

**PARODONTIITIN YHTEYS ALZHEIMERIN TAUTIIN – NYKYKÄSITYS
PATOGENEESIMEKANISMIIEN VÄLISESTÄ YHTEYDESTÄ**

Määttä, Anni
Syventävien opintojen tutkielma
Hammaslääketieteen tutkinto-ohjelma
Lääketieteellinen tiedekunta
Oulun yliopisto
Huhtikuu 2024
Prof. Pekka Ylöstalo

OULUN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

Hammaslääketieteen tutkinto-ohjelma

TIIVISTELMÄ

Määttä, Anni: Parodontiitin yhteys Alzheimerin tautiin – nykykäsitys

patogeneesimekanismien välisestä yhteydestä

Syventävien opintojen tutkielma: 65 sivua, ei liitteitä

Alzheimerin tauti on etenevä aivojen neuroinflammatorinen ja neurodegeneratiivinen sairaus, jonka histopatologiaa leimaavat intrasellulaariset beeta-amyloidin (A β) kertymät ja hyperfosforyloituneen tau-proteiinin (pTau) aggregaation seurauksena muodostuneet neurofibrillikimput (NFT). Parodontiitti on etiologialtaan mikrobialinen hampaan kiinnityskudosten krooninen tulehdussairaus, joka johtaa pitkittyessään hampaan kiinnityskudosten tuhoutumiseen. Molemmat sairaudet ovat globaalisti merkittäviä pitkäaikaissairauksia aikuisväestössä.

Parodontiitin ja Alzheimerin taudin patogeneesissä yhdistävänä tekijänä toimii tulehdus. Tämä yhteys on herättänyt tutkimuspiireissä kiinnostuksen selvittää parodontiitin patogeneesiin liittyvien tekijöiden yhteyttä Alzheimerin taudin syntyyn. Tarkat solu- ja molekyyli-tason mekanismit, joiden välityksellä tulehdustekijät ja parodontopatogeenit kulkeutuvat ja välittävät vaikutuksensa suun ja aivojen välillä ovat kuitenkin nykytieteelle vielä epäselviä. Parodontopatogeenien ja niiden metaboliatuotteiden sekä parodontiumista lähtöisin olevien tulehdusvälittäjäaineiden uskotaan kuitenkin verenkiertoon tunkeutuessaan aiheuttavan systeemisen tulehdustilan, jolla uskotaan olevan negatiivinen vaikutus aivojen toimintaan.

Tämä syventävien opintojen tutkielma toteutettiin systemaattisena kirjallisuuskatsauksena. Lähdeaineisto koottiin PubMed- ja Scopus-tietokannoista valikoiduista tutkimusviitteistä, jotka käsittelevät parodontiitin ja Alzheimerin taudin patogeneesien välistä yhteyttä. Tarkoituksena on tutkimusnäytön pohjalta esitellä niitä solu- ja molekyyli-tason tapahtumia ja mekanismeja, jotka puoltavat parodontiitin ja Alzheimerin taudin välistä yhteyttä. Tarkoituksena on erityisesti esitellä mekanismeja, joilla keskeinen parodontopatogeeni *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) mahdollisesti myötävaikuttaa neuroinflammaation syntyyn, vaikuttaa veri-aivoesteeseen ja kulkeutuu aivoihin.

Tutkimusten tulokset osoittivat, että *P. gingivaliksella* ja sen metaboliatuotteilla on kyky penetroitua veri-aivoesteen läpi ja infektoida aivokudosta. *P. gingivalis*-infektion ja bakteremian havaittiin olevan yhteydessä aivokudoksen patologiisiin prosesseihin: mikrogliaosiin, astrogliaosiin, komplementtijärjestelmän aktivaatioon, tulehdusta indusoivien signaalintireittien aktivaation sekä A β - ja pTau-assosioituun neuroinflammaatioon ja neurodegeneraatioon.

Tutkimusnäyttö tukee hypoteesia, että suu-aivoakselilla on merkitys Alzheimerin taudin patogeneesissä. Tulevaisuudessa parodontiitin varhaisdiagnostiikalla, hoidolla, potilaan tehokkaalla omahoidon ohjauksella ja hyvien suunhoitotottumusten omaksumisella voi olla entistä painavampi rooli osana ihmisen kokonaisvaltaista terveyttä myös muistisairauksien ehkäisyosalta.

Avainsanat: Alzheimerin tauti, parodontiitti, *Porphyromonas gingivalis*, tulehdus, veri-aivoeste

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ.....	2
SISÄLLYSLUETTELO	3
1. JOHDANTO	4
1.1 Tutkimuksen taustaa	4
2. TUTKIMUSAINEISTO JA TUTKIMUSMENETELMÄT	6
2.1 Tutkimusmenetelmä.....	6
2.1 Aineiston kokoaminen	6
2.3. Aineiston rajaaminen ja tiedonkeruu	6
3. PARODONTIITTI	9
3.1 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	10
4. ALZHEIMERIN TAUTI.....	13
4.1 Beeta-amyloidi (A β)	13
4.2 Neurofibrillikimput	14
4.3 Mikroglia-solut.....	15
5. VERI-AIVOESTE	17
6. PARODONTIITIN JA ALZHEIMERIN TAUDIN PATOGENEESIMEKANISMIEN VÄLINEN YHTEYS.....	18
6.1 Tutkimuksia, joissa havaittu yhteys parodontiitin ja heikentyneen kognition välillä	18
6.2 Ihmiskokeita, joissa havaittu mekanistinen yhteys parodontiitin ja heikentyneen kognition välillä	23
6.3 Eläinkokeita, joissa havaittu mekanistinen yhteys <i>P. gingivaliksen</i> ja heikentyneen kognition välillä	29
6.4 In vitro-kokeet, joissa havaittu mekanistinen yhteys <i>P. gingivaliksen</i> ja heikentyneen kognition välillä	40
6.5 Tutkimuksia, joissa havaittu mekanistinen yhteys <i>P. gingivaliksen</i> ja veri-aivoesteen läpäisevyyden välillä.....	52
6. POHDINTA.....	59
LÄHDELUETTELO	62

1. JOHDANTO

1.1 Tutkimuksen taustaa

Parodontiitti eli hampaan kiinnityskudosten sairaus ja yleisin neurodegeneraatiotauti eli Alzheimerin tauti ovat molemmat globaalisti merkittäviä kansantauteja (Liccardo ym. 2020). Vaikka Alzheimerin taudin patogeneesiä on tutkittu runsaasti, taudin etiologia on nykytieteelle vielä tuntematon (Liccardo ym. 2020, Rinne & Scheinin 2018). Lääketiede ei toistaiseksi tunne myöskään Alzheimerin taudin etenemistä ehkäiseviä, hidastavia tai parantavia hoitokeinoja, vaikka taudin oireita kyetään jonkin verran lievittämään lääkehoidolla (Hakkola 2021, Liccardo ym. 2020). Alzheimerin taudin patofysiologiaa on kuitenkin tutkittu runsaasti, ja laaja-alaista neuronin- ja synapsikatoa, beeta-amyloidin ($A\beta$) kertymisen seurauksena muodostuneita ekstrasellulaarisia beeta-amyloidiplakkeja ja neuroneiden intrasellulaarisia neurofibrillikertymiä (NFT) aivokuoren ja hippokampuksen alueella pidetään histopatologisesti taudin tärkeimpinä muutoksina (Hakkola 2021, Rinne & Scheinin 2018). Etiologiaan ja patogeneesiin liittyvän aukkoisuuden takia tutkimuspiireissä on herännyt runsaasti kiinnostusta tunnistaa ja tutkia Alzheimerin taudin riskitekijöitä ja mekanismeja, jotka liittyvät Alzheimerin taudin kehitykseen ja etenemiseen (Liccardo ym. 2020).

Viime aikoina immuunijärjestelmän merkitys sairauksien synnyssä ja/tai etenemisessä on kasvanut koko lääketieteen laajuudella. Parodontiitin ja Alzheimerin taudin patogeneesissä yhdistävänä tekijänä toimii tulehdus (Liccardo ym. 2020). Tämä yhteys on herättänyt tutkimuspiireissä kiinnostuksen selvittää parodontiitin patogeneesiin liittyvien tekijöiden yhteyttä Alzheimerin taudin syntyyn ja etenemiseen (Liccardo ym. 2020).

Tarkat solu- ja molekyyli-tason mekanismit, joiden välityksellä parodontiumista lähtöisin olevat tulehdustekijät ja parodontopatogeenit kulkeutuvat ja välittävät vaikutuksensa suun ja aivojen välillä ovat kuitenkin nykytieteelle vielä epäselviä. Parodontopatogeenien ja niiden metaboliatuotteiden uskotaan kuitenkin verenkiertoon tunkeutuessaan aiheuttavan systeemisen tulehdustilan, jolla katsotaan olevan negatiivinen vaikutus aivojen toimintaan neuroinflammaation välityksellä. Tätä tukee vastikään tehdyt havainnot parodontopatogeenien ja niiden virulenssitekijöiden löydöksistä Alzheimerin tautia sairastavien potilaiden aivoissa. (Liccardo ym. 2020)

Parodontiittia voidaan hoitaa toisin kuin Alzheimerin tautia (Hakkola 2021). Siksi näiden sairauksien patogeneesimekanismien tarkempi selvittäminen ja ymmärtäminen tarjoaisivat keinon estää parodontiittiin liittyvän systeemisen inflammaation vaikutusta Alzheimerin tautiin. On mahdollista, että parodontiitti vaikuttaa Alzheimerin taudin kehittymiseen ja etenemiseen yhtenä osatekijänä taudin patogeneesissä.

Tämä syventävien opintojen tutkielma laadittiin systemaattisena kirjallisuuskatsauksena. Kirjallisuuskatsauksen aineisto koottiin PubMed- ja Scopus-tietokannoista valikoiduista tutkimusviitteistä, jotka käsittelevät parodontiitin ja Alzheimerin taudin patogeneesiin välistä yhteyttä. Tarkoituksena oli selvittää niitä solu- ja molekyyli-tason tapahtumia ja mekanismeja, joiden kautta parodontiitti voi vaikuttaa Alzheimerin taudin syntyyn tai etenemiseen.

Keskeiset tutkimusongelmat, joihin tämä kirjallisuuskatsaus pyrkii vastaamaan ovat: Minkälaisilla mekanismeilla keskeinen parodontopatogeeni *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) voi myötävaikuttaa neuroinflammaation syntyyn? Miten *P. gingivalis* ja sen virulenssitekijät vaikuttavat veri-aivoesteeseen ja kulkeutuvat aivoihin? Tarkoitus on myös pohtia ja koota päätelmät parodontiitin merkityksestä Alzheimerin taudin riskitekijänä ja ottaa kantaa yhteyden merkityksestä hammaslääkärin kliinisessä työssä. Tutkimuksen hypoteesi on, että *P. gingivalis* ja sen virulenssitekijät vaikuttavat Alzheimerin taudin syntyyn ja taudinkulkuun yhtenä patogeenisenä tekijänä muiden joukossa.

2. TUTKIMUSAINIESTO JA TUTKIMUSMENETELMÄT

2.1 Tutkimusmenetelmä

Tämä syventävien opintojen tutkielma toteutettiin systemaattisena kirjallisuuskatsauksena.

2.1 Aineiston kokoaminen

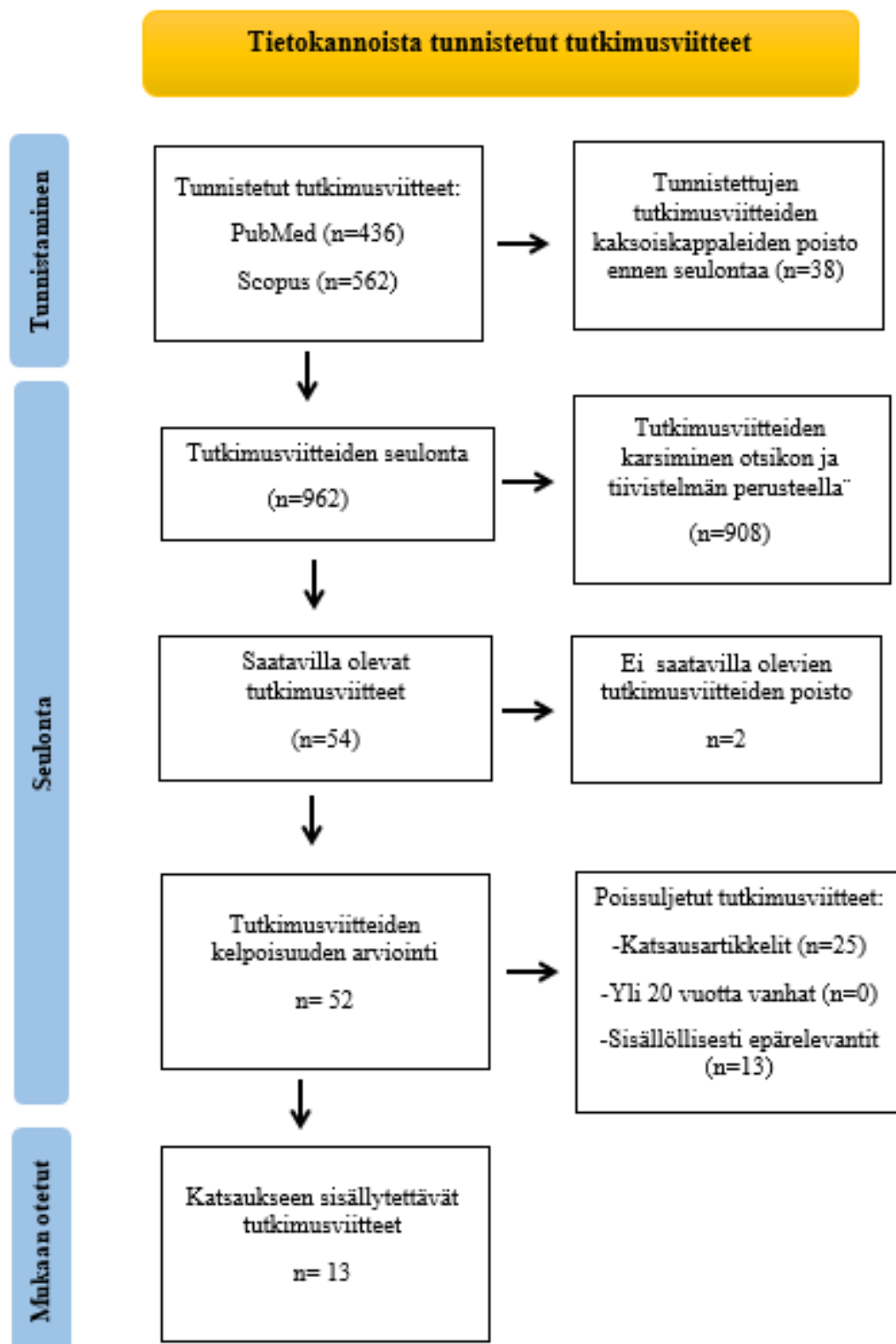
Tutkimusaineisto kerättiin kirjallisuushaulla englanninkielisistä PubMed- ja Scopus-tietokantojen artikkeleista tammikuussa 2023. PubMed-tietokannassa käytettiin seuraava hakulauseketta: ("Periodontitis"[Mesh] OR periodont*[tw]) AND ("Alzheimer Disease"[Mesh] OR Alzheimer*[tw] OR "Senile Dementia"[tw] OR "Presenile Dementia"[tw] OR "Senile Degenerative Dementia"[tw]). Scopus-tietokannassa oli puolestaan käytössä seuraava hakustrategia: (periodont*) AND (Alzheimer* OR "Senile Dementia" OR "Presenile Dementia" OR "Senile Degenerative Dementia").

2.3. Aineiston rajaaminen ja tiedonkeruu

PubMed- ja Scopus-tietokannoista valikoituneiden tutkimusviitteiden valintaan käytettiin Covidence-viitteidenhallintaohjelmaa. Kuviossa 1 on osoitettu katsaukseen sisällytettävien tutkimusviitteiden valintaprosessin eteneminen PRISMA-kaaviona. PRISMA-vuokaaviota hyödynnetään systemaattisen tiedonhaun dokumentaatiossa.

PubMed- ja Scopus-tietokannoista saatu tutkimusaineisto siirrettiin Covidence-ohjelmaan. Ohjelma poisti automaattisesti tietokantahakujen päällekkäiset tutkimusviitteet. Tämän jälkeen ohjelman avulla toteutettiin tutkimusviitteiden (n=962) seulonta. Seulonnan ensimmäisessä vaiheessa käytiin läpi jokainen jatkoon valikoitunut tutkimusviite otsikon ja tiivistelmän perusteella. Otsikon ja tiivistelmän perusteella päätettiin, onko viite tutkielman aiheen kannalta relevantti vai jätetäänkö se katsauksen ulkopuolelle. Seulonnan toisessa vaiheessa ensimmäisessä vaiheesta jatkoon valikoituneiden kohteiden joukosta karsittiin pois ei saatavilla olevat tutkimusviitteet. Kolmannessa vaiheessa tutkimusaineiston

ulkopuolelle jätettiin katsausartikkelit ja sellaiset tutkimusviitteet, jotka olivat julkaistu yli 20 vuotta sitten. Lisäksi tässä seulonnan vaiheessa katsaukseen sisällytettävien tutkimusten tuli käsitellä Alzheimerin taudin ja parodontiitin patogeenimekanismien välistä yhteyttä solu- ja molekyyli-tasolla. Aiheen tarkemmaksi rajaamiseksi alkuperäisestä tutkimussuunnitelmasta hieman poiketen mekanistista näyttöä tautien yhteydestä esittävien tutkimusten tuli myös liittyä *Porphyromonas gingivalis*-bakteeriin.



Kuvio 1. Muokattu PRISMA-kaavio tutkimusaineiston systemaattisen valinnan etenemisestä.

3. PARODONTIITTI

Parodontiitti on etiologialtaan mikrobialinen hampaan kiinnityskudosten krooninen tulehdussairaus, joka aiheuttaa hampaan kiinnityskudoskatoa. Valtaosa parodontiumissa tapahtuvasta kudostuhosta johtuu subgingivaalisen biofilmin patogeenisten mikrobien (lähinnä gram-negatiivisten anaerobibakteerien) ja niiden virulenssitekijöiden käynnistämästä isännän immuno-inflammatorisesta vasteesta, jota isännän tulehdusmediaattorit välittävät ja parodontopatogeenit ylläpitävät. Mikrobialisten virulenssitekijöiden aiheuttama kudostuho ja kudostuhoa välittävien tulehdusmediaattorien merkitys kudostuhoon taustalla on vähäistä isännän immuno-inflammatoriseen vasteeseen verrattuna. (Newman ym. 2018)

Kliinisesti parodontiitti käynnistyy ientulehduksesta, jonka edetessä parodontiitti voi ilmetä hampaan epiteeli- ja sidekudoskiinnityksen menetyksen myötä syventyneinä ientaskuina, ienten vetäytymisenä, alveoliluukatonä, hampaiden lisääntyneenä liikkuvuutena ja lopulta hampaan menetyksenä. Ientulehdus ei automaattisesti johda parodontiittiin, mutta hoitamattomana ja riskialttiilla yksilöllä todennäköisyys parodontiitin puhkeamiselle kasvaa. (Newman ym. 2018)

Kudoksissa vasteena pitkäaikaiselle dysbioottiselle biofilmille syntyvien immuno-inflammatoristen reaktioiden perimmäinen tarkoitus on estää tulehduksen etenemistä syvemmälle elimistöön parodontiumin kautta. Kroonistuessaan isännän puolustusreaktiot aiheuttavat kuitenkin merkittävää kiinnityskudostuhoa, mikä voi lopulta johtaa hampaan irtoamiseen alveolikuopastaan ja hampaan lopulliseen menetykseen. Koska immuno-inflammatorista vastetta modifioivat monet geneettiset, ympäristö- ja käyttäytymistekijät, riski sairastua parodontiittiin on yksilöllinen. Yksilölliset erot immuno-inflammatorisessa vasteessa voivat myös vaikuttaa parodontiitin etenemisnopeuteen ja vakavuuteen eri yksilöiden välillä. (Newman ym. 2018)

Parodontiitti on globaalisti merkittävä suun krooninen infektiosairaus, jota esiintyy noin 20-50%:lla maailman väestöstä. Parodontiitin esiintyvyys on suurta nuorilla, aikuisilla ja vanhusväestössä. (Nazir 2017).

Suomalaisilla 30 vuotta täyttäneillä hampaallisilla suomalaisilla 64 %:lla esiintyy vähintään yksi syventynyt (≥ 4 mm) ientasku ja 21 %:lla esiintyy vähintään yksi syvä (≥ 6 mm) ientasku (Veikalahti 2004). Tiedetään, että jo alle 30-vuotiailla parodontiitin esiintyvyys on

lisääntynyt, ja että vaikean parodontiitin esiintyvyys lisääntyy iän myötä (Thomson ym. 2013, Kassebaum ym. 2014).

3.1 *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*) on keskeinen gram-negatiivinen, anaerobinen parodontopatogeeni, jonka on osoitettu olevan myös Alzheimerin taudin riskitekijä (Ryder 2020). Viimeaikaiset tutkimuslöydökset ovat osoittaneet, että *P. gingivalis*in DNA:ta ja virulenssitekijöitä (LPS, gingipains) tavataan Alzheimerin tautia sairastavien potilaiden aivokudoksesta (Poole ym. 2013, Dominy ym. 2019). *P. gingivalis* on myös tutkimusnäytön perusteella yhdistetty Alzheimerin taudin patologiin muutoksiin (Dominy ym. 2019). Kuitenkin näyttö mekanismeista kuinka *P. gingivalis* tai sen virulenssitekijät päätyvät aivoihin ja vaikuttavat neuroinflammaatioon on vähäistä ja nykytutkimusnäytön valossa vielä epäselvää (Lei ym. 2023).

Lipopolysakkaridi (LPS) on gram-negatiivisten bakteerien ulkokalvolla sijaitseva lipidi A-osasta ja polysakkaridikomponentista koostuva suuri molekyyli, joka on keskeinen gram-negatiivisten bakteereiden virulenssitekijä. LPS toimii endotoksiinina, jonka tiedetään saavan aikaan voimakkaita immuunivasteita eläimissä. (Newman ym. 2018)

Eläinten immuunijärjestelmät ovat kehittyneet tunnistamaan LPS:n Tollin kaltaisten reseptoreiden (TLR) kautta. TLR-reseptorit ovat solujen pintareseptoreita, jotka ovat erittäin konservoituneita eri eläinlajien keskuudessa banaanikärpäsistä ihmisiin. Tämä heijastaa niiden keskeistä roolia synnynnäisissä immuunivasteissa. TLR-reseptorit tunnistavat patogeeneiden ilmentämiä konservoituneita molekyyli-rakenteita (microbe-associated molecular patterns, MAMPs), joista LPS on yksi esimerkki. (Newman ym. 2018)

TLR-4 tunnistaa gram-negatiivisten bakteerien LPS:n ja toimii osana solun pintamolekyylien muodostamaa kompleksia, johon kuuluvat myös CD14 ja MD-2 (lymfosyyttiantigeeni 96). Tämän CD14/TLR-4/MD-2-kompleksin vuorovaikutus LPS:n kanssa laukaisee joukon solunsisäisiä tapahtumia, joiden nettotuloksena tulehdusvälittäjäaineiden (erityisesti proinflammatoristen sytokiinien) tuotanto lisääntyy ja puolustusjärjestelmän solut aktivoituvat ja erilaistuvat tehokkaiden immuunivasteiden kehittämiseksi patogeenejä vastaan. LPS on keskeinen virulenssitekijä ien- ja

parodontiumin kudosten tulehdusvasteiden käynnistämisessä ja ylläpitämisessä. *P. gingivaliksen* tiedetään ilmentävän epätyypillistä LPS-muotoa, jonka kykenee tunnistamaan sekä TLR-2- että TLR-4-reseptori. (Newman ym. 2018)

TLR-4-reseptorin aktivoitumisesta laukeavan signalointireitin on osoitettu olevan pääasiallinen tulehdusvasteen laukaisija. TL4-signalointireitti säätelee sekä perifeeristä inflammaatiota että neuroinflammaatiota. TLR4 on keskeinen rooli aivojen mikroglia-solujen aktivaatiossa. LPS:n sitoutuessa TLR4-reseptoriin käynnistyy solunsisäinen signaalitransduktio, jonka seurauksena käynnistyy proinflammatoristen sytokiinien erityys. *P. gingivalis*-LPS-kykenee stimuloimaan aivokudoksessa proinflammatoristen sytokiinien eritystä TLR4-välitteisesti. Tämä indusoi puolestaan neuroinflammaatiota. (Hu ym. 2020)

Gingipain-proteasit ovat *P. gingivalikselle* tyypillisiä virulenssitekijöitä, jotka kykenevät pilkkomaan parodontiumin eheyden kannalta keskeisiä proteiinirakenteita, kuten kollageenia, elastaania ja fibronektiiniä bakteerin ravintotarpeiden tyydytystä varten. Gingipain-virulenssitekijät käsittävät kolmenlaisia kysteiniiproteaaseja. Näitä ovat arginiini-spesifinen gingipain A ja B (RgpA ja RgpB) ja lysini-spesifinen gingipain (Kgp). Gingipainit voivat moduloida immuunijärjestelmää ja häiritä isännän immuno-inflammatorista vastetta, mikä saattaa lisätä parodontiumin kudosten hajoamista. Gingipainit vaikuttavat myös stimuloimalla proinflammatoristen sytokiinien eritystä aktivoimalla proteaasiaktivoituja reseptoreita (PAR). Esimerkiksi RgpB voi stimuloida sytokiinieritystä PAR-1:n ja PAR-2:n välityksellä. RgpB:n ja Kgp:n tiedetään stimuloivan monosyyttien IL-6 ja IL-8:n eritystä PAR-1- ja PAR-3-aktivaation kautta. (Newman ym. 2018)

P. gingivalista pidetään keskeisenä parodontopatogeeninä, koska sen katsotaan liittyvän keskeisesti parodontiitin etenemiseen ja taudin huonoon hoitovasteeseen. *P. gingivaliksen* rooli parodontiitin ”avainpatogeeninä” perustuu pääasiassa epidemiologiseen tutkimusdataan, kykyyn indusoida parodontiitin kehittyminen jo pieninä määrinä sekä kykyyn tuottaa virulenssitekijöitä, jotka saavat aikaan voimakkaita immuno-inflammatorisia vasteita ihmisissä ja eläimissä sekä mahdollistavat tarttumisen suun kova- ja pehmytkudospinnoille. *P. gingivalis* tunnetaan myös ns. ”punaisen kompleksin” bakteerina yhdessä *Tannerella forsythian* ja *Treponema denticolan* kanssa. Tämän kompleksin bakteerien on katsottu olevan yhteydessä verenvuotoon ientaskumittarilla koetettaessa. (Newman ym. 2018)

On kuitenkin huomionarvoista ymmärtää, että pelkästään *P. gingivaliksen* tai muiden yksittäisten oletettujen parodontopatogeenien esiintyminen parodontiumissa ei itsessään riitä käynnistämään tai aiheuttamaan parodontiittia. Ei myöskään ole olemassa tiettyjä parodontiitin tyyppejä, joissa on aina havaittavissa tietty tunnettu patogeeni. (Newman ym.2018)

Parodontiittia pidetään nykykäsityksen mukaan kompleksisena sekainfektiona, jossa dysbioottinen biofilmi voi koostua taksonomisesti hyvin erilaisista mikrobeista (Gürsoy ym. 2022, Newman ym. 2018). Nykykäsityksen mukaan patogeenisen biofilmin ei katsota muodostuvan vain ”klassisista” parodontopatogeenista, kuten ”punaisen kompleksin” lajeista, vaan nykYTEknologian keinoin on voitu osoittaa dysbioottisen biofilmin sisältävän lajeja, jotka ovat tuntemattomia tai joita ei ole osattu liittää parodontiitin patogeneesiin (Gürsoy ym. 2022). Lisäksi yksilöllinen vaihtelu subgingivaalisen mikrobiston koostumuksessa on suurta niin terveillä kuin sairailta (Gürsoy ym. 2022). Yhden bakteerilajin seulominen voisi johtaa runsaasti vääriin positiivisiin ja väärin negatiivisiin tuloksiin (Gürsoy ym. 2022).

Nykyinen parodontiittia selittävä ajattelu tukee käsitystä, että sekä isännällä että mikrobeilla on keskeinen vaikutus subgingivaalisen biofilmin lopullisessa mikrobikoostumuksessa (Newman ym. 2018). On esitetty useita teorioita (ns. ”plakkihypoteeseja”) sen määrittämiseksi, onko subgingivaalisen biofilmin määrällä, laadulla, mikroympäristöllä tai tietyillä biofilmissä esiintyvillä patogeeneillä enemmän merkitystä parodontiitin patogeneesissä (Newman ym. 2018). Minkään yksittäisen hypoteesin ei ole voitu kuitenkaan osoittaa kuvaavan pitävästi mikrobien ja isännän välillä vallitsevaa monimutkaista vuorovaikutussuhdetta, joka ylläpitää terveyteen assosioituvaa biofilmiä tai johtaa dysbioottisen, sairauteen liittyvän biofilmin kehittymiseen (Newman ym. 2018). Lukijan on näin ollen hyvä pitää mielessä, että vaikka tässä kirjallisuuskatsauksessa tarkastellaan aiheen rajaamiseksi lähinnä *P. gingivaliksen* vaikutusta, parodontiitti ei ole infektio sanan klassisessa merkityksessä, jossa yksi tietty patogeeni riittää aiheuttamaan taudin.

4. ALZHEIMERIN TAUTI

Dementiailla viitataan somaattisista eli elimellisistä syistä johtuvaan laaja-alaiseen älyllisten toimintojen heikkenemisen tilaan, joka rajoittaa ihmisen kykyä selviytyä jokapäiväisistä toimista. Dementia ei ole yksittäinen sairaus, vaan kyse on oireyhtymästä. Dementia-termin voidaan katsoa toimivan yhteisnimityksenä muistin ja muista älyllisistä toiminnoista vastaavien aivoalueiden ja neurokemiallisten järjestelmien vaurioitumisesta seuraavien yksittäisten oireiden muodostamalle kokonaisuudelle. (Rinne & Scheinin 2018).

Nykyisin arviolta 55 miljoonaa maailman ihmisistä kärsii dementiasta, ja sen esiintyvyydessä on arvioitu tapahtuvan noin 3-kertainen lisäys vuoteen 2050 mennessä (WHO 2021). Suomalaisista yli 65-vuotiaista noin 7 %:lla on keskivaikea tai vaikea dementia (Rinne & Scheinin 2018). Heidän muodostama osuus suomalaisessa väestössä on noin 120 000. Näistä tapauksista noin 70 %:ia (80 000) on yleisimmän dementiaa aiheuttavan sairauden eli Alzheimerin taudin aiheuttamia. Ikä lisää taudin sairastumisriskiä merkittävästi (Rinne & Scheinin 2018). Toinen ei-perinnöllisen tautimuodon tärkeä riskitekijä on apolipoproteiini E-geenin $\epsilon 4$ -alleeli (Rinne & Scheinin 2018).

Taudin etenemiseen on havaittu liittyvän myös useiden välittäjäainetasojen laskua aivoissa. Erityisen merkittävää on muistitoimintojen kannalta keskeisten asetyylikoliinitasojen väheneminen ja glutamaattitasojen ekstrasellulaarinen kohoaminen. Nykyinen Alzheimerin taudin lääkehoito on oireenmukaisesta eikä vaikuta itse tautiprosessiin. (Hakkola 2021)

4.1 Beeta-amyloidi (A β)

Amyloidiprekursoriproteiini (APP) on solukalvon glykoproteiini, jolla oletetaan olevan merkitystä useissa biologisissa toiminnoissa, kuten hermosolujen kehityksessä, solujen välisessä viestinnässä, intrasellulaarisessa kuljetuksessa ja muissa hermoston homeostasiaa ylläpitävissä toiminnoissa (Chen ym. 2017). Tätä glykoproteiinia koodaavan geenin lokus sijaitsee kromosomissa 21 (Dominy ym. 2019). APP-proteiinia ekspressoituu monissa kudoksissa mutta erityisen runsaasti hermosolujen synapseissa, jotka ovat keskeisessä roolissa Alzheimerin taudin patogeneesissä (Chen ym. 2017). APP-perheeseen kuuluu kaksi nisäkkäillä esiintyvää homologia: APLP1 ja APLP2 (Hu ym. 2020). APP-perheen jäseniä

yhdistää niitä prosessoivat sekretaasit: α -sekretaasi (ADAM10), β -sekretaasi (BACE1) ja γ -sekretaasi (PS1 ja PS2) (Hu ym. 2020).

Normaalitilassa solukalvoissa oleva APP pilkkoutuu α - ja γ -sekretaasientsyymien vaikutuksesta liukoiseksi osiksi. APP voi pilkkoutua myös vaihtoehtoisesti α -sekretaasin asemesta ensin β -sekretaasilla, jolloin solukalvossa olevan jäännösosan pilkkoutuessa γ -sekretaasilla muodostuu 40 tai 42 aminohapon pituinen beeta-amyloidipeptidi (A β) (A β 40 tai A β 42). Epänormaalien APP-prosessoimien tuottamalla A β :lla on keskeinen rooli kognitiivisten rappeumasairauksien patogeenisissä, koska liukenematon A β kertyy aivokudokseen ja muodostaa solunulkoisia proteiinikertymiä eli amyloidiplakkeja. (Chen ym. 2017).

Beeta-amyloidista koostuvat plakit ovat Alzheimerin taudin neuropatologisen diagnoosin varmistamiseen vaadittavia löydöksiä (Chen ym. 2017). Kun A β -plakkeja kertyy aivohermosolujen väliin, ne voivat alkaa häiritä hermosolujen välistä signalointia (Chen ym. 2017). Vaurio kohdistuu erityisesti neuroneihin, jotka toimivat osana aivojen muistijärjestelmää ja jotka käyttävät asetyylikoliinia välittäjäaineenaan (Sulkava 2016).

4.2 Neurofibrillikimput

Keskushermostossa esiintyy runsaasti liukoista tau-fosfoproteiinia. Tau-fosfoproteiini on solunsisäinen mikrotubuluksia vakauttava rakenneproteiini. Aikuisella ihmisellä tau-proteiinia esiintyy kuutena eri isomuotona. Tau-fosfoproteiinin geeni sijaitsee kromosomissa 17. Tau-proteiinia esiintyy ensisijaisesti hermosolujen aksoneissa. (Medeiros ym. 2011)

Fysiologisissa olosuhteissa tau esiintyy hyvin liukoisena ja luonnostaan laskostumattomana proteiinina, joka reagoi tubuliinin kanssa edistää mikrotubulusten järjestäytymistä vakauttaen niiden rakennetta. Normaalisti tau-proteiinin rakenteessa 2-3 aminohappotähdettä on fosforyloituneita. Tätä suurempi fosforylaatioaste (Alzheimerin taudissa keskimäärin yhdeksän fosfaattia tau-molekyyliä kohden) eli tau-proteiinin hyperfosforylaatio (pTau) vähentää proteiinin liukoisuutta ja aiheuttaa solunsisäisten parillisten kierteisten filamenttien muodostumisen. Ne muodostavat aggregoituessaan solunsisäisiä inklusioita eli neurofibrillikimppuja (NFT). Ekstrasellulaaristen A β -plakkien

ohella intrasellulaariset neurofibrillikimput ovat Alzheimerin taudille tyypillisiä histopatologisia muutoksia. (Medeiros ym. 2011)

4.3 Mikroglia-solut

Mikroglia-solut ovat keskushermoston makrofageja, joilla on keskeinen rooli keskushermoston homeostasian säätelyssä ja ensilinjan puolustusjärjestelmässä. Mikroglia-solut ovat keskushermoston runsaslukuisimpia soluja käsittäen noin 10 %:ia kaikista aivokudoksessa esiintyvistä soluista. (Augusto-Oliveira ym. 2019)

Mikroglia-solujen toimintojen tarkastelun helpottamiseksi mikroglia-solut jaetaan usein kahteen luokkaan, jotka on johdettu perifeeristen makrofagien luokituksesta. Tämän jaottelun mukaan mikroglia-solut jaetaan ”klassisesti aktivoituihin” eli M1-fenotyyppin mikroglia-soluihin, jotka ovat luonteeltaan proinflammatorisia. M2-fenotyyppin mikroglia-solut ovat puolestaan anti-inflammatorisia. M1/M2-luokitus on kuitenkin vain karkea jaottelu mikroglia-solujen tarkastelussa, koska mikroglia-solujen toiminnan tiedetään olevan hyvin kompleksista ja heterogeenistä esimerkiksi erilaisten patologisten ärsykevästeiden aiheuttamien solumorfologiassa ja fenotyypissä tapahtuvien muutosten suhteen. (Augusto-Oliveira ym. 2019)

Mikroglia-pysyvät lepotilassa ylläpitäen keskushermoston normaalia toimintaa, kun niiden mikroympäristö aivokudoksessa pysyy vakaana. Kun mikroglia-solujen mikroympäristössä tapahtuu muutos, mikroglia-solu voi aktivoitua. Aktivoituneilla mikroglia-soluilla on kyky proliferoitua, fagosytosoida ja tehdä antigeeniesittelyä, joten ne kykenevät suorittamaan tarpeettomien synapsiyhteyksien karsimista ja vierasesinepartikkeleiden poistoa. Aktivoidut mikroglia-solut erittävät myös useita humoraalisia tekijöitä, kuten proinflammatorisia sytokiineja, kemokiineja ja neuroprotektiivisiä tekijöitä (esim. BDNF). (Matsushita ym. 2020)

Alzheimerin taudin kannalta mikroglia-solut muodostavat aivoihin immuunivalvontajärjestelmän, joka säätelee Alzheimerin taudin patogeneesiä prosesseja, kuten A β -plakkien ja poikkeavan tau-proteiinin poistoa sekä neurotrofisten ja neuroinflammatoristen tekijöiden tuotantoa. Mikroglia-solujen on ehdotettu olevan merkittävässä määrin osallisena Alzheimerin taudissa, koska aktivoituneiden mikroglia-solujen kertymistä on havaittu osana taudin patogeneesiä. (Matsushita ym. 2020)

TREM-2 (triggering receptor expressed on myeloid cells) on mikroglia-solujen solukalvoreseptori, joka sitoo hyvin monentyypisiä ligandeja (mm. LPS, A β -oligomeerejä). Ligandi-TREM-2-vuorovaikutus aktivoi solunsisäisen signalointireitin, joka säätelee mikroglia-solujen fagosytoosia, metaboliaa, liikkumista, elinkykyä sekä geeniekspressiota. (Ulrich ym. 2017)

Useiden harvinaisten TREM-2-reseptorin geenimutaatioiden on osoitettu lisäävän riskiä sairastua Alzheimerin tautiin (Ulrich ym. 2017). Kyse on TREM-2-reseptoriin toimintaan liittyvistä muutoksista, joiden seurauksena mikroglia-solujen vaste erilaisille mikroympäristön paikallisille ärsykkeille muuttuu (Ulrich ym. 2017). Koska useat eri yhdisteet, jotka vaikuttavat keskushermostoinfektioon ja neuroinflammaatioon ovat osallisena mikroglia-solujen aktivaatiossa, on mahdollista, että parodontiittiin liittyvät proinflammatoriset tulehdusmediaattorit ja parodontopatogeenien metaboliatuotteet kulkeutuvat aivoihin, vaikuttavat aivojen mikroglia-solujen aktivaatioon ja edistävät siten Alzheimerin tautiin liittyvää neuroinflammaatiota (Matsushita ym. 2020).

5. VERI-AIVOESTE

Veri-aivoeste (blood brain barrier, BBB) on keskeinen matalan permeabiliteetin omaava rakenteellinen ja toiminnallinen komponentti, joka toimii ensilinjan fyysisenä esteenä estäen monien verenkiertoon liuenneiden aineiden pääsyä verenkierrosta aivoihin (Daneman & Prat 2015). Veri-aivoesteen pääasiallisia rakennekomponentteja ovat aivojen mikrovaskulaariset endoteelisolut (brain microvascular endothelial cells, BMECs), astrosyytit, perisytyt ja tyvikalvo (Lei ym. 2023). Veri-aivoeste erottaa systeemisen verenkierron ja keskushermoston toisistaan, minkä takia sillä on keskeinen tehtävä estää perifeeristen haitallisten yhdisteiden päätymistä keskushermoston kudoksiin (Daneman & Prat 2015). Veri-aivoesteessä tapahtuvien toiminnallisten vaurioiden oletetaan olevan yhteydessä kognitiiviseen rappeumaan ja neuronikatoon (Nation ym. 2019).

Veri-aivoesteen läpäisevyydessä tapahtuvien muutoksien katsotaan selittyvän pääasiassa BMEC-solujen läpi tapahtuvalla transsytoosilla (transsellulaarinen reitti) ja BMEC-solujen välisten intersellulaaristen sidosten katkeamisella (ekstrasellulaarinen reitti) (Lei ym. 2023). Uusimmissa tutkimuksissa ulkokalvovesikkeleiden (outer membrane vesicles, OMVs) sisältämiä *P. gingivaliksen* virulenssitekijöiden (mm. LPS, gingipain) on havaittu in vitro BBB-mallissa lisäävän veri-aivoesteen läpäisevyyttä BMEC-solujen intersellulaarisista sidoksista vastaavien proteiinien hajotuksen kautta (Pritchard ym. 2022, Nonaka ym. 2022). *P. gingivaliksen* vaikutusta transsytoosiin tai BMEC-solujen tiiviiden liitosten läpi tapahtuvaan kulkeutumiseen ei ole kuitenkaan voitu osoittaa pitävästi (Lei ym. 2023).

6. PARODONTIITIN JA ALZHEIMERIN TAUDIN PATOGENEESIMEKANISMIIEN VÄLINEN YHTEYS

6.1 Tutkimuksia, joissa havaittu yhteys parodontiitin ja heikentyneen kognition välillä

Parodontiitin on ajateltu olevan yksi yleisimmistä potentiaalisista demencian riskitekijöistä (Sung ym. 2019). Sung ym. (2019) tutkivat poikkileikkaustutkimuksessaan parodontiitin ja demencian välistä yhteyttä NHANES III-tietokannasta (National Health and Nutrition Examination Survey) saadun aineiston perusteella. NHANES III oli vuosina 1988-1994 National Center for Health Statistics-toimesta tehty poikkileikkaustutkimus, jossa tutkittiin yhdysvaltalaisten yleisterveyttä ja ravitsemustilaa.

Tutkimukseen valikoitui mukaan yhteensä 4663 koehenkilöä, jotka olivat iältään 20-59-vuotiaita. Heille tehtiin koko suun kattava parodontiumin statustutkimus ja validoidut, kognitiivista suorituskykyä mittaavat testit. Parodontiitti luokiteltiin kiinnityskadon menetyksen ja taskusyvyyksien perusteella vaikeusasteeltaan kolmeen eri luokkaan: vaikea, kohtalainen ja lievä. Vaikeassa parodontiitissa kahden tai useamman interproksimaalivälin kiinnityskato (AL) oli $\geq 6\text{mm}$ ja yhdessä tai useammassa interproksimaalivälissä taskusyvyys (PD) oli $\geq 5\text{mm}$. Kohtalaisessa parodontiitissa puolestaan kahden tai useamman interproksimaalivälin kiinnityskato oli välillä $\geq 4\text{mm}$ ja $< 6\text{mm}$ tai kahdessa tai useammassa interproksimaalivälissä taskusyvyys oli $\geq 5\text{mm}$. Lievässä parodontiitissa taas kahden tai useammassa interproksimaalivälin kiinnityskato oli välillä $\geq 3\text{mm}$ ja $< 4\text{mm}$ ja kahdessa tai useammassa interproksimaalivälissä taskusyvyys oli $\geq 4\text{mm}$ tai yhdessä interproksimaalivälissä taskusyvyys oli $\geq 5\text{mm}$. (Sung ym. 2019)

Tutkimuksessa potilaiden kognitiivista suorituskykyä mitattiin SRTT- (simple reaction time test), SDST-(symbol digit substitution test) ja SDLT-(serial digit learning test) testien avulla. Koehenkilöt, joilla oli lievä (n=674, 14,45%) tai kohtalainen/vaikea parodontiitti (n= 407, 8,73%) saivat korkeampia pisteitä SDLT- ja SDST-testeissä, mikä indikoi heikentyneitä kognitiivista suorituskykyä verrattuna parodontaalisesti terveisiin. (Sung ym. 2019)

Huomioiden demografiset tekijät (koulutus, tupakointi, sydän- ja verisuonisairaudet sekä laboratoriotutkimukset) parodontiitti korreloi merkittävästi SDST- ja SDLT-testipisteiden kanssa (p-arvot 0,014 ja 0,038). Parodontiitin ja SRTT-testitulosten välillä ei havaittu tilastollisesti merkittävää yhteyttä. Johtopäätöksenä voidaan todeta, että parodontiitti oli

tässä yhdysvaltalaisen aikuisten edustamassa edustavassa otoksessa yhteydessä kognitiiviseen rappeumaan. (Sung ym. 2019)

Gil-Montoya ym. (2015) Espanjan Granadassa tammikuun 2011 ja joulukuun 2012 välille ajoittuvan tapaus-verrokkitutkimuksen tarkoituksena oli selvittää parodontiitin yhteyttä kognitiivisen suorituskyvyn heikentymiseen. Tutkimusaineisto koostui yhteensä 409 hampaallisesta aikuisesta, jotka olivat iältään yli 50-vuotiaita. Heistä 180:llä (tapaukset) oli kognitiivisen suorituskyvyn alenemaa. Loput 229 koehenkilöä olivat kognitiivisesti terveitä (verrokkit).

Tapauksien ja verrokkien keski-ikä oli 77 ja 78,5 vuotta. 67,2%:ia tapauksista ja 55,9 %:ia verrokeista olivat naisia. Tapaukset olivat värvätty kahden eri sairaalan neurologisen osaston potilaista. Kontrollit puolestaan värvättiin perusterveydenhuollossa muista kuin hampaastoon liittyvistä tai neurologisista syistä asioineista potilaista. Kontrolleilta kerättiin anamnestiset tiedot ja heille tehtiin yleinen kliininen tutkimus ennen tutkimukseen sisääntuloa. Lisäksi heille tehtiin Phototest-testaus, joka on perusterveydenhuollon käyttöön suunniteltu lyhyt kognitiivinen testi seulomaan kognitiivista rappeumaa ja dementiaa. Sekä tapauksien että kontrollien tuli olla hampaallisia ja yli 50-vuotiaita. Kontrolleilta edellytettiin > 30 pistettä Phototestin tuloksena ja heillä ei saanut olla subjektiivista tunnetta muistiongelmista. Tapauksilta edellytettiin luonnollisesti diagnosoitua lievää kognitiivista heikentymää tai vaikeusasteeltaan minkä tasoista tahansa dementiaa. Tutkimuksen poistokriteereinä olivat diagnosoitu masennus, skitsofrenia, persoonallisuushäiriö, hoitamaton akuutti tai krooninen sairaus, lääkkeiden väärinkäyttö ja viimeisen puolen vuoden aikana tehty parodontologinen hoito. Kaikilta tutkimukseen osallistuvilta kerättiin kirjallinen suostumus osallistua mukaan tutkimukseen. (Gil-Montoya ym. 2015)

180:stä tapauksesta 21:llä oli lievä kognitiivisen suorituskyvyn alenema ilman diagnosoitua dementiaa, 123:lla lievä tai keskivaikea dementia ja 36:lla vaikea-asteinen dementia. 70%:lla dementiapotilaista oli diagnosoitu Alzheimerin tauti. Tapauksien ja verrokkien välillä ei havaittu merkittäviä eroja iässä, koulutustasossa, alkoholinkulutuksessa tai tupakoinnin määrässä. Kognitiivisen suorituskyvyn alenema oli diagnosoitu Spanish Society of Neurology Behavioral and Dementia Study Group-kriteeristön mukaisesti. Alzheimerin taudin diagnoosi määräytyi puolestaan National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke–Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA)-kriteeristön perusteella. Tapauksien neurologisesta

statustutkimuksesta ja edellä mainittujen diagnoosikriteeristöjen soveltamisesta vastasi yksi neurologi kummassakin tapauksia värvänneessä sairaalassa. (Gil-Montoya ym. 2015)

Parodontiumin statustutkimuksen suoritti yhteensä neljä eri hammaslääkäriä. Tutkimuksessa määritettiin menetettyjen hampaiden lukumäärä (viisaudenhampaat mukaan lukien), Löe- ja Sillness-indeksi, plakki-indeksi (PI), taskusyvytydet (PD), kiinnityskato (AL) ja verenvuoto (BOP). Menetettyjen hampaiden katsottiin johtuvan parodontiitista. Vähintään kolme hammaspintaa tutkittiin vähintään kahdesta hampaasta sekstanteittain tai kaikki kohdat, jos hampaita oli jäljellä vähemmän kuin 12. Parodontiitin aste määräytyi niiden kohtien prosentuaalisena osuutena, joissa kiinnityskatoa oli enemmän kuin 3 mm seuraavasti: 0 %:ia ei sairautta, 0-32 %:ia lievä, 33-66%:ia kohtalainen, 67-100%:ia vaikea. Koehenkilöiltä kysyttiin myös suun omahoitotottumuksista ja asioimisesta suun terveydenhuollossa. (Gil-Montoya ym. 2015)

Tutkimustulosten mukaan tapauksien suun terveysstatus oli huonompi kontrolleihin verrattuna. Riski kognitiiviselle rappeumalle oli 1,76-kertaa suurempi vajaahampaisilla ja 15,7-kertaa suurempi korkean plakki-indeksin (PI) omaavilla yksilöillä. Lievä parodontiitti diagnosoitiin 10%:lla, keskivaikea 21,7 %:lla ja vaikea 68,3 %:lla tapauksista. Erot olivat tilastollisesti merkittävät verrattuna kontrolleihin. Tutkimustulokset osoittivat myös, että BOP, PD ja AL olivat tilastollisesti merkittävässä yhteydessä kognitiiviseen rappeumaan. Riski kognitiiviselle rappeumalle oli 3,04-kertaa suurempi yksilöillä, joilla oli vaikea parodontiitti. (Gil-Montoya ym. 2015)

Tutkimustulosten mukaan muuttujat, jotka vaativat kauan aikaa ilmentyäkseen (hampaiden puutokset ja AL) eivät olleet tilastollisesti merkittävässä yhteydessä dementian vaikeusasteeseen eli vaikea-asteinen parodontiitti ei ollut yhteydessä pitkälle edenneeseen kognitiiviseen heikentymiseen. Huonot omahoitotottumukset ja suuri BOP olivat kuitenkin yhteydessä vaikea-asteisempaan kognitiivisen heikentymisen asteeseen. (Gil-Montoya ym. 2015)

Tutkijat arvioivat myös hampaiden lukumäärän ja kiinnityskadon yhteyttä kognitiiviseen heikentymään huomioiden keskeiset sekoittavat tekijät. Tutkimustulosten mukaan hampaiden menetyksen ja kognitiivisen heikentymisen välillä ei havaittu tilastollisesti merkittävää yhteyttä, kun huomioitiin ikä, sukupuoli, koulutustaso, kiinnityskato, omahoitotottumukset ja hyperlipidemia. Kuitenkin kiinnityskadon (AL) ja kognitiivisen rappeuman välillä oli tilastollisesti merkitsevä yhteys, kun huomioitiin samat sekoittavat

tekijät. Suurin riski kiinnityskadolle (OR =2,97) oli vaikeaa parodontiittia sairastavilla potilailla, kun huomioitiin hampaiden lukumäärä, kiinnityskato, ikä ja sukupuoli. Riski pieneni, kun huomioitiin loputkin tarkasteltavat sekoittavat tekijät (koulutustaso, omahoitotottumukset ja hyperlipidemia), mutta riski kiinnityskatoon säilyi edelleen tilastollisesti merkittävänä. (Gil-Montoya ym. 2015)

Yhteenvedona Gil-Montoya ym. (2015) tutkimustulokset osoittivat, että kiinnityskadon ja kognitiivisen rappeuman välillä oli tilastollisesti merkitsevä yhteys, kun huomioitiin potilaiden ikä, sukupuoli, koulutustaso, omahoitotottumukset ja hyperlipidemia. Tutkimustulosten perusteella parodontiitti vaikutti olevan yhteydessä kognitiiviseen rappeumaan.

Kamer ym. (2015) poikkileikkaustutkimuksessa tutkimushypoteesina oli, että kognitiivisesti terveillä henkilöillä parodontiittiin liittyvä inflammaatio/infektio lisää riskiä aivojen amyloidikertymiselle. Hypoteesin testaamiseksi Kamer ym. (2015) rekrytoivat tutkimukseen kognitiivisesti terveitä henkilöitä, joille tehtiin PET-kuvaus aivojen amyloidikertymien havaitsemiseksi. PET-kuvantamisessa seurattiin 11C-Pittsburgh compound-B:n (PIB) kertymistä amyloidikertymien kannalta herkille aivoalueille (MaskAD).

Koehenkilöiden valinta tehtiin satunnaisotannalla paikallisesta äänioikeusrekisteristä. Alun perin 250 henkilöä kutsuttiin mukaan tutkimukseen. Heistä 70 ilmoitti halukkuutensa osallistua. Näistä 40 koehenkilölle suoritettiin National Alzheimer Coordinating Centerin ohjeistuksen mukaiset standardoidut lääketieteelliset ja kognitiiviset tutkimukset NewYorkissa lääketieteellisessä tiedekunnassa (University School of Medicine, NYU). Tutkimukset pitivät sisällään lääketieteellisen, psykiatrisen ja neuropsykologisen statustutkimuksen, apolipoproteiini E (ApoE)-genotyypityksen, magneetikuvauksen ja standardisoidun parodontologisen tutkimuksen. 38:lle koehenkilölle tehtiin PET-kuvaus amyloidikertymien havaitsemiseksi. Kaikki tutkimukseen rekrytoidut koehenkilöt täyttivät kirjallisen suostumuksen osallistua mukaan tutkimukseen. PET-kuvauksen ja parodontologisen tutkimuksen välinen aikaväli oli 1,29 +/- 0,89 vuotta. Tutkimuksen mittaukset toteutettiin sokkoutettuna kliinisistä tiedoista. (Kamer ym. 2015)

Tutkimuksessa koehenkilöiltä edellytettiin 12 vuoden koulutustaustaa ja sujuvaa englannin kielen taitoa. Kognitiivisesti terveen mittarina käytettiin Clinical Dementia rating (CDR)-pistemäärää 0, Global Deterioration Scale (GDS)-testissä tasoa ≤ 2 ja Mini-mental-state-examination (MMSE)-tutkimuksessa ≥ 28 pistettä. Lisäksi koehenkilöiltä edellytettiin

minimissään 10 tutkimuskelpoista hammasta ja itsenäistä fyysistä suorituskkyä toteuttaa omahoitoa. (Kamer ym. 2015)

Poissulkukriteereinä tutkimuksessa olivat sairaus tai sairaushistoria aivojen rakennetta tai toimintaa muuttavasta tilasta, huonossa hoitotasapainossa oleva verenpainetauti, diabetes, pään alueelle kohdistunut trauma, joka on johtanut tajuttomuuteen, neurodegeneratiivinen sairaus, krooninen masennus ja MRI-kuvantaen todettu hydrokefalus tai aivokasvain. Lisäksi koehenkilöt, jotka olivat syöneet krooniseen sairauteen anti-inflammatorista lääkitystä, saaneet parodontologista hoitoa tai syöneet antibiootteja kolme kuukautta ennen parodontologista statustutkimusta suljettiin tutkimuksen ulkopuolelle. (Kamer ym. 2015)

Parodontologisessa statustutkimuksessa rekisteröitiin hampaiden lukumäärä, hammasplakin määrä ja CAL ientaskumittarin avulla kaikkien hampaiden 6:lta eri pinnalta. CAL määräytyi taskusyvyuden (ienrajan etäisyys taskun pohjaan, PD) sekä ienrajan ja kiille-sementtirajan (CEJ) välisen etäisyyden (positiivinen, jos ienraja sijaitsee CEJ:stä apikaalisesti ja negatiivinen, jos ienraja sijaitsee CEJ:hin nähden koronaalisesti) summana. Lisäksi verenvuotoindeksi eli BOP (bleeding on probing) arvioitiin jokaisen taskumittauksen kohdalta. Tutkimuksessa parodontiitin diagnoosi määräytyi 5th EWP:n (European Workshop in Periodontology) määritelmän mukaisesti: proksimaalista kiinnityskatoa ≥ 3 mm (CAL3) vähintään kahdessa ei-vierekkäisessä hampaassa. Kaikilla koehenkilöillä esiintyi CAL3 useissa hampaissa, joten he täyttivät edellä mainitun määritelmän parodontiitista. CAL, ja tarkemmin vielä CAL3, valittiin tutkimuksessa parodontiittia mittaavaksi parametriksi, koska se kuvaa parodontiitin krooniseen luonteeseen liittyvää sairaustaakkaa. Myös amyloidikertymien muodostuminen on krooninen, elämän mittaan tapahtuva prosessi. (Kamer ym. 2015)

Koehenkilöt olivat keski-ikänsä 61,3-vuotiaita, 68 %:ia heistä oli naisia ja 42 %:ia omasi ApoE4-alleelin. 55 %:lla henkilöistä ei ollut diagnosoitua perussairautta, ja valtaosalla (73 %) ei ollut tupakointitaustaa. Kolmella henkilöllä oli diagnosoitu korkea systolinen ja kahdella korkea diastolinen verenpaine. Viisi koehenkilöä oli lihavia (BMI>30). 68 %:ia koehenkilöistä raportoi harjaavansa hampaat vähintään kerran päivässä, ja 71,1 %:ia ilmoitti käyvänsä vähintään puolivuositain säännöllisissä hammastarkastuksissa. (Kamer ym. 2015)

Tutkimus oli ensimmäinen, joka osoitti, että keskeisten sekoittavien tekijöiden (lääketieteellinen yleisstatus, ikä, hampaiden menetys, ApoE-genotyypitys, tupakointi, omahoitotottumukset, kognitiivinen suorituskky) poissulun jälkeen kognitiivisesti

terveiden vanhuksien parodontiitti (CAL) oli yhteydessä aivojen amyloidikertymiin PET-kuvantamisella arvioituna. Tutkimustulosten mukaan CAL3 oli tilastollisesti merkittävästi yhteydessä PIB-retentioon MaskAD-alueille huomioiden ikä, apoE ja tupakointi ($r=0,50$, $p=0,0002$, $\beta=0,011$, 95 % CI = 0,004-0,017). Tutkimuksessa 22%:ia PIB-retention vaihtelusta MaskAD-alueilla oli yhteydessä CAL3:een. Yhteys oli tilastollisesti merkittävä kaikilla MaskAD:n kattavilla aivoalueilla. Myös $CAL \geq 4\text{mm}$ (CAL4) sekä Perio1 ($CAL3 \geq 66\%$ tutkittavilla pinnoilla sekä $PD \geq 5\text{mm}$) korrelaatiot amyloidikertymiin havaittiin merkittäviksi (CAL4: $r=0,410$, $p=0,015$, $\beta=0,008$, 95 % CI = 0,002-0,015; Perio1: $r=0,412$, $p=0,017$, $\beta=0,482$, 95% CI = 0,084-0,881), mutta nämä yhteydet eivät olleet yhtä vahvoja. $PD \geq 3\text{mm}$ eli PD3:n ja BOP:n korrelaatioissa amyloidikertymiin ei havaittu tilastollista merkittävyyttä (PD3: $r=0,299$, $p=0,085$, $\beta=0,009$, 95% CI =0,001-0,019; BOP: $r=-0,096$, $p=0,584$, $\beta=-0,003$, 95% CI = -0,003-0,019). (Kamer ym. 2015)

6.2 Ihmiskokeita, joissa havaittu mekanistinen yhteys parodontiitin ja heikentyneen kognition välillä

Ide ym. (2016) tutkimushypoteesina oli, että parodontiitti on yhteydessä dementian vaikeusasteeseen ja nopeampaan kognitiiviseen rappeutumiseen Alzheimerin taudissa. Tutkijat pyrkivät selvittämään liittyykö parodontiitti Alzheimerin taudin yhteydessä dementian suurempaan vaikeusasteeseen ja kognitiiviseen rappeutumiseen sekä voimistuneeseen systeemiseen proinflammatoriseen tilaan.

Kyseessä oli puolen vuoden mittainen kohorttitutkimus, johon osallistui 60 tupakoimatonta henkilöä, joilla oli lievä tai kohtalainen Alzheimerin tauti. Koehenkilöiden Alzheimerin tauti määräytyi National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) -kriteeristön mukaisesti. Kaikilla koehenkilöillä oli ollut myös käytössä koliiniesteraasi-inhibiittori ainakin puolen vuoden ajan. Koehenkilöiden keskimääräinen ikä oli 77,7-vuotta ja yhteensä 30 heistä oli miehiä. 60 koehenkilön joukosta yksi jouduttiin jättämään pois, koska hän tupakoi. Kaikilla koehenkilöillä oli lähtötilanteessa vähintään 10 hammasta eikä heistä kukaan ollut saanut parodontologista hoitoa viimeisen puolen vuoden aikana. Tutkimuspopulaatio kerättiin elokuun 2012 ja elokuun 2013 välillä Yhdistyneen Kuningaskunnan Southamptonissa muistitesteihin lähetettyjen henkilöiden joukosta.

Potilaille informoitiin tutkimuksen luonteesta, ja heidän tuli kyetä itsenäisesti hyväksymään osallistuminen mukaan tutkimukseen. Tutkimuksen puolen vuoden seuranta-ajan jälkeen tutkimuspopulaatiossa oli mukana enää 52 koehenkilöä. Yksi potilas kuoli, kolme kieltäytyi seurannasta ja kolme katosi tutkimuksen seurantajakson aikana. (Ide ym. 2016)

Tutkimuksessa koehenkilöiden kognition testaamiseen käytettiin Alzheimer's Disease Assessment Scale (ADAS-cog)- ja standardized Mini-Mental State Examination (sMMSE)-testejä. Koehenkilöiltä kerättiin laskimoverinäytteet systeemisten tulehdusmerkkiaineiden määrittämiseksi. Näitä merkkiaineita olivat CRP, proinflammatorinen sytokiini TNF- α , anti-inflammatorinen sytokiini IL-10 ja *P. gingivalis*-vasta-aineet. Lisäksi verinäytettä käytettiin koehenkilöiden ApoE-genotyypin määrittämiseen. (Ide ym. 2016)

Hampaiston terveyden arvioi suuhygienisti, jolla ei ollut käsitystä potilaiden kognitiivisesta tilasta. Suun tutkimuksessa koehenkilöiltä mitattiin plakin määrä (luokka 2: visuaalisesti havaittavissa, luokka 1: havaittavissa ientaskumittarilla), ientaskusyvytydet ja BOP. Nämä parametrit ovat osa The Centers for Disease Control and Prevention/American Academy of Periodontology (CDC/AAP)-kriteeristöä, jonka perusteella määrytyi koehenkilöiden parodontiittidiagnoosi. Koehenkilöiden anamnestiset tiedot puolen vuoden ajalta kerättiin omaishoitajilta. Alkutilan tutkimukset ja omaishoitajahaastattelut toistettiin kuuden kuukauden kuluttua. (Ide ym. 2016)

Alussa yhteensä 22:lla potilaalla diagnosoitiin CDC/AAP-kriteeristön mukainen parodontiitti. Heistä 15:sta parodontiitti oli vaikeusasteeltaan kohtalainen ja seitsemällä vaikea. Lähtötilanteessa koehenkilöiden keskimääräiset tulokset kognitiivisissa testeissä oli ADAS-cog-testin osalta 46,2 ja sMMSE-testin osalta 20,4. Puolen vuoden seurantajakson jälkeen alussa CDC/APP-mukaisen parodontiittidiagnoosin saaneista yhteensä 15 henkilöä 20:stä täytti edelleen kriteerit ja 32:sta kriteerit alussa täyttämättömistä 30:llä ei kriteeristö täyttynyt puolen vuoden seurantajakson jälkeenkään. (Ide ym. 2016)

Kognitiivista statusta mittaavassa ADAS-cog-arvossa havaittiin tutkimusjakson aikana keskimäärin 2,9 pisteen muutos huonompaan. sMMSE-testissä muutos oli keskimäärin -1,4 pistettä. Tutkimustulosten perusteella parodontiittiin liittyi 6-kertainen kognitiivinen rappeutumisnopeus Alzheimer's Disease Assessment Scale (ADAS-cog)-testipistein arvioituna puolen vuoden seurantajakson aikana. Myös sMMSE-testipisteiden ja parodontiitin välillä havaittiin merkitsevä yhteys, mutta ikä, sukupuoli ja lähtötilanteen sMMSE-testitulos huomioiden tulos ei ollut merkitsevä. (Ide ym. 2016)

Puolen vuoden seurantajakson jälkeen verinäytteissä ei havaittu merkitsevää yhteyttä *P. gingivaliksen* vasta-ainetasojen ja ADAS-cog- ja sMMSE-testipisteiden laskun välillä. Puolen vuoden seurannassa ei havaittu myöskään merkitsevää yhteyttä hampaiden lukumäärän ja seerumin inflammatoristen merkkiaineiden välillä. Lähtötilanteen parodontiitin havaittiin kuitenkin olevan yhteydessä anti-inflammatorisen sytokiinin IL-10 seerumitasojen laskuun. Lähtötilanteen *P. gingivaliksen* vasta-ainetasoilla oli myös yhteys IL-10 tasojen laskuun, minkä lisäksi vasta-ainetasoilla havaittiin yhteys proinflammatorisen sytokiinin TNF- α :n tasojen nousuun. (Ide ym. 2016)

Ide ym. (2016) tutkimus osoitti, että Alzheimerin tautia sairastavan parodontiitti on yhteydessä merkittävään kognitiiviseen rappeuman lisääntymiseen puolen vuoden seurantajakson aikana, ja että yhteys on riippumaton lähtötilanteen kognitiiviseen tilaan. Ide ym. (2016) tutkimuksessa osoitettiin myös laskimoverinäytteiden tulehdusmerkkiaineiden mittauksella proinflammatorisessa tilassa suhteellista nousua ja vastaavasti anti-inflammatorisen suhteellista laskua parodontiittia sairastavilla Alzheimerin taudin potilailla.

Yhteenvetona tutkimustulokset osoittivat, että parodontiitti on yhteydessä Alzheimerin taudin kognitiiviseen heikkenemiseen, ja yhteys on riippumaton lähtötason kognitiivisesta tilasta. Vaikutuksen arvioidaan välittyvän systeemisen inflammaation vaikutusten kautta.. (Ide ym. 2016)

Andreadou ym. (2021) toteuttama poikkileikkaustutkimus oli tiettävästi ensimmäinen tutkimus, jossa tutkittiin LPS:n yhteyttä tulehdusta aiheuttavien prostaglandiinien synteesistä vastaaviin COX-1/2-entsyymeihin seerumissa ja aivoselkäydinnesteessä Alzheimerin tautia ja lievää kognitiivista heikentymää (Mild Cognitive Impairment, MCI) sairastavilla potilailla kognitiivisesti terveisiin yksilöihin (kontrolliryhmä) verrattuna. Lievä kognitiivinen heikentyminen on normaalin kognition ja muistisairauden välissä oleva oiretila, joka usein edeltää Alzheimerin tautia.

Andreadou ym. (2021) tutkimuksen tarkoituksena oli myös selvittää voiko LPS-tasoa pitää potentiaalisena Alzheimerin taudin patogeneesin biomarkkerina. Tätä tarkoitusta varten tutkijat tutkivat aivo-selkäydinnesteen ja seerumin LPS-tasojen mahdollista korrelaatiota A β 42- ja tau- ja COX-1 ja COX-2-tasoihin aivo-selkäydinnesteessä ja seerumissa.

Tutkijat olivat tilanneet aivo-selkäydinneste- ja seeruminäytteet kreikkalaisen yliopistosairaala Thessalonikin neurologian poliklinikalta. Ennen neurologin suorittamaa lumbaalipunktiota ja verinäytteiden ottoa potilailta tai heidän laillisilta edunvalvojilta oli

pyydetty kirjallinen suostumus näytteiden keräämistä tutkimusta varten. (Andreadou ym. 2021)

Aivo-selkäydinnestenyhteet kerättiin 54:ltä Alzheimerin tautia sairastavalta, 47:ltä lievää kognitiivista heikentymää potevalta ja 23:lta kognitiivisesti terveeltä yksilöltä. Seeruminäytteet kerättiin 18:sta Alzheimerin tautia sairastavalta, 26:lta lievää kognitiivista heikentymää potevalta ja 13:sta kognitiivisesti terveeltä yksilöltä. Lievä kognitiivinen heikentyminen diagnosoitiin Petersenin diagnostisten kriteerien mukaan. Alzheimerin tauti diagnosoitiin puolestaan National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA)-kriteeristön mukaisesti. Tutkimukseen valitut koehenkilöt valittiin osasta suurempaa kohorttia ja kriteeriksi asetettiin iältään 60–76-vuotiaat henkilöt. Kolmessa tutkimuksen eri osajoukossa ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja osallistujien sukupuolen ja koulutustason suhteen. (Andreadou ym. 2021)

Tutkimustulosten mukaan LPS-tasot olivat koholla Alzheimerin tautia sairastavien potilaiden seerumissa verrattuna MCI-yksilöihin ja kognitiivisesti terveisiin. LPS-tasojen havaittiin olevan koholla myös Alzheimerin tautia sairastavien ja MCI-yksilöiden aivo-selkäydinnesteessä verrattuna kognitiivisesti terveisiin. (Andreadou ym. 2021)

Seerumin LPS:n havaittiin toimivan hyvänä biomarkkerina erottamaan kognitiivisesti terveet ja MCI-yksilöt Alzheimerin tautia sairastavista. Aivo-selkäydinnesteen LPS-tasojen diagnostinen arvo toimia biomarkkerina ei ollut yhtä vahva tekemään eroa terveiden yksilöiden ja Alzheimerin tautia sairastavien ja kognitiivisesti terveiden ja Alzheimerin tautia sairastavien välillä kuin seerumin LPS-tasojen. (Andreadou ym. 2021)

COX-1-tasot olivat koholla Alzheimerin tautia sairastavien seerumissa verrattuna kognitiivisesti terveisiin. Myös aivo-selkäydinnesteen COX-1-tasot olivat suuremmat Alzheimerin tautia sairastavilla kuin MCI-yksilöillä ja kognitiivisesti terveillä. Lisäksi MCI-yksilöiden COX-1-tasot aivo-selkäydinnesteessä olivat suuremmat kuin kognitiivisesti terveillä. (Andreadou ym. 2021)

Aivo-selkäydinnesteen COX-1-tasojen diagnostinen arvo toimia biomarkkerina erottamaan Alzheimerin tautia sairastavat kognitiivisesti terveistä tai MCI-yksilöistä osoittautui todennäköiseksi. COX-1-pitoisuudet aivo-selkäydinnesteessä eivät kuitenkaan riittäneet erottelemaan kognitiivisesti terveitä MCI-yksilöistä. Tilastollinen analyysi osoitti kuitenkin,

että seerumin COX-1-tasoilla oli diagnostista arvoa erottaa kognitiivisesti terveet Alzheimerin tautia sairastavista. (Andreadou ym. 2021)

COX-2-tasojen osalta tutkimustulokset osoittivat nousua Alzheimerin tautia sairastavien seerumissa ja aivo-selkäydinnesteessä verrattuna kognitiivisesti terveisiin. MCI-yksilöiden ja kognitiivisesti terveiden seerumin ja aivo-selkäydinnesteen COX-2-tasoissa ei havaittu merkittävää eroa. Lisäksi COX-2-tasot Alzheimerin tautia sairastavien seerumissa olivat MCI-yksilöitä suuremmat. Aivo-selkäydinnesteen COX-2-tasoilla Alzheimerin tautia sairastavien ja MCI-yksilöiden välillä ei havaittu merkittävää eroa. (Andreadou ym. 2021)

Seerumin COX-2-tasojen arvo toimia biomarkkerina erottamaan MCI-yksilöt Alzheimerin tautia sairastavista osoittautui todennäköiseksi. Seerumin ja aivo-selkäydinnesteen COX-2-pitoisuuden diagnostinen arvo erottaa kognitiivisesti terveet Alzheimerin tautia sairastavista ei osoittautunut analyysin perusteella tilastollisesti merkittäväksi. (Andreadou ym. 2021)

Tutkijat tutkivat myös aivo-selkäydinnesteen ja seerumin LPS-tasojen mahdollista korrelaatiota COX-1/2-tasoihin ja potilaiden kognitiiviseen suorituskäyttöön MMSE-testin (Mini-Mental State Examination) pistemäärinä arvioituna koko potilaskohortissa. Tutkimustulosten mukaan koko kohortissa LPS-tasot korreloivat positiivisesti sekä COX-1-että COX-2-tasojen kanssa sekä seerumissa että aivo-selkäydinnesteessä. (Andreadou ym. 2021)

Tutkimustulokset osoittivat myös, että koko kohortissa aivo-selkäydinnesteen ja seerumin LPS-tasot korreloivat positiivisesti COX-1/2-tasojen lisäksi A β 42- ja tau-tasojen kanssa. Koko kohortissa aivo-selkäydinnesteen ja seerumin LPS-tasoilla havaittiin myös tilastollisesti merkittävä negatiivinen korrelaatio MMSE-testituloksiin. (Andreadou ym. 2021)

Tutkijat analysoivat myös seerumin ja aivo-selkäydinnesteen LPS-tasojen korrelaatiota COX-1/2-, A β 42- ja tau-tasoihin kussakin ryhmässä erikseen. Kognitiivisesti terveiden ryhmässä seerumin LPS-tasot korreloivat merkittävästi COX-1/2-tasoihin. Korrelaatiota A β 42- ja tau-proteiiniin ei puolestaan havaittu. Aivoselkäydinnesteen LPS-tasojen osalta kognitiivisesti terveiden ryhmässä ei havaittu odotetusti korrelaatiota seerumin COX-1/2-, A β 42- ja tau-tasoihin. (Andreadou ym. 2021)

MCI-yksilöiden seerumin LPS-tasot korreloivat seerumin COX-2 tasoihin. Korrelaatiota COX-1-tasoihin A β 42- ja tau-proteiiniin ei havaittu. MCI-yksilöiden aivoselkäydinnesteen

LPS-tasot korreloivat merkittävästi aivoselkäydinnesteen COX-1-tasoihin ja A β 42- ja tau-proteiiniin määriin. (Andreadou ym. 2021)

Alzheimerin tautia sairastavien ryhmässä seerumin LPS-tasojen ei yllättäen havaittu korreloivan COX-1/2-tasoihin. Alzheimerin tautia sairastavien seerumin LPS-tasoilla havaittiin kuitenkin vahva positiivinen korrelaatio tau-proteiinin tasoihin. Korrelaatiota seerumin A β 42-tasoihin ei havaittu. Alzheimerin tautia sairastavien aivo-selkäydinnesteen LPS-tasoilla havaittiin positiivinen korrelaatio COX-1/2-, A β 42- ja tau-proteiinin tasoihin. (Andreadou ym. 2021)

Andreadou ym. (2021) tutkimustulokset osoittivat, että koko potilaskohortissa tarkasteltuna seerumin COX-2- ja LPS-tasoilla oli kaikista vahvin yhteys. Koko potilaskohortissa yhteys oli myös merkittävä seerumin LPS-tasojen ja A β 42- sekä tau-tasojen välillä. Koko potilaskohortin osalta aivo-selkäydinnesteen LPS-tasojen havaittiin korreloivan vahvimmin sekä COX-1- että tau-tasojen kanssa. (Andreadou ym. 2021)

MCI-potilailla aivo-selkäydinnesteen LPS- ja COX-1-tasojen välillä oli vahvin yhteys. Seerumin LPS-tasot olivat MCI-potilailla puolestaan tilastollisesti merkittävässä yhteydessä COX-2- ja A β 42-tasoihin. (Andreadou ym. 2021)

Alzheimerin tautia sairastavilla aivo-selkäydinnesteen LPS-tasot olivat vahvimmin yhteydessä COX-1- ja tau-tasoihin. Seerumin LPS-tasot korreloivat puolestaan vahvimmin seerumin tau-tasojen kanssa. (Andreadou ym. 2021)

Kognitiivisesti terveillä seerumin LPS-tasojen havaittiin korreloivan vahvimmin COX-2-tasojen kanssa. Aivo-selkäydinnesteen LPS-tasojen ei havaittu olevan kognitiivisesti terveillä tilastollisesti merkittävässä yhteydessä COX-1/2- tai A β 42-tasoihin. Kognitiivisesti terveiden aivo-selkäydinnesteen LPS-tasoilla havaittiin kuitenkin tilastollisesti merkittävä yhteys aivo-selkäydinnesteen tau-tasoihin. (Andreadou ym. 2021)

Yhteenvetona Andreadou ym. (2021) tutkimustulokset osoittivat, että koko kohortissa seerumin ja aivo-selkäydinnesteen LPS-tasot korreloivat positiivisesti COX1/2- , A β 42- ja tau-tasoihin sekä negatiivisesti kognitiiviseen suorituskykyyn MMSE-testipisteinä arvioituna. Seerumin LPS-tasot korreloivat voimakkaimmin COX-2-tasojen kanssa, kun taas aivo-selkäydinnesteen LPS-tasot olivat voimakkaimmin yhteydessä COX-1-tasoihin. Nämä tulokset korostavat mikrobietiologian/tulehduksen osallisuuden merkitystä kognitiivisissa rappeumasairauksissa ja tarjoavat uusia näkökulmia LPS:n ja COX-1/2-entsyymien roolista

Alzheimerin taudin patogeneesissä. Tutkimustulosten perusteella Andreadou ym. (2021) ehdottavat, että häiriö veri-aivoesteen toiminnassa parodontopatogeenien virulenssitekijöiden vaikutuksesta voi olla keskeinen selittävä tekijä mikrobi- ja tulehduskomponenttien vuodolle seerumista aivoihin ja päinvastoin ja puoltaisi mikrobi- ja tulehduskomponentin osallisuutta Alzheimerin taudin patogeneesissä.

6.3 Eläinkokeita, joissa havaittu mekanistinen yhteys *P. gingivaliksen* ja heikentyneen kognition välillä

Hao ym. (2022) tutkimuksessa tutkijat tutkivat *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)-infektion vaikutusta Alzheimerin tautiin liittyvään neurodegeneraatioon amyloidiprekursoriproteiini (APP) knock-in (APPKI) hiirimallissa. Lisäksi tutkijat selvittivät komplementtijärjestelmään kuuluvan C1q:n osallisuutta Alzheimerin taudin patogeneesissä.

Tutkimukseen sisällytettiin kuuden viikon ikäisiä APPKI-hiiriä ja kontrolleiksi valittiin samanikäisiä villityypin (WT) hiiriä. Molempien ryhmien hiiret olivat samaa sukupuolta. Ennen kokeellisen parodontiitin indusoimista sekä APPKI- että WT-hiiriryhmän sisällä tehtiin ryhmien sisäinen satunnaistettu jako kontrollihiiriin ja *P. gingivalis*-infektion saaviin hiiriin. (Hao ym. 2022)

Ennen *P. gingivalis*-infektiota suun normaaliflooraa pyrittiin vähentämään lisäämällä rottien juomaveteen kanamysiiniä (1mg/ml) viikon ajaksi. Kolme päivää antibioottialtistuksen jälkeen APPKI-ryhmän hiiriin injektoitiin *P. gingivalista* 100 µl:aa osana 2 %:sta karboksimeetyyliselluloosa (CMC)-liuosta. Kontrolliryhmiin injektoitiin 100 µl:aa CMC-liuosta. Injektiot suoritettiin kolme kertaa viikossa kuuden viikon ajan kokeellisen parodontiittimallin luomiseksi. (Hao ym. 2022)

Hiirille suoritettiin yhteensä kolme käyttäytymistä mittaava testiä 4, 6 ja 10 kuukauden ikäisinä. Ensimmäisenä testipäivänä hiirille tehtiin lokomotorista toiminta mittaava open field-testi. Toisena testipäivänä hiirten ahdistuneisuuteen liittyvää käyttäytymistä testattiin elevated zero maze (EZM)-testillä. Kolmas testi oli oppimista ja muistikykyä testaava Morris water maze (MWM)-testi, joka suoritettiin yhden lepopäivän jälkeen yhteensä viiden päivän ajan EZM-testin suorittamisesta. (Hao ym. 2022)

Tutkimustulosten mukaan 4 kuukauden testituloksissa ei havaittu merkittäviä eroja hiirten välillä. 6 kuukauden testituloksissa *P. gingivalis*-APPKI-hiirien lokomotorinen aktiivisuus OF-testillä mitattuna ja ahdistuneisuuteen liittyvä käyttäytyminen EZM-testillä mitattuna olivat merkittävästi suurempia kuin *P. gingivalis*-vapailta APPKI-hiirillä. Lisäksi *P. gingivalis*-APPKI-hiirten suoriutuminen oppimista ja muistikykyä mittaavassa MWM-testissä oli *P. gingivalis*-vapaita APPKI-hiiriä heikompaa. *P. gingivalis*-WT- ja *P. gingivalis*-vapaiden WT-hiirien ja *P. gingivalis*-vapaiden WT- ja *P. gingivalis*-vapaiden APPKI hiirien välillä ei havaittu merkittäviä eroja testituloksissa. 10 kuukauden testituloksissa *P. gingivalis*-vapaita APPKI-hiiret pärjäsivät merkittävästi huonommin MWM-testissä *P. gingivalis*-vapaisiin WT-hiiriin verrattuna. Lisäksi *P. gingivalis*-APPKI-hiirillä havaittiin 10 kuukauden kohdalla testitulosten perusteella merkittävää kognition heikkenemistä. Tutkimuslöydökset antavat viitteitä siitä, että *P. gingivalis*-infektio nopeuttaa kognition heikkenemistä ja heikentää suoriutumista behavioraalisisissa testeissä APPKI-hiirillä. (Hao ym. 2022)

Tutkimustulosten mukaan *P. gingivalis*-infektio lisäsi alveoliluukatoa merkittävästi 4 kuukauden ikäisissä APPKI- ja WT-hiirissä verrattuna hiiriryhmien infektiovapaisiin kontroleihin. Lisäksi *P. gingivalis*-infektio lisäsi TLR2-reseptorin ja proinflammatoristen sytokiinien (IL-1 β , IL-6 ja TNF- α) geeniekspressiota ienkudoksessa. Myös komplementtijärjestelmän klassisen aktivaatioreitin keskeisen aloittavan proteiinin C1q:n alayksikön C1qa:n sekä C3-komplementin geeniekspression havaittiin lisääntyvän merkittävästi sekä APPKI- että WT-hiirien ienkudoksessa *P. gingivalis*-infektion seurauksena. Huomionarvoista oli myös se, että ilman *P. gingivalis*-infektiota APPKI-hiirillä havaittiin WT-hiiriä suuremmat proinflammatoristen sytokiinien tasot, suurempi alveoliluukadon määrä ja komplementtiin liittyvä geeniekspressio. Tulos viittaa siihen, että APPKI-hiirillä oli jo lähtötilanteessa voimakkaampi parodontiitti. (Hao ym. 2022)

Tutkijat tutkivat immunohistokemiallisen analyysin avulla *P. gingivalis*-infektion vaikutusta aivokudoksen A β -tuotantoon ja amyloidiplakkien kertymiseen *P. gingivalis*-vapailta ja *P. gingivalis*-APPKI-hiirillä. Tutkimustulosten mukaan *P. gingivalis*-infektio lisäsi A β :n ja amyloidiplakkien määrää APPKI-hiirten hippokampusissa ja korteksilla, kun muutoksia seurattiin hiirien ollessa 6 ja 10 kuukauden ikäisiä. (Hao ym. 2022)

Tutkijat kykenivät myös osoittamaan, että *P. gingivalis* kykenee invasoitumaan aivoihin. *P. gingivalis*in invaasio osoitettiin eristämällä *P. gingivalis*in virulenssin ja selviytymisen

kannalta erittäin korkean spesifisyyden omaava *hmuY*-geeni *P.g*-WT- ja *P.g*-APPKI-hiirien aivokudoksesta. Molemmista hiiriryhmissä myös *P. gingivaliksen* *16S rRNA*:n ilmentyminen hiirien aivoissa oli myös merkittävästi lisääntynyt, ja vielä niin, että *P. gingivalis*-APPKI-ryhmän hiirin aivoissa ekspressio oli *P. gingivalis*-WT-hiiriä suurempaa. *P. gingivaliksen* osoittamiseen aivokudoksesta käytettiin myös hybridisaatiota *P. gingivalikselle* spesifisen *16S rRNA*-koettimen avulla. *P. gingivalis*-APPKI-hiirten aivoista havaittiin *16S rRNA*-koettimen hybridisoitumista bakteeriaggregaattien kanssa paikantuen aivosolujen perinukleaariseen alueelle. (Hao ym. 2022)

Tutkijat havaitsivat *P. gingivaliksen* kykenevän myötävaikuttamaan neuroinflammaatioon ja komplementin aktivoitumiseen. Tutkimustulokset osoittivat *P. gingivalis*-infektion lisäävän TLR2:n ja proinflammatoristen sytokiinien geeniekspressiota WT- ja APPKI-hiirien aivokudoksessa. Samanlaiset tulokset havaittiin myös C1qa:n ja C3:n geeni- ja proteiiniekspression osalta. Nämä tulokset viittaavat siihen, että parodontiittiin liittyvä tulehdus edistää Alzheimerin tautiin liittyvää neuroinflammaatiota ainakin osittain komplementtijärjestelmän aktivaation kautta. (Hao ym. 2022)

Tutkimuksessa havaittiin myös, että *P. gingivalis*-infektio lisää aktivoituneiden mikrogliaosolujen määrää APPKI-hiirissä. Lisäksi aktivoituneiden mikrogliaosolujen havaittiin paikantuvan merkittävässä määrin C1qa-komplementin yhteyteen. Aktivoituneet mikrogliaosolut ovat pääasiallinen tulehdustekijöiden lähde Alzheimerin taudin patogeneesissä. Tutkimuslöydös tukee näin ollen *P. gingivalis*-infektion yhteyttä Alzheimerin tautiin. (Hao ym. 2022)

P. gingivaliksen kyky indusoida A β -kertymien virittämien mikrogliaosolujen neuroinflammatorista vaikutusta osoitettiin, kun tutkijat viljelivät mikrogliaosoluja erilaisissa kasvatusviljelmissä. Yhdellä kasvatusalustalla viljeltiin mikrogliaosolujen lisäksi A β -oligomeereja (A β o). Toisessa kasvatusviljelmässä kasvoi mikrogliaosolujen lisäksi *P. gingivalista*. Kolmas viljelmä koostui mikrogliaosoluista ja A β -oligomeereista yhdessä *P. gingivaliksen* kanssa. Neljännen kasvualustan mikrogliaosolut puolestaan esikäsiteltiin ensin A β -oligomeereilla, minkä jälkeen maljalle tehtiin *P. gingivalis*-infektio. Tutkijoilla oli käytössä useita eri kasvatusviljelmiä, joissa A β -oligomeerien pitoisuudet vaihtelivat (0,1, 1, tai 10 μ m). (Hao ym. 2020)

Tutkimustulosten mukaan yllättäen A β -oligomeerit yksistään eri pitoisuuksilla indusoivat vain erittäin vähän mikrogliaosolujen proinflammatorista sytokiinierytystä ja C1qa-

geeniekspressiota. A β -*P. gingivalis*-yhteisstimulaatio puolestaan vähensi mikroglia-solujen proinflammatoristen sytokiinien tuotantoa verrattuna viljelmään, jolle tehtiin vain *P. gingivalis*-stimulaatio. Kuitenkin maljalla, jossa mikroglia-solut esikäsiteltiin A β :lla ennen *P. gingivalis*-infektiota havaittiin mikroglia-solujen merkittävä proinflammatoristen sytokiinien ja C1q-geeniekspression voimistuminen *P. gingivalis*-vaikutuksesta. (Hao ym. 2022)

Tutkijat ehdottavat, että kognitiivisesti terveessä tilassa A β -plakeilla voi olla hermokudoksessa anti-inflammatorinen vaikutus. Osoituksena aiempaan tutkimusnäyttöön tutkijat ehdottavat, että A β -plakit voivat suojata hermosoluja patogeeneilta muodostamalla fibrillejä, jotka osallistuvat patogeenien eristämiseen ja tuhoamiseen. A β -plakkien anti-inflammatoriset ominaisuudet voivat selittää, miksi A β -*P. gingivalis*-yhteisstimulaatio vähensi mikroglia-solujen proinflammatoristen sytokiinien ilmentymistä verrattuna viljelmään, jolle tehtiin vain *P. gingivalis*-stimulaatio. (Hao ym. 2022)

C1-INH on C1-komplementin proteaasi-inhibiittori (Markovic ym. 2000). Kun tutkijat esikäsitelivät mikroglia-soluviljelmää C1-INH:lla ennen A β - ja sen jälkeistä *P. gingivalis*-stimulaatiota, A β -oligomeerien virittämien mikroglia-solujen proinflammatoristen sytokiinien tuotannossa ja C1q-ekspressiossa tapahtui merkittävää vähenemistä. *P. gingivalis*-yhteys komplementin aktivaatioon osoitettiin myös C1q-knock-down-mikroglia-solumallissa, jossa *P. gingivalis*-indusoima proinflammatoristen sytokiinien erityis väheni merkittävästi. Nämä tulokset viittaavat siihen, että komplementti C1q voi olla keskeinen *P. gingivalis*-välitteinen neuroinflammaatiota indusoiva komponentti Alzheimerin taudin patogeneesissä. (Hao ym. 2022)

Tutkijat osoittivat myös, että *P. gingivalis*-infektio lisää mikroglia-solujen C1q-välitteistä synapsikatoa APPKI-hiirillä. Keskeinen löydös oli, että C1q:n havaittiin toimivan mikroglia-solujen fagosytoosimarkkereina synapsien hävittämistä varten. Nämä tulokset viittaavat siihen, että C1q-komplementti ja mikroglia-solut kykenevät kommunikoimaan keskenään ja myötävaikuttamaan neurodegeneraatioon synapsikadon kautta. *P. gingivalis*-infektiolla voi olla tässä merkittävä potentoiva vaikutus. (Hao ym. 2022)

Tutkimustulosten pohjalta tutkijat ehdottavat ”kahden osuman”-mallia Alzheimerin taudin etenemisestä parodontiitin myötävaikutuksesta. Mallin mukaan tutkijat olettavat Alzheimerin taudin patogeneesiin liittyvien A β -kertymien toimivan ensimmäisenä ”osumana”, jonka vaikutuksesta mikroglia-soluissa tapahtuu ”virittymistä” eli vähäistä

aktivaatiota. Tämä indusoi mikroglia-solujen C1q-ekspressiota ja proinflammatoristen sytokiinien eritystä. Parodontopato-genien kyky tunkeutua veri-aivoesteen läpi aivokudokseen toimii puolestaan toisena ”osumana” voimistaen A β -kertymien virittämien mikroglia-solujen tulehduksellista aktivaatiota. Kahden osuman mallin mukaan parodontiitilla olisi siis Alzheimerin taudin patogeneesissä neuroinflammaatiota voimistava vaikutus. (Hao ym. 2022)

Kantarci ym. (2020) tutkimuksen hypoteesina oli, että hiirillä kokeellisesti aiheutettu parodontiitti on yhteydessä Alzheimerin tautiin liittyvään neuroinflammaatioon. Tutkijat käyttivät Alzheimerin taudin patogeneesin tutkimuksessa vakiintunutta hiirikantaa, jolle on ominaista A β :n nopea kertyminen (5xFAD hiiret). Verrokkeina tutkimuksessa toimivat normaalit villityypin hiiret (WT-hiiret). Tutkimus oli tutkijoiden mukaan tietävästi ensimmäinen, jossa tarkasteltiin keinotekoisien ligatuura-indusoidun parodontiitin yhteyttä neuroinflammatorisiin prosesseihin Alzheimerin taudin patogeneesin tutkimuksessa vakiintuneella hiirikannalla.

Tutkimukseen sisällytettiin yhteensä 15 kahdeksan kuukauden ikäistä 5xFAD-uroshiirtä ja yhteensä 15 kahdeksan kuukauden ikäistä villityypin-uroshiirtä. Molemmista koeryhmistä valittiin kahdeksan hiirtä, joihin indusoitii kokeellisesti aiheutettu parodontiitti. Tässä tutkimuksessa keinotekoisien parodontiitin luomiseen käytettiin ligatuura-indusoitua PD-mallia. Silkkiligatuurat sijoitettiin subgingivaalisesti oikeaan ja vasempaan toiseen ylämolaariin mikrokirurgisesti puudutuksessa. Kroonisen parodontiitin kehittymiseen meni neljä viikkoa. Tutkimuksen aikana hiirien terveydentilaa seurattiin viikoittaisin punnituksin. Ligatuura-indusoitujen ja indusoimatta jääneiden hiirien painossa ei havaittu tutkimuksen aikana muutoksia. (Kantarci ym. 2020)

Parodontiitin ja alveoliluukadon arviointia varten lopetettujen hiirten yläleuat dissekoitiin irti lihas- ja pehmytkudoksesta säilyttäen kiinnittyneen gingivan eheys, minkä jälkeen yläleuka jaettiin kahteen puoliskoon ylänkisiivien välistä. Oikeaa yläleukapuoliskoä käytettiin morfometristä analyysiä varten ja vasenta yläleukapuoliskoä histologiseen tutkimukseen. Alveoliluukadon määrän arviointia varten oikea yläleukapuolisko värjättiin metyleenisinisellä. Arviointi tehtiin visuaalisesti hyödyntämällä hampaan ja luun kovakudoksen kalkkeutumisaste-eroa, joka saa aikaan eron hampaan ja luun välille. Vasemman yläleukapuoliskon histologisesta leikkeistä arvioitiin luukato histologisesti värjäysmenetelmin. (Kantarci ym. 2020)

Hiiarten lopettamisen jälkeen niiden aivot kerättiin. Vasemman aivopuoliskon leikkeitä käytettiin mikroglia-solujen ja A β -plakkien immunohistologista analyysiä varten. Oikean aivopuoliskon prefrontaalikorteksia käytettiin ELISA-menetelmällä tapahtuvaan A β -tasojen mittaamiseen ja immunohistokemiallisin menetelmin tapahtuvaan inflammatoristen sytokiinien ja kemokiinien määrän arviointiin. (Kantarci ym. 2020)

Tulokset osoittivat, että Alzheimerin taudin kaltainen tila yksistään saa aikaan parodontaalista luukatoa, sillä tutkimuksen lähtötilanteessa 5xFAD-hiirillä ilmeni merkittävää alveoliluukatoa WT-hiiriin verrattuna jo ennen ligatuuran asettamista. Kokeellisen parodontiitin indusoinnin jälkeen merkittävää alveoliluukatoa ilmeni sekä 5xFAD-hiirillä että WT-hiirillä. Makroskooppiset löydökset alveoliluukatoalöydöksistä vahvistettiin ylämolaarin furkaatioalueen histologisista leikkeistä hematoksyliini-eosiini (H&E)-värjäyksellä. (Kantarci ym. 2020)

5xFAD-hiirillä kokeellisen parodontiitin havaittiin lisäävän liukenemattoman A β 42:n määrää verrattuna ligatoimattomiin 5xFAD-hiiriin. A β 40-tasoissa ei havaittu vastaavaa merkittävää yhteyttä. Plakkikertymien määrässä 5xFAD- ja ligatoimattomien 5xFAD-hiirien aivokuorella, hippokampuksessa ja dentate gyruksessa (DG) ei havaittu merkitsevää eroa. (Kantarci ym. 2020)

Tutkijat arvioivat kokeellisen parodontiitin vaikutusta WT- ja 5xFAD-hiirien mikroglia-solujen aktivaatioon Iba1-immunovärjäyksen avulla. WT-hiirillä kokeellinen parodontiitti oli yhteydessä Iba1-immunovärjättyjen mikroglia-solujen merkittävään määrän lisääntymiseen aivojen kortikaalisissa kerroksissa sekä hippokampuksessa. Myös 5xFAD-hiirillä havaittiin odotetusti Iba1-immunovärjäyksellä runsasta mikroglia-solujen kertymää korteksilla ja hippokampuksella. Kokeellinen parodontiitti ei kuitenkaan lisännyt Iba1-immunovärjäyksellä havaittavaa mikroglia-solujen kertymää 5xFAD-hiirillä ligatoimattomiin 5xFAD-hiiriin verrattuna. Paradoksaalisesti ligatoiduilla 5xFAD-hiirillä havaittiin Iba1-immunovärjättyjen mikroglia-solujen vähentymistä dentate gyrus alueella verrattuna ligatoimattomiin 5xFAD-hiiriin.. (Kantarci ym. 2020)

Aktivoituneiden mikroglia-solujen toiminta Alzheimerin taudissa riippuu niiden assosioitumisesta A β -plakkeihin (Condello ym. 2015). Näin ollen Kantarci ym. (2020) pyrkivät selvittämään, onko kokeellisella parodontiitilla yhteys PAM-solujen (plakkiassosioituneiden mikroglia-solujen) tiheyteen 5xFAD-hiirillä. Tutkijat käyttivät kaksoisleimattua fluoresenssia amyloidifibrillien (tioflaviini S, ThS) ja mikroglia-solujen

(Iba1-vasta-aineet) visualisoimiseen. Kaksoisleimatut fluoresenssikuvat osoittivat A β -plakkien lähellä Iba1:n fluoresenssin vähentymistä ligatoiduilla 5xFAD-hiirillä verrattuna ligatoimattomiin 5xFAD-hiiriin. Tulos viittaa siihen, että kokeellinen parodontiitti vähentää PAM-solujen kertymistä A β -plakkien ympärille. Kokeellisen parodontiitin ei havaittu olevan yhteydessä tioflaviini S:n ja Iba1:n kokonaisfluoresenssiin.

Tutkijat tutkivat kokeellisen parodontiitin vaikutusta sytokiinien ilmentymiseen WT- ja 5xFAD-hiirien aivoissa immunomäärityksen avulla. Ligatoimattomilla 5xFAD hiirillä TNF- α :n ja IL-10:n ekspressio oli merkittävästi suurempaa ja GM-CSF:n ja IFN- γ :n merkittävästi vähäisempää kuin ligatoimattomilla WT-hiirillä. Ligaation havaittiin vähentävän merkittävästi IL-6, MCP-1-, GM-CSF- ja IFN- γ -ekspressiota WT-hiirillä. 5xFAD-hiirillä ligaatio vähensi merkittävästi IL-10:n ilmenemistä. Ligatoiduilla 5xFAD hiirillä MCP-1 ekspressio oli merkittävästi suurempaa WT-hiiriin verrattuna. Arvioitaessa aktiivista tulehduksellista tilaa käyttäen proinflammatorisen TNF- α :n ja anti-inflammatorisen IL-10:n välistä suhdetta indeksinä, 5xFAD hiirillä tulehdustila aivoissa oli tilastollisesti merkittävästi suurempi sekä ennen ligatuuran asettamista että sen asettamisen jälkeen verrattuna WT-hiiriin. (Kantarci ym. 2020)

Tutkijat pitävät yllättävänä löydöksenä, että 5xFAD-hiirillä ligaation ei havaittu lisäävän IL-1 β :n, IL-6:n, IFN- γ ja GM-CSF:n ekspressiota tässä tutkimuksessa käytetyillä kahdeksan kuukauden ikäisillä hiirillä. Tutkijoiden aiemmassa tutkimuksessa (Kantarci ym. 2018), jossa samat hiiret olivat kolmen kuukauden ikäisiä, havaittiin näiden sytokiinien ekspressiossa merkittävää lisääntymistä. Vaikka on näyttöä sytokiiniekspression vaihtelevuudesta Alzheimerin taudin patogeneesissä, tutkijat ehdottavat tämän ristiriidan liittyvän ainakin osittain mahdollisesti mikroglia-solujen kykyyn toimia suojaavina tekijöinä vasteena kertyville A β -plakeille ja tähän liittyvään vaihtelevaan sytokiinituotantoon. Toinen selittävä tekijä voi olla A β -plakkien anti-inflammatorinen, patogeneesi- ja virulenssitekijöitä puskuroiva vaikutus A β -plakkien kerääntymisen alkuvaiheessa, mikä näkyy sytokiiniekspression vaihtelevuudessa. Ilmeisen ristiriidan ymmärtämiseksi aivojen sytokiiniprofiilissa tapahtuvat muutokset tarvitsevat jatkossa lisää tutkimuksia. (Kantarci ym. 2020)

Kantarci ym. (2020) tutkimustulokset nostivat esiin plakkiassosioituneiden mikroglia-solujen mahdollisesti keskeisen roolin Alzheimerin taudin patogeneesissä. Keskeinen löydös oli myös se, että 5xFAD-hiirillä kokeellisen parodontiitin havaittiin lisäävän liukenemattoman

A β 42-määrä verrattuna ligatoimattomiin 5xFAD-hiiriin, mutta ligaatio kuitenkin vähensi PAM-solujen kertymistä A β -plakkien ympärillä. (Kantarci ym. 2020)

Tutkijat ehdottavat tämän selittyvän sillä, että parodontiitin aiheuttama lisääntynyt tulehduskuormitus aiheuttaa muutoksia plakkiassosioituneiden mikrogliasolujen luontaisessa roolissa toimia suojaavana barrierina A β -plakkien ympärillä Alzheimerin taudin patogeneesissä. PAM-solujen dysfunktion seurauksena plakkien ympärille muodostuu ns. ”hot spotteja”, jotka aiheuttavat A β -plakkien järjestäytymisessä häiriöitä ja lisäävät siten niiden neurotoksisuutta aivoissa. Normaalitilassa PAM-solujen katsotaan omaavan neuroprotektiivisen roolin, sillä niillä on kyky fagosytoida A β -plakkeja ja estää neurodegeneraatiota. Dysfunktionaalisten PAM-solujen indusoima neuroinflammaatio voi edelleen häiritä ei-plakkiassosioituneiden mikrogliasolujen ja muiden keskushermoston solujen toimintaa, minkä takia parodontiitin vaikutuksella PAM-soluihin voi olla keskeinen rooli neuroinflammaation säätelyssä. Tätä havaintoa tukevat myös tutkimuksen havainnot kokeellisen parodontiitin aiheuttamassa poikkeavasta sytokiiniekspressiosta aivoissa, mikä on mitä todennäköisemmin yhteydessä Alzheimerin taudin neuroinflammaatioon. (Kantarci ym. 2020)

Johtopäätöksenä tutkimustuloksistaan tutkijat esittävät, että luontaisesti protektiivisen roolin omaavaat PAM-solut voivat Alzheimerin tautiin liittyvän inflammaation lisäksi saada lisävaikutusta parodontiitin indusoimasta tulehduksesta, mikä voi potentoida PAM-solujen toimintahäiriön kehittymistä. Vaihtoehtoisesti tutkijat esittävät, että parodontiitti voi altistaa PAM-soluja hyperaktivaatiolle ja dysfunktion nopeammalle kehittymiselle Alzheimerin taudin patogeneesin etenemisen myötä. Molemmat hypoteesit vaativat lisätutkimusta, mutta ovat tutkijoiden mielestä kovin mahdollisia tutkimusnäytön pohjalta, sillä kokeellinen parodontiitti lisäsi merkittävästi mikrogliaoluaktivaatiota. Tämä oli erittäin selkeästi havaittavissa tutkimuksessa ligatoiduilla WT-hiirillä. (Kantarci ym. 2020)

Hu ym. (2020) tutkivat parodontiitin ja oppimis- ja muistihäiriöiden välistä yhteyttä Sprague Dawley rotilla. Tutkimuksessa 32 kymmenen viikon ikäistä Sprague Dawley-urostrottaa jaettiin satunnaistetusti neljään eri ryhmään: *P. gingivalis*-LPS-ryhmä, *P. gingivalis*-LPS-TAK-242-ryhmä, TAK-242-ryhmä ja kontrolliryhmä. TAK-242 (tunnetaan myös nimellä CLI-095) on spesifinen TLR4-reseptorin inhibiittori. 10 viikon iässä LPS- ja LPS-TAK-242-urostrotaryhmien ensimmäisten ylämolaarien palatinaaliseen ientaskuun istutettiin nukutuksessa *P. gingivalis*-peräistä LPS-polysakkaridia (0,5mg/kg) 10 viikon ajan kaksi

kertaa viikossa keinotekoisien parodontiitin luomiseksi. LPS-TAK-242-ryhmän rotille TAK-242 (0,5mg/kg) injektoitiin etukäteen. TAK-242-ryhmälle TAK-242 (0,5mg/kg) injektoitiin kahdesti viikossa 10 viikon ajan. Kontrolliryhmän rotille injisoitiin vastaava määrä suolaliuosta. LPS- ja TAK-242-annosmäärien suuruudet määräytyivät aiemman tutkimusnäytön perusteella.

Kolmen päivän jälkeen viimeisestä injektioista rotille suoritettiin lokomotorista aktiiviteettia arvioiva avoin kenttätesti (open field test, OFT), ja sen jälkeen oppimis- ja muistikykyä arvioiva Morris Water Maze (MWM)-testi. Tutkimuksessa ei havaittu tilastollisesti merkittäviä eroja eri ryhmän rottien lokomotorisessa aktiiviteetissa OFT-testillä arvioituna. MWM-testitulosten perusteella puolestaan *P. gingivalis*-LPS-ryhmän rotilla parodontiitti oli tilastollisesti merkittävässä yhteydessä rottien oppimisen ja muistitoimintojen heikkenemiseen kontrolliryhmään verrattuna (Hu ym. 2020)

MWM-testituloksissa *P. gingivalis*-LPS-ryhmän latenssiajat olivat merkittävästi suurempia testipäivinä 3,4 ja 5 kontrolliryhmän rottiin verrattuna. Kontrolliryhmän ja LPS-TAK-242-ryhmän rottien välillä ei havaittu merkittäviä eroja latenssiajassa. (Hu ym. 2020)

MWM-testiprotokollan mukaisesti rottien spatiaalisen muistin arvioimiseksi testipäivänä 6 alusta poistettiin, rottien uimista seurattiin 60 sekunnin ajan ja rekisteröitiin kunkin rotan viettämä aika alustan sisältäneessä kohdesektorissa sekä alustan ylitysten määrä. Tutkimustulosten mukaan *P. gingivalis*-LPS-ryhmän rotilla havaittiin merkittävää vähenemistä molemmissa mitatuissa suureissa kontrollirottiin verrattuna. Kontrolliryhmän rotat oppivat heti navigoimaan poistetun alustan sektorille. MWM-testituloksissa *P. gingivalis*-LPS-TAK-242- ja TAK-242-ryhmän rottien välillä ei havaittu tilastollisesti merkittäviä eroja. MWM-testin tulokset viittaavat siihen, että *P. gingivalis*-LPS:n indusoima parodontiitti voi olla keskeinen oppimisen ja muistitoimintojen heikkenemisen riskitekijä. (Hu ym. 2020)

Rottien yläleuan alveoliluun resorption arvioimiseen käytettiin mikro-tietokonetomografiaa (micro-CT). Parametreina mittauksessa käytettiin luun tilavuutta suhteessa kokonaistilavuuteen (BV/TV), luun pinnan suhdetta luutilavuuteen (BS/BV) ja luun mineraalitiheyttä (BMD). *P. gingivalis*-LPS-ryhmässä havaittiin BV/TV-suhteen vähenemistä ja BS/BV-suhteen kasvamista tilastollisesti merkittävästi kontrolliryhmään

verrattuna. Tämä osoitti, että *P. gingivalis*-LPS voi indusoida alveoliluun resorpoitumista. TAK-242:lla oli resorptiota inhiboiva vaikutus. (Hu ym. 2020)

Parodontiitin vaikutusta hiirten LPS- ja proinflammatoristen sytokiinien tasoihin plasmassa tutkittiin entsyymivälitteisen immunosorbenttimäärityksen (ELISA) avulla. Plasman IL-1 β , IL-6-, IL-8-, IL-21- ja LPS-tasot olivat huomattavasti korkeampia *P. gingivalis*-LPS-ryhmässä kuin kontrolliryhmässä. LPS-TAK-242-ryhmässä havaittiin puolestaan kyseisten ekspressiotasojen olevan matalammat kuin *P. gingivalis*-LPS-ryhmässä. (Hu ym. 2020)

RT-PCR-menetelmällä tutkittiin parodontiitin vaikutusta proinflammatoristen sytokiinien ekspressioon rottien aivokuorella. *P. gingivalis*-LPS-rottien aivokuorella IL-1 β -, IL-6-, IL-8, IL-1-proteiini ja -mRNA-tasot olivat merkittävästi suurempia kontrolliryhmään verrattuna. LPS-TAK-242-ryhmässä IL-1 β -, IL-6 ja IL-8-tasot olivat puolestaan pienemmät *P. gingivalis*-LPS-ryhmään verrattuna. Tulos osoittaa, että *P. gingivalis*-LPS lisää proinflammatoristen sytokiinien ekspressiota keskushermostossa. TAK-242:lla puolestaan on tulosten perusteella ekspressiota merkittävästi inhiboiva vaikutus. Tutkimustulokset osoittivat siis *P. gingivalis*-LPS:n olevan yhteydessä proinflammatoristen sytokiinien ekspressiotasojen kohoamiseen sekä plasmassa että aivokuorella. (Hu ym. 2020)

Parodontiitin vaikutusta aivokuoren mikroglia-solujen ja astrozyttien aktivaatioon tutkittiin hiirien aivokudosleikkeistä immunohistokemiallisesti spesifisten vasta-ainevärjäysten avulla. Aktivoituneiden mikroglia-solujen osoitus tehtiin Iba1:n avulla ja astrozyttien GFAP-värjäyksen avulla. Tutkimustulosten perusteella havaittiin mikroglia-solujen ja astrozyttien suurempaa aktivaatiota *P. gingivalis*-LPS-ryhmän rottien aivokorteksilla kontrolliryhmän rottiin verrattuna. Tulos viittaa *P. gingivalis*-LPS:n indusoiman parodontiitin ja neuroinflammaation väliseen yhteyteen, jossa aktivoituneet mikroglia- ja astrozytit toimivat keskeisenä välittäjänä. (Hu ym. 2020)

Hu ym. (2020) tutkimustulokset osoittivat myös, että *P. gingivalis*-LPS-rotilla APP:n, APP:n homologien (APLP1 ja APLP2), BACE1:n (β -sekretaasi), PS2:n (γ -sekretaasi) ja tau-proteiinin ekspressio lisääntyivät korteksilla. Lisäksi *P. gingivalis*-LPS-rotilla solunsisäisissä A β 1-42- ja APP-pitoisuuksissa havaittiin lisääntymistä. Tämä havaittiin keltaruskeina sytoplasmisina partikkeleina histologisissa leikkeissä. TAK-242:lla oli kaikkien edellä mainittujen tekijöiden ekspressiota vähentävä vaikutus. Tutkimustulosten mukaan *P. gingivalis*-LPS voi edistää APP-proteiinin epänormaalia prosessointia lisäämällä β - ja γ -sekretaasin ekspressiota. (Hu ym. 2020)

Tutkimuksessa havaittiin myös A β 1-40/A β 1-42-suhteen suurentuminen *P. gingivalis*-LPS-rottien plasmassa ja aivokuorella. Lisäksi lisääntynyt BACE-1 ja APP-ekspressio *P. gingivalis*-LPS-rottien korteksilla vahvisti *P. gingivalis*-LPS:n yhteyttä APP-proteiinin epänormaaliin eli β -sekretaasille spesifiseen APP-proteiinin prosessointiin lisääntyneen β -sekretaasin ekspression kautta. LPS-TAK-242-ryhmässä APP:n prosessointiin liittyvä mRNA- ja proteiiniekspressio oli vähäisempää *P. gingivalis*-LPS-rottiin verrattuna. (Hu ym. 2020)

APP-proteiinin prosessoinnin häiriintyminen voi lisätä Alzheimerin taudin patogeneesissä keskeisten A β -kertymien muodostusta (Hu ym. 2020). Perinteisesti on uskottu, että A β :n muodostuminen tapahtuu aivokudoksessa (Bu ym. 2018). On kuitenkin olemassa tutkimusnäyttöä, että A β -synteesiä voi tapahtua myös perifeerisissä kudoksissa mm. verihiutaleissa, maksan monosyyteissä/makrofageissa, ihon fibroblasteissa, luustolihasoluissa ja aivoverisuonten sileälihassoluissa (Citron ym. 1994, Li ym. 1995, Kuo ym. 2000, Van Nostrand & Melchor 2001, DeMattos ym. 2002, Nie ym. 2019).

Koska Hu ym. (2020) havaitsivat A β 1-40/A β 1-42-suhteen suurentumista sekä *P. gingivalis*-LPS-rottien plasmassa että aivokuorella tutkijat ehdottavat, että aivoperäisillä A β -kertymillä voi mahdollisesti olla myös perifeerinen alkuperä. Kun systeeminen A β kulkeutuu verenkierron kautta aivokudokseen, sillä voi olla aivojen A β -kertymää lisäävä ja siten neuroinflammaatiota potentioiva vaikutus. Tutkimustuloksiinsa vedoten Hu ym. (2020) ehdottavat, että parodontiitti voi olla yhteydessä epäsuorasti tai suorasti A β -kertymien muodostumiseen myös perifeerisissä kudoksissa.

Hu ym. (2020) tutkimuksessa TLR4/NF- κ B-signalointireitin aktivaatiota mitattiin RT-PCR:n avulla TLR4- ja CD14-mRNA-ekspressiona arvioituna. Tutkimustulosten mukaan *P. gingivalis*-LPS-rotilla TLR4:n ja CD14-mRNA:n ekspressio PBMC-soluissa (peripheral blood mononuclear cells) ja korteksilla oli 2- ja 1,5-kertaa ja suurempaa kontrollirottiin verrattuna. TAK-242 havaittiin inhiboivan molempien ekspressiota. (Hu ym. 2020)

Tutkijat käyttivät Western blot-analyysiä analysoidakseen tarkemmin parodontiitin aiheuttaman neuroinflammaation taustalla olevia mahdollisia mekanismeja. *P. gingivalis*-LPS-ryhmän rotilla TLR4-, CD14-, IRAK1-, p65- ja pp65-ekspressiotasojen havaittiin suurentuneen aivokuorella. TAK-242:n havaittiin hillitsevän ekspressiota. Nämä tekijät ovat keskeisiä TLR4/NF- κ B-signalointireitillä ilmentyviä komponentteja, minkä perusteella

tutkimustulokset viittaavat siihen, että parodontiittiin liittyvä neuroinflammaatio välittyy ainakin osakseen TLR4/NF- κ B-signlontireitin aktivaation kautta. (Hu ym. 2020)

Yhteenvedona Hu ym. (2020) tutkimuksen tulokset osoittivat, että keinotekoisesti luotu parodontiitti *P. gingivalis*-LPS:n avulla oli yhteydessä rottien heikentyneisiin muisti- ja oppimistoimintoihin TLR4/NF- κ B-signlontireitin aktivaation kautta. Keskeisiä löydöksiä olivat proinflammatoristen sytokiinien lisääntyminen plasmassa ja aivokudoksessa, mikrogliaosolujen ja astrosyyttien aktivaatio sekä APP-proteiinin prosessoinnin häiriintyminen parodontiitin vaikutuksesta. Tutkimustulokset osoittavat, että parodontiitti saattaa edistää Alzheimerin taudin patogeneesiä aiheuttamalla merkittävää tulehduskuormitusta sekä perifeerisesti että sentraalisesti (Hu ym. 2020)

6.4 In vitro-kokeet, joissa havaittu mekanistinen yhteys *P. gingivaliksen* ja heikentyneen kognition välillä

Tran ym. (2021) tutkimuksessa hypoteesina oli, että *P. gingivalis* tuottaa sekundaarimetaboliitteja, jotka ovat yhteydessä neurodegeneraatioon mikrogliaosolujen välittämien suorien ja epäsuorien vaikutusmekanismien kautta. Tutkijat olettivat, että *P. gingivalis* ja sen virulenssitekijät ovat yhteydessä mikrogliaosiin ja astrogliaosiin, jotka johtavat neuroinflammaatioon ja edelleen neurodegeneraatioon.

Hypoteesin testaamiseksi tutkijat käsitelivät *P. gingivalista* sisältävällä bakteerimediolla kahta soluviljelmää, joista toisessa viljeltiin ihmisen mikrogliaosoluja. Toisella kasvualustalla puolestaan kasvoi kroonista parodontiittia sairastavilta potilailta eristettyjä neuroneita ja astrosyyttejä. (Tran ym. 2021)

Tran ym. (2021) tutkimustulokset osoittivat, että *P. gingivalis*-stimulaatio mikrogliaosoluja sisältävässä soluviljelmässä lisäsi mikrogliaosolujen TREM-2 ekspressiota stimuloimattomiin mikrogliaosoluihin verrattuna. TREM-2 (triggering receptor expressed on myeloid cells) on mikrogliaosolujen solukalvoreseptori, joka sitoo hyvin monentyypisiä ligandeja (mm. A β -oligomeereja) (Ulrich ym. 2017). Ligandi-TREM2-vuorovaikutus aktivoi solunsisäisen signaalintireitin, joka säätelee mikrogliaosolujen fagosytoosia, metaboliaa, liikkumista, elinkykyä sekä geeniekspressiota (Ulrich ym. 2017).

P. gingivalis-stimulaation havaittiin lisäävän myös mikroglia-solujen CD86-ekspressiota (Tran ym. 2021). CD86 on M1-fenotyypin mikroglia-solujen ekspressoima proinflammatorinen markkeri (Tran ym. 2021). M1-fenotyypin mikroglia-solut eli klassisesti aktivoituneet mikroglia-solut ovat yhteydessä proinflammatoristen sytokiinien tuotantoon, pintaproteiinien tuotantoon ja lisääntyneeseen iNOS-ekspressioon, joka on puolestaan yhteydessä NO-tuotantoon (Lan ym. 2017).

Tutkimustulokset osoittivat, että *P. gingivalis*-stimulaatio lisäsi mikroglia-solujen iNOS-ekspressiota ja NO-tuotantoa stimuloimattomiin mikroglia-soluihin verrattuna. Myös useiden proinflammatoristen sytokiinien ja tulehdusta edistävien komponenttien (IL-8, IL-18, MIF ja Serpin) ekspressio mikroglia-soluissa lisääntyi *P. gingivalis*-vaikutuksesta. (Tran ym. 2021)

Nämä Tran ym. (2021) tutkimustulokset osoittivat, että *P. gingivalis*-peräinen bakteeristimulaatio indusoi mikroglia-välitteistä inflammaatiota, jolla voi olla neuroinflammatiota voimistava vaikutus. Tutkimustulokset tukevat myös tutkijoiden hypoteesia siitä, että *P. gingivalis*-infektio voi olla mikrogliaosin kautta yhteydessä Alzheimerin tautiin liittyvään neuroinflammatioon.

Tran ym. (2021) tutkivat myös *P. gingivalis*-yhteyttä neurodegeneraatioon suoran ja epäsuoran mekanismin kautta astrozyttien ja neuronien yhteisviljelmässä. Epäsuoran yhteyden testaamiseksi tutkijat käsitelivät yhteisviljelmää *P. gingivalis*-stimuloituilla mikroglia-soluilla.

Tutkimuksessa sekä suoran *P. gingivalis*-stimulaation että epäsuoran *P. gingivalis*-välitteisen mikroglia-solujen tulehdusellisen aktivaation eli mikrogliaosin havaittiin saavan aikaan merkittäviä muutoksia astrozyttien ja neuroneiden solumorfologiassa. Lisäksi suoran ja epäsuoran stimulaation havaittiin lisäävän astrozyttien GFAP-ekspressiota. GFAP (glial fibrillary acidic protein) on reaktiivisten astrozyttien ilmentämä proteiini. *P. gingivalis*-stimuloituilla mikroglia-soluilla käsitellyissä astrozytteissa havaittiin stimuloimattomiin astrozytteihin verrattuna lähes 9-kertaa suuremmat GFAP-ekspressiotasot. *P. gingivalis*-stimulaatio yksin nosti GFAP-ekspressiotasoja noin 7-kertaisesti stimuloimattomiin astrozytteihin verrattuna. (Tran ym. 2021)

Tran ym. (2021) osoittivat myös, että *P. gingivalis*-välitteinen mikrogliaosi sai aikaan suurempaa neurodegeneraatiota neuroneiden pTau-ekspressiotasoina arvioituina verrattuna suoraan *P. gingivalis*-stimulaatioon. pTau-ekspressiotasot olivat noin 11,25- ja 9,5-kertaisia

P. gingivalis-välitteisen mikrogliaosin ja *P. gingivalis*-stimulaation seurauksena stimuloimattomiin neuroneihin verrattuna.

P. gingivalis-välitteisen mikrogliaosin yhteys neurodegeneraatioon osoitettiin myös, kun Tran ym. (2021) tutkivat *P. gingivalis*-stimulaation ja *P. gingivalis*-välitteisen mikrogliaosin vaikutusta astrozyytti- ja neuronikatoon propidiumjodidi-(PI)- ja DAPI-värjäyksen avulla. PI-värjäystä käytettiin elävien solujen värjäämiseen ja DAPI-värjäys värjäsi sekä elävien että kuolleiden solujen tumat. Tämän jälkeen tehtiin kuolleiden solujen määritys. Tran ym. (2021) tutkimustulosten mukaan suora *P. gingivalis*-stimulaatio ja *P. gingivalis*-välitteinen mikrogliaosi vähensivät elävien astrozyyttien ja neuronien määrää 70 ja 90 %:ia stimuloimattomiin soluihin verrattuna.

Tran ym. (2021) tutkimustulokset suoran *P. gingivalis*-stimulaation ja epäsuoran *P. gingivalis*-välitteisen mikrogliaosin vaikutuksista astrozyytteihin ja neuroneihin puoltavat Alzheimeriin tautiin liittyvän *P. gingivalis*-infektion yhteyttä neurodegeneratiivista mikrogliaosiin. Tähän liittyen Tran ym. (2021) osoittivat myös, että *P. gingivalis*-stimulaatio ja *P. gingivalis*-välitteinen mikrogliaosi lisäsivät proinflammatoristen sytokiinien (ICAM-1, CXCL1, CCL2, IL-6, IL-8, IL-18 ja Serpin) tuotantoa astrozyyttien ja neuroneiden yhteisviljelmässä. *P. gingivalis*-stimulaatiolla havaittiin kuitenkin olevan *P. gingivalis*-välitteistä mikrogliaosia voimakkaampi ekspressiota indusoiva vaikutus IL-18:n ekspressiota lukuunottamatta (Tran ym. 2021).

Koska tutkimustulokset osoittivat, että sekä *P. gingivalis*-stimulaatio että *P. gingivalis*-välitteinen mikrogliaosi lisäsivät astrozyytti- ja neuronikatoa, tutkijat tutkivat onko astrogliaosilla ja mikrogliaosilla eli astrozyyttien ja mikrogliaosolujen tulehduksellisella aktivaatiolla mahdollisesti bidirektionaalinen vaikutus toisiinsa. Koska mikrogliaosi indusoi astrozyytti- ja neuronikatoa, astrogliaosi voi olla mahdollisesti yhteydessä mikrogliaosolujen tulehdukselliseen aktivaatioon. Näin ollen mikrogliaosi ja astrogliaosi voivat mahdollisesti ilmetä samaan aikaan ja indusoida toinen toisiaan *P. gingivalis*-infektion yhteydessä. Yhteyden tutkimiseksi tutkijat käsittelivät mikrogliaosoluja *P. gingivaliksella* stimuloituilla neuroneilla ja astrozyyteillä. (Tran ym. 2021)

Astrogliaosin aktivoiman mikrogliaosin havainnointimittareina käytettiin mikrogliaosolujen morfologisia ja aktivaatiosta kertovien keskeisten proteiinien ekspressiotasojen (TREM-2, CD86-, CD206 ja iNOS) muutoksia. Tutkimustulokset osoittivat, että mikrogliaosolujen käsittely *P. gingivaliksella* stimuloituilla neuroneilla ja astrozyyteillä lisäsi mikrogliaosolujen

morfologisia muutoksia sekä TREM-2, iNOS- ja NO-ekspressiota kontrollisoluihin verrattuna. Lisäksi proinflammatorisen CD86-proteiinin ekspressio lisääntyi ja anti-inflammatorisen CD206-proteiinin ekspressio väheni merkittävästi verrattuna stimuloimattomaan mikrogliaisoluviljelmään. (Tran ym. 2021)

Yhteenvetona tutkimustulokset astrogliaosin yhteydestä mikrogliaosiin osoittivat *P.gingivalis*-stimuloitujen neuroneiden ja astrosyyttien indusoivan myös mikrogliaosia. Näin ollen tutkijat esittävät mikrogliaosilla ja astrogliaosilla olevan bidirektionaalinen vaikutus toisiinsa, minkä tutkijat ajattelevat potentioivan neurodegeneraation pahentumista Alzheimerin taudin patogeneesissä. (Tran ym. 2021)

Sukkinaattidehydrogenaasi (SDH) oli yksi tutkimuksessa käytössä olleen *P. gingivalis*-viljelmän sisältämistä yhdisteistä. SDH:n tiedetään lisäävän sukkinatoin hapettumista, mikä puolestaan lisää typpioksidin ja proinflammatoristen sytokiinien eritystä. *P. gingivaliksen* LPS:n vaikutuksesta mikrogliaosolot saattavat indusoida glykolyysiä ja lisätä SDH:n kautta sukkinatoin oksidaatiota. SDH:n ja LPS:n yhteisvaikutuksella eli kostimulaatiolla voisi tutkijoiden mukaan olla siten mikrogliaosia ja edelleen neuroinflammaatiota ja neurodegeneraatiota tehostava vaikutus proinflammatoristen sytokiinien ja typpioksidin lisääntyneen erityksen kautta. (Tran ym. 2021)

Hypoteesin testaamiseksi tutkijat tutkivat LPS:n ja SDH:n yksittäistä ja yhtäaikaista inhibitiota hyödyntämällä mikrogliaosolujen TREM-2, CD86- ja iNOS-vasta-ainevärjäystä. LPS:n sitoutumisen estämiseksi TLR4-kohdereseptoriin tutkijat käyttivät TLR4-reseptorin inhibiittoria (i-TLR4). SDH:n vaikutuksien inhiboimiseen käytettiin puolestaan sille spesifisenä inhibiittorina dimetyylimalonaattia (DMM). (Tran ym. 2021)

Tutkimustulosten mukaan sekä LPS:n ja SDH:n inhibitio yhdessä ja erikseen vähensi mikrogliaosolujen TREM-2-, CD86- ja iNOS-ekspressiota *P. gingivalis*-stimuloituihin mikrogliaosoluihin verrattuna. Yhteisinhibition havaittiin vähentävän ekspressiotasoa voimakkaammin kuin yksittäinen TLR4- tai DMM-inhibitio. Näiden tutkimustulosten valossa tutkijat esittävät, että LPS:llä ja SDH:lla on *P. gingivalis*-välitteistä mikrogliaosia indusoiva kostimulatorinen vaikutus. (Tran ym. 2021)

Dominy ym. (2019) tutkimushypoteesina oli, että *P. gingivalis*-infektio vaikuttaa Alzheimerin taudin patogeneesiin gingipain-virulenssitekijöiden aiheuttaman neurodegeneraation kautta. Yhteyden osoittamiseksi Dominy ym. (2019) tutkivat *P. gingivaliksen* esiintyvyyttä Alzheimerin tautia sairastavien potilaiden aivokudoksessa ja

mahdollisia *P. gingivalis*-riippuvaisia vaikutusmekanismeja neurodegeneraatioon ja Alzheimerin taudin patogeneesiin in vitro ja in vivo-kokeissa. Lisäksi tutkijat toteuttivat prekliinisiä kokeita testatakseen kehittelemiensä pienimolekyylisten gingipain-inhibiittoreiden vaikutusta *P. gingivaliksen* indusoimaan Alzheimerin taudin patologiaan.

Tutkimuksessa käytettiin ihmiskudosnäytteinä histologisesti todennettua Alzheimerin tautia sairastaneiden ja neurologisesti terveiden/muuhun kuin neurologiseen tilaan kuolleiden henkilöiden biopankkiperäisiä postmortem-aivokudosnäytteitä. Tutkimuksessa käytössä olleet ienkudos-, sylki- ja plakkinäytteet kerättiin vapaaehtoisilta kroonista parodontiittia sairastavilta potilailta. Lisäksi vapaaehtoisilta diagnosoitua lievää kognitiivista heikentymää (mild cognitive impairment, MCI) sairastavilta kerättiin tutkimusta varten aivo-selkäydin- ja sylkinäytteet. Tutkimuksessa oraalisen *P. gingivalis*-infektion vaikutuksien tutkimiseen käytettiin spesifisiä patogeenivapaita (SPF) naaraspuolisia BALB/c-hiiriä. (Dominy ym. 2019)

Tutkijat osoittivat, että Alzheimerin taudin diagnoosi oli yhteydessä gingipainien kertymiseen aivokudokseen. Yhteyden testaamiseksi tutkijoilla oli käytössä TMA-monikudosblokkeja (tissue microarray), jotka sisälsivät kuolleiden, samaa sukupuolta edustavien ja saman ikäisten Alzheimerin tautia sairastavien sekä kognitiivisesti terveiden (kontrolliryhmä) henkilöiden gyrus temporalis mediuksesta eristettyjä kudoksenäytteitä. Tutkijat käyttivät TMA-blokkeja immunohistokemiallista (IHC) tutkimusta varten. Immunohistokemiallisen tutkimuksen lisäksi tutkijat hyödynsivät *P. gingivaliksen* osoittamiseen aivokudosnäytteistä immunopresipitaatiota (IP), Western blot-analyysiä (WB) ja PCR-tekniikkaa. (Dominy ym. 2019)

Tutkimuksessa *P. gingivaliksen* gingipain-virulenssitekijöiden osoittamiseen kudoksenäytteistä käytettiin gingipain-virulenssitekijöille spesifisiä vasta-aineita. Nämä olivat arginiini-spesifinen gingipain B (RgpB)-spesifinen CAB101 ja lysini-spesifinen gingipain (Kgp)-spesifinen CAB102. Tau-proteiinin osoittamiseksi tutkijat käyttivät tau-spesifistä DAKO A0024-vasta-ainetta, joka kykenee sitoutumaan sekä fosforyloitumattomaan että fosforyloituneeseen tau-proteiiniin. (Dominy ym. 2019)

Tutkimustulosten mukaan 96 %:ia (51/53) Alzheimerin tautia sairastavien kudoksenäytteistä ilmensi RgpB:tä ja 49%:ia (49/54) Kgp:ta. Alzheimerin tautia sairastavilla RgpB:n ja Kgp:n ilmentyminen oli merkittävästi suurempaa kuin kognitiivisesti terveiden aivoissa.

Kognitiivisesti terveillä vastaavat luvut olivat 39 %:ia (18/46) ja 52 %:ia (26/50). (Dominy ym. 2019)

Alzheimerin taudissa tau-proteiinin kertyminen on osoitettu olevan yksi keskeisistä tekijöistä Alzheimerin taudin patologiassa (Medeiros ym. 2011). Tutkimustulokset osoittivat tilastollisesti merkittävän yhteyden RgpB:n ja tau-proteiinin sekä Kgp:n ja tau-proteiinin ekspresion välillä. Tau-kertymän havaittiin siis korreloivan gingipainien kertymään TMA-blokeissa. (Dominy ym. 2019)

Ubikitiini-proteiini toimii soluissa markkeriproteiinina, joka kiinnittyessään kohdeproteiiniinsa merkitsee sen hajotettavaksi proteasomien kautta (Hershko & Ciechanover 1998). Ubikitiinin tiedetään kerääntyvän myös tau-proteiinien ja A β -plakkien yhteyteen (Hershko & Ciechanover 1998, Chu ym. 2000). TMA-blokkien ubikitiini-värjäyksellä osoitettiin tilastollisesti merkittävä yhteys RgpB:n ja ubikitiinin sekä Kgp:n ja ubikitiinin kertymien välillä. Lisäksi kontrollien TMA-blokeissa havaittiin gingipainien ja tau-ekspresion sekä gingipainien ja ubikitiiniekspression välillä yhteys ja jo olemassa olevaa Alzheimerin taudin patologiaa, mikä tukee käsitystä prekliinisestä Alzheimerin taudista. Sillä tarkoitetaan sairauden vaihdetta, jossa taudille tyypillistä patologisia muutoksia on olemassa ilman kliinisiä oireita. Nämä Dominy ym (2019) tutkimustulokset Alzheimerin taudin ja *P. gingivaliksen* gingipain-virulenssitekijöiden aivokertymien välisestä yhteydestä viittaavat siihen, että RgpB ja Kgp ilmentyvät aivoissa toisistaan riippumatta ja ovat tilastollisesti merkittävässä yhteydessä Alzheimerin taudin patogeenisissä tau- ja ubikitiiniilmentymiin.

Varsinainen hippokampus koostuu, kolmesta osa-alueesta (CA1, CA2 ja CA3), ja hippokampuksen tiedetään olevan keskeinen vaurioituva alue Alzheimerin taudin patogeenisissä (Dominy ym. 2019). Dominy ym. (2019) havaitsivat RgpB:n monoklonaalisen vasta-ainevärjäyksen (18E6) avulla RgpB:n kolokaloituvan gyrus dentatuksen ja hippokampuksen CA1-, CA2- ja CA3-osa-alueiden neuroneiden yhteyteen. RgpB-CAB101-immunofluoresenssilla osoitettiin myös RgpB:n kolokalisaatio MAP2-positiivisten neuroneiden kanssa. Kolokalisaatiota oli havaittavissa myös GFAP-positiivisten astrosyyttien, tau-proteiinien sekä intrasellulaaristen A β -plakkien yhteyteen. Tutkimuksessa ei havaittu kolokalisaatiota IBA1-positiivisten mikroglia-solujen kanssa.

Tutkijat suorittivat kolmelle Alzheimeria tautia sairastaneen potilaan ja kuudelle kognitiivisesti terveelle henkilön aivojen korteksiinäytteille IP-tutkimuksen Kgp-spesifisen

CAB102:n avulla sekä WB-analyysin selvittääkseen *P. gingivalis*-spesifisen Kgp:n ilmentymistä korteksilla. WB-analyysin tulokset osoittivat, että kaikissa Alzheimerin tautia sairastaneiden näytteissä ekspressoitui samaa molekyylipainoa (40) edustava Kgp-viiva osoituksena *P. gingivalis* kantojen W83:n, ATCC33277:n ja FDC381:n Kgp-ekspressiosta korteksilla. Kognitiivisesti terveiden näytteissä viidessä kuudesta ilmeni samanlaista Kgp-ekspressiota kuin Alzheimerin tautia sairastaneiden aivoissa, mikä tukee tutkimuksessa havaitun gingipainien ja ubikitiini-ekspression välisen yhteyden tavoin hypoteesia prekliinisestä Alzheimerin taudista. (Dominy ym. 2019)

Tutkijat tutkivat myös *P. gingivaliksen* geenien ilmentymistä qPCR-analyysin avulla samoilla korteksinäytteillä, joille oli tehty IP- ja WB-tutkimus. qPCR-analyysin avulla havaittiin *P. gingivaliksen 16S rRNA*-geeni kaikissa kolmessa analysoidussa AD-korteksinäytteessä. Myös kuudesta kognitiivisesti terveen näytteessä viidessä havaittiin geenin ilmentymistä. Lisäksi kaikissa *16S rRNA*-positiivisissa AD- ja kontrollinäytteissä myös *P. gingivalikselle* erittäin spesifisen *hmuY*-geenin ilmentyminen oli positiivista. *P. gingivalikselle* spesifisten geenien ekspressio keskushermostossa puoltaa bakteerin kykyä infektoida aivokudosta. (Dominy ym. 2019)

Tutkijat suorittivat qPCR-analyysin tutkiakseen *hmuY*-geenin ilmentymistä lievää tai kohtalaista kognitiivista heikentymää sairastavilta potilailta (n=10) kerätyissä aivo-selkäydin- ja sylkinäytteissä. Tutkimustulokset osoittivat että aivo-selkäydinnestestä seitsemässä kymmenestä havaittiin *hmuY*-geenin ekspressiota. Sylkinäytteissä puolestaan kaikissa ilmeni *hmuY*-geeni. Löydös *hmuY*-geenin ilmentymisestä aivo-selkäydinnesteessä puoltaa myös *P. gingivaliksen* kykyä infektoida keskushermoston kudoksia Alzheimerin taudin patogeneesissä. (Dominy ym. 2019)

Tutkijat selvittivät onko gingipainien kolokalisaatiolla tau-proteiinien yhteyteen yhteys myös niiden pilkkoutumiseen. Tau-fragmentaation on ehdotettu omaavan keskeisen roolin Alzheimerin taudin patologiassa liukenemattoman ja hyperfosforyloituneen tau-proteiinin muodostuksessa (Yin & Kuret 2006, Kovacech & Novak 2010, Taniguchi-Watanabe ym. 2015).

Tutkijat hyödynsivät yhteyden testaamisessa ihmisen neuroblastooma SH-SY5Y-soluja ja koettimena monoklonaalista Tau-5-vasta-ainetta. Tutkimuksessa SH-SY5Y-soluihin tehtiin *P. gingivaliksen* infektiio kolmessa eri konsentraatiossa, ja analyysi suoritettiin kolmessa eri aikapisteessä (1h, 4h, 8h) infektion jälkeen. Tutkimustulokset osoittivat annosriippuvaisen

häviämisen liukoisen tau-proteiinin määrässä yhden tunnin sisällä *P. gingivalis*-infektiosta verrattuna infektiovapaisiin soluihin Tau-5-vasta-ainesignaalilla mitattuna. Osaan SH-SY5Y-soluja infektoidiin gingipaineja ekspressoimatonta *P. gingivalis*-kantaa, ja näissä soluissa liukoisen tau-proteiinin määrän havaittiin säilyvän samalla tasolla kuin infektiovapaissa soluissa. (Dominy ym. 2019)

Tutkijat tutkivat myös gingipainien tau-proteiinin pilkkoutumiskohtaa massaspektrometrian avulla. Löydökset osoittivat, että Tau-5-vasta-aineen epitooppi sisälsi kaksi RgpB:lle ja kaksi Kgp:lle spesifistä pilkkoutumiskohtaa. Tästä päätellen tutkijat osoittivat, että gingipainit olivat yhteydessä liukoisen tau-proteiinin häviämiseen Tau-5-epitoopin pilkkoutumisesta seuraavan Tau-5-signaalin häviämisen kautta *P. gingivalis* infektoiduissa SH-SY5Y-soluissa. (Dominy ym. 2019)

Massaspektrometriset löydökset osoittivat myös, että Rgp tuotti TPSLPTPPTR-tau-fragmentin, joka on osa Tau-5 epitooppia (Dominy ym. 2019). Kyseisen pilkkoutumisfragmentin tiedetään myös olevan yhteinen kaikille tau-isoformeille (Dominy ym. 2019). Fragmenttia on käytetty yleisesti myös tau-tasojen mittaamiseen aivo-selkäydinnesteessä (McAvoy ym. 2014). Sen on havaittu lisääntyneen 1,7-kertaisesti Alzheimerin tautia sairastavien potilaiden aivo-selkäydinnesteessä verrattuna kognitiivisesti terveisiin (McAvoy ym. 2014).

Kgp puolestaan tuotti neljä uniikkia peptidifragmenttia, jotka sisälsivät VQIVYK-sekvenssin (Dominy ym. 2019). Lisäksi Kgp tuotti kaksi uniikkia peptidifragmenttia, joissa esiintyi yhteisenä VQIINK-sekvenssi. Näiden heksapeptidifragmenttien on raportoitu osallistuvan neurofibrillikimppujen (NFT) muodostumiseen (von Bergen ym. 2000, Stöhr ym. 2017). Edellä esitellyt Dominy ym. (2019) tutkimustulokset osoittivat siis, että gingipainit olivat yhteydessä liukoisen tau-proteiinin häviämiseen tau-proteiinin fragmentaation kautta.

Gingipainien in vitro-neurotoksisuuden selvittämiseksi tutkijat altistivat SH-SY5Y-soluja yhdessä ja erikseen RgpB:n ja Kgp:n vaikutuksille 24 tunnin ajan. RgpB:n ja Kgp:n annostelu yhdessä lisäsi merkittävästi solujen aggregaatiota. Kun gingipaineja esikäsiteltiin jodiasetamidilla (irreversiibeli kysteiiniproteaasi-inhibiittori) gingipainien indusoima aggregaatio estyi, mikä osoitti gingipainien proteolyyttisen aktiivisuuden olevan SH-SY5Y-solujen morfologisten muutosten taustalla. (Dominy ym. 2019)

Osana tutkimusta tukijat kehittivät pienimolekyyliset gingipain-inhibiittorit tutkiakseen gingipainien neurotoksisten vaikutusten estämistä. Nämä olivat RgA/B-spesifinen irreversiibeli COR286-inhibiittori, Kgp-spesifinen irreversiibeli COR271-inhibiittori ja Kgp-spesifinen reversiibeli COR119-inhibiittori. (Dominy ym. 2019)

Gingipain-inhibiittoreiden neuroprotektiivisen vaikutuksen tukimiseksi, tutkijat infektoivat *P. gingivalis*-W8-kantaa SH-SY5Y-soluihin 48 tunnin ajan. Tutkimustulokset osoittivat, että *P. gingivalis* (400 MOI) on toksista SH-SY5Y-soluille ja indusoi niiden kuolemaa, sillä noin 50%:ia soluista havaittiin kuolleen 48 tunnin jälkeen. COR286- ja COR271-inhibiittorit kykenivät kuitenkin tehokkaasti estämään *P. gingivalis*-välitteistä solukuolemaa annosriippuvaisella tavalla. Laajakirjoisten antibioottien (moksifloksasiinin ja doksisykliinin) ei havaittu suojaavan SH-SY5Y-soluja *P. gingivaliksen* indusoimalta solukuolemalta. Lisäksi tutkijat testasivat *P. gingivaliksen* kykyä indusoida SH-SY5Y-solukuolemaa A β -muodostuksen kautta, mutta γ -sekretaasin inhibiittorilla (LY450139) ei havaittu olevan *P. gingivalis*-välitteistä A β ₁₋₄₂-muodostumista estävää vaikutusta. (Dominy ym. 2019)

Tutkijat arvioivat gingipainien neurotoksisuutta myös in vivo ja sitä kykenevätkö gingipain-inhibiittorit kulkeutumaan aivoihin ja estämään gingipainien neurotoksisia vaikutuksia. Tämän testaamiseksi tutkijat annostelivat 8-viikon ikäisille BALB/c-naarashiirille COR286- ja COR271-inhibiittoria, ja 1,5 tuntia annostelun jälkeen tutkijat suorittivat Kgp- ja RgB-injektiot hiirien hippokampukseen. Osa hiiristä jätettiin käsittelemättä COR286- ja COR271-inhibiittorilla. Kontrollihiirille injektioitiin annosmäärältä vastaava määrä suolaliuosta. Seitsemän päivän jälkeen injektioista inhibiittoreilla käsittelemättömien hiirten aivoissa havaittiin gingipainien vaikutuksesta merkittävää neurodegeneraatiota kontrollihiiriin verrattuna. Hiirien esikäsitteily gingipain-inhibiittoreilla vähensi kuitenkin neurodegeneraatiota merkittävästi, mikä puoltaa niiden neuroprotektiivista vaikutusta in vivo. (Dominy ym. 2019)

Tutkijat tutkivat oraalisien *P. gingivalis*-infektion yhteyttä aivokudoksen infekioon. Lisäksi tutkijat halusivat selvittää onko *P. gingivaliksella* A β ₁₋₄₂-kertymiä indusoiva vaikutus. Tutkimuksessa oraalisien *P. gingivalis*-infektion vaikutusten tutkimiseksi 44 viikon ikäisiin BALB/c-naarashiiriin infektoitiin joka toinen päivä kuuden viikon ajan oraalisesti *P. gingivalis*-W8-, *P. gingivalis*-Kgp-knock-out- tai *P. gingivalis*-RgpA/B-knock-out-kantaa. *P. gingivalis*-W8-infektoiduista hiiristä erotettiin osajoukko, joihin injisoitiin lisäksi

subkutaanisti COR119-inhibiittoria. Tutkimustulosten mukaan kuuden viikon infektion jälkeen kaikkien hiirien aivoissa havaittiin *P. gingivaliksen* invaasio. Gingipain-knock out- ja COR119-käsitellyissä hiirissä kolonisaatio oli kuitenkin vähäisempää. (Dominy ym. 2019)

Oraalisen *P. gingivalis*-infektion osoitettiin lisäävän hiirien aivoissa $A\beta_{1-42}$ -tasoja merkittävästi. *P. gingivalis*-W83-infektoiduilla hiirillä aivojen $A\beta_{1-42}$ -tasot olivat merkittävästi suuremmat kuin infektiovapailla kontrollihiirillä, COR119- ja Kgp- ja RgpA/B-gingipain-knock-out-käsitellyillä hiirillä. Kgp- ja RgpA/B- gingipain-knock-out-käsittelyn ei havaittu lisäävän aivojen $A\beta_{1-42}$ -tasoja kontrollihiirien $A\beta_{1-42}$ -tasoihin verrattuna, mikä viittaa siihen, että $A\beta_{1-42}$ -tasojen indusointi in vivo vaatii molempien Kgp- ja RgpA/B-gingipainin yhteisvaikutuksen. (Dominy ym. 2019)

Tutkijat arvioivat *P. gingivaliksen* ja $A\beta_{1-42}$:n välistä vuorovaikutusta ja $A\beta_{1-42}$:n mahdollisia antimikrobisia ominaisuuksia in vitro. Tutkijat asettivat hypoteesiksi, että $A\beta_{1-42}$ reagoi *P. gingivaliksen* kanssa ja vähentää sen elinkykyä in vitro. Hypoteesin testaamiseksi tutkijat inkuboivat $A\beta_{1-42}$ -viljelmään *P. gingivalista*. Koska $A\beta_{1-42}$:n tiedetään omaavan kyvyn hajottaa solukalvoja, tutkijat ehdottavat, että $A\beta_{1-42}$:n yksi antimikrobisista vaikutuksista liittyy sen solumembraaneja hajottavaan vaikutukseen ja siten kykyyn aiheuttaa *P. gingivaliksen* kuolemaa. Tutkimustulokset osoittivat, että $A\beta_{1-42}$ kolokalisoitui yhdessä RgpB-gingipainin kanssa *P. gingivaliksen* pinnalle. Lisäksi kuolleiden ja kuolevien *P. gingivalis*-bakteereiden osuus lisääntyi merkittävästi *P. gingivalis*- $A\beta_{1-42}$ -yhteisviljelmässä. Tutkimustulokset viittaavat siihen, että $A\beta_{1-42}$:lla on antimikrobisia ominaisuuksia *P. gingivalista* vastaan. (Dominy ym. 2019)

Tutkijat arvioivat gingipain-inhibiittoreiden vaikutusta aivojen *P. gingivalis*-infektioon infektoimalla 8-viikon ikäisiin BALB/c-naarashiiriin oraalisesti *P. gingivalis*-W83-kantaa (10^9 CFU) joka toinen päivä 42 päivän ajan. Kaikkien hiirien aivoissa havaittiin PCR-tutkimuksella *P. gingivalis*-DNA:ta infektion aloituksesta 35 päivän eli viiden viikon kuluttua. *P. gingivalis*-genomissa havaittiin merkittävää monistumista 70. päivään eli 10. viikkoon asti. (Dominy ym. 2019)

P. gingivalis-aivoinfektion varmistamisen jälkeen hiirille tehtiin COR271- ja COR286-inhibiittoreiden annostelu (päivät 36 ja 70 oraalisen infektion aloituksesta). COR271-inhibiittori vähensi merkittävästi *P. gingivaliksen* genomikopioiden määrää aivoissa verrattuna viidennen viikon lähtötason genomikopioiden määrään. Myös COR286:n

havaittiin kymmenennen viikon tarkasteluajankohdassa vähentävän genomikopioiden määrää viidennen viikon lähtötason alapuolelle, mutta vaikutus ei ollut yhtä tehokas. Laajakirjoisen moksifloksasiinin havaittiin myös vähentävän *P. gingivaliksen* genomikopioiden määrää viidennen ja kymmenennen viikon tarkasteluajanjakson välillä, mutta sen vaikutuksesta genomikopioiden määrä ei tippunut viidennen viikon lähtötason alapuolelle. COR271-inhibiittorin kombinointi moksifloksasiinin tai COR286:n kanssa eivät saaneet aikaan suurempaa vähennystä genomikopioiden määrässä kuin mitä COR271:n vaikutus genomikopioiden määrän vähenemiseen oli yksistään. (Dominy ym. 2019)

Alzheimerin taudin neurokuvantamis- ja post mortem-tutkimukset ovat osoittaneet hippokampuksen GABAergisen järjestelmän vaurioitumista vaihtelevissa määrin (Govindpani ym. 2017). Kymmenen viikon tutkimusjakson jälkeen histologiset tutkimukset osoittivat *P. gingivalis*-W83-infektoiduilla hiirillä merkittävää Gad67⁺-gabaergisten neuroneiden katoa hippokampuksen gyrus dentatuksen alueella (Dominy ym. 2019). Viiden viikon kohdalla annostellulla COR271- ja COR286-inhibiittorilla yksistään, COR271-COR286-kombinaatiolla, COR271-COR286-kombinaatioon yhdistetyllä moksifloksasiinilla sekä moksifloksasiinilla yksistään havaittiin kymmenennen viikon tarkasteluajankohdan aikana Gad67⁺-gabaergisten neuroneiden kadon vähenemistä. COR271- ja COR286-inhibiittoreilla havaittiin kuitenkin moksifloksasiinia suurempi Gad67⁺-gabaergisia neuroneita suojaava vaikutus (Dominy ym. 2019).

Koska COR271-inhibiittorin neuroprotektiiviset vaikutukset tutkimuksessa osoittautuivat merkittäviksi, tutkijat kehittivät COR271-inhibiittoria vastaavan analogin, COR388:n. Kuten COR271, myös COR388 on erittäin voimakas, irreversiibeli, pienimolekyylinen ja selektiivinen Kgp-estäjä. Erotuksena COR271:een COR388:n ominaisuudet ovat kuitenkin paremmat suun kautta tapahtuvaan annosteluun liittyvän farmakokinetiikan ja lääkinällisen käytön kannalta (mm. merkittävä kyky tunkeutua keskuhermostoon). (Dominy ym. 2019)

COR388-Kgp-vuorovaikutuksen tutkimiseksi *P. gingivaliksessa* ja biologisissa kudoksenäytteissä tutkijat kehittivät fluoresoivan COR553-koettimen, joka koostui COR388-inhibiittorista ja fluoresoivasta syaniini-5 (Cy5)-yhdisteestä. COR553:een sidotun COR388-inhibiittorin sitoutuminen ja spesifisyys Kgp:hen validoitiin in vitro-kokeilla hyödyntämällä koettimen fluoresoivaa signaalia. COR553:een sidotun COR388-inhibiittorin havaittiin sitoutuvan Kgp:tä ilmentäviin *P. gingivalis*-bakteerikulttuureihin.

Fluoresenssia ei puolestaan havaittu *P. gingivalis*-Kgp-knock out-kannoissa. (Dominy ym. 2019)

Kun COR553 koetinta testattiin parodontiittia sairastavien potilaiden tutkimukseen lahjottamissa subgingivaalisissa biofilminäytteissä, tutkimustulokset osoittivat, että COR553:n fluoresoimaa Kgp:tä havaittiin yhteensä neljässä viidestä biofilminäytteessä. Biofilminäytteiden preinkubaatio COR388:lla esti COR553:n sitoutumista Kgp:n aktiiviseen kohtaan, mutta Kgp-gingipainien kokonaismäärä oli silti havaittavissa CAB102-vasta-ainevärjäyksen avulla. (Dominy ym. 2019)

Kgp:n suuri määrä näissä neljässä biofilminäytteessä oli myös yhteydessä suureen määrään *P. gingivaliksen* genomikopioita, sillä subgingivaalisten biofilminäytteiden qPCR-analyysi osoitti *P. gingivalikselle* spesifisen *hmuY*-geenin merkittävää ilmenemistä kaikissa neljässä näytteessä. Samoilla henkilöillä havaittiin myös *P. gingivaliksen* DNA:n merkittävää ilmenemistä syljessä. (Dominy ym. 2019)

Dominy ym. (2019) havaitsivat myös, että COR388 inhiboi *P. gingivaliksen* kasvua määritellyllä kasvualustalla. Tämä viittaa siihen, että *P. gingivaliksen* Kgp-virulenssitekijän inhibitiolla on bakteriostaattista vaikutusta. Tutkijat ehdottavat, että Kgp-virulenssitekijän inhibitio vähentää Kgp:n vaikutuksesta muodostuvia peptidiravintoaineita, joiden tiedetään olevan välttämättömiä *P. gingivaliksen* selviytymisen kannalta (Shi ym. 1999). Myös Kgp-riippuvainen hemin saanti on elintärkeää *P. gingivaliksen* energiantuotannossa (Smalley ym. 2007, Pathirana ym. 2007)

COR388:ia vastaan kehittyvän potentiaalisen resistenssin testaamiseksi *P. gingivalista* viljeltiin COR388:n sekä laajakirjoisen moksifloksasiini-antibiootin kanssa. Tutkijat osoittivat, että *P. gingivalis* kehitti nopeasti täydellisen resistenssin moksifloksasiinille. Resistenssiä COR388:lle puolestaan ei kehittynyt tässä tutkimuksessa. Koska nykyään antibioottiresistenssi on globaali ongelma, bakteeri-infektioiden hoidossa bakteerien virulenssitekijöitä estävät lähestymistavat voivat olla lupaavia keinoja vähentää antibioottiresistenssin kehittymistä. (Dominy ym. 2019)

Lisäksi COR388-inhibiittorin tehoa testattiin hiirimallissa in vivo vastaavasti kuin edellä kuvatussa COR271-testauksessa. COR388:n oraalinen annostelu kahdesti vuorokaudessa johti annoksesta riippuvaiseen tehoon estää *P. gingivaliksen* infektoitumista hiirien aivoihin. COR388-annokset 10 ja 30 mg/kg havaittiin vähentävän *P. gingivaliksen* määrää, A β ₁₋₄₂-tasoa ja TNF- α :n ilmenemistä aivoissa. Pienin CPR388-annos 3mg/kg vähensi jonkin

verran aivojen *P. gingivalis*-kuormaa, mutta vaikutusta $A\beta_{1-42}$ -tasoihin ja TNF- α :n ilmenemiseen ei havaittu. (Dominy ym. 2019)

Tutkimuksen julkaisuajankohdan aikaan COR388 on testattavana kliinisissä ihmiskokeissa (ClinicalTrials.gov NCT03331900). Tutkimustulokset antavat viitteitä siitä, että tehokas ja selektiivinen Kgp-estäjä voi vähentää *P. gingivalis*-infektiota aivoihin ja hidastaa tai estää Alzheimerin tautiin liittyviä patofysiologisia muutoksia. (Dominy ym. 2019)

6.5 Tutkimuksia, joissa havaittu mekanistinen yhteys *P. gingivaliksen* ja veri-aivoesteen läpäisevyyden välillä

Lei ym. 2023 toteuttamassa tutkimuksessa tutkittiin *P. gingivaliksen* vaikutusta veri-aivoesteen läpäisevyyteen rotilla. Tutkijat laativat myös BMEC-solujen (aivojen mikrovaskulaaristen endoteelisolujen) ja astrosyyttien yhteisviljelmään perustuvan in vitro BBB-mallin tutkiakseen *P. gingivaliksen* yhteyttä veri-aivoesteen permeabiliteettiin.

Endosytoosi tapahtuu pääasiassa klatriini- tai caveola-välitteisen reitin kautta (Lei ym. 2023). Caveola-rakenteet ovat kooltaan n. 50-100 nm:n mittaisia solukalvon organelleja, jotka poimuttuessaan solun sisälle muistuttavat muodoltaan pulloa tai sipulia (Andreone ym. 2017, Filippini & D'Alessio 2020). Caveola-rakenteita esiintyy useissa ihmisen eri solutyypeissä, ja ne ovat keskeisiä rakenteita solujen endosytoosissa, transsytoosissa, signaalitransduktiossa ja sytoskeletonin säätelyssä (Andreone ym. 2017, Filippini & D'Alessio 2020). Caveolin-1 (Cav-1) on caveola-rakenteiden kaikista tärkein rakenneproteiini (Busija ym. 2017). Sen on oletettu olevan keskeinen välittäjä *P. gingivaliksen* internalisaatiossa oraaliepiteelisoluihin (Tamai ym. 2005). Caveola-välitteisen transsytoosin merkitys *P. gingivalis*-infektion ja veri-aivoesteen BMEC-solujen permeabiliteetin lisääntymisessä on nykytutkimuksen valossa vielä epäselvää (Lei ym. 2023). Niinpä Lei ym. (2023) keskittyivät tutkimuksessaan selvittämään tarkemmin *P. gingivalis*-infektion ja caveola-välitteisen mekanismin yhteyksiä veri-aivoesteen läpäisevyyteen.

Tutkimuksessa oli käytössä kahdeksan viikon ikäisiä SD-rotia, joiden häntälaskimoon injektoidiin *P. gingivalista* kolme kertaa viikossa kahdeksan viikon ajan bakteremian aikaansamiseksi. Tutkimuksessa korkean intensiteetin rottaryhmässä injektoitu annos oli 10^8

CFU-yksikköä *P. gingivalista* osana 200µl fosfaattipuskuroitua suolaliuosta. Matalan intensiteetin ryhmässä injektoitu *P. gingivalis*-annos oli 10³ CFU-yksikköä. Kontrolliryhmän rotille injektointiin pelkkää fosfaattipuskuroitua suolaliuosta sama tilavuusmäärä. Kussakin ryhmässä oli yhteensä kuusi rottaa. Viimeisen injektion jälkeen rotat nukutettiin ja niiden aivokorteksilta ja hippokampukselta kerättiin kudosleikkeet, joita jatkokäsiteltiin läpäisyelektronimikroskooppitutkimusta (TEM), Western blot- analyysiä (WB) sekä immunohistokemiallisia ja immunofluoresenssimikroskopiaan perustuvaa tutkimusta varten. (Lei ym. 2023)

Tutkimuksessa havaittiin, että *P. gingivalis*-bakteremia lisäsi Evans blue-väriaineen infiltraatiota rottien aivokudokseen erityisesti korkean intensiteetin ryhmän rotilla kontrolliryhmän rottiin verrattuna. Lisäksi tutkimuksessa havaittiin, että *P. gingivalis*-bakteremia lisäsi albumiinin ilmentymistä 1,83- ja 1,26-kertaisesti korkean intensiteetin ryhmän rottien hippokampuksella ja korteksilla. Myös immunofluoresenssivärjäys osoitti albumiiniproteiinin kertymän merkittävää lisääntymistä korkean intensiteetin ryhmän rottien hippokampuksen ja aivokuoren alueella. Myös matalan intensiteetin ryhmässä albumiinin ilmentyminen lisääntyi 1,62-kertaisesti hippokampuksessa, ja tulos oli tilastollisesti merkitsevä. Matalan intensiteetin rotilla ei kuitenkaan havaittu tilastollisesti merkittävää yhteyttä *P. gingivalis*-bakteremian ja aivokuoren albumiinikertymien tai Evans blue-väriaineen infiltraation välillä. Tutkimustulokset viittaavat siihen, että *P. gingivalis*-bakteremia on mahdollisesti yhteydessä veri-aivoesteen läpäisevyyden lisääntymiseen. Huomionarvoinen löydös oli, että jo matalan intensiteetin rotilla veri-aivoesteen läpäisevyydessä havaittiin lisääntymistä. Matala-asteinenkin infektiio voi pitkittyessään olla yhteydessä neuroinflammaatioon. (Lei ym. 2023)

Tutkijat havaitsivat myös *P. gingivalis*-tyyppisiä bakteereita aivojen hiusverisuonissa ja parenkyymissä TEM-leikkeissä tarkasteltuna. Tutkijat osoittivat myös, että *P. gingivalis* (MOI 100 ja 500) kykeni läpäisemään in vitro-BBB-mallin ja lisäsi BMEC-solujen permeabiliteettia. Tutkimustulokset viittaavat siihen, että *P. gingivalis* voi lisätä veri-aivoesteen läpäisevyyttä, mikä edesauttaa itse bakteerin ja sen virulenssitekijöiden invaasiota aivokudokseen. (Lei ym. 2023)

Tutkijat analysoivat tarkemmin mahdollisia mekanismeja, joiden välityksellä *P. gingivalis* lisää BMEC-solujen permeabiliteettia veri-aivoesteessä. Tutkimuksessa TEM-leikkeissä havaittiin *P. gingivaliksen* lisäävän caveola-tyyppisten rakenteiden esiintymistä rottien

hippokampuksen ja korteksin mikroverisuonistossa. TEM-leikekuvissa havaittiin myös *P. gingivaliksen* internalisaatio BMEC-soluihin. Lisäksi *P. gingivaliksen* infektoimien BMEC-solujen solukalvoilla havaittiin caveola-tyyppisten rakenteiden lisääntyntä muodostumista. (Lei ym. 2023)

Immunohistokemiallinen värjäys puolestaan osoitti, että Cav-1-ekspressiotaso hiirten hippokampuksen ja korteksin parenkyymissä lisääntyi merkittävästi *P. gingivalis*-infektion vaikutuksesta korkean intensiteetin hiiriryhmässä. WB-analyysin perusteella *P. gingivalis*-infektion havaittiin lisäävän Cav-1-ekspressiota BMEC-soluissa 1,9-kertaisesti. Tutkimustulokset osoittivat myös, että Cav-1-knock-down vähensi 0,7-kertaisesti BMEC-solujen internalisoimien *P. gingivalis*-bakteereiden lukumäärää. (Lei ym. 2023)

Transsytoosin lisäksi intersellulaaristen liitosten katkeamisen tiedetään olevan toinen mekanismi, jonka välityksellä veri-aivoesteen permeabiliteetti voi heikentyä. Tutkimuksessa *P. gingivalis*-infektion ei kuitenkaan havaittu vaikuttavan solujen välisten liitoksien kannalta keskeisen okkludiini-proteiinin (Occludin, OCLD) ekspressioon korkean intensiteetin hiirten hippokampuksessa ja korteksilla. Tutkimustulokset viittaavat siihen, että *P. gingivalis* lisää veri-aivoesteen permeabiliteettia pääasiassa transsytoosin kautta. (Lei ym. 2023)

Näiden tutkimustulosten perusteella tutkijat uskovat, että *P. gingivalis* voi edistää caveolarakenteiden muodostumista ja lisätä Cav-1-ekspressiota edistääkseen veri-aivoesteen läpäisevyyttä BMEC-solujen suhteen. Permeabiliteetin heikentyminen edistää albumiinin ja *P. gingivaliksen* pääsyä BMEC-soluihin. (Lei ym. 2023)

Lei ym. (2023) tarkastelivat tarkemmin myös *P. gingivalikselle* tyypillisiä gingipainivirulenssitekijöitä (RgpA/B ja Kgp), jotka voivat välittää *P. gingivaliksen* ja Cav-1:n välistä vuorovaikutusta. Tutkijat osoittivat, että *P. gingivalis*-gingipainit (RgpA/Kgp) kykenevät sitoutumaan Cav-1:n kanssa ja välittävän ainakin osan *P. gingivaliksen* ja Cav-1:n välisestä vuorovaikutuksesta.

Kun tutkijat arvioivat tarkemmin *P. gingivaliksen* RgpA:n ja Cav-1:n proteiimirakenteiden välistä avaruudellista vuorovaikutusta, löydökset osoittivat RgpA:n Ser1050- ja Thr1075- ja Cav-1:n Tyr-118-tähteiden muodostavan keskenään vetysidoksen. Löydös vahvistaa *P. gingivaliksen* kykyä kolokalisoitua RgpA:n välityksellä Cav-1:n kanssa. Tämän löydöksen perusteella tutkijat ehdottavat, että *P. gingivaliksen* gingipainit (erityisesti RgpA) voivat olla

keskeisiä molekyylejä, jotka välittävät *P. gingivaliksen* ja Cav-1:n välistä vuorovaikutusta. (Lei ym. 2023)

Tutkimuksessa tutkijat selvittävät myös mahdollista molekyylitason mekanismia, jolla *P. gingivalis* indusoi caveolae-rakenteiden muodostumista. Mfsd2a (major facilitator superfamily domain containing 2a) on keskeinen molekyyliveri-aivoesteen rakenteen ja toiminnan kannalta. Mfsd2a:n on havaittu inhiboivan merkittävästi Cav-1-ekspressiota ja sijoittumista solukalvolla ja siten vähentävän caveolae-rakenteiden muodostumista. Tutkimustulosten mukaan *P. gingivalis* inhiboi merkittävästi Mfsd2a-ekspressiota rottien aivokudoksessa ja BMEC-soluissa. Mfsd2a:n havaittiin myös inhiboivan Cav-1-ekspressiota ja vähentävän *P. gingivalis*-internalisaatiota BMEC-soluihin. Tutkimusnäyttö osoittaa, että *P. gingivalis* edistää caveola-rakenteiden muodostumista inhiboimalla Mfsd2a-ekspressiota ja siten lisää BMEC-solujen permeabiliteettia veri-aivoesteessä. (Lei ym. 2023)

Yhteenvetona Lei ym. (2023) tutkimustulokset antavat viitteitä siitä, että *P. gingivalis*-bakteremia saattaa lisätä BMEC-solujen permeabiliteettia ja siten veri-aivoesteen permeabiliteettia Mfsd2a/Cav-1-välitteisen transsytoosin välityksellä. Tutkijat ehdottavat, että BMEC-solujen vähentynyt Mfsd2a-ekspressio *P. gingivalis*-infektion vaikutuksesta lisää Cav-1-ekspressiota ja caveola-muodostusta, mikä puolestaan lisää transsytoosia ja siten lisää veri-aivoesteen läpäisevyyttä. Veri-aivoesteen lisääntynyt permeabiliteetti edistää puolestaan *P. gingivaliksen* ja sen virulenssitekijöiden sekä neurotoksisten aineiden, kuten albumiinin, invaasiota aivokudokseen. Tutkimuksen mukaan Cav-1-välitteinen transsytoosi omaa keskeisen roolin veri-aivoesteen permeabiliteetin lisääntymisen mitä tulee *P. gingivaliksen* vaikutuksiin. Lisäksi Rgp:n ja Cav-1:n välisellä vuorovaikutuksella voi olla mekanistinen rooli *P. gingivaliksen* endosytoosissa BMEC-soluihin. Lisäämällä Mfsd2a-ekspressiota ja inhiboimalla Rgp/Cav-1-välitteistä transsytoosia voidaan inhiboida *P. gingivaliksen* vahingoittavaa vaikutusta veri-aivoesteeseen, mutta mekanistisen yhteyden varmistaminen vaatii vielä lisää tutkimusta tulevaisuudessa. (Lei ym. 2023)

Gong ym. (2022) tutkimuksessa tutkijat tutkivat *P. gingivaliksen* ulkokalvovesikkeleiden (outer membrane vesicles, OMV) yhteyttä Alzheimerin taudin patologiaan. Ulkokalvovesikkelit ovat gram-negatiivisten bakteereiden ulkokalvosta kuroutuvia, 20-250 nm:n kokoisia vesikkeleitä, jotka kuljettavat mukanaan bakteerien solukomponentteja (mm. LPS, proteaaseja, kalvoreseptoreita, DNA:ta, RNA:ta ym.) (Toyofuku ym. 2019). On ehdotettu, että ulkokalvovesikkelit voivat toimia ns. ”pitkän matkan aseina” ja olla siten

mukana systeemisairauksien, kuten Alzheimerin taudin patogeneesissä (Nara ym. 2021). On myös tutkimusnäyttöä, että suurin osa *P. gingivaliksen* gingipaineista ovat pakattuina ulkokalvovesikkeleihin, ja että ne voivat lisätä veri-aivoesteen läpäisevyyttä ja tiiviiden liitosten proteiinien hajotusta ihmisen soluilla toteutetussa in vitro-mallissa (Nara ym. 2021, Pritchard ym. 2022). Olemassa olevan tutkimusnäytön pohjalta Gong ym. (2022) halusivat tutkia tarkemmin *P. gingivaliksen* ulkokalvovesikkeleiden yhteyttä Alzheimerin taudin patologiaan.

Tutkimuksessa oli käytössä 14 kuukauden ikäisiä C57BL/6-uroshiiriä, jotka jaettiin kontrolli- ja koeryhmiin (n=12 hiirtä/ryhmä). Tutkimuksessa koeryhmän hiirille annosteltiin oraalisesti *P. gingivalis*-peräisiä ulkokalvovesikkeleitä (4mg/kg) joka toinen päivä kahdeksan viikon ajan. Kontrolliryhmän hiiret saivat vastaavan määrän fosfaattipuskuroitua suolaliuosta. (Gong ym. 2022)

Tutkimuksessa havaittiin, että *P. gingivalis*-OMVt kykenivät läpäisemään veri-aivoesteen, sillä kolmen päivää annostelun jälkeen tutkijat havaitsivat DiO-fluoresenssin avulla ulkokalvovesikkeleiden ilmentymistä hiirten korteksilla ja hippokampuksessa. Tutkijat hyödynsivät Western blot-analyysiä ja RT-gPCR-menetelmää testatakseen muuttivatko *P. gingivaliksen* ulkokalvovesikkelit veri-aivoesteen permeabiliteetin eheyden kannalta tärkeiden proteiinien ilmenemistä. Claudin-5, ZO1- ja occludin ovat keskeisiä proteiineja endoteelisolujeen tiiviissä liitoksissa. Tutkimustulokset osoittivat, että *P. gingivalis*-OMV-käsitellyillä hiirillä kaikkien näiden proteiinien ekspressio väheni hippokampuksessa. (Gong ym. 2022)

Tutkimustulokset osoittivat myös, että *P. gingivalis*-OMVt olivat yhteydessä hiirten heikentyneeseen muisti- ja oppimistoimintoihin MWM- ja Y-maze-testillä arvioituna. Lisäksi *P. gingivalis*-OMVt lisäsivät merkittävästi tau-proteiinin fosforylaatiota (Thr231) hiirten hippokampuksessa immunofluoresenssiin perustuvassa analyysissä. (Gong ym. 2022)

P. gingivalis-OMV-käsittelyn havaittiin myös indusoivan myös neuroinflammaatiota hippokampuksen mikrogliaosulujen, astrosyyttien ja IL-1 β -immunofluoresenssianalyysin avulla. Aktivoituneiden mikrogliaosulujen osoitus tehtiin Iba1:n avulla ja astrosyyttien GFAP-värjäyksen avulla. Tutkimustulosten perusteella mikrogliaosulujen ja astrosyyttien aktivaatio oli merkittävästi suurempaa *P. gingivalis*-OMV-käsiteltyjen hiirten

hippokampuksessa kontrolliryhmän hiiriin verrattuna. Myös neuroinflammaatiassa keskeisen proinflammatorisen IL-1 β -sytokiinin ekspresio lisääntyi merkittävästi *P. gingivalis*-OMV-hiirten hippokampuksessa. (Gong ym. 2022)

Tutkimuksen keskeinen löydös oli myös havainto *P. gingivalis*-OMV-käsittelyn olevan yhteydessä hippokampuksen NLRP3-inflammasomiaktivaatioon. Tämä havaittiin NLRP3-inflammasomiaktivaatioon liittyvien keskeisten proteiinien (NLRP3, ASC ja kaspasi-1) ekspresion merkittävänä lisääntymisenä *P. gingivalis*-OMV-hiirten hippokampuksessa kontrollihiiriin verrattuna. NLRP3-inflammasomiaktivaatioon liittyen immunofluoresenssivärjäyksen tulokset osoittivat myös ASC-proteiinin kolokalisoituvan mikroglia-solujen yhteyteen. Lisäksi intrasellulaaristen ASC-positiivisten mikroglia-solujen ja ekstrasellulaarisen ASC-proteiinin määrä *P. gingivalis*-OMV-hiirten hippokampuksessa lisääntyivät kontrollihiiriin verrattuna. (Gong ym. 2022)

Yhteenvetona Gong ym. (2022) tutkimustulokset osoittivat, että *P. gingivalis*-OMVt heikensivät veri-aivoesteiden permeabiliteettia, mikä oli yhteydessä mikroglia-solujen ja astrocyttien aktivaatioon, NLRP3-inflammasomiaktivaatioon, lisääntyneeseen IL-1 β -tuotantoon ja tau-proteiinin fosforylaatioon. Tutkimuslöydösten perusteella Gong ym. (2022) ehdottavat, että *P. gingivalis* ulkokalvovesikkeillä voi olla keskeinen rooli neuroinflammaation aktivaatiossa NLRP3-inflammasomiaktivaation välityksellä Alzheimerin taudin patogeneesissä.

Xue ym. (2020) tutkimuksessa tutkijat tutkivat ligatuura-indusoidun parodontiitin yhteyttä veri-aivoesteeseen hiirimallissa. Tutkimuksessa oli käytössä 12 viikon ikäisiä C57BL/6 uroshiiriä, joista muodostettiin kontrolli- ja koeryhmä (n=18 hiirtä/ryhmä). Kroonisen parodontiitin (CP) indusoimiseksi koeryhmän hiirten vasemmanpuoleisen toisen ylämolaarin ympärille asetettiin subgingivaalisesti silkkiligatuura. Ligatuuran annettiin pysyä paikoillaan 12 kuukauden ajan, ja sen pysyminen paikoillaan tarkistettiin kerran viikossa.

Tiiviiden liitosten proteiinit ja adheesioliitosproteiinit ovat keskeisiä rakenteellisia tekijöitä veri-aivoesteiden permeabiliteetin kannalta (Daneman & Prat 2015). Xue ym. (2020) tutkimuksessa Western blot-analyysi osoitti ligatuura-indusoidujen hiirten aivoissa merkittävää tiiviiden liitoksien kannalta keskeisten proteiinien (Claudin-5, occludin, ja ZO-1 ja adheesioon liittyvän proteiini VE-kadheriiniin) merkittävää ekspresiotasojen laskua kontrollihiiriin verrattuna. Lisäksi CP-hiirillä havaittiin LPS:n merkittävästi suurempaa

ilmentymistä aivoissa kontrollihiiriin verrattuna. Myös TLR4-reseptorin ekspresio, ja sen signalointikaskadissa ekspresoituvan myeloidisen erilaistumistekijän (MyD88) sekä NF- κ B p65:n ilmentyminen oli tilastollisesti merkittävästi suurempaa CP-hiirillä verrattuna kontrollihiiriin.

Yhteenvetona Xue ym. (2020) tutkimustulokset osoittivat, että ligatuura indusoidun parodontiittimallin hiirillä veri-aivoesteen läpäisevyys lisääntyi, mikä mahdollisti neuroinflammaatiota lisäävien tekijöiden kulkeutumisen aivoihin. Lisäksi kroonisen parodontiittimallin hiirillä havaittu merkittävä LPS-pitoisuuden kasvu ja TLR4/MyD88/NF- κ B-signalointireitin aktivaatio viittaavat siihen, että krooninen parodontiitti indusoi Alzheimerin tautiin liittyvää inflammaatiota LPS:n indusoiman TLR4/MyD88/NF- κ B-signalointireitin aktivaation kautta.

6. POHDINTA

Parodontiitin on todettu olevan yhteydessä Alzheimerin tautiin (Sung ym. 2019, Gil-Montoya ym. 2015 & Ide ym. 2015). Yhteys on voitu osoittaa siitäkin huolimatta, että Alzheimerin tautiin ja parodontiittiin liittyy useita yhteisiä riskitekijöitä (Sung ym. 2019, Gil-Montoya ym. 2015 & Ide ym. 2015). Näitä ovat esimerkiksi ikä, sukupuoli, tupakointi, koulutustaso ja omahoitotottumukset (Ide ym. 2015).

On kuitenkin huomioitava, että poikkileikkaustutkimuksissa syy-seuraussuhteiden määrittämiselle välttämätöntä tapahtumien ajallista järjestystä ei voida määrittää. Sung ym. (2019) ja Ide ym. (2015) osoittivat parodontiitin ja Alzheimerin taudin välisen yhteyden poikkileikkausasetelmassa.

Myös Kamer ym. (2015) poikkileikkaustutkimuksessa osoitettiin, että kognitiivisesti terveiden vanhuksien parodontiitti (CAL) oli yhteydessä aivojen amyloidikertymiin PET-kuvantamisella arvioituna. Vaikka tutkimuksessa havaittiin heikentyneen parodontiumin terveyden yhteys A β -kertymiin/heikentyneeseen kognitioon, tutkimustulosten tulkinnassa tulee huomioida, että yhtä mahdollista voi olla myös se, että ihmisillä, joilla on heikentynyt kognitio voi olla myös huonompi suunterveys ja plakkikontrolli kuin kognitiivisesti terveillä. Kamer ym. (2015) tutkimuksessa kaikki koehenkilöt olivat kuitenkin kognitiivisesti terveitä, jolloin käänteinen yhteys ei teoriassa päde.

Aiemmin ei ole esitetty pitkäaikaistutkimusnäyttöä huonon suunterveyden ja heikentyneen kognitiivisen suorituskyvyn välisestä yhteydestä siten, että tutkimuksessa olisi otettu huomioon lähtötilanteen kognitiivinen tila. Ide ym. (2016) tutkimus kuitenkin osoitti, että Alzheimerin tautia sairastavan parodontiitti on yhteydessä merkittävään kognitiiviseen rappeuman lisääntymiseen puolen vuoden seurantajakson aikana, ja tämä yhteys on riippumaton lähtötilanteen kognitiivisesta statuksesta. Vaikutuksen arvioidaan välittyvän systeemisen inflammaation vaikutusten kautta. (Ide ym. 2016)

Alzheimerin taudin ja parodontiitin yhteyttä tutkivassa tutkimuksessa tutkimusten pienet otoskoot eivät voi poissulkea mahdollisuutta, että yhteys on seurausta sattumasta. Tämän takia yhteyden vahvistaminen vaatisi toistettavuutta. Yhteyden välistä tulkintaa sekoittaa myös mahdollisesti se, että henkilöillä, joilla kognitiivinen rappeutuminen tapahtuu nopeammin altistuvat parodontiitille kognitiivisen rappeuman asteesta riippumattoman tuntemattoman mekanismin kautta. On myös mahdollista, että Alzheimerin taudin

yhteydessä esiintyvä parodontiitti on seurausta sekoittavasta tekijästä, kuten immuno-inflammatorisesta vasteesta, jolla on myös Alzheimerin tautia potentoiva vaikutus. Immuno-inflammatorisessa vasteesta on eroja eri yksilöiden välillä, minkä takia riski sairastua parodontiittiin ja Alzheimerin tautiin on yksilöllinen. Parodontiittiin liittyvällä tulehduksella voi myös olla itsenäinen Alzheimerin taudin patogeneesiä edistävä vaikutus. (Ide ym. 2016)

Katsauksessa esiteltyjen tutkimusten mukaan parodontiitti näyttää olevan yhteydessä Alzheimerin tautiin ja kognitiiviseen heikkenemiseen, kun keskeisten sekoittavien tekijöiden vaikutus on otettu huomioon. Sitä vastoin – edistääkö parodontiitti kognition heikentymistä vai onko parodontiitti seuraus kognition heikentymisestä vai sekä että – on osassa tutkimuksissa epäselvää ja yhteyden ajallisen järjestyksen selvittäminen vaatisi pitkittäistutkimuksia ja kliinisiä kokeita. Alzheimerin taudin ja parodontiitin välisen yhteyden tutkimusta vaikeuttaa myös taudinkuvien erilaiset määritelmät ja testiparametrit eri tutkimuksien välillä.

Parodontiitin ja kognitiivisen rappeuman välisen suhteen mekanismeihin liittyvä näyttö on vielä epäselvää. Tässä katsauksessa esiteltyjen tutkimusten perusteella on kuitenkin olemassa näyttöä *P. gingivaliksen* ja sen virulenssitekijöiden kyvystä aiheuttaa merkittävää tulehduskuormaa systeemisesti ja sentraalisesti, millä on osoitettu olevan vaikutusta Alzheimerin tautiin liittyvään kognition heikkenemiseen.

Kirjallisuuskatsauksessa esitellyt tutkimustulokset osoittivat, että kroonisella parodontiitilla, jossa *P. gingivalis* toimii keskeisenä avainpatogeenina, on vaikutusta kognitiivista rappeutumista aiheuttaviin aivokudoksen patologiisiin muutoksiin: mikroglioosiin, astrogliaosiin, komplementtijärjestelmän aktivaatioon, proinflammatoristen sytokiinien eritykseen, tulehdusta indusoivien signaalintireittien aktivaatioon, veri-aivoesteen permeabiliteetin läpäisevyyteen sekä A β - ja pTau-assosioituun neuroinflammaatioon ja neurodegeneraatioon. Näin ollen voidaan pitää hyvinkin mahdollisena, että parodontiitti vaikuttaa Alzheimerin taudin kehittymiseen ja toimii yhtenä sairauden patogeneesiä edistävänä tekijänä muiden tekijöiden joukossa. Tulevaisuudessa tarvitaan kuitenkin lisää mekanistisia tutkimuksia tautien yhteisten patogeneesimekanismien ja parodontiitin suorien kognitiivista rappeumaa aiheuttavien vaikutusten vahvistamiseksi ja selvittämiseksi.

Parodontiittia voidaan hoitaa toisin kuin Alzheimerin tautia. Siksi näiden sairauksien yhteisten patogeneesimekanismien tarkempi selvittäminen ja ymmärtäminen tarjoaisivat

keinon estää parodontiittiin liittyvän inflammaation vaikutusta Alzheimerin tautiin. Parodontologisen hoidon hyödyt kognitiivisen rappeuman etenemisen ennaltaehkäisyssä ja parantamisessa vaatisivat tulevaisuudessa satunnaistettuja kliinisiä kokeita hypoteesin testaamiseksi.

Vaikka toistaiseksi on epäselvää, voidaanko parodontiittia hoitamalla estää muistisairauden kehittymistä, jokaisen kliinistä työtä tekevän hammaslääkärin tulisi pitää mielessä suun kroonisen tulehduksen mahdollinen yhteys muistisairauden kehittymiseen. Parodontiitti on alidiagnosoitu sairaus, jonka varhaisdiagnostiikka ja hoito voivat edistää merkittäväällä tavalla aivoterveyttä.

Hammaslääkärin tulee olla tietoinen siitä, että potilaan yhtäkkiset muutokset motivaatiossa toteuttaa omahoitoa ja saapumattomuus unohtelun vuoksi sovituille hoitoajoille voivat olla Alzheimerin taudin ensioireita. Oireiden varhainen tunnistaminen on tärkeää, koska potilaan ohjaaminen tarkempiin tutkimuksiin ja varhainen diagnoosi mahdollistavat puuttumisen Alzheimerin taudin etenemisnopeuteen.

On mahdollista, että parodontiitin ja immuunijärjestelmän merkitys tulevat tulevaisuudessa yhä näkyvämmäksi hermoston rappeumasairauksissa. Tulevaisuudessa parodontiitin varhaisdiagnostiikalla, hoidolla, potilaan tehokkaalla omahoidon ohjauksella ja hyvien suunhoitotottumusten omaksumisella voi olla entistä painavampi rooli osana ihmisen kokonaisvaltaista terveyttä myös muistisairauksien ehkäisyn osalta.

LÄHDELUETTELO

- Andreadou EG, Katsipis G, Tsolaki M & Pantazaki AA (2021). Involvement and relationship of bacterial lipopolysaccharides and cyclooxygenases levels in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment patients. *Journal of Neuroimmunology* 357:577561.
- Andreone BJ, Chow BW, Tata A, Lacoste B, Ben-Zvi A, Bullock K ym. (2017). Blood-Brain Barrier Permeability Is Regulated by Lipid Transport-Dependent Suppression of Caveolae-Mediated Transcytosis. *Neuron* 3;94(3):581-594
- Augusto-Oliveira M, Arrifano GP, Lopes-Araújo A, Santos-Sacramento L, Takeda PY, Anthony DC ym. (2019). What Do Microglia Really Do in Healthy Adult Brain? *Cells* 8(10):1293.
- Bu XL, Xiang Y, Jin WS, Wang J, Shen LL, Huang ZL ym. (2018). Blood-derived amyloid- β protein induces Alzheimer's disease pathologies. *Molecular Psychiatry* 23(9):1948-1956.
- Busija AR, Patel HH & Insel PA (2017). Caveolins and cavins in the trafficking, maturation, and degradation of caveolae: implications for cell physiology. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 1;312(4):C459-C477.
- Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K ym. (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica* 38(9):1205-1235.
- Chu CT, Caruso JL, Cummings TJ, Ervin J, Rosenberg C & Hulette CM (2000). Ubiquitin immunohistochemistry as a diagnostic aid for community pathologists evaluating patients who have dementia. *Modern Pathology* 13(4):420-6.
- Citron M, Vigo-Pelfrey C, Teplow DB, Miller C, Schenk D, Johnston J ym. (1994). Excessive production of amyloid beta-protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the Swedish familial Alzheimer disease mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 6;91(25):11993-7.
- Condello C, Yuan P, Schain A & Grutzendler J (2015). Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar A β 42 hotspots around plaques. *Nature Communications* 29;6:6176.
- Daneman R & Prat A (2015). The blood-brain barrier. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7(1):a020412.
- DeMattos RB, Bales KR, Parsadanian M, O'Dell MA, Foss EM, Paul SM ym. (2002). Plaque-associated disruption of CSF and plasma amyloid-beta (A β) equilibrium in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 81(2):229-36.
- Dominy SS, Lynch C, Ermini F, Benedyk M, Marczyk A, Konradi A ym. (2019). *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Science Advance* 23:5(1).
- Filippini A & D'Alessio A (2020). Caveolae and Lipid Rafts in Endothelium: Valuable Organelles for Multiple Functions. *Biomolecules* 10(9):1218.
- Gil-Montoya JA, Sanchez-Lara I, Carnero-Pardo C, Fornieles F, Montes J, Vilchez R ym. (2015). Is periodontitis a risk factor for cognitive impairment and dementia? A case-control study. *Journal of Periodontology* 86(2):244-53.
- Gong T, Chen Q, Mao H, Zhang Y, Ren H, Xu M ym. (2022). Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* trigger NLRP3 inflammasome and induce neuroinflammation, tau phosphorylation, and memory dysfunction in mice. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12:925435.

- Govindpani K, Calvo-Flores Guzmán B, Vinnakota C, Waldvogel HJ, Faull RL & Kwakowsky A (2017). Towards a Better Understanding of GABAergic Remodeling in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 21;18(8):1813.
- Gürsoy UK, Belibasakis G, Belstrøm D, Sorsa T & Bolstad AI (2022). Uusia näkökulmia parodontiitin diagnostiikkaan ja hoitoon. *Suomen Hammaslääkärilehti* 2022 (4):36-41.
- Hakkola J (2021). Neurologisten sairauksien lääkehoito. Luento. Oulun yliopisto, lääketieteellinen tiedekunta. Kevätlukukausi 2021.
- Hao X, Li Z, Li W, Katz J, Michalek SM, Barnum SR ym. (2022). Periodontal Infection Aggravates C1q-Mediated Microglial Activation and Synapse Pruning in Alzheimer's Mice. *Frontiers in Immunology* 13:816640.
- Hershko A & Ciechanover A (1998). The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry* 67:425-79.
- Hu Y, Li H, Zhang J, Zhang X, Xia X, Qiu C ym. (2020). Periodontitis Induced by *P. gingivalis*-LPS Is Associated With Neuroinflammation and Learning and Memory Impairment in Sprague-Dawley Rats. *Frontiers in Neuroscience* 14:658.
- Ide M, Harris M, Stevens A, Sussams R, Hopkins V, Culliford D ym. (2016). Periodontitis and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *PLoS One* 11(3):e0151081.
- Kamer AR, Pirraglia E, Tsui W, Rusinek H, Vallabhajosula S, Mosconi L ym. (2015). Periodontal disease associates with higher brain amyloid load in normal elderly. *Neurobiology of Aging* 36(2):627-33.
- Kantarci A, Aytan N, Palaska I, Stephens D, Crabtree L, Benincasa C ym. (2018). Combined administration of resolvin E1 and lipoxin A4 resolves inflammation in a murine model of Alzheimer's disease. *Experimental Neurology* 300:111-120.
- Kantarci A, Tognoni CM, Yaghmoor W, Marghalani A, Stephens D, Ahn JY ym. (2020). Microglial response to experimental periodontitis in a murine model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports* 10(1):18561.
- Kassebaum N, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray C & Marcenes W (2014). Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *Journal of Dental Research* 93(11):1045-53.
- Kovacech B & Novak M (2010). Tau truncation is a productive posttranslational modification of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research* 7(8):708-16.
- Kuo YM, Kokjohn TA, Watson MD, Woods AS, Cotter RJ, Sue LI ym. (2020). Elevated abeta42 in skeletal muscle of Alzheimer disease patients suggests peripheral alterations of AbetaPP metabolism. *The American Journal of Pathology* 156(3):797-805.
- Lan X, Han X, Li Q, Yang QW & Wang J (2017). Modulators of microglial activation and polarization after intracerebral haemorrhage. *Nature Reviews Neurology* 13(7):420-433.
- Lei S, Li J, Yu J, Li F, Pan Y, Chen X ym. (2023). *Porphyromonas gingivalis* bacteremia increases the permeability of the blood-brain barrier via the Mfsd2a/Caveolin-1 mediated transcytosis pathway. *International Journal of Oral Science* 15(1):3.
- Li QX, Evin G, Small DH, Multhaup G, Beyreuther K & Masters CL (1995). Proteolytic processing of Alzheimer's disease beta A4 amyloid precursor protein in human platelets. *Journal of Biological Chemistry* 270(23):14140-7.
- Liccardo D, Marzano F, Carraturo F, Guida M, Femminella GD, Bencivenga L ym. (2020). Potential Bidirectional Relationship Between Periodontitis and Alzheimer's Disease. *Frontiers in Psychology* 11:683.

- Markovic SN, Inwards DJ, Frigas EA & Phyliky RP (2000). Acquired C1 esterase inhibitor deficiency. *Annals of Internal Medicine*. 2000 18;132(2):144-50.
- Matsushita K, Yamada-Furukawa M, Kurosawa M & Shikama Y (2020). Periodontal Disease and Periodontal Disease-Related Bacteria Involved in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Journal of Inflammation Research* 13:275-283.
- McAvoy T, Lassman ME, Spellman DS, Ke Z, Howell BJ, Wong O ym. (2014). Quantification of tau in cerebrospinal fluid by immunoaffinity enrichment and tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 60(4):683-9.
- Medeiros R, Baglietto-Vargas D & LaFerla FM (2011). The role of tau in Alzheimer's disease and related disorders. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 17(5):514-24.
- Nara PL, Sindelar D, Penn MS, Potempa J & Griffin WST (2021). Porphyromonas gingivalis Outer Membrane Vesicles as the Major Driver of and Explanation for Neurodegeneration, the Cholinergic Hypothesis, Iron Dysregulation, and Salivary Lactoferrin in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease* 82(4):1417-1450.
- Nation DA, Sweeney MD, Montagne A, Sagare AP, D'Orazio LM, Pachicano M ym. (2019). Blood-brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction. *Nature Medicine* 25(2):270-276.
- Nazir MA (2017). Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International Journal of Health Sciences (Qassim)* 11(2):72-80.
- Newman M, Takei H, Klokkevold P & Carranza F (2018). *Newman and Carranza's Clinical Periodontology* (13th ed.). Elsevier.
- Nie R, Wu Z, Ni J, Zeng F, Yu W, Zhang Y ym. (2019). Porphyromonas gingivalis Infection Induces Amyloid- β Accumulation in Monocytes/Macrophages. *Journal of Alzheimer's Disease* 72(2):479-494.
- Nonaka S, Kadowaki T & Nakanishi H (2022). Secreted gingipains from Porphyromonas gingivalis increase permeability in human cerebral microvascular endothelial cells through intracellular degradation of tight junction proteins. *Neurochemistry International* 154:105282.
- Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Brammar GC, Slakeski N & Reynolds EC (2007). Kgp and RgpB, but not RgpA, are important for Porphyromonas gingivalis virulence in the murine periodontitis model. *Infection and Immunology* 75(3):1436-42.
- Poole S, Singhrao SK, Kesavalu L, Curtis MA & Crean S (2013). Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. *Journal of Alzheimer's Disease* 36(4):665-77.
- Pritchard AB, Fabian Z, Lawrence CL, Morton G, Crean S & Alder JE (2022). An Investigation into the Effects of Outer Membrane Vesicles and Lipopolysaccharide of Porphyromonas gingivalis on Blood-Brain Barrier Integrity, Permeability, and Disruption of Scaffolding Proteins in a Human in vitro Model. *Journal of Alzheimer's disease* 86(1):343-364.
- Rinne J & Scheinin M (2018). *Alzheimerin tauti sairautena*. Teoksessa Ruskoaho H, Hakkola J, Huupponen R, Kantele A, Korpi E, Moilanen E ym. (toim.): *Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia*. Kustannus Oy Duodecim, Helsinki.
- Ryder MI (2020). Porphyromonas gingivalis and Alzheimer disease: Recent findings and potential therapies. *Journal of Periodontology* 91 (Suppl 1):S45-S49.
- Shi Y, Ratnayake DB, Okamoto K, Abe N, Yamamoto K & Nakayama K (1999). Genetic analyses of proteolysis, hemoglobin binding, and hemagglutination of Porphyromonas gingivalis. Construction of mutants with a combination of rgpA, rgpB, kgp, and hagA. *Journal of Biological Chemistry* 274(25):17955-60.
- Smalley JW, Birss AJ, Szmigielski B & Potempa J (2007). Sequential action of R- and K-specific gingipains of Porphyromonas gingivalis in the generation of the haem-

- containing pigment from oxyhaemoglobin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 465(1):44-9.
- Stolt M, Axelin A & Suhonen R (2016). Kirjallisuuskatsaus hoitotieteessä. Turun yliopisto.
- Stöhr J, Wu H, Nick M, Wu Y, Bhate M, Condello C ym. (2017). A 31-residue peptide induces aggregation of tau's microtubule-binding region in cells. *Nature Chemistry*. 9(9):874-881.
- Sulkava R (2016). Alzheimerin tauti. Teoksessa Tilvi R, Pitkälä K, Strandberg T, Sulkava R & Viitanen M (toim.): Geriatria. Kustannus Oy Duodecim, Helsinki
- Sung CE, Huang RY, Cheng WC, Kao TW & Chen WL (2019) Association between periodontitis and cognitive impairment: Analysis of national health and nutrition examination survey (NHANES) III. *Journal of Clinical Periodontology* 46(8):790-798.
- Tamai R, Asai Y & Ogawa T (2005). Requirement for intercellular adhesion molecule 1 and caveolae in invasion of human oral epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity* 73(10):6290-8.
- Taniguchi-Watanabe S, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Tarutani A ym. (2015). Biochemical classification of tauopathies by immunoblot, protein sequence and mass spectrometric analyses of sarkosyl-insoluble and trypsin-resistant tau. *Acta Neuropathologica*.131(2):267-280.
- Thomson W, Shearer D, Broadbent J, Foster Page L & Poulton R (2013). The natural history of periodontal attachment loss during the third and fourth decades of life. *Journal of Clinical Periodontology* 40(7):672-80.
- Toyofuku M, Nomura N & Eberl L (2019). Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nature Reviews Microbiology* 17(1):13-24.
- Tran VTA, Kang YJ, Kim HK, Kim HR & Cho H (2021). Oral Pathogenic Bacteria-Inducing Neurodegenerative Microgliosis in Human Neural Cell Platform. *International Journal of Molecular Sciences* 22(13):6925.
- Ulrich JD, Ulland TK, Colonna M & Holtzman DM (2017). Elucidating the Role of TREM2 in Alzheimer's Disease. *Neuron* 94(2):237-248.
- Van Nostrand WE & Melchor JP (2001). Disruption of pathologic amyloid beta-protein fibril assembly on the surface of cultured human cerebrovascular smooth muscle cells. *Amyloid* 1:20-7.
- Vehkalahti M (2004). Suun terveyden ja terveystapojen muutos 1980-2000. Teoksessa Suominen-Taipale L, Nordblad A, Vehkalahti M & Aromaa A (toim.): Suomalaisten aikuisten suun terveys Terveys 2000 tutkimus. Kansanterveyslaitoksen julkaisuja, KTL B16/2004.
- von Bergen M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM & Mandelkow (2000). Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 97(10):5129-34.
- WHO (2021). Newsroom. Dementia.
<https://www.who.int/newsroom/factsheets/detail/dementia>. Luettu 11.9.2022
- Xue L, Zou X, Yang XQ, Peng F, Yu DK & Du JR (2020). Chronic periodontitis induces microbiota-gut-brain axis disorders and cognitive impairment in mice. *Experimental Neurology* 326:113176.
- Yin H & Kuret J (2006). C-terminal truncation modulates both nucleation and extension phases of tau fibrillization. *FEBS Letters* 9;580(1):211-5.