarinic acetylcholine receptor type 2 abutting on α -motoneurons innervating the ankle extensor and flexor muscles*. J Neurochem. 2018 Aug 13. doi: 10.1111/jnc.14567.

Impact Factor = 4,066