® Postepy Hig Med Dosw (online), 2011; 65: 73-92
e-ISSN 1732-2693

Received: 2010.09.23
Accepted: 2011.01.21
Published: 2011.02.17

Rola nauk biologicznych w zrozumieniu genezy i nowego podejścia terapeutycznego do choroby Alzheimera

The role of biological sciences in understanding the genesis and a new therapeutic approach to Alzheimer's disease

Eugenia Tęgowska, Adrianna Wosińska

Zakład Toksykologii Zwierząt, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Streszczenie

W pracy porównano historyczny obraz przyczyn choroby Alzheimera (AD) ze współczesnym spojrzeniem na czynniki, które mogą leżeć u podstaw jej symptomów. Nauki biologiczne zajmujące się budową i fizjologią komórki pozwoliły na zrozumienie roli defektów mitochondrialnych w procesie powstawania splątków i β-amyloidu, co daje nadzieję na opracowanie nowej, bardziej efektywnej terapii AD. Obecnie należy przyjąć, że choć mitochondria stale generują wolne rodniki, przed których szkodliwym wpływem chronią je odpowiednie systemy obronne, w pewnych okolicznościach może dojść do ich rozregulowania i powstawania wolnorodnikowych uszkodzeń. Powoduje to wystąpienie deficytu energetycznego w neuronach i dalsze narastanie puli wolnych rodników. Reakcją kompensacyjną organizmu jest wytworzenie splątków i/lub zwiększenie tempa wytwarzania β-amyloidu. Twory te początkowo mają charakter ochronny, działając antyoksydacyjnie, jednak wraz z narastaniem masy, ten korzystny wpływ zanika. Stają się one miejscem odkładania substancji wzmagających procesy wolnorodnikowe i sprawiających, że same stają się neurotoksyczne. Przyjmując takie uwarunkowania jako pierwotną przyczynę AD, można zaproponować rozważenie terapii na bazie błękitu metylenowego, laserem czy donosowo podawaną insuliną. Warunkiem jednak jest wcześniejsze rozpoznanie choroby. Istnieje wiele metod diagnostycznych, ale ich niewielka swoistość, przy wysokiej cenie lub uciążliwości dla pacjenta, nie pozwala na stosowanie ich do badań przesiewowych, wcześnie wykrywających chorobę. Obiecująca jest propozycja testu węchowego; jest to metoda tania, nieinwazyjna, nadająca się do badań przesiewowych, jednak ze względu na ograniczoną swoistość wymaga łączenia z innymi testami. Te propozycje nie wykluczają dotychczasowe metody terapeutyczne związane ze stymulacją cholinergiczną, zwłaszcza że obecnie terapię rozpoczyna się, gdy obfite inkluzje mózgowe w znacznej mierze upośledzają przekaźnictwo.

Słowa kluczowe: **choroba Alzheimera • choroby mitochondrialne • wolne rodniki • stres oksydacyjny • insulina • błękit metylenowy • laser • test węchowy**

Summary

The paper contrasts the historical view on causal factors in Alzheimer's disease (AD) with the modern concept of the symptoms' origin. Biological sciences dealing with cell structure and physiology enabled comprehension of the role of mitochondrial defects in the processes of formation

Electronic PDF security powered by www.IndexCopernicus.com

of neurofibrillary tangles and β-amyloid, which in turn gives hope for developing a new, more effective therapeutic strategy for AD. It has been established that although mitochondria constantly generate free radicals, from which they are protected by their own defensive systems, in some situations these systems become deregulated, which leads to free radical-based mitochondrial defects. This causes an energetic deficit in neurons and a further increase in the free radical pool. As a result, due to compensation processes, formation of tangles and/or acceleration of β-amyloid production takes place. The nature of these processes is initially a protective one, due to their anti-oxidative action, but as the amount of the formations increases, their beneficial effect wanes. They become a storage place for substances enhancing free radical processes, which makes them toxic themselves. It is such an approach to the primary causal factor for AD which lies at the roots of the new view on AD therapy, suggesting the use of methylene blue-based drugs, laser or intranasally applied insulin. A necessary condition, however, for these methods' effectiveness is definitely an earlier diagnosis of the disease. Although there are numerous diagnostic methods for AD, their low specificity and high price, often accompanied by a considerable level of patient discomfort, make them unsuitable for early, prodromal screening. In this matter a promising method may be provided using an olfactory test, which is an inexpensive and non-invasive method and thus suitable for screening, although as a test of low specificity, it should be combined with other methods. Introducing new methods of AD treatment does not mean abandoning the traditional ones, based on enhancing cholinergic transmission. They are valuable as long as the therapy starts when abundant brain inclusions disturb the transmissions.

Key words: **Alzheimer's disease • mitochondrial diseases • free radicals • oxidative stress • insulin • methylene blue • laser • olfactory test**

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=933430

Word count: 12543
Tables: –
Figures: –
References: 141

Adres autorki: prof. dr hab. Eugenia Tęgowska, Zakład Toksykologii Zwierząt UMK, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń; e-mail: tegowska@umk.pl

Wykaz skrótów: **4-HNE** – 4 hydroksynonenal (4-hydroxynonenal); **ABAD** – dehydrogenaza alkoholowa wiążąca β-amyloid (amyloid-beta binding alcohol dehydrogenase); **AD** – choroba Alzheimera (Alzheimer's disease); **APOE** – apolipoproteina E (apolipoprotein E); **APP** – prekursorowe białko amyloidu (amyloid precursor protein); **IDE** – enzym rozkładający insulinę (insulin degrading enzyme); **MAP** – białka związane z mikrotubulami (microtubule-associated proteins); **NFT** – splątki neurofibrylarne (neurofibrillary tangles); **NOS** – syntaza tlenku azotu (nitric oxide synthase); **PD** – choroba Parkinsona (Parkinson's disease); **PHF** – sparowane spiralne filamenty (paired helical filaments); **TGF** – transformujący czynnik wzrostu (transforming growth factor).

Wstęp

Niedawno pojawił się patent autorstwa DiMauro i wsp. [33] i trzy ekscytujące doniesienia zespołów Atamny [4], Wischika [133] i De Felice [26] o przełomie w leczeniu osób z chorobą Alzheimera (AD). Patent dotyczył terapii wczesnych stadiów choroby poprzez naświetlanie opuszki węchowej światłem czerwonego lasera; publikacje poświęcone były odpowiednio: leczniczym właściwościom substancji od dawna znanej w akwarystyce, okulistyce i diagnostyce przyżyciowej – błękitowi metylenowemu oraz opracowanemu na jego podstawie nowemu lekowi, jak i efektom, jakie daje aplikowana donosowo insulina. Ponadto kilka lat wcześniej zaproponowano niekonwencjonalną metodę wczesnej diagnostyki tego schorzenia, opierającej się na teście węchowym [113] – wprawdzie nieswoistym tylko dla AD [127], lecz stwarzającym przesłanki do zdiagnozowania neurodegeneracyjnej choroby na długo zanim wystąpią pierwsze objawy neurologiczne. Pojawiło się także sporo prac wykazujących, że ograniczenia pokarmowe i/lub suplementacja diety antyoksydantami może dawać dobre rezultaty zarówno w profilaktyce, jak i w opóźnieniu postępów choroby. Są to więc zdecydowanie inne środki niż te zmierzające do wzmocnienia przekaźnictwa cholinegricznego, które były jak dotąd pierwszoplanowymi środkami terapeutycznymi, których stosowanie wynikało z dotychczasowych zapatrywań na temat genezy choroby. W pracy omówiono także biologiczne podstawy zmian dotychczasowych poglądów na pierwotną przyczynę zachorowania oraz przedstawiono wiadomości pozwalające uwiarygodnić diagnostyczne znaczenie testu węchowego oraz leczniczego oddziaływania proponowanych

Electronic PDF security powered by www.IndexCopernicus.com

terapii. Okazało się bowiem, w świetle obecnych badań biochemicznych, genetycznych oraz fizjologicznych zarówno na poziomie organizmu, jak i na poziomie subkomórkowym, że tytuł pracy A. Nunomury: „Neuropathology in Alzheimer's disease: awaking from a hundred-year-old dream" [95] nie jest przesadzony i należy zmodyfikować utrwalony od przeszło stu lat pogląd o genezie i terapii choroby Alzheimera.

Historia i najpopularniejszy obraz patogenezy choroby

Po raz pierwszy symptomy tego „osobliwego schorzenia kory mózgowej" [23] opisał w 1906 roku Alois Alzheimer. Początkowym niepokojącym objawem u jego 51-letniej pacjentki z Wrocławia była paranoidalna zazdrość o męża, której jednak szybko zaczęła towarzyszyć postępująca demencja, a choroba po czterech latach zakończyła się zgonem pacjentki. Wykonane przez Alzheimera pośmiertne histologiczne badania mózgu wykazały zmiany zanikowe tkanki nerwowej; badania cytohistologiczne ujawniły pozaneuronalne złoża wybarwiające się substancjami reagującymi z cukrami (β-amyloid) oraz twory wewnątrzkomórkowe, widoczne po zastosowaniu barwników reagujących z białkami (splątki neurofibrylarne). Były to zmiany spektakularne i zapewne dlatego w dalszych badaniach właśnie na te symptomy zwracano uwagę, natomiast mniejsze zainteresowanie budziły, także opisane przez Alzheimera, symptomy reakcji zapalnej w uszkodzonej tkance nerwowej.

Stwierdzono, że obecność tych patologicznych tworów upośledza cholinergiczne przekaźnictwo synaptyczne, doprowadzając następnie do stanów zapalnych i degeneracji neuronów. Naturalną koleją rzeczy było więc stosowanie terapii substancjami wzmacniającymi neurotransmisję cholinergiczną [92], które jednak, jak się szybko okazało, nie tylko nie powodowały cofania się patologicznych zmian, ale nawet nie były w stanie powstrzymać na długo ich postępu. Tak więc, mimo zastosowania terapii pozornie wycelowanej w samo źródło problemu, diagnoza choroby Alzheimera pozostawała i nadal pozostaje dla pacjentów wyrokiem. Dramat chorych i ich rodzin nie jest bynajmniej marginalnym problemem dla społeczeństwa. Choroba Alzheimera jest jedną z najczęstszych przyczyn załamania się funkcji psychicznych u starszych ludzi i szacuje się, że odpowiada za ponad połowę przypadków otępienia starczego u osób w podeszłym wieku. Obecnie choruje na nią 6–13% (około 15 mln) ludzi po 65 roku życia i dwa razy tyle osób powyżej 85 lat [92]. Prognozuje się, że jeśli choroba ta pozostanie nieuleczalna, do roku 2050 liczba osób zniedołężniałych z jej powodu może wzrosnąć nawet czterokrotnie. Oznacza to olbrzymi światowy problem ekonomiczny, bowiem już obecnie roczny koszt terapii chorych na AD tylko w USA wynosi 100 miliardów dolarów. W kwotę tę nie są wliczone straty państwa związane z tym, że choroba ta dotyka nie tylko pacjenta, ale też na okres kilku lat dezorganizuje życie całej rodziny, a mimo najlepszej opieki i terapii jak dotąd nie odnotowano nie tylko żadnego przypadku wyleczenia choroby, ale nawet długotrwałego zatrzymania jej postępów.

Wczesne objawy choroby Alzheimera są trudne do rozpoznania. Późniejsze symptomy obejmują:

- wyraźne zaburzenia pamięci i zdolności logicznego rozumowania;
- problemy z orientacją przestrzenną i czasową oraz postępującą demencją;
- zmiany osobowości (napady niepokoju, agresji i podejrzliwości);
- dezorganizację cykliki okołodobowej snu i czuwania z następczą insomnią;
- utratę mowy i rozumienia aż do skrajnego otępienia, kończącego się śmiercią.

Jak wspomniano wyżej, pierwotnie uznano, że zmiany neurologiczne, takie jak upośledzenie procesów pamięciowych oraz bezsenność, są wynikiem zaburzeń neurotransmisji w układzie cholinergicznym z powodu utraty neuronów, w których przekaźnikiem jest acetylocholina. Pogląd ten znalazł poparcie w badaniach przeprowadzonych na transgenicznych myszach, u których nadmierna ekspresja acetylocholinasterazy, doprowadzająca do deficytu acetylocholiny, prowadziła jednocześnie do upośledzenia procesów uczenia się [7].

Łączenie zanikania przekaźnictwa cholinergicznego i postępującego upośledzenia pamięci z tworzeniem się blaszek β-amyloidalnych oraz splątków neurofibrylarnych wynikało nie tylko z obserwacji przeprowadzonych *post mortem* na mózgach chorych, ale także znajdywało potwierdzenie w badaniach immunocytochemicznych, które wykazały, iż przeciwciała skierowane przeciw ubikwitynie silnie znaczą splątki neurofibrylarne i płytki starcze, co jest oznaką upośledzenia procesów degradacji białek krótko żyjących. Zarówno zahamowanie usuwania owych białek, jak i zredukowanie przewodnictwa cholinergicznego, stanowi poważną przeszkodę dla procesów formowania pamięci długotrwałej [100]. Nie jest to jednak jedyna sugerowana przyczyna jej upośledzenia. Badania elektrofizjologiczne, w których podawano szczurom domózgowo ludzki β-amyloid, wykazały hamowanie procesów długotrwałego wzmocnienia synaptycznego w hipokampie. Hamowanie to nie następowało jednak, jeśli zwierzętom podawano inhibitor γ-sekretazy (co przeciwdziałało tworzeniu się oligomerów amyloidowych) [128].

Ten przyczynowo-skutkowy obraz etiologii choroby, przedstawiający amyloid i splątki jako czynniki sprawcze, miał jednak pewne wady, bowiem choć choroba ta dotyczy osób starszych (zwykle stwierdza się ją nie wcześniej, niż około 65 roku życia), tego typu zmiany histopatologiczne pojawiają się dość wcześnie, bo już u osób 35-letnich, u których nie obserwuje się postępującej demencji. Tę niespójność próbowano tłumaczyć plastycznością mózgu, w którym do chwili utraty 2/3–3/4 neuronów próg wydolności poznawczej nie zostaje przekroczony, a tym samym nie pojawiają się żadne zewnętrzne symptomy choroby.

Kolejne nieścisłości pojawiają się w związku z korelacją występowania obu tworów patologicznych z czasem wystąpienia i trwania objawów choroby. W przypadku splątków neurofibrylarnych jednoczynnikowa analiza regresji wykazała taką zależność, odpowiednio sięgającą 85 i 91%; dodatkowo liczba splątków prognozowała też ostrość przebiegu choroby. Nie wykazano jednak podobnych korelacji w przypadku β-amyloidu – stąd wysnuto wniosek, że w patogenezie choroby Alzheimera splątki odgrywają ważniejszą rolę i to właśnie one są przyczyną obumierania neuronów [92].

Electronic PDF security powered by www.IndexCopernicus.com

Splątki neurofibrylarne (NFT – neurofibrillary tangles) figurują w opisie wykonanym przez Alzheimera jako agregaty cytoszkieletu. Obecnie, na podstawie subkomórkowych badań histologiczno-biochemicznych, opisuje się je jako sparowane spiralne filamenty (PHF – paired helical filaments), które tworzą olbrzymie splątki, wywodzące się z nich lub będące ich przekształceniami. Poszczególne PHF wydają się składać ze sterty podwójnych, spiralnych, poprzecznie zorientowanych podjednostek, dając ogólny kształt taśmy zwiniętej w lewoskrętną helisę. Najwcześniej pojawiają się one w korze śródwęchowej i hipokampie, następnie w jądrach podstawy i jądrze przednio-grzbietowym wzgórza [92]. Zmiany te rozprzestrzeniają się do innych struktur korowych i ciała migdałowatego [65], czemu towarzyszy pogarszanie się stanu chorego i progresywne obumieranie neuronów, prowadzące do zmniejszania się masy mózgowia, a zwłaszcza hipokampu (o około 45%). Zarówno utrata neuronów, jak i demencja wykazują korelację z obecnością NFT [92,131,132].

Jak wiadomo z badań biochemiczno-histologicznych, PHF tworzą się jako agregaty neuronalnego białka tau, które w fizjologicznych warunkach jest związane z mikrotubulami (MAP – microtubule-associated proteins). Te z kolei pełnią rolę strukturalną oraz uczestniczą w transporcie wewnątrzkomórkowym. Transport ten zachodzi dzięki kinazom i fosfatazom, przeprowadzającym procesy fosforylacji i defosforylacji białek tau. Procesy fosforylacji i defosforylacji, które warunkują pracę mikrotubul, pochłaniają ogromne nakłady energii, jest to cena, jaką organizm płaci nie tylko za ich funkcje transportowe, ale także ich wkład w funkcje kognitywne mózgu. Stopień ufosforylowania MAP rzutuje na ich właściwości, a co za tym idzie – funkcje. Niskofosforylowane białko tau wykazuje znaczne powinowactwo do mikrotubul, podczas gdy hiperfosforylowane – traci tę właściwość. W sytuacji, kiedy procesy fosforylacji i defosforylacji ulegają zaburzeniu, hiperfosforylowane białko tau polimeryzuje, staje się nierozpuszczalne i jest redystrybuowane w PHF. Te z kolei w warunkach nieredukcyjnych akumulują się w splątki neurofibrylarne, które zakłócają funkcjonowanie mikrotubul, hamując tym samym transport neuronalny i doprowadzając do śmierci komórek nerwowych [69,132]. Splątki mogą być również źródłem wolnych rodników [62].

Białko tau nie jest jedynym elementem, który w wyniku zaburzenia fizjologicznych warunków jego funkcjonowania, może pośrednio odpowiadać za część symptomów w AD. Same mikrotubule są zbudowane z tubuliny, której wytwarzanie, jak wykazano w doświadczeniach na kurczętach, koreluje z procesami uczenia się i zapamiętywania [49]. Potwierdzają to również badania na młodych szczurach, u których wytwarzanie tubuliny przez korę mózgową następuje z chwilą otwarcia oczu [3]. O związkach procesów poznawczych z mikrotubulami świadczy również to, że u zwierząt niedotlenionych stopień upośledzenia funkcji kognitywnych wykazuje korelację z obniżeniem poziomu dendrytycznego MAP, a selektywne uszkodzenie kolchicyną mikrotubul tkanki nerwowej powoduje zaburzenia pamięci oraz procesów uczenia się, czyli wykazuje podobne symptomy, jak AD – łącznie z powstawaniem splątków neurofibrylarnych [za 49].

Pierwszoplanowy (w stosunku do β-amyloidu) charakter roli NFT w patologii AD nie jest bezdyskusyjny. Jako kontrargument wysuwa się to, że splątki występują także w wielu innych chorobach neurodegeneracyjnych. Badania cytologiczne z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej wykazały jednak, że w poszczególnych chorobach splątki te nie są identyczne. W zależności od typu agregatów białkowych wchodzących w ich skład, wyróżniono 5 klas tauopatii; w chorobie Alzheimera zasadniczą część splątków tworzą białka 60, 64, 69 i 72/74 kDa, należące do I klasy [30].

Tauopatia może wyjaśnić pewne zbieżności między odrębnymi chorobami. Na przykład, wczesna postać choroby Alzheimera występuje w rodzinach, w których diagnozowano zespół Downa i chłoniaki, a dodatkowo dotyczy osób urodzonych ze starszych rodziców. Zjawisko to tłumaczy się tym, że w tych chorobach obserwuje się dysfunkcję mikrofilamentów i mikrotubul, a że od nich zależy ruchliwość plemników, mężczyźni nią obciążeni mają większe problemy z zapłodnieniem (wskutek czego zostają ojcami później). Ich potomstwo natomiast może dziedziczyć genetyczne dysfunkcje mikrotubul [130], predestynujące do rozwoju AD czy zespołu Downa.

Beta-amyloid

Amyloid pierwszy opisał Virchow już w 1854 r. Może on odkładać się nie tylko w tkance nerwowej, ale także w świetle naczyń, ograniczając ukrwienie mózgu [72] i uszkadzając nie tylko samą tkankę, ale również pogarszając warunki jej regeneracji. Beta-amyloid powstaje z dużego integralnego białka prekursorowego (APP – amyloid precursor protein), tkwiącego w błonie komórkowej tak, że jego koniec C pozostaje wewnątrz komórki, a koniec N tkwi w przestrzeni międzykomórkowej. Pełni ono prawdopodobnie w błonie funkcje receptorowe, bierze udział w kaskadzie sygnałów w komórce, zachodzących z udziałem białka G i poprzez aktywację kinaz serynowo-treoninowych. Rozpuszczalne białka APP to także aktywatory kanałów potasowych; biorą też udział w procesach regeneracyjnych i powstawaniu odczynów immunologicznych.

W warunkach fizjologicznych białko APP ulega proteolizie przeprowadzanej przez sekratazy -α, -β i -γ (metaloproteazy zależne od jonów cynku). Pierwsza z nich uwalnia do przestrzeni międzykomórkowej rozpuszczalny fragment APP; kolejnego cięcia dokonuje γ-sekretaza – w wyniku tego procesu nie powstaje β-amyloid. Niekiedy jednak pierwszego cięcia dokonuje β-sekretaza, w wyniku czego w błonie pozostaje większy, 99-aminokwasowy fragment. Następny etap, przeprowadzany przez γ-sekretazę, może przebiegać dwojako: na zewnątrz może zostać uwolniony fragment 40-aminokwasowy, rozpuszczalny lub 42–43-aminokwasowy, nierozpuszczalny. Ten ostatni wchodzi w skład złogów β-amyloidu. To jednak jeszcze nie przesądza o zaistnieniu zmian patologicznych, bowiem cytoplazma, błona komórkowa i mitochondria są wyposażone w liczne proteazy degradujące β-amyloid. Problem pojawia się, gdy system ochronny zawodzi, co stwierdzono na przykładzie enzymu IDE (insulin degrading enzyme), metaloproteazy cynkowej odpowiedzialnej za rozkład β-amyloidu, której defekt aktywności stwierdzano w rodzinach, w których stwierdzano wystąpienie AD [60].

Podobnie jak w przypadku splątków, tu również istnieją badania sugerujące pierwotny i wyłącznie patologiczny

Electronic PDF security powered by www.IndexCopernicus.com

charakter procesu odkładania się β-amyloidu [50,128], jednak i one nie pozostawiają pewnych kwestii bez wątpliwości. Stwierdzono bowiem m.in., że:

1) nie ma korelacji między postępem demencji a przyrostem liczby blaszek amyloidalnych [52];
2) amyloid występuje również w mózgach zdrowych ssaków, a jego stężenie zmienia się w cyklu okołodobowym i zależy od ilości czasu spędzanego we śnie, a endogennym sygnałem do zmian w jego stężeniu jest oreksyna [56];
3) w AD typu rodzinnego przed osiągnięciem określonego wieku objawów choroby nie obserwuje się, mimo podwyższonego stężenia β-amyloidu [62];
4) u myszy transgenicznych wytwarzających ludzkie białko APP (niewytwarzające przy tym splątków), choć dochodzi do odkładania się β-amyloidu, obserwowane straty neuronalne są niewielkie [53].

Ponadto β-amyloid i splątki formują się w różnych regionach mózgu [30], na różnych etapach choroby [105], co sugeruje, że ich powstawanie może mieć różne przyczyny. Podobnie jak NFT, β-amyloid również nie jest tworem występującym wyłącznie w AD; stanowi wspólny patologiczny element w dużej grupie chorób – skrobiawicach.

Wobec przedstawionych wyżej faktów powstaje pytanie, czy NFT i β-amyloid można traktować jako twory patognomomiczne czy patogeniczne; czy ich powstawanie ma charakter pierwotny, czy wtórny i wreszcie – czy ich formowanie jest wyłącznie procesem patologicznym, czy też zależy to od nasilenia zjawiska (podobnie jak obrona immunologiczna przed antygenami z otoczenia a alergią), czy też może, przynajmniej w niektórych przypadkach AD, wytwarzanie β-amyloidu jest także próbą obrony organizmu (np. ograniczenia liczby wolnych rodników – patrz niżej).

Poglądy na genezę choroby

Jak to słusznie zauważają Nunomura i wsp., neuropatologiczne zmiany u osób z demencją już z definicji opisującej tę zmianę stanowią zjawisko końcowe [95]. Natomiast z badań tych i innych autorów wynikało, że jako zjawisko pierwotne we wrażliwych neuronach (tzn. tych, w których później rozwija się typowy obraz uszkodzeń neuronalnych w AD), stwierdza się wzrost natężenia oksydacji komórkowej [9,10,22,62,74,103,104], co jest wyraźną oznaką następującej peroksydacji lipidów w związku z dużą zawartością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, które są szczególnie podatne na oksydację. Ponieważ wolne rodniki powstają podczas oddychania, defekty nimi wywołane najbardziej dotykają te regiony mózgu, które charakteryzuje najwyższe tempo metabolizmu oraz wykazują największy stopień ekspresji funkcji mitochondrialnych.

Mitochondria służą jako bufor stężenia wapnia i są jednocześnie źródłem oraz likwidatorem wolnych rodników, a także regulatorem apoptozy, jednak ich najbardziej znaną rolą jest dostarczanie komórce energii. Energia ta powstaje w reakcjach łańcucha transportu elektronów i jest zużywana do pompowania protonów z macierzy mitochondrialnej do przestrzeni między błonami mitochondrialnymi. Tak powstały protonowy gradient elektrochemiczny jest w kompleksie V używany do wytworzenia 90% zawartego ATP. Dlatego defekty w pracy mitochondriów odbiją się przede wszystkim na pracy narządów najbardziej wrażliwych na deficyty metaboliczne, tzn. na pracę mózgu, mięśnia sercowego, mięśni szkieletowych, nerek i gruczołów.

Liczne powiązania między patologiami mitochondrialnymi i chorobami neurodegeneracyjnymi, a także wspólny mianownik między nimi w postaci występowania stresu oksydacyjnego, skupiły uwagę badaczy na tych strukturach i ich roli w genezie AD.

Choroby mitochondrialne

Mianem chorób mitochondrialych określa się grupę klinicznych symptomów wynikających z anomalii w metabolizmie energetycznym mitochondriów – defektów fosforylacji oksydatywnej (OXPHOS) [10,137,139]. Większość tych chorób należy do schorzeń neurologicznych [18] lub psychiatrycznych [40], ponieważ dysfunkcje mitochondrialne najbardziej rzutują na pracę tkanek o największych wymaganiach energetycznych, a zwłaszcza mózgu. Mogą one mieć związek z dysfunkcją łańcucha oddechowego wynikłą z pojedynczego lub licznych defektów w pięciu kompleksach oddechowych. Pięcioczłonowy kompleks systemu OXPHOS składa się z kilkudziesięciu podjednostek, z których 13 jest kodowanych przez mitochondrialne DNA. Koduje ono m.in. podjednostki kompleksów I (NADH, ubikwinon: oksydoreduktaza), III (ubikwinol: oksydoreduktaza cytochromu c), IV (oksydaza cytochromu c) i V (syntaza ATP), co oznacza, że podjednostki te są produktami dwóch różnych genomów: jądrowego i mitochondrialnego [137]. Wiele defektów pracy mitochondriów umiemy już przypisać do konkretnych zmian w genomie [18] i wiemy, że nie są one rzadkie; np. w Wielkiej Brytanii występują one z częstością 1 na 10 000 przypadków. Choroby mitochondrialne możemy rozpatrywać jako pierwotne – wrodzone, związane z defektami w genomach: jądrowym lub mitochondrialnym, lub wtórne – indukowane, zarówno przez czynniki wewnętrzne, jak i egzogenne toksyny, ale dodatkowo wyodrębnia się grupę chorób neurodegeneracyjnych, które mogą wynikać z błędnego genomu, jak i być egzogennie indukowane [18,103] i właśnie przynależność AD do tej ostatniej grupy zostanie niżej rozważona.

Komórki somatyczne zawierają dwie kopie każdego jądrowego genu (od obojga rodziców), lecz wiele tysięcy kopii mitochondrialnego DNA jest wyłącznie matczynego pochodzenia. Pacjenci z patogenicznym mitochondrialnym DNA (mtDNA) zwykle posiadają miks kopii prawidłowych i zmutowanych genów – są heteroplazmatyczni. Proporcje jednych do drugich genów mogą wynosić 1–99%. Zwykle jeśli tych zmutowanych jest mniej niż 50% (ale próg ujawnienia się mutacji zależy od jej typu – może więc to być nawet 80%), początkowo objawy choroby nie ujawniają się [18]. Ponieważ podział mitochondriów w dzielących się komórkach nie jest ściśle regulowany, w tym samym organizmie poszczególne tkanki czy narządy mogą być bogatsze w zdrowe lub w zmutowane komórki. W konsekwencji tego, ten sam defekt w OXPHOS mitochondrium może ujawnić u jednej osoby symptomy o różnym nasileniu z różnych tkanek – zależnie od zapotrzebowania tego organu na energię. U dwóch osób, nawet bliźniąt jednojajowych, objawy mogą wystąpić z innych narządów, np. u jednej z mięśni, a u drugiej z CNS, przy czym zjawiska te również mogą mieć różne nasilenie. Choroby mitochondrialne, nawet wrodzone,

Electronic PDF security powered by www.IndexCopernicus.com

mogą się uwidoczniać po wielu latach, ponieważ w miarę podziału komórek populacje DNA w kolejnych pokoleniach będą coraz bardziej jednorodne, z przewagą zdrowych lub zmutowanych komórek. Ponieważ OXPHOS jako skutek własnej pracy generuje wolne rodniki, dodatkowo z biegiem czasu mogą się w nim pojawiać kolejne mutacje, tym bardziej że w mtDNA nie występują histony, chroniące przed uszkodzeniami [11], choć istnieje możliwość, że ich funkcje przynajmniej częściowo pełni mitochondrialny czynnik transkrypcyjny A [57].

Wytwarzanie wolnych rodników samo w sobie nie jest procesem patologicznym, jest bowiem nierozerwalnie związane z wytwarzaniem energii w komórce w wyniku fosforylacji oksydatywnej. Szacuje się, że około 2% tlenu konsumowanego w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym wytwarza wolne rodniki (głównie w kompleksach I i III) w wyniku spontanicznego „wycieku" elektronów [11]. W stanie fizjologicznym organizm utrzymuje jednak równowagę między szybkością ich wytwarzania i usuwania przez komórkowe zmiatacze wolnych rodników. Ochrona komórkowa przed wolnymi rodnikami obejmuje liczne związki, np. dysmutazę ponadtlenkową, peroksydazę i katalazę glutationową. Jednak w stanie patologicznym równowaga między wytwarzaniem a usuwaniem wolnych rodników zostaje zachwiana, może dojść do degeneracji różnych struktur komórkowych – w tym mitochondriów. Mogą wówczas one zmienić swe funkcje tak, że liczba wolnych rodników będzie jeszcze szybciej narastała, prowadząc do jeszcze szybszego narastania patologii mitochondrialnych. Kompleks I jest szczególnie wrażliwy na rodniki wodorotlenowe, a IV – na stres peroksydacyjny. Ponieważ wszystkie pięć kompleksów łańcucha oddechowego działają w środowisku lipidowym, wszystkie też są wrażliwe na peroksydację lipidów [11]. Jeśli więc wytwarzanie wolnych rodników przewyższy wydajność ich zmiataczy, mogą się rozwinąć różne procesy patologiczne doprowadzające do dysfunkcji mitochondriów i deficytów energetycznych, np. w neuronach, co może prowadzić do neuropatii typu AD.

Mitochondria w chorobie Alzheimera

U chorych na AD stwierdza się zwiększone stężenie utlenionych lipidów, białek i RNA, a ponieważ zjawisko to występuje na wcześniejszym etapie choroby niż NFT czy β-amyloid, uznano, że to właśnie wolnorodnikowe uszkodzenia są w etiologii AD głównym i pierwotnym czynnikiem patologicznym, a powstawanie β-amyloidu i NFT jest konsekwencją reakcji na stres oksydacyjny [103,139]. Pogląd ten znajduje poparcie w obserwacji, że aby β-amyloid stał się toksyczny, niezbędne są czynne mitochondria [15]. Wprawdzie były to badania *in vitro* na klonach ludzkich komórek potworniakowych, ale stosowano tu zarówno mitochondria z nieuszkodzonym łańcuchem oddechowym, jak i linię komórek p0 – czyli komórek z mitochondrialnym DNA powodującym niezdolność do przeprowadzania fosforylacji oksydacyjnej. Dodatkowo wykazano też, iż preinkubacja tych komórek z melatoniną lub witaminą E przeciwdziała toksycznemu wpływowi β-amyloidu, są to więc bardzo przekonujące badania podstawowe. Kolejne badania [75], w których wykorzystano myszy transgeniczne o mitochondriach obciążonych APP oraz myszy obciążone APP i ABAD (dehydrogenaza alkoholowa wiążąca β-amyloid), wykazały, że β-amyloid może wpływać szkodliwie na mitochondria poprzez interakcję z ABAD. To również są badania przeprowadzane na modelach zwierzęcych, jednak – jak zauważają autorzy – przyżyciowo nie można ich przeprowadzić na ludziach, a badania pośmiertne mogą dać błędne wyniki ze względu na to, że zarówno komórki, jak i mitochondria, od chwili zgonu pacjenta ulegają przemianom rozkładowym, co może prowadzić do powstawania zjawisk niemających nic wspólnego z samą chorobą.

Pierwsze, nieliczne doniesienia o zmianach energetycznych w tkance nerwowej u ludzi chorych na AD pochodzą z lat 80 ub.w. Opisano wówczas deficyt glukozy w mózgach pacjentów z AD [119], a w 10 lat później udowodniono, że owo zwolnione tempo metabolizmu wyprzedza symptomy AD o dziesięciolecia [116], natomiast uzupełnienie tych deficytów poprawia stan pacjentów [78]. Wyniki te znalazły poparcie w badaniach z wykorzystaniem emisyjnej tomografii pozytronowej, które opisują Mielke i wsp. [86]. Wykazują one obniżony metabolizm glukozy w korze mózgowej, zwłaszcza w obszarach ciemieniowo-skroniowych i czołowym. Ponadto wykazywano także hipometabolizm we wczesnych stadiach AD [10,86], przy czym spadek zużycia glukozy był tu znaczniejszy (o 50%) niż zużycia tlenu (o 20%). W późniejszych stadiach spadek metabolizmu obu był proporcjonalny [10]. Kolejne prace z drugiej połowy lat 90. ub.w. przyniosły coraz liczniejsze dowody na to, że AD jest związana z dysfunkcją mitochondrialną [11]. Wprawdzie początkowo wyniki bywały dyskusyjne, jako że dane otrzymane przez jednych autorów przeczyły wynikom otrzymanym przez innych badaczy, ale wynikać to mogło z różnych przyczyn. Jedną z nich była zapewne metoda pobierania próbek, bowiem uzyskiwano je zarówno przez biopsję mózgową żywych osób [16], jak i *post mortem* w 2–3 h od śmierci w przypadku kontroli i 4 h w przypadku chorych na AD [74]; niekiedy czas ten wynosił nawet 20,5 h [51] lub 24 h [2]. Inną, najbardziej prawdopodobną przyczyną rozbieżności było to, że badania prowadzono na wielu skrawkach, z wielu części mózgu, podczas gdy zmiany te nasilone są tylko w pewnych regionach mózgowych [51] i mogą się zmieniać wraz z postępem choroby. Tak więc w niektórych badaniach wykazano, iż w AD ogólnie obniża się aktywność oksydazy cytochromu c [97], podczas gdy Hirai i wsp. [51], w badaniach zarówno przeżyciowych, jak i z autopsji, wykazali, że zmiany w ilości mtDNA i oksydazy u osób z AD wystąpiły w hipokampie i korze nowej, lecz nie w móżdżku. Zmiany te były więc obserwowane nie w całym mózgu, tylko w regionach wrażliwych, w których u pacjentów z AD występują NFT i płytki starcze. Ponadto w pracy tej wykazano nie spadek, lecz wzrost ilości mtDNA i oksydazy cytochromowej. Wyniki omówione wyżej nie muszą być sprzeczne, bo sama obecność enzymu nie jest równoznaczna z jego aktywnością. Wiadomo, że aby oksydaza cytochromowa spełniała swoje funkcje, musi być związana z błonami, a tymczasem wzrost ilości mtDNA i oksydazy c-1 obserwowano nie w mitochondriach, lecz w cytoplazmie i w wakuolach, a więc w tym przypadku nie pełniła ona swych funkcji. Takie umiejscowienie oksydazy wskazuje, że dochodzi do przyspieszonego obrotu mitochondriów, spowodowanego występowaniem w nich licznych defektów. Dodatkowo u chorych na AD w płytkach krwi wykazano, że zmniejszenie się efektywności oksydazy

Electronic PDF security powered by www.IndexCopernicus.com

powoduje wzrost wolnych rodników [14]. Ich liczba może również wzrastać w związku z obecnością wewnątrz mitochondriów β-amyloidu [1] lub zanikiem potencjału oksydoredukcyjnego, co prowadzi do zmniejszenia ilości ATP i wtórnego narastania stresu oksydacyjnego. Widzimy zatem, że już samo zahamowanie łańcucha transportu elektronów prowadzi do wzmożonego wytwarzania wolnych rodników przez cytochrom b_{566} [25]. Te z kolei mogą wtórnie uszkadzać mitochondria, a ponieważ jak wspomniano, genom mitochondrialny nie jest chroniony przez histony, procesy patologiczne narastają lawinowo. Mitochondria o uszkodzonym łańcuchu oddechowym różnią się od prawidłowych kształtem i rozmieszczeniem komórek; mogą także mieć zdeformowane grzebienie [5]. Ponieważ zniekształcone mitochondria nie mogą wytwarzać ATP w ilości niezbędnej np. do funkcjonowania synaps, już ten pojedynczy defekt mógłby być przyczyną utraty funkcji neuronów.

Inne badania biochemiczne u osób z AD wykazały dodatkowe anomalie biochemiczne w mitochondriach: trzykrotnie zwiększoną ilość 8 OH-dG (8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny, markera uszkodzenia tlenowego DNA) oraz niedobór dwóch głównych enzymów cyklu Krebsa – dehydrogenazy pirogronianowej i 2-oksoglutaranowej, przy jednoczesnym wzroście aktywności dehydrogenazy bursztynianowej i jabłczanowej. Wszystkie te zmiany są skorelowane ze stanem klinicznym chorych, można zatem sądzić, że widoczny w AD postępujący spadek funkcji mózgowych wynika z sukcesywnego hamowania metabolizmu mózgowego [10,78]. Pogląd ten w pełni poparły badania analizujące korelację transkrypcji mRNA z postępem klinicznych zmian w AD, począwszy od pełnej normy do ostatniego stadium choroby [27]. Dzięki użyciu metody RT-PCR badano transkrypty mRNA odpowiadające białkom mitochondrialnych kompleksów I–V. Wykazano wówczas znacznie obniżoną ekspresję genów kompleksu IV i V oraz wzmożoną ekspresję genu proapoptotycznego oraz wszystkich trzech izoform syntazy tlenku azotu, podczas gdy aktywność mechanizmów ochronnych komórki była ograniczona. Wyniki te wykazują, że AD wiąże się z wczesnym wzrostem stężenia markerów stresu oksydacyjnego przy jednoczesnym obniżeniu wydajności procesów ochronnych. Autorzy sugerują więc rozważenie wprowadzenia substancji, które wpływając na aktywność syntazy tlenku azotu, mogłyby być pomocne w leczeniu wczesnych stadiów AD. Jak zatem obecnie pojmuje się rolę w patogenezie AD:
1) dysfunkcji mitochondrialnych;
2) NFT;
3) β-amyloidu?

Który czynnik jest pierwotny, a który wtórny? Ustalenie tego stało się podstawą badań ukierunkowanych na stworzenie nowych metod diagnostycznych i terapeutycznych.

Stres oksydacyjny a splątki neurofibrylarne i β-amyloid

Ponieważ zmiany w mtDNA i oksydazie stwierdzano w neuronach, w których jeszcze nie było NFT, sugerowano, że obserwowana patologia jest pierwotna wobec splątków [5,51]. Z kolei zmiany w mtDNA i oksydazie mogą się wzajemnie nasilać, bo mtDNA jest bardzo wrażliwy na oksydacyjne uszkodzenia i odwrotnie, defekty w mtDNA, a co za tym idzie i w samych mitochondriach, indukują stres oksydacyjny [5].

Analogiczna sytuacja występuje w przypadku β-amyloidu – zmiany oksydacyjne również stwierdzane są wcześniej, niż następuje formowanie blaszek starczych. Taki wniosek wynika z doświadczeń, w których hodowle komórkowe poddawano działaniu jonów miedzi i/lub β-amyloidu (42-aminokwasowej postaci). Jak wiadomo, przejściu Cu^{2+} w Cu^{+} towarzyszy wytworzenie H_2O_2. Komórki takie poddawano więc działaniu katalazy albo hamowano działanie glutationu. Okazało się, że sam β-amyloid zabił około 38% komórek, natomiast po dodaniu katalazy przeżyło ich dwukrotnie więcej, podczas gdy po zahamowaniu glutationu przeżyło 5 razy mniej komórek w porównaniu do tych, które były eksponowane tylko na β-amyloid. Dodanie jonów miedzi do hodowli z β-amyloidem zmniejszyło przeżywalność dwukrotnie, a podanie jonów cynku (hamujących wytwarzanie H_2O_2), choć zwiększyło agregację amyloidu, to jednak zwiększyło też przeżywalność tak, jak podanie dodatkowych ilości katalazy. Świadczy to zdecydowanie o tym, że neurony obumierały nie z powodu samego β-amyloidu, ale z powodu wytworzenia się wolnych rodników [22].

β-amyloid – patogen czy protektor

Wiodącą rolę stresu oksydacyjnego w patogenezie AD i akumulacji splątków oraz amyloidu sugerowano już od początku lat 90. ubiegłego wieku [9]. W tym samym czasie propagowano jednak również pogląd przeciwny, głoszący, że to 42-aminokwasowy amyloid – jeszcze o monomerycznej i rozproszonej postaci (niespolimeryzowany w blaszki), generuje wolne rodniki, jest więc neurotoksyczny [54] i pogląd ten nadal jest podnoszony [56]. Oznaczałoby to, że to powstanie β-amyloidu jest pierwotną przyczyną AD, a wolne rodniki wytwarzane są w odpowiedzi na jego obecność. Gdyby jednak pogląd ten był słuszny i wyczerpujący, to po stwierdzeniu złóż β-amyloidu, podawanie dużych dawek leków przeciwzapalnych powinno doprowadzać przynajmniej do zahamowania postępu choroby. Tymczasem, jak zauważają w swej inspirującej pracy przeglądowej Lee i wsp. [70], w której zestawiają liczne fakty świadczące za pozytywną i negatywną rolą β-amyloidu, zastanawiająca jest mała skuteczność terapeutyczna leków przeciwzapalnych, które przecież blokują proces powstawania wolnych rodników. Należy jednak zauważyć, że były one podawane już po wystąpieniu uszkodzeń spowodowanych przez rodniki, a ponadto źródła i rodzaje tychże są różne, co może znacząco wpływać na skuteczność leków przeciw nim skierowanych. Ponadto wykazano, że w chwili pojawienia się monomerycznej lub dyfuzyjnej postaci β-amyloidu, oksydatywne uszkodzenia neuronów samoistnie zmniejszają się, a zjawisko to występuje zarówno w sporadycznych, jak i rodzinnych postaciach AD [96]. Wywnioskowano więc, iż to powstawanie β-amyloidu łączy się z wygaszaniem stresu oksydacyjnego [62], a więc ma ono charakter reakcji kompensacyjnej. Późniejsze badania wykazały nawet, że nanomolarne stężenia β-amyloidu mogą hamować apoptozę komórek nerwowych po wystąpieniu stresu oksydacyjnego – oznaczałoby to, że β-amyloid jest wręcz tworem niezbędnym do przeżywalności komórek [63].

Te sprzeczne poglądy znalazły konsensus w pracach, w których wzajemne zależności procesów oksydacyjnych i β-amyloidu przebadano na kulturach tkankowych, gdzie można było oddzielić od siebie wpływ poszczególnych frakcji β-amyloidu, dodatkowo uwzględniając stan ich

Electronic PDF security powered by www.IndexCopernicus.com

rozproszenia. Wykazano wówczas, iż najsilniejsze właściwości antyoksydacyjne przejawiają postaci 1-40; słabsze działanie przeciwzapalne cechowało postaci 1-42 [22, 140], którym jeszcze bardziej ustępowały postaci 25-35, zaś 35-25 okazały się nieaktywne [63]. Jednocześnie wykazano jednak, iż żadna z nich nie zachowuje swoich antyoksydacyjnych właściwości w chwili, kiedy ich stężenie w płynie mózgowo-rdzeniowym narasta, zaś kiedy przekracza 1 nM, zyskują właściwości prooksydacyjne [63]. Podobna sytuacja zdarza się, jeśli postać monomeryczna przechodzi w dyfuzyjną, a ta w skupiskową [140].

Antyoksydacyjne właściwości β-amyloidu nie ograniczają się jedynie do chelacji, ale obejmują także jego zdolność do redukcji metali przejściowych [62]. Jego protekcyjna rola dotyczy jednak tylko ochrony przed uszkodzeniami związanymi z indukcją wywołaną jonami miedzi (II) oraz żelaza (II) i (III), a nie np. spowodowanymi defektem łańcucha oddechowego. Udział jonów miedzi i żelaza w budowie złogów amyloidalnych stwierdzono już 10 lat temu, przy czym zauważono, że te pierwsze odkładają się przede wszystkim na obrzeżach blaszek, podczas gdy te drugie – równomiernie w środku i na obwodzie [140]. Wykazano również, że jony obu tych pierwiastków indukują agregację β-amyloidu, lecz nie doprowadzają do tworzenia się włókien, co z kolei stwierdzono w przypadku cynku, również występującego w blaszkach starczych [74,140]. Świadczy to niekorzystnie o tym pierwiastku, lecz jego właściwości mają także pozytywną stronę – hamuje on wytwarzanie H_2O_2 indukowane przez 42-aminokwasową postać β-amyloidu. Można zatem wysnuć wniosek, że chelatowanie przez β-amyloid aktywnych oksydacyjnie metali odgrywa rolę ochronną w komórce [63], co by tłumaczyło doniesienia o ujemnej korelacji między jego poziomem a zakresem uszkodzeń oksydacyjnych w kwasach nukleinowych [22]. W świetle tych faktów uznano β-amyloid za zmianę kompensacyjną, zmniejszającą szkody wyrządzane w komórce przez stres oksydacyjny, co ma znaczenie nie tylko teoretyczne, ale znajduje praktyczne przełożenie na właściwe ukierunkowanie terapii. Terapeutyczne chelatowanie jonów cynku (z pomocą kliochinolu), a nawet miedzi (D-penicylaminą), znacznie zwiększa rozpuszczalność blaszek β-amyloidu, co doprowadza do wzmożenia stresu oksydacyjnego i zwiększenia progresji AD. Wydawać by się mogło, że jest to sprzeczne z przedstawionymi wyżej danymi, które sugerują, iż dyfuzyjne postaci β-amyloidu są mniej szkodliwe, niż blaszki. Jednak, jak wspomniano wyżej, jony miedzi znajdują się przede wszystkim na obrzeżach blaszek, a więc po ich częściowym rozpadzie (gdy w pierwszej kolejności dokonuje się chelacji cynku), stają się one bardziej dostępne reakcjom chemicznym. Nie jest to bez znaczenia, wykazano bowiem, że spośród metali to właśnie miedź jest najskuteczniejszym katalizatorem procesów oksydacyjnych [62]. Można więc rozważać, czy to właśnie jej nie należałoby poddawać chelacji w pierwszej kolejności, po czym dopiero żelazo i cynk [22].

Pozornie sprzeczne dane na temat właściwości β-amyloidu przedstawiali Hardy i Selkoe [50] oraz De Felice i wsp. [25], którzy stwierdzili, że jego oligomeryczne postaci nie tylko nie hamują procesów związanych z wolnymi rodnikami, ale wręcz indukują ich powstawanie. Jednocześnie wykazali, że ten ostatni proces, jak również zjawisko przyłączania β-amyloidu do neuronów, można zahamować, podając przeciwciała przeciw zewnątrzkomórkowej domenie receptora (NR1)-NMDA lub memantynę (bloker tego receptora). Warto jednak zwrócić uwagę, że doświadczenia te przeprowadzono na hodowlach tkankowych, w których badano powstawanie wolnych rodników nieindukowane jonami metali, lecz pracą kanału NMDA. W tym przypadku zatem β-amyloid nie mógł pełnić roli ochronnej w pełnym zakresie, ponieważ brakowało czynnika, przeciw któremu jego działanie jest ukierunkowane. Do pewnego stopnia jednak spełniał swoją rolę, ponieważ jak wykazano, powstanie wolnych rodników (bez względu na ich pochodzenie) stymuluje tworzenie się β-amyloidu [62].

Nie wszystkie osoby obciążone są jednakowym ryzykiem powstawania wolnych rodników indukowanych jonami metali. Jeśli występuje u nich deficyt enzymów odpowiedzialnych za ich wiązanie, takich jak metalotioneiny i transferryny, oznacza to dla nich zwiększoną podatność na stres oksydacyjny. Dotyczy to również osób zamieszkujących tereny o znacznych zanieczyszczeniach metalami. Przy takim środowiskowym przeciążeniu metalami, przyjęte z wodą lub pokarmem nadmierne ich ilości mogą inicjować reakcje wolnorodnikowe, a amyloid może wyciszać powstawanie wolnych rodników indukowanych metalami. Tak więc, mimo że występujące w AD uszkodzenia mitochondriów mogą mieć tło genetyczne, mogą też być indukowane poprzez środowisko. Stwierdzono, że w obszarach zanieczyszczonych β-amyloid może pełnić funkcje kompensacyjne, natomiast jeśli tworzenie się wolnych rodników wynika z wadliwej pracy receptora NMDA lub pracy łańcucha mitochondrialnego czy samego powstawania H_2O_2 [140], antyoksydacyjne znaczenie amyloidu jest mniejsze, a co więcej może być prooksydacyjne. Ponadto jako twór, na którym może dochodzić do osadzania się produktów metabolizmu neuronalnego lub metali przejściowych obecnych w każdej komórce, amyloid może paradoksalnie (przynajmniej w późniejszym etapie dysfunkcji mitochondrialnych) sprzyjać tworzeniu się wolnych rodników.

Dodatkowym czynnikiem komplikującym znalezienie odpowiedzi na pytanie czy β-amyloid jest anty- czy prooksydantem jest to, że wykazuje on różną neurotoksyczność zależnie od zawartej izoformy apolipoproteiny E (APOE). W badaniach nad rolą APOE w AD za pomocą pozytronowej emisyjnej tomografii komputerowej i fluorodeoksyglukozy stwierdzono, że posiadanie APOE ε4 wiąże się z ogólnie niższym tempem metabolizmu w mózgu [116]. Natomiast w badaniach przeprowadzonych na hodowlach komórkowych Neuro-2a [54] wykazano, że gdy posiada się izoformę APOE ε4, to neurotoksyczność β-amyloidu jest większa niż przy innych postaciach, ponieważ dochodzi wówczas do zmian w budowie błon lizosomalnych i przecieków lizosomalnych doprowadzających do apoptozy. Z kolei w badaniach na komórkach B-103-APP wykazano wpływ ε4 na zwiększenie wytwarzania β-amyloidu [135]. Obecność różnych postaci APOE tłumaczy również zmniejszenie (poprzez ε3) lub zwiększenie (poprzez ε4) neurotoksyczności oligomerycznej postaci β-amyloidu przez wpływ na jego agregację [80]. APOE wpływa również na drugi twór związany z AD, czyli NFT, bowiem w skrawkach hipokampalnych osób zmarłych na AD wykazano obecność tej apolipoproteiny także w splątkach neurofibrylarnych. Również w tym przypadku tworzenie się NFT zależy od posiadanych postaci APOE, jako że te mają różną zdolność do łączenia się z białkiem tau [109].

Electronic PDF security powered by www.IndexCopernicus.com

Tak więc β-amyloid i splątki, za sprawą interakcji z APOE, mogą być różne, zależnie od postaci: oligomerycznej, rozpuszczalnej czy zagregowanej, nierozpuszczalnej, łączącej się z białkami tau lub nie i dlatego też, niestety, badania przeprowadzone na myszach transgenicznych, które uwzględniają tylko jeden czynnik, np. wytworzenie nadmiernej ilości APP, mają umiarkowaną wiarygodność w wyrokowaniu o przyczynach neurodegeneracji u ludzi chorych na AD.

Splątki neurofibrylarne – patogen czy protektor

Przedstawiony wcześniej dość jednoznaczny obraz roli białek tau w fizjologii i jako czynnika inicjującego patologię obecnie został uzupełniony o kilka danych wskazujących na to, że tworzenie się NFT nie jest wyłącznie procesem związanym z AD. Obserwowana u chorych na AD redukcja zarówno pod względem liczby, jak i długości mikrotubul i hamowania transportu aksonalnego występuje szybciej, niż tworzenie się NFT, jest więc to proces od nich niezależny; ponadto dzieje się tak w fizjologicznych procesach starzenia się organizmu [16]. Jak wykazano w badaniach porównawczych od niemowląt po osoby 90-letnie (niechorujące na AD), wraz z wiekiem dochodzi do obniżenia stężenia tubuliny w komórkach o 90%, choć wówczas liczba splątków nie narasta. Natomiast istnieją powiązania między patologiami białek tau a stresem oksydacyjnym:

1. Jak wykazali Bowling i Beau [11], w AD dochodzi do dysfunkcji mitochondrialnych, co powoduje obniżenie stężenia ATP i wzrost aktywności kinazy, co z kolei przyczynia się do hiperfosforylacji białek tau. Dodatkową przyczyną tworzenia się NFT jest akumulacja markerów stresu oksydacyjnego, takich jak 4-HNE. Jest to aldehyd o toksycznych właściwościach, tworzony spontanicznie w czasie peroksydacji lipidów i jak wykazano ze zdolnością do indukowania zmian strukturalnych w tau, które prowadzą do tworzenia się splątków [97]. Tak więc oba zjawiska wyraźnie wyprzedzają formowanie NFT.
2. Wykazano również, że ekspresja tau podlega kontroli kinaz regulowanych przez sygnały pozakomórkowe (ERK – extracellular signal-regulated kinases), których aktywność jest wrażliwa na działanie stresu oksydacyjnego.
3. Nadmierna ekspresja oksygenazy hemowej indukuje powstawanie antyoksydantu – bilirubiny, która z kolei powoduje spadek stężenia białek tau oraz wzmożenie oporności komórek na uszkodzenia oksydacyjne wywołane przez H_2O_2 [122].
4. Fosforylacja białek tau sprzyja przeżywalności komórek w czasie ekspozycji na oksydanty, co wykazano w badaniach na neuronach embrionalnych [69].

Podobnie jak w przypadku β-amyloidu, wyłącznie patogeniczny charakter splątków jest dyskusyjny. W doświadczeniach wykonanych na myszach transgenicznych z ludzkim białkiem tau [114] wykazano, że zwiększeniu liczby splątków towarzyszy utrata neuronów i deficyty behawioralne, a stłumienie ekspresji białka tau (doksycykliną) powodowało zahamowanie neurodegeneracji i poprawianie procesów pamięciowych. Nie zatrzymywało jednak procesu odkładania się NFT, który w tej sytuacji nie rzutował na deficyty pamięci. Autorzy sugerowali więc, że skoro powrót funkcji poznawczych jest możliwy we wczesnych stadiach tauopatii, mimo ich narastania, należy zastanowić się, czy splątki są tylko patologią, czy też pełnią rolę protekcyjną, np. kierując substancje neurotoksyczne w mniej groźną, bardziej stabilną postać.

To pytanie zadali również Lee i wsp. [69], którzy w swej pracy przeglądowej zwrócili uwagę, iż sama korelacja postępu choroby i ilości NFT nie przesądza co jest przyczyną AD. Wykazano przecież, iż neurony obciążone splątkami przeżywają dziesięciolecia, a z kolei tracone z wiekiem neurony wielokrotnie przewyższają liczbowo te, które wykazują obecność NFT. Tak więc, ponieważ nie ma korelacji między apoptotycznymi zmianami, a depozytami białek tau, to nie one są pierwotnym czynnikiem neurodegeneracyjnym. Uznano zatem, że w AD pierwotnym czynnikiem inicjującym kaskadę zdarzeń, jest stres oksydacyjny [69,70], inicjujący powstawanie β-amyloidu i splątków, a twory te działają synergistycznie [59]. Oddziaływanie wytworzonych wolnych rodników na białka, DNA czy lipidy błonowe, kumuluje się z czasem, objawowo AD jest więc zawsze chorobą wieku podeszłego, mimo że gdy jest związana z mutacją niektórych genów, istnieje od chwili narodzin. Choroba wówczas rozwija się wcześniej, jednak objawy i tak nie występują przed piątą dekadą życia.

Genetyczne tło choroby

Jak już wspomniano wyżej, w indukcji AD bierze się pod uwagę zarówno wpływ czynników środowiskowych, jak i genetyczne uwarunkowanie. Wykazano wiele zmian genetycznych, które sprzyjają rozwojowi choroby, choć żaden z nich nie jest wyłącznym czynnikiem sprawczym. Tak więc wcześniej wystąpi i będzie miała szybszy przebieg u osób z mutacjami np.:

- na chromosomie **21** (związana z nadmiernym tworzeniem prekursora β-amyloidu, APP) [110];
- na chromosomach **14** i **1** (geny kodujące preseniliny 1 i 2, związane z transportem cholesterolu i białek, aparatem Golgiego, modyfikujące działanie sekretaz i kodujące nadmierne wytwarzanie dysmutazy ponadtlenkowej) [110];
- na chromosomie **19** (zawierającym geny kodujące APOE, związaną z metabolizmem lipidowym i odpowiedzialną za modulację wzrostu komórek i ich procesy regeneracyjne). Jak wspomniano wyżej, istnieją cztery izoformy APOE, ale tylko ε4 jest związana z deficytem acetylocholinesterazy [118] i wrażliwością mężczyzn na choroby sercowo-naczyniowe [130]. Przy dwóch allelach ε4 obserwuje się większy deficyt acetylocholinesterazy i wcześniejsze wystąpienie choroby, niż przy jednym [130];
- na chromosomie **12** (zawierającym geny kodujące dehydrogenazę aldehydową – ALDH, detoksyfikującą także 4 hydroksynonenal – 4-HNE, toksyczny produkt peroksydacji lipidów). U osób homozygotycznych z APOE-ε4 i choćby z jednym allelem ALDH2*2 ryzyko zachorowania na AD wzrasta 36-krotnie [110];
- na chromosomie **10** (gdzie usytuowany jest gen kodujący enzym degradujący insulinę [60] i gen kodujący zwiększone stężenie plazmowe βA42 [39]) – dotyczy to choroby o późnym początku.

O tym, że tylko wystąpienie danej mutacji, np. zwiększenie puli APP, nie wystarcza do rozwoju choroby, świadczą obserwacje przeprowadzane na bliźniętach. Autorzy prac badających częstość występowania AD wśród bliźniąt

Electronic PDF security powered by www.IndexCopernicus.com

jedno- i dwujajowych, stwierdzili bowiem, że wśród tych pierwszych nie zawsze obie osoby zapadają na AD, choć rzeczywiście zachorowalność obu była tu częstsza niż w przypadku bliźniąt dwujajowych [117]. Zjawisko to, jak wspominano wyżej, wynika z tego, iż przy AD ważne jest nie tylko dziedziczenie jądrowe, ale też mitochondrialne, a to z kolei nie jest tak precyzyjne jak jądrowe, tak więc przy podziałach komórkowych może dojść do nierównomiernego rozdziału mitochondriów zdrowych i obciążonych genetycznie do obu organizmów.

Poszukiwanie metod wcześniejszej diagnozy AD

Zmiana poglądów o roli NFT i β-amyloidu w genezie AD niesie ze sobą potrzebę zadania sobie pytania, czy dotychczasowe metody terapeutyczne, związane z podtrzymywaniem stymulacji cholinergicznej, również nie wymagają radykalnej zmiany. Wydaje się, że odpowiedź jest negatywna przynajmniej z dwóch powodów. Po pierwsze, wykazano, iż stymulacja receptorów cholinergicznych jest nie tylko niezbędna do podtrzymania zdolności kognitywnych, ale też za sprawą pobudzania receptorów muskarynowych, pozwala chronić DNA przed uszkodzeniami, stresem oksydacyjnym i skutkami upośledzenia funkcji mitochondrialnych [29]. Po drugie, dopóki nie zostaną wprowadzone metody wcześniejszego diagnozowania AD (wśród których proponuje się m.in. test węchowy i badania przesiewowe na obecność 4-HNE w moczu lub w krwi) i nie będzie możliwe rozpoczęcie terapii wyprzedzającej zaawansowane zmiany w neuronach (jak to się obecnie dzieje), proponowane w dalszej części pracy terapie będą miały ograniczone działanie.

Według danych z roku 2003 biochemiczna, przyżyciowa diagnoza AD przeprowadzana na próbkach osocza, ukierunkowana na β-amyloid czy splątki jest trudna i jej trafność mieści się w przedziale 65–90%. Stosunkowo najlepiej diagnozuje się AD badając płyn mózgowo-rdzeniowy, jednakże u około 2% osób łączy się to z ciężkim bólem głowy, ponadto muszą to być badania nie pojedynczego czynnika, lecz kompleksowe, a to zwiększa ich koszt. Wykazano bowiem, że należy brać pod uwagę co najmniej dwa markery jednocześnie, ponieważ analizy pojedyncze, np. całkowitej zawartości białek tau czy β-amyloidu, dają mało wiarygodne wyniki. Łączne oznaczanie tych dwóch czynników w zakresie odróżnienia chorych od zdrowych daje 86% czułości i 97% swoistości, w zakresie odróżniania od innych chorób – odpowiednio 80 i 73%, a w zakresie odróżniania chorych na AD od pacjentów z innymi chorobami neurologicznymi – 80 i 89%. By jednak te wyniki były wiarygodne, zmiany muszą być duże, a to oznacza, że i postęp choroby musi być znaczny [76]. Sprawdza się więc wartość diagnostyczną w płynie mózgowo-rdzeniowym kolejnych czynników: stężenia białka MPA-tau, stosunku ufosforylowango białka P-MPA-tau do całkowitego białka MPA-tau, stężenia β-amyloidu, markerów stresu zapalnego, stresu oksydacyjnego, stężenia cytokin (sposób najbardziej zawodny); przeprowadza się także badania genetyczne stosunku alleli APOEε4 do APOEε3. Z tego zestawu jedynie badanie markerów stanu oksydacyjnego można uznać za wynik wykrywający stosunkowo wczesną zmianę, ale jest to parametr mało swoisty (patrz niżej). Dobrym wskaźnikiem ryzyka, zarówno w rodzinnych, jak i sporadycznych AD o późnym początku, są badania na posiadaną postać APOE [118]. Wykazano, że przy każdym allelu ε4 symptomy AD mogą wystąpić o 5–7 lat wcześniej [64]. Może to być związane z tym, że u tych osób, nawet zdrowych, zmniejsza się przepływ krwi i tempo metabolizmu [108]. Takie warunki same w sobie powodują zwyrodnienie neuronalne, a więc rozwój choroby może wystąpić wcześniej. Jednak choć czynnik ten jest oznaczany we krwi stosunkowo łatwo i powszechnie (np. w Kanadzie), nie zaleca się go do celów diagnostycznych jako standardowy wskaźnik przedobjawowy, ponieważ w przypadkach AD związanych z obecnością allelu ε4 „nie istnieją metody zapobiegawcze" [92]. Autorzy tego stwierdzenia w chwili publikacji nie wykluczali wartości testu w przyszłości, kiedy będzie możliwa terapia genetyczna, bowiem wiadomo, że postać ε4 różni się od korzystnej ε3 tylko jednym aminokwasem. Tymczasem już po 8 latach od tej publikacji okazało się, że po podaniu pacjentom z ε4 środka poprawiającego wrażliwość na insulinę i aktywującego mitochondria – Rozyglitazonu – poprawiają się zdolności poznawcze u ludzi, a pamięć i procesy uczenia się u myszy [12,99]. Niepotrzebna jest więc manipulacja genetyczna, by zmniejszyć szkody spowodowane przez ε4, a badania tego markera stają się terapeutycznie wskazane i to już przy podejrzeniu początków choroby, jako że Rozyglitazon jest skuteczny tylko w początkowych i umiarkowanych patologiach związanych z AD [12].

Pozostałe wymienione potencjalne wskaźniki AD również nie pozostają bez wad. W przypadku MPA-tau wiążą się one z nieswoistością tego markera, ponieważ jego ilość wzrasta również w innych chorobach, np.: w otępieniu starczym, zespole Downa, depresji i chorobie Creutzfeldta-Jakoba (tu wzrost jest kilkakrotnie większy niż w innych chorobach). Precyzyjność testu opartego na MPA-tau można poprawić, badając stosunek PMPA-tau/MPA-tau. Ponadto to, iż wskaźnik ten wykazuje wyższe wartości w depresji, którą rozważa się jako syndrom prodromalny AD [46], nie wyklucza jego wartości w diagnostyce tej choroby.

W przypadku metody opartej na badaniu 42 β-amyloidu wątpliwości budzą sprzeczne wyniki o związku jego stężenia z postępem choroby. Dotychczas zjawisko to tłumaczono tym, że wraz z postępem choroby spada stężenie izoformy 42 β-amyloidu, ponieważ zostaje ona związana w blaszkach [140]. Badania należałoby więc wykonywać w kilku powtórzeniach, aby wykryć zmianę, a dodatkowo – jak wynika z przedstawionych wyżej faktów – wynik pozytywny potwierdzi AD, ale w późniejszym stadium chorobowym. Ponadto obecność amyloidu stwierdza się także w innych chorobach otępiennych.

Główną wadą diagnostyki opartej na badaniu markerów procesu zapalnego jest, jak już wspomniano, niewielka swoistość tego testu. Polega on na badaniu stężenia markera IL-1 w mózgu, który w przypadku tworzenia się blaszek, czemu towarzyszy reakcja ostrej fazy i aktywacja mikrogleju, wzrasta nawet sześciokrotnie. Jednakże choć obserwuje się korelację między wzrastaniem stężenia IL-1 a pogłębieniem objawów AD [115], zjawisko to obserwuje się także w trakcie innych chorób neurodegeneracyjnych, np. w chorobie Parkinsona [6].

Jak już wspominano, w AD stwierdza się dużą aktywność wolnych rodników. Narasta stężenie izoprostanów i CuZn-SOD (dysmutazy ponadtlenkowej), a ich ilość wykazuje

Electronic PDF security powered by www.IndexCopernicus.com

korelację z postępem objawów otępiennych [104], w dodatku można je oznaczać w moczu – jest to więc badanie nieuciążliwe dla pacjenta. Można także oznaczać 3-nitrozynę (wczesny marker stresu oksydacyjnego). Zaletą tych oznaczeń jest to, że stężenie jej narasta nawet przed behawioralnymi symptomami AD [41], jest to więc metoda obiecująca i wczesna. Zastosowanie w diagnostyce AD może znaleźć także badanie stężenia 8-hydroksyguanozyny, który wprawdzie narasta także w zespole Downa, ale w przypadku AD obserwowana jest korelacja z czasem trwania i siłą symptomów. Niestety, w przypadku testów związanych z markerami stresu oksydacyjnego, choć jak wynika z powyższych faktów, jest to metoda obiecująca i pozwalająca na stosunkowo wczesną diagnostykę, z powodu małej swoistości i konieczności wprowadzania dodatkowych testów biochemicznych nie nadaje się do badań przesiewowych.

Jeśli przyjmiemy, że dobry marker powinien się odznaczać następującymi cechami:

- jednoznacznością (przynajmniej 80% czułość i 80% swoistość);
- łatwym dostępem do materiału biologicznego (mocz lub krew);
- korelacją z ostrością symptomów,

a ponadto być prognostykiem choroby i postępów terapii, to powyższy przegląd metod diagnostycznych sugeruje, że dalsze innowacyjne badania są niezbędne.

Wymienione testy nie są ani tanie, ani nieinwazyjne, ani w pełni jednoznaczne, ani skorelowane tylko z tą chorobą, ani nie pozwalają na skuteczne (w zakresie utrzymania zdolności kognitywnych) terapie. Dlatego należy rozważyć naukowe podstawy proponowanej nowatorskiej metody badań węchu jako prognostykę choroby i zweryfikować jej wiarygodność. Jest to może metoda nietypowa, także nie w pełni swoista, ale tańsza od testów biochemicznych i z pewnością nieinwazyjna, może przy tym pełnić rolę testu szybkiego ostrzegania, a to z kolei może pozwolić na włączenie, ale już w węższej grupie osób obciążonych ryzykiem, innych potwierdzających testów, np. zawartości 4-HNE w moczu. W przypadku wyniku pozytywnego umożliwi to zastosowanie terapii działających na wcześniejszym etapie, niż te skupiające się na podtrzymywaniu przekaźnictwa synaptycznego.

Węch a choroby

Człowiek jest gatunkiem mikroosmatycznym, lecz mimo to ostatnio patologie ludzkiego węchu przeżywają wyraźny wzrost zainteresowania ze strony naukowców i lekarzy. Upośledzenie węchu może wynikać ze zmian w obrębie samej śluzówki nosa i/lub ze zmian w opuszce czy drogach węchowych albo też w poszczególnych częściach ośrodkowego układu nerwowego, takich jak płaty przedczołowe, jądra przegrodowe, ciała migdałowate lub płaty skroniowe. Rejony te mają liczne połączenia z innymi ważnymi częściami mózgu, takimi jak wzgórze, podwzgórze oraz kora czołowa i skroniowa. Istnieje więc anatomiczne uwarunkowanie wpływu np. opuszki węchowej na działalność hipokampa, poparte zresztą badaniami na szczurach, które wykazały, iż usunięcie opuszki węchowej powoduje pogorszenie procesów uczenia się zwierząt, a podnoszenie stężenia cynku w hipokampie (przez podawanie dootrzewnowe) poprawia ich wyniki (cynk jest blokerem receptorów NMDA, a więc działa podobnie jak memantyna [94]).

Chory może być świadomy swojego upośledzenia węchu, lecz równie dobrze może nie zdawać sobie z tego sprawy, nawet w przypadku znacznych ubytków [32]. Zanikowi węchu mogą towarzyszyć zmiany w odczuwaniu smaku potraw, lecz i to nie zawsze występuje [za 34]. Hiposmia występuje w różnych chorobach, takich jak chociażby zapalenie zatok przynosowych, w chorobie Parkinsona (PD) [84], Huntingtona [88], narkolepsji [120], a nawet trądzie [87]. Można więc uznać, że upośledzenie węchu jest zjawiskiem mało swoistym, a ponieważ odróżnienie na jego podstawie początków choroby Parkinsona i AD jest niemożliwe [35], traktowanie go jako prognostyka konkretnej choroby neurodegeneracyjnej wzbudza kontrowersje. Jakie są więc biologiczne podstawy szukania współzależności między utratą węchu a chorobą Alzheimera i jakie zastosowanie mogą one znaleźć w diagnostyce?

Już 20 lat temu w badaniach histopatologicznych zauważono, że zmiany opisywane jako typowe dla przebiegu AD, czyli blaszki amyloidalne i NFT, znajdują się nie tylko w hipokampie, ale również w jądrze węchowym przednim, opuszce węchowej oraz ośrodkowych strukturach węchowych (ciałach migdałowatych i płatach skroniowych) [39,65]. Również typowe dla AD zmiany zanikowe nie ograniczają się do hipokampa, ale stwierdza się je również w drogach węchowych i sięgają one 40% na przekroju i 52% w liczbie zmielinizowanych neuronów [24]. Kolejnym powiązaniem między patologiami struktur węchowych a AD jest to, iż w obu biorą udział jony metali. Samudralwar i wsp. [113] po analizie występowania 11 pierwiastków w drogach węchowych prawie u 100 pacjentów z AD stwierdzili największe obciążenie jonami żelaza (zwiększone o około 20% w ciałach migdałowatych i o 30% w korze gruszkowatej) oraz cynku (zawartości miedzi nie badano). Może to sugerować zwiększoną generację wolnych rodników i degradację komórek właśnie w tych regionach, analogicznie do zmian stwierdzanych w hipokampie. Zjawisko to nie jest przypadkowe, bowiem badania pośmiertne przeprowadzone na tkankach mózgowych 14 chorych wyraźnie wykazały swoistość rozmieszczenia zmian patologicznych występujących w AD: NFT i blaszki amyloidalne występowały obficie w rejonach węchowych mózgu, za to w korze czuciowej, ruchowej i wzrokowej zmiany były minimalne i typowe dla wieku [98]. Ponadto dzięki zastosowaniu technik obrazowania rezonansu magnetycznego, wykazano w tych regionach zmieniony i zredukowany przepływ krwi. Wywnioskowano zatem, że drogi węchowe są miejscem ważnym w patogenezie AD. Zarówno tu, jak i w hipokampie dochodzi do analogicznych zmian, przy czym patologie w strukturach węchowych skutkują upośledzeniem tego zmysłu [65,72]. Znajduje to również poparcie w badaniach nad transgenicznymi myszami (obciążonymi patogenicznym białkiem tau i nadmiarem białka APP), u których zmiany degradacyjne stwierdzano w układzie limbicznym i korze węchowej [71]. Powiązania deficytów węchowych i AD mogą mieć zatem podłoże genetyczne, zwłaszcza, iż rejestruje się je nie tylko u chorych, ale również ich krewnych pierwszego stopnia [za 32], a jeśli asomia łączy się z obecnością przynajmniej jednego allela APOE ε4, prawdopodobieństwo zachorowania wzrasta pięciokrotnie [45].

Electronic PDF security powered by www.IndexCopernicus.com

Najważniejszym aspektem związanym z upośledzeniem węchu jest, z punktu widzenia diagnostyki AD, jego wczesne występowanie. Wykazano, że zmiany w funkcjonowaniu tego zmysłu pojawiają się u osób, u których deficyty kognitywne są jeszcze nieznaczne [36]; dowiedziono również korelacji między stopniem upośledzenia powonienia a tempem postępowania demencji i jej nasileniem [65,105]. Jako narzędzie diagnostyczne lub prognostyczne, ma ono jednak pewne wady. Pierwszą i najpoważniejszą jest jego mała swoistość. W metaanalizie prawie 50 prac stwierdzono, że nie ma różnic w charakterze zmian w powonieniu u osób z AD i PD [84]. Nie można jednak wykluczyć, że w przyszłości bardziej precyzyjne badania (rozpatrujące różnice w odczuwaniu jakości i/lub ilości zapachów lub ich składu) pozwolą na opracowanie jego specyfiki chorobowej, co wykorzystano w przypadku trzech postaci trądu [87]. Drugim słabym punktem diagnostyki AD opartej na deficytach węchowych jest to, iż są one naturalnym zjawiskiem w procesach starzenia się organizmu [90]. Szacuje się, że dotyczą one przeszło 50% populacji osób po 65 roku życia [42]. Próg pobudliwości węchowej rośnie z wiekiem i ponad 75% ludzi powyżej 80 lat wykazuje osłabione odczuwanie zapachów. Problem ten można jednak rozwiązać odpowiednio zawężając grupy wiekowe (dobierając równolatków w grupie kontrolnej i z podejrzeniem choroby). Deficyty węchowe zależą także od wielu innych czynników, tak biologicznych, jak i środowiskowych. Inną zdolność do odczuwania zapachów wykazują kobiety i mężczyźni, a dodatkowo różnice między nimi nasilają się z wiekiem (u mężczyzn zanik wrażliwości powonienia może być nawet trzykrotnie większy niż u kobiet [90]). Innego rzędu zmiany występują również w zależności od palenia tytoniu, wykształcenia i wykonywanego zawodu [32]. Aby test węchowy miał jakąkolwiek wartość należy więc badaną grupę wyselekcjonować z uwzględnieniem tych czynników, co nie zawsze jest proste (np. w starszych grupach wiekowych, w związku z różną średnią życia kobiet i mężczyzn, tych pierwszych będzie więcej). Na wartość diagnostyczną upośledzenia powonienia ma ponadto wpływ stan zdrowia pacjentów. Stopień demencji rzutuje na zdolność badanego do oceny własnych braków, na jego reaktywność i współpracę z badającym. Jednak i ten problem można przezwyciężyć, a wyniki zobiektywizować, badając potencjały wywołane i/lub rytm oddechowy. Badania rytmu oddechowego w dużym stopniu uniezależniają wynik od stopnia demencji i/lub niekomunikatywności. Polegają one na rejestracji głębokości wdechu w odpowiedzi na podany bodziec węchowy, z tym że wówczas powinien to być zapach awersyjny [123]. Jak wykazano w pracy Franka i wsp., taka odpowiedź na awersyjne bodźce zapachowe jest reakcją odruchową, nie jest więc tłumiona u osób z deficytami pamięci lub uwagi [42]. Badania takie powinny jednak być ujednolicone co do dawki stymulanta (co jest może oczywiste), ale także co do rodzaju zastosowanej substancji, bo jak wykazano, kłębuszki w opuszce węchowej są wrażliwe na różne stężenia różnych cząsteczek zapachowych [93]. Jak wspomniano, badania olfaktometryczne można wykonywać także u osób niechętnie współpracujących z pomocą dodatkowej obiektywnej rejestracji potencjałów wywołanych [129], która powinna być oczywiście poprzedzona stwierdzeniem braku uszkodzeń nocyceptorów śluzówki nosa (stymulacja kontrolna 50% CO_2) [101]. Badania takie powinny też być ciągłe – jak wykazał to zespół Memory Disorders Clinic [32], który powtarzał badania 90 pacjentów co pół roku przez 50 miesięcy. Stwierdził on, że znaczące różnice między osobami z grupy ryzyka a grupą kontrolną pojawiły się po 2 latach. Przy okazji wyłoniono dodatkowy czynnik prognostyczny, bowiem u około 82% osób, u których na początku badań stwierdzono duże upośledzenie węchu i które nie były świadome swoich braków, w ciągu 2 lat zdiagnozowano AD. Jest to więc czynnik znaczący.

Podsumowując, w oparciu o obiektywne badania z rejestracją głębokości wdechu, zwłaszcza wzbogacone o rejestrację potencjałów wywołanych oraz badania psychologiczne, można sprawić, iż chory rozpocznie terapię, zanim dojdzie do znaczących ubytków w tkance mózgowej. Jednak bez względu na wady testu olfaktometrycznego, a także konieczność stosowania dodatkowych parametrów diagnostycznych, już samo wskazanie tak prostą i tanią metodą grupy ryzyka jest wskazaniem, u których osób po wykonaniu tych badań przesiewowych należy przeprowadzić testy uściślające. Mogą to być testy biochemiczne, takie jak badanie obecności allela APOE ε4 [45], a nawet biopsja, ponieważ nabłonek węchowy jest zdecydowanie najmniej inwazyjnym miejscem poboru próbek (co już zresztą znalazło zastosowanie w diagnostyce choroby Creutzfeldta-Jakoba).

Sposoby terapii a znajomość genezy choroby

Stwierdzenie, że u osób chorych na AD dochodzi do osłabienia przekaźnictwa cholinergicznego przyniosło oczywisty skutek w postaci ukierunkowania terapii na wzmacnianie neurotransmisji. W świetle obecnych danych na temat genezy AD oznacza to, iż leczono tę chorobę objawowo, nie hamując jej rozwoju. Uwaga badaczy skierowała się więc w stronę przeciwdziałania tworzenia się β-amyloidu i splątków neurofibrylarnych. Wychodzili oni z założenia, że AD to następstwo chronicznego braku równowagi między wytwarzaniem i usuwaniem β-amyloidu, w związku z czym zaproponowali 6 możliwych strategii leczenia [50,81]:

1. Częściowe zahamowanie aktywności β- lub γ-sekretazy, enzymów odpowiedzialnych za cięcie APP, prekursora β-amyloidu. Pierwsza publikacja opisująca wyniki hamowania γ-sekretazy przez DAPT ukazała się w 2004 r., a w roku następnym opisano działanie inhibitora β-sekretazy. W obu przypadkach występowały jednak niespodziewane działania niepożądane [81]. Jednakże skoro białko APP po zakończeniu swych funkcji powinno być przez sekretazy usuwane z błony, trudno spodziewać się, że może to być bezpieczna droga terapeutyczna.
2. Przeciwdziałanie oligomeryzacji lub podwyższenie szybkości usuwania β-amyloidu (w tym immunizacja przeciw β-amyloidowi) [50]. Również w tym przypadku doszło do pojawienia się niespodziewanych działań niepożądanych w postaci stanów zapalnych ośrodkowego układu nerwowego. Mogły być one spowodowane tym, że różne pule β-amyloidu cechują prawdopodobnie różne mechanizmy eliminacji i katabolizmu, tak więc tego typu leki musiałaby się charakteryzować dużą swoistością.
3. Zapobieganie reakcjom zapalnym, np. przez stosowanie inhibitorów cyklooksygenazy [50]. U myszy transgenicznych o wzmożonym wytwarzaniu ludzkiego APP metoda ta dawała korzystne efekty, jednak u ludzi takiego wpływu dla niesteroidowych leków przeciwzapalnych nie wykazano – z wyjątkiem grupy osób stosujących duże dawki (patrz niżej).

Electronic PDF security powered by www.IndexCopernicus.com

4. Modulowanie stężenia cholesterolu. Metoda ta dawała efekty u osób stosujących statyny. W doświadczeniach przeprowadzonych na myszach transgenicznych dla APP wykazano korzystny wpływ obniżenia stężenia cholesterolu na stężenie β-amyloidu [50], ale statyny mają również inne oddziaływanie, niezwiązane ze stężeniem cholesterolu.
5. Zapobieganie agregacji β-amyloidu poprzez chelację miedzi i cynku. Pierwiastki te mają jednak ważne znaczenie dla organizmów żywych, a chelatory cechuje wysoka stała nieodwracalnego łączenia się z metalami, mogą więc usunąć zbyt dużą ich pulę. Ponadto wyżej wspomniano o możliwości powstania paradoksalnej reakcji narastania w takiej sytuacji ilości wolnych rodników, tak więc i ta metoda okazuje się ryzykowna. Natomiast nowa grupa leków – MPAC (metal-protein attenuating compounds), słabiej wiążąca metale, nienaruszająca więc homeostazy metali w całym organizmie, jest w stadium prób klinicznych [50].
6. Zapobieganie synapsotoksyczności i neurodegenaracji przez stosowanie substancji o właściwościach neuroprotekcyjnych lub neurotroficznych. Także ta terapia pozostaje jeszcze w fazie prób (choć można do nich zaliczyć także stosowany już w cukrzycy Rozyglitazon).

Trwają również badania nad modyfikacją białek tau, np. przez zastosowanie czynników stabilizujących mikrotubule czy hamujących swoiste kinazy [81].

Wszystkie te metody, choć działające na etapie wcześniejszym niż substancje podtrzymujące przekaźnictwo, działają jednak na powstające lub już powstałe twory patologiczne, natomiast znacznie korzystniejszą terapią byłaby taka, która uderzałaby w pierwotne źródło patologii, czyli – zgodnie ze stanem obecnej wiedzy – w stres oksydacyjny.

Przyjęcie poglądu o roli stresu oksydacyjnego w genezie AD tłumaczy korzystną rolę statyn w ochronie przed tą chorobą, inną niż stabilizacja stężenia cholesterolu. Udowodniono bowiem, że leki te zwiększają całkowity potencjał oksydacyjny osocza, chronią więc neurony przed oksydacją lipidów błonowych [66]. Tłumaczy to też, dlaczego w większości opracowań epidemiologicznych wykazywano, że w grupie osób cierpiących na reumatoidalne zapalenie stawów, które stosowały stale duże dawki leków przeciwzapalnych, ryzyko zachorowania na AD spadało [73]. Natomiast wystąpienie niedokrwiennego udaru mózgu, nawet najdrobniejszego, podnosiło ryzyko wystąpienia demencji dwudziestokrotnie [131].

Wolnorodnikowa teoria genezy AD jest również podstawą do proponowania zmian dietetycznych lub suplementacji diety jako metod profilaktycznych. Wśród substancji najczęściej wymienianych jako zmiatacze wolnych rodników, a więc substancji, które mogą działać na poziomie inicjacji zmian chorobowych, wymienia się około 20 substancji [103], w tym najczęściej witaminę C oraz substancje lipofilne: witaminę E [55] i melatoninę [15]. Wyniki eksperymentów z ich zastosowaniem bywają jednak rozbieżne. Wyjaśnienie tego sugerują badania przeprowadzone na wielką skalę, w których pacjentom w średnim lub zaawansowanym stadium AD podawano 2000 IU tokoferolu (witaminy E), co skutkowało wprawdzie spowolnieniem postępów choroby, lecz nie cofnięciem jej objawów [92]. Z kolei w doświadczeniach, w których działanie witaminy E i melatoniny było zdecydowanie pozytywne, substancje te były podawane prewencyjnie, a nie leczniczo [15,103]. Wskazuje to więc, że gdy zmiatacze wolnych rodników zostały podane w chwili, kiedy doszło już do wytworzenia patologicznych zmian, np. do peroksydacji lipidów, można tylko spowolnić dalsze narastanie tych procesów. Wprawdzie w doświadczeniach na myszach wykazano, iż podawanie w diecie kwasów tłuszczowych nasyconych lub nienasyconych może zmienić szybkość uczenia się i skład lipidowy błony (co mogłoby sugerować wymianę kwasów tłuszczowych, a więc „odwracalność" procesów peroksydacji) w porównaniu z grupą kontrolną, hodowaną na standardowej diecie, jednak badania te po pierwsze, przeprowadzono na zdrowych myszach, a po drugie, trwały one około ⅓ długości życia zwierząt [121]. Także najnowsze badania na ludziach, którzy otrzymywali z pokarmem kwasy tłuszczowe n-3 częściej niż 2 razy w tygodniu, po prawie 4-letniej obserwacji częstość występowania AD była o 60% niższa, niż w grupie kontrolnej [91].

Z kolei badania przeprowadzone na dużej populacji Kanadyjczyków (6434 osób po 65 roku życia) wykazały, że picie wina i kawy zmniejsza częstość zachorowań [73], co wiąże się z obecnością zmiataczy wolnych rodników w tych substancjach. Jednak nasze codzienne używki (kawa, alkohol), poprzez podwyższenie stężenia homocysteiny, indukującej stres oksydacyjny, mogą równie dobrze zwiększyć szansę na wystąpienie AD [43].

W doświadczeniach na szczurach, u których badano zdolność do zapamiętywania, czynność elektrofizjologiczną mózgu, poziom uwalnianej dopaminy i markery stresu oksydacyjnego, wykazano korzystny wpływ truskawek i szpinaku oraz witaminy E – były to jednak zwykłe, starzejące się osobniki, a nie transgeniczne dla jakiegokolwiek markera AD [55]. Ponadto doświadczenie trwało 8 miesięcy, czyli prawie ¼ życia szczura i nie zawsze wpływ danego czynnika był taki sam (korzystny) we wszystkich badanych parametrach biochemicznych.

To, że antyoksydanty mogą w terapii AD działać zarówno korzystnie, jak i nie działać wcale, częściowo wyjaśniają doświadczenia przeprowadzone na szczurach transgenicznych badające nadmierne wytwarzanie ludzkiego APP lub której dodatkowo towarzyszyła cytokina TGF-β1 (transforming growth factor – transformujący czynnik wzrostu), przyspieszająca i zaostrzająca symptomy AD u ludzi. W pierwszym przypadku antyoksydanty pomagały, w drugim nie [49]. Przy podwójnym defekcie nadmiar wolnych rodników przerastał możliwości terapeutyczne antyoksydantów.

Z pewnością warto zmienić nawyki pokarmowe, jednak rezultaty są zbyt nikłe, by mogły stanowić remedium dla komórki obciążonej ponadfizjologicznym stężeniem wolnych rodników. Dlatego też poszukiwano łatwej do podawania, bezpiecznej, a jednocześnie efektywnej substancji zmniejszającej stężenie wolnych rodników. Substancję o dużych właściwościach buforujących ich nadmiar znano od dawna.

Sposoby działania błękitu metylenowego

W lipcu w 2008 r. na sympozjum „Alzeimer's Association International Conference on AD" Wischik, Bentham

Electronic PDF security powered by www.IndexCopernicus.com

i Wischik [131] przedstawili doniesienie: „Tau aggregation inhibitor (TAI) therapy with Rember™ arrests disease progression in mild and moderate Alzheimer's disease over 50 weeks". Przedstawili w nim wyniki podawania Remberu, czyli leczniczej postaci błękitu metylenowego. Substancję tę stosowano w dawce 30, 60 i 100 mg trzy razy dziennie u przeszło 300 osób metodą podwójnie ślepej próby; nie podawano przy tym żadnego innego środka. Po prawie roku sprawdzono postęp choroby i stwierdzono jej zahamowanie w przypadkach łagodnych i umiarkowanych, nawet o około 81% (w przypadku dawki 60 mg), co w porównaniu z innymi lekami stanowi wynik rewelacyjny. Jest to również wynik całkowicie zrozumiały z punktu widzenia nauk biologicznych, bo przedstawione wyżej badania wyraźnie wskazywały, iż lek ten ma szansę działać u początku patologii, a nie w końcu łańcucha zdarzeń (patrz wyżej). Co istotne, wykazano, że lek ten jest bezpieczny przy długotrwałych terapiach, nawet w dawce 780 mg/dzień oraz że może być stosowany przez osoby z niedoborem dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej i dopiero dożylne podawanie dawek przekraczających 7 mg/kg powoduje duszności, bóle w klatce piersiowej, drgawki, sinicę i anemię hemolityczną [79].

Błękit metylenowy nie jest substancją nową i bez tradycji terapeutycznych. Zsyntetyzowany w 1876 r., należy do barwników tiazynowych i od dziesięcioleci znajduje zastosowanie w biologii, chemii i medycynie, a to ze względu na szeroki zakres oddziaływania na ssaki. Już 80 lat temu stwierdzono, że dożylne podanie błękitu metylenowego może zmienić tempo metabolizmu i temperaturę ciała ssaka. Wykazano przy tym też nieswoistość tych zmian, bo ich kierunek i wielkość zależały od rozmiaru zwierzęcia oraz od temperatury otoczenia. U większych gatunków (pies, małpa) stwierdza się wzrost temperatury ciała, podczas gdy u mniejszych (szczur) w cieple hipertermię (włącznie ze śmiercią z przegrzania), a w chłodzie hipotermię [47]. Jak do tej pory nie znaleziono przyczyny tych różnic w reakcji. Wyjaśniono natomiast dlaczego prawie 120 lat temu Ehrlich zaobserwował terapeutyczne oddziaływanie błękitu metylowego podawanego chorym na malarię [za 79]. Lek ten bowiem swoiście hamuje reduktazę glutationową *Plasmodium falciparum* i w związku z tym obecnie powraca do terapii malarii jako alternatywa dla chininy, na którą stale rośnie oporność [83]. Błękit metylenowy może też służyć jako wskaźnik jakości nasienia, ponieważ jego współczynnik redukcyjności jest zależny od ruchliwości plemników [17]. Ponadto jest stosowany jako lek dla osób ze wstrząsem septycznym [67], u których poprawia krążenie zwiększając ciśnienia tętnicze, obniżając próg wrażliwości na noradrenalinę, adrenalinę i dopaminę oraz wspomagając utlenowywanie tkanek. Wszystkie te właściwości zwiększają szanse przeżycia pacjenta o prawie 20%, przy czym jest środkiem nie tylko bezpiecznym, ale i tanim. Korzystny wpływ błękitu na parametry życiowe stwierdzono także w doświadczeniach przeprowadzonych na szczurach z niedociśnieniem wywołanym przez endotoksyny [58]. Ponadto osłabia on zespół poreperfuzyjny po przeszczepie wątroby [61]. W wymienionych wyżej trzech przypadkach przyczyną poprawy stanu zdrowia organizmu było zahamowanie przez błękit metylenowy syntazy tlenku azotu (NOS – nitric oxide synthase) i ograniczanie przez to liczby wolnych rodników [112]. Właśnie te właściwości błękitu, przede wszystkim w odniesieniu do poprawy mózgowych przemian metabolicznych, leżą u podstaw zainteresowania tym związkiem jako potencjalnym lekiem na AD, choć jego korzystny wpływ na procesy pamięciowe znany jest już prawie 30 lat [za 4]. W doświadczeniach wykonanych na szczurach (zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*) wykazano, że w homogenatach mózgowych wzmaga zużycie tlenu (o około 25%) [13], a w doświadczeniach behawioralnych poprawia procesy konsolidacji pamięci [44]. W tych ostatnich badaniach wykazano, że błękit metylenowy akumuluje się wybiórczo w mózgu uczących się szczurów, osiągając koncentrację 10-krotnie wyższą, niż we krwi. Ponadto istnieje korelacja między poprawą pamięci i wzrostem aktywności mózgowej oksydazy cytochromowej c (o około 38%) [44]. Oznacza to, że błękit metylenowy może kompensować niedobory oksydazy u osób chorych, czyli jego oddziaływanie zdaje się trafiać w źródło patologicznych zdarzeń występujących w AD.

Zapewne znajomość tych faktów oraz to, że we wczesnych stadiach AD wykazywano znaczny wzrost ekspresji genów NOS (średnio o 60%), przyciągnęło uwagę badaczy na zależność AD-NO. Wzrost ekspresji genów NOS prowadzi do zwiększenia ilości syntazy tlenku azotu, co z kolei wiąże się z podwyższeniem stężenia tlenku azotu, hamującego aktywność mitochondrialnego kompleksu IV. Zmianom tym towarzyszy wzrost ekspresji genów NADPH-oksydazy (NOX), która będąc silnym utleniaczem, może doprowadzać do uszkodzeń w obrębie DNA i wzmagać neurotoksyczne działanie NO. Co ciekawe, narastanie stężenia NOS1 obserwowano tylko w stadiach AD 0-5, lecz nie w końcowym, 6. Zjawisko to tłumaczy się tym, iż wzmożona ekspresja NOS1 cechuje neurony poddane stresowi oksydacyjnemu lub uszkodzone, lecz zanika wraz z malejącą liczbą czynnych komórek nerwowych. Z kolei podwyższone stężenie NOS2 prowadzi do wzmożonego wytwarzania NO i nadtlenoazotynu, które również wykazują właściwości cytotoksyczne. Nadekspresja NOS3 wywołuje stres oksydacyjny, dodatkowo powodując zwiększenie ekspresji genu APP i odkładanie się β-amyloidu. Tak więc tłumienie syntezy NO przez błękit metylenowy [82] może mieć terapeutyczne znaczenie, zwłaszcza jeśli zostanie on wprowadzony we wcześniejszych stadiach AD.

Błękit metylenowy oprócz tego, że tłumi ekspresję NOS i tym samym zapobiega tworzeniu się nadtlenoazotynu i utlenianiu przez niego lipidów i białek, może się też przyczyniać do wielokrotnego wydłużenia życia komórek. W badaniach przeprowadzonych na fibroblastach stwierdzono polepszenie pod jego wpływem funkcji mitochondriów, co przejawiało się we wzroście zużycia tlenu aż o 70% [4]. Błękit metylenowy szybko i swoiście podwyższa β-oksydację długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w mitochondriach wątroby – prawdopodobnie poprzez zmianę przepuszczalności błony mitochondrialnej [125], nie badano jednak, czy ten czynnik także ma udział w poprawie pracy neuronów. Błękit zwalniał jednak starzenie się mitochondriów wywołane H_2O_2 lub kadmem oraz indukował drugą fazę enzymów antyoksydacyjnych. Podłożem tych zmian było cykliczne przechodzenie błękitu z postaci zredukowanej do utlenionej, co blokowało wytwarzanie oksydantów przez mitochondria. Co najistotniejsze jednak, podnosił on poziom mitochondrialnego kompleksu IV o 30%, a to właśnie ten kompleks wraz z wiekiem, ale zwłaszcza w AD, wykazuje dysfunkcje [4].

Electronic PDF security powered by www.IndexCopernicus.com

Inną właściwością błękitu metylenowego, która może znaleźć zastosowanie w terapii AD jest jego oddziaływanie z białkiem tau, a konkretnie zaburzanie stabilności PHF przez hamowanie interakcji prowadzących do łączenia się filamentów, co może być pomocne w proteolitycznym rozkładzie splątków [132]. Prawdopodobnie właśnie to, że błękit metylenowy może oddziaływać zarówno na same PHF, jak i na poprawę funkcjonowania mitochondriów, był przyczyną jego dużej skuteczności, opisanej przez wspomniany zespół [131]. Wykazali oni w badaniach cytologicznych, że Rember, podany w nanomolowych ilościach (0,15–0,58 μM) rozpuszcza spolimeryzowane tau i zapobiega jego kumulacji. Z kolei w doświadczenia na myszach transgenicznych zdołał on wywołać cofnięcie tauopatii w mózgu i wyraźnie poprawić zdolności poznawcze zwierząt [131]. Wszystko to wskazuje, iż błękit metylenowy może stanowić obiecujący lek na AD, zwłaszcza jeśli diagnostyka tego schorzenia rozwinie się na tyle, by umożliwić wprowadzanie go na wcześniejszych etapach choroby, niż obecnie.

Dlaczego naświetlanie opuszki węchowej

Jak wspomniano, istnieje powiązanie między stanem opuszki węchowej a procesami zachodzącymi w hipokampie, a pewne symptomy (takie jak NFT) pojawiają się w tej pierwszej wcześniej [39]. W związku z powyższym zwrócono uwagę na procesy energetyczne zachodzące w opuszce, jako że zmiany w nich, zgodnie z obecnym stanem wiedzy, leżą u podstaw etiologii AD. Ponieważ każdy wdech wiąże się z pobudzeniem w drogach węchowych i pewne ich struktury, takie jak kłębuszki w opuszce węchowej, nigdy nie pozostają całkowicie nieczynne, można założyć, że opuszka węchowa jest wyjątkowo silnie uzależniona od dostaw energii, a więc i sprawnych mitochondriów. O wielkości zapotrzebowania na energię świadczą wyniki badań Nawroth i wsp. [93], którzy wykazali, że spoczynkowe zużycie tlenu przez szczura pod znieczuleniem całkowitym wynosi 75 μM s^{-1}, co oznacza, że jest to jedna ze struktur o największym zużyciu energii ze wszystkich badanych, bowiem w pozostałych tkankach nerwowych w spoczynku wskaźnik ten wynosił 25–84 μM s^{-1}. Oczywistym jest, że na ten i tak wysoki poziom zużycia energii wpływa jeszcze transport aksonalny oraz przekaźnictwo synaptyczne. Wydawało się więc, iż dostarczenie dodatkowej energii może poprawić funkcjonowanie neuronów. Pogląd ten potwierdziły wyniki badań przeprowadzonych na szczurach, u których najpierw usunięto opuszkę, co wywołało nienormalne zachowanie w testach unikania i symptomy depresyjne [94], ale co ważniejsze, następne dostarczenie energii odwracało ten proces. Narzędziem, które precyzyjnie i wybiórczo może dostarczać energię jest laser.

Fotobiomodulację (terapię światłem o niskiej częstotliwości) przez światło czerwone lub bliskie podczerwieni (630–1000 nm), laserowe lub z diody LED [31], stosuje się już od prawie 30 lat. Pozwala szybciej odzyskać zdrowie po niedotlenieniu serca i udarze mózgu [68], przyspiesza regenerację nerwu twarzowego, zmniejsza toksyczność TTX, cyjanku i azydku sodu (są to blokery mitochondriów lub ograniczają wytwarzanie ATP) [133], zmniejsza toksyczność dioksyn, [31] i zapobiega degeneracji nerwu wzrokowego i siatkówki u zwierząt intoksykowanych metanolem [37]. W tych bardzo różnych patologiach występuje jeden czynnik wspólny – zapotrzebowanie na dodatkową energię. Absorpcja energii dostarczanej z zewnątrz może się odbywać z udziałem chromoforów, którymi u człowieka są trzy związki: hemoglobina, mioglobina i oksydaza cytochromowa c. Wszystkie trzy są w stanie absorbować ten zakres fal, które wysyła laser czerwony. Pasmo to przenika tkanki głębiej niż światło widzialne lub UV, lecz w przeciwieństwie do tego ostatniego nie wywołuje efektu jonizacyjnego, więc nie stanowi takiego zagrożenia dla zdrowia. Odpowiednie długości fal mogą przenikać głęboko do mózgu, aktywując przy tym fotoczułe tkanki.

W chorobach mitochondrialnych można próbować dostarczać energię oksydazie cytochromowej c. Ma ona dwa centra aktywne zawierające miedź (Cu_A i Cu_B). Cu_A jest pierwotnym chromoforem, który w swej oksydowanej postaci ma szczyt absorpcji około 830 nm. Takie światło na poziomie subkomórkowym przede wszystkim wzmaga aktywność oksydazy cytochromowej c (podobnie jak błękit metylenowy – patrz wyżej), a więc podwyższa stężenie ATP w komórce (w korze mózgowej szczura o około 19%) [89]. Ponadto jest antyoksydantem, ponieważ reaktywuje katalazę i dysmutazę ponadtlenkową (zahamowanej w związku z niskim pH, stanem zapalnym lub hipoksją) – może więc także zapobiegać apoptozie [126].

Ze względu na powyższe dane, zespół DiMauro opatentował „Intranasal red light probe for treating Alzheimer's disease" jako narzędzie terapeutyczne wspomagające energetykę neuronu i zmniejszające liczbę wolnych rodników [33]. W patencie tym, oprócz opisu techniczno-anatomicznego użytkowania lasera, znajduje się także obszerne i przekonujące 6-stronicowe uzasadnienie medyczne. Autorzy podnoszą w nim mitochondrialne uwarunkowania choroby, wspominając dodatkowo, że laser może: obniżać poziom ekspresji genów syntazy NO (patrz wyżej) i IL-6 (co ogranicza stan zapalny), a jednocześnie zwiększać ilość czynnika wzrostu TGF-β. Omawiają również uwarunkowania anatomiczne stosowania lasera, podkreślając nieinwazyjność metody. Nie można jednak pozostawić tego tematu bez wskazania pewnych wad omawianej metody. W badaniach biochemicznych wykazano, że reaktywacja dysmutazy ponadtlenkowej wskutek działania lasera wiąże się z jego oddziaływaniem w miejscu histydyna-miedź. Ponieważ wiele enzymów ma podobną strukturę, można się spodziewać, że zastosowanie lasera nie pozostanie dla nich obojętne. Nawet jeśli będzie on oddziaływał wyłącznie stymulująco na wybrane enzymy, spowoduje to zaburzenie równowagi biochemicznej organizmu, co może dać trudne do przewidzenia skutki. Jednakże w chwili stwierdzenia choroby AD, jest to na pewno metoda warta propagowania, podobnie jak w innych chorobach mitochondrialnych, takich jak dziedziczna neuropatia nerwu wzrokowego Lebera [111].

Terapia insuliną w AD

O tym, że stosując na śluzówkę nosa różne substancje chemiczne, wirusy czy bakterie, możemy je tą drogą wprowadzić w głąb mózgu, wiemy przynajmniej od 1929 r. Dodatkowo może to być szybka reakcja, skoro np. podany w ten sposób błękit pruski dociera do przestrzeni podpajęczynówkowej, krwi i naczyń limfatycznych już w ciągu 2 min [107]. Śluzówka nosa może więc być dogodnym

Electronic PDF security powered by www.IndexCopernicus.com

miejscem wprowadzania innych leków, np. insuliny, choć ta osiąga hipokamp po nieco dłuższym czasie – około 15 min.

Jak wspomniano wyżej [116], już od prawie 15 lat wiadomo, że AD towarzyszy zmniejszone tempo metabolizmu mózgowego i mniejsze zużycie glukozy, natomiast wzrost stężenia dostępnej dla mózgu glukozy wspomaga pamięć chorych. Przyczyną tego może być jednak zarówno sam wzrost stężenia glukozy, jak i towarzyszący mu wzrost insuliny. Dlatego też na grupie pacjentów z AD przeprowadzono badania stosując warunki hiperglikemii z małym stężeniem insuliny oraz hiperinsulinemię z małym stężeniem glukozy. Badania te wykazały jednoznacznie, iż poprawa pamięci związana była z podwyższonym stężeniem insuliny bez hiperglikemii [20] oraz że:

1. Mózg może wykorzystywać insulinę zarówno pochodzenia obwodowego (trzustkowego), jak i insulinę własną. Ma bowiem receptory insulinowe w opuszce węchowej, hipokampie i korze mózgowej – czyli w regionach związanych z genezą AD [124], a co więcej, oprócz receptorów insulinowych, ma także receptory insulinopodobnego czynnika wzrostu w korze móżdżkowej, wzgórzu, podwzgórzu, jądrach pnia mózgu, rdzeniu kręgowym, a nawet w siatkówce [28]. Ich stymulacja sprzyja wzrostowi populacji neuronów i oligodendrocytów, a także zawartości mieliny, a inaktywacja sprzyja większej wrażliwości błony mitochondrialnej na sygnały proapoptotyczne, które zwiększają przepuszczalność błony. Doprowadza to do generowania wolnych rodników, uszkodzenia funkcji mitochondriów, uwalniania cytochromu c i aktywacji kaspaz [28].
2. Jednym z czynników zwiększających prawdopodobieństwo zachorowania na AD (i to dwukrotnie [28]) jest cukrzyca typu 2, związana z opornością receptorów insulinowych.
3. Stymulujący wpływ cukrzycy na demencję (tak AD, jak i naczyniową) jest tym silniejszy, im wcześniej choroba ta się rozwinie [134].
4. Wywołanie cukrzycy u myszy prowadzi do degeneracji synaps i ograniczenia funkcji poznawczych [26].
5. Rozyglitazon, lek zwiększający czułość receptorów insulinowych, poprawia funkcje poznawcze u transgenicznych myszy z AD [99].
6. Insulina częściowo odwraca wywołane β-amyloidem hamowanie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego w skrawkach hipokampa [26].
7. W eksperymentach *in vitro* wykazano, że śmierci neuronów indukowanej podaniem amyloidu można zapobiec, podając insulinopodobny czynnik wzrostu 1 lub 2 (ale ten ostatni działa wielokrotnie słabiej) [28].
8. U szczurów poddanych testom związanym z pamięcią przestrzenną zaobserwowano wzrost mRNA receptorów insulinowych w hipokampie, a badania *in vitro* dodatkowo sugerowały wzrost czułości receptorów insulinowych [138]. Jest to zgodne z obserwacją na ludziach, że praca umysłowa może opóźniać rozwój choroby [8].
9. Donosowe podanie insuliny poprawia pamięć zarówno u osób z demencją, jak i zdrowych [26].
10. Jak wykazuje De Felice, poziom ekspresji genów kodujących insulinę i insulinopodobny czynnik wzrostu oraz ich receptory obniża się z postępom AD [26]. De la Monte donosi również o wzroście ekspresji receptorów insulinowych, ale może to być reakcja kompensacyjna na wykazaną jednocześnie redukcję aktywności kinazy tyrozynowej [28]. Ponadto wynik badań nad ekspresją receptorów będzie prawdopodobnie zależał od etapu choroby. Tak więc rozstrzygnięcie przyniosą zapewne badania na zwierzętach transgenicznych, wśród których można precyzyjnie selekcjonować grupy wiekowe (etap choroby).
11. Pobudzenie receptorów insulinowych przez insulinę wiąże się z hamowaniem fosforylazy, a więc zmniejsza się prawdopodobieństwo hiperfosforylacji białek tau. Z kolei ich zahamowanie powoduje aktywację kinaz fosforylujących białko tau. Wykazano to w badaniach przeprowadzonych na myszach, którym podano streptozotocynę, by wywołać deficyt insuliny. Już po 10 dniach rozpoczął się proces hiperfosforylacji białek tau [102].

Niezwykle obiecujące jest też wykazanie przez Zahnisera i wsp. [136], że w przeciwieństwie do receptorów obwodowych eksponowanych na duże stężenie insuliny, receptory mózgowe nie ulegają zjawisku „down-regulation", sugeruje to więc, że jest możliwa długa efektywna stymulacja tych receptorów donosowo.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty, De Felice i wsp. [26] wysunęli teorię, że AD stanowi w rzeczywistości nową postać cukrzycy (typ 3), ograniczającą się tylko do mózgu i podjęli próbę wyjaśnienia podłoża towarzyszących jej zjawisk, zwracając jednak szczególną uwagę na zależność β-amyloid-insulina. Wykazali, że rozproszone pochodne amyloidu są silną neurotoksyną, ponieważ łączą się z receptorami insulinowymi w synapsach, doprowadzając do zaniku kolców synaptycznych i hamując długotrwałe wzmocnienie synaptyczne, niezbędne do wytworzenia się szlaków pamięciowych. Przede wszystkim jednak doprowadzają do zredukowania liczby receptorów insulinowych o 22% (po 30 min), a nawet o 68% (po 3 h) od ekspozycji i reakcja ta jest pierwotna wobec zaniku kolców synaptycznych. Natomiast insulina, blokując przyłączanie się rozproszonych pochodnych β-amyloidu do receptorów insulinowych – przeciwdziałała neurotoksyczności.

Badania roli terapii insulinowej w AD wykazały też inny ciekawy problem. Jak wspomniano wyżej, posiadanie izoformy APOE ε4 jest czynnikiem ryzyka wystąpienia AD, bowiem jak podsumowali to Mahley, Weisgraber i Huang (badania były wykonywane zarówno na ludziach, jak i na zwierzętach transgenicznych oraz na hodowlach komórkowych) [77]:

- nie sprzyja to regeneracji neuronów;
- wzmaga to odkładanie się złogów β-amyloidu (dwukrotnie bardziej, niż gdy ma się izoformę ε3);
- oznacza to czterokrotnie wyższą szansę wystąpienia indukowanego amyloidem przecieku lizosomalnego i związanej z tym apoptozy, niż w przypadku posiadania APOE ε3;
- zwiększa ilość wewnątrzkomórkowego wolnego wapnia [106];
- wiąże się ze zwiększoną hiperfosforylacją białka tau, mniejszą stabilnością mikrotubul, w następstwie czego tworzą się w hipokampie struktury podobne do splątków neurofibrylarnych;
- wiąże się też ze zwiększoną ilością czynników uszkadzających mitochondria, ponieważ forma ε4 jest bardziej od innych wrażliwa na proteolizę, w związku z czym jest źródłem większej ilości produktów zagrażających

Electronic PDF security powered by www.IndexCopernicus.com

mitochondriom [77], z uwalnianiem oksydazy cytochromowej c włącznie [106];
- posiadanej postaci APOE ε4 towarzyszy zaburzenie metabolizmu glukozy [77,108] w tkance mózgowej i to zanim dojdzie do rozwoju AD [108].

Można by więc sądzić, że terapia donosową insuliną jest szczególnie wskazana u osób obciążonych APOE ε4. Niestety, na razie nie są to wskazania absolutnie pewne, bowiem jak wykazała Craft i wsp. [21], podanie insuliny zmniejsza u chorych na AD stężenie APP, ale tylko u osób bez allelu ε4. Ta sama autorka wykazała też [19], że reakcja na insulinę u osób z ε4 zależy od tego, czy są one homoczy heterozygotyczne dla ε4 i od wielkości dawki, ale nie są to zależności wprost proporcjonalne (występował większy efekt przy mniejszej dawce). Ponadto Messier [85] wykazał, iż osoby z ε4 i cukrzycą wykazywały dwukrotnie większe prawdopodobieństwo rozwoju AD niż osoby z ε4, ale bez cukrzycy. Dodatkowo badania pośmiertne wykazały, że osoby z cukrzycą i ε4 miały większe depozyty β-amyloidu i splątków neurofibrylarnych, niż osoby tylko z cukrzycą. Jednak Craft [19,20] wykazuje, iż u osób z cukrzycą bez genu ε4 hiperinsulinemia jest skorelowana z demencją typu AD. Również osoby zdrowe (niediabetyczne) z genotypem ε4 wykazywały korelację z AD. Wszystko to wskazuje, że cukrzyca i ε4 to dwa odrębne czynniki ryzyka rozwoju AD. Bez względu jednak na przyczynę tych różnic, oba te czynniki mogą na pewno działać synergistycznie w kierunku rozwoju AD, dlatego dogłębne wyjaśnienie tych wszystkich zależności może być bezcenne dla efektywności terapii insuliną.

Wyżej wspomniano, że korzystne działanie błękitu metylenowego w niektórych sytuacjach (takich jak przeszczepy czy wstrząs septyczny) wiąże się z hamowaniem przez niego NOS [112], co oznacza, że w przypadku AD jego dobroczynny wpływ nie jest już tak oczywisty, ponieważ NOS1 kontroluje wydzielanie insuliny. W związku z tym obserwowany w AD wzrost poziomu NOS1 może stanowić przejaw reakcji kompensacyjnej, mającej na celu zwiększenie dostaw insuliny do mózgu.

Choć więc ciągle jeszcze istnieje wiele problemów, które wymagają dalszych badań medycznych i biologicznych, to jednak tylko poszukiwanie nowych, czasami nietypowych metod diagnostycznych i terapeutycznych może dać szanse starzejącemu się społeczeństwu.

Piśmiennictwo

[1] Anandatheerthavarada H.K., Devi L.: Amyloid precursor protein and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. Neuroscientist, 2007; 13: 626–638

[2] Andrási E., Farkas É., Gawlik D., Rösick U., Brätter P.: Brain iron and zinc contents of German patients with Alzheimer Disease. J. Alzheimer Dis., 2000; 2: 17–26

[3] Aoki C., Siekevitz P.: Ontogenic changes in the cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-stimulatable phosphorylation of cat visual cortex proteins, particularly of microtubule-associated protein 2 (MAP 2): effects of normal and dark rearing and of the exposure to light. J. Neurosci., 1985, 5: 2465–2483

[4] Atamna H., Nguyen A., Schultz C., Boyle K., Newberry J., Kato H., Ames B.N.: Methylene blue delays cellular senescence and enhances key mitochondrial biochemical pathways. FASEB J., 2008; 22: 703–712

[5] Baloyannis S.J.: Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis., 2006; 9: 119–126

[6] Bałkowiec-Iskra E.Z., Kurkowska-Jastrzębska I.: Wzajemne oddziaływania układów odpornościowego i dopaminergicznego. Farmakoterapia w Psychiatrii i Neurologii, 2005, 1: 51–59

[7] Beeri R., Andres C., Lev-Lehman E., Timberg R., Huberman T., Shani M., Soreq H.: Transgenic expression of human acetylcholinesterase induces progressive cognitive deterioration in mice. Curr. Biol., 1995; 5: 1063–1071

[8] Bennett D.A., Wilson R.S., Schneider J.A., Evans D.A., Mendes de Leon C.F., Arnold S.E., Barnes L.L., Bienias J.L.: Education modifies the relation of AD pathology to level of cognitive function in older persons. Neurology, 2003; 60: 1909–1915

[9] Blass J.P., Gibson G.E.: The role of oxidative abnormalities in the pathophysiology of Alzheimer's disease. Rev. Neurol., 1991; 147: 513–525

[10] Blass J.P., Gibson G.E., Hoyer S.: The role of the metabolic lesion in Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis., 2002; 4: 225–232

[11] Bowling A.C., Beal M.F.: Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Life Sci., 1995; 56: 1151–1171

[12] Brodbeck J., Balestra M.E., Saunders A.M., Roses A.D., Mahley R.W., Huang Y.: Rosiglitazone increases dendritic spine density and rescues spine loss caused by apolipoprotein E4 in primary cortical neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008; 105: 1343–1346

[13] Callaway N.L., Riha P.D., Bruchey A.K., Munshi Z., Gonzales-Lima F.: Methylene blue improves brain oxidative metabolism and memory retention in rats. Pharmacol. Biochem. Behav., 2004; 77: 175–181

[14] Cardoso S.M., Proenca M.T., Santos S., Santana I., Oliveira C.R.: Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets. Neurobiol. Aging, 2004; 25: 105–110

[15] Cardoso S.M., Santos S., Swerdlow R.H., Oliveira C.R.: Functional mitochondria are required for Aβ-mediated neurotoxicity. FASEB J., 2001; 15: 1439–1441

[16] Cash A.D., Aliev G., Siedlak S.L., Nunomura A., Fujioka H., Zhu X., Raina A.K., Vinters H.V., Tabaton M., Johnson A.B., Paula-Barbosa M., Avila J., Jones P.K., Castellani R.J., Smith M.A., Perry G.: Microtubule reduction in Alzheimer's disease and aging is independent of filament formation. Am. J. Pathol., 2003; 162: 1623–1627

[17] Chandler J.E., Harrison C.M., Canal A.M.: Spermatozoal methylene blue reduction: an indicator of mitochondrial function and its correlation with motility. Theriogenology, 2000; 54: 261–271

[18] Chinery P.F.: The mitochondrion and its disorders. Pract. Neurol., 2003; 3: 100–105

[19] Craft S., Asthana S., Cook D.G., Baker L.D., Cherrier M., Purganan K., Wait C., Petrova A., Latendresse S., Watson G.S., Newcomer J.W., Schellenberg G.D., Krohn A.J.: Insulin dose-response effects on memory and plasma amyloid precursor protein in Alzheimer's disease: interactions with apolipoprotein E genotype. Psychoneuroendocrinology, 2003; 28: 809–822

[20] Craft S., Asthana S., Newcomer J.W., Wilkinson C.W., Matos I.T., Baker L.D., Cherrier M., Lofgreen C., Latendresse S., Petrova A., Plymate S., Raskind M., Grimwood K., Veith R.C.: Enhancement of memory in Alzheimer disease with insulin and somatostatin, but not glucose. Arch. Gen. Psychiatry, 1999; 56: 1135–1140

[21] Craft S., Asthana S., Schellenberg G., Baker L., Cherrier M., Boyt A.A., Martins R.N., Raskind M., Peskind E., Plymate S.: Insulin effects on glucose metabolism, memory, and plasma amyloid precursor protein in Alzheimer's disease differ according to apolipoprotein -E genotype. Ann. N.Y. Acad. Sci., 2000; 903: 222–228

[22] Cuajungco M.P., Goldstein L.E., Nunomura A., Smith M.A., Lim J.T., Atwood C.S., Huang X., Farrag Y.W., Perry G., Bush A.I.: Evidence that the β-amyloid plaques of Alzheimer's disease represent the redox-silencing and entombment of Aβ by zinc. J. Biol. Chem., 2000; 275: 19439–19442

[23] Dahm R.: Alzheimer's discovery. Curr. Biol., 2006; 16: R906–R910

[24] Davies D.C., Brooks J.W., Lewis D.A.: Axonal loss from the olfactory tracts in Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging, 1993; 14: 353–357

[25] De Felice F.G., Velasco P.T., Lambert M.P., Viola K., Fernandez S.J., Ferreira S.T., Klein W.L.: Aβ oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. J. Biol. Chem., 2007; 282: 11590–11601

Electronic PDF security powered by www.IndexCopernicus.com

[26] De Felice F.G., Vieira M.N.N., Bomfim T.R., Decker H., Velasco P.T., Lambert M.P., Viola K.L., Zhao W.Q., Ferreira S.T., Klein W.L.: Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Aβ oligomers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009; 106: 1971–1976

[27] de la Monte S.M., Wands J.R.: Molecular indices of oxidative stress and mitochondrial dysfunction occur early and often progress with severity of Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis., 2006; 9: 167–181

[28] de la Monte S.M., Wands J.R.: Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis., 2005; 7: 45–61

[29] De Sarno P., Shestopal S.A., King T.D., Zmijewska A., Song L., Jope R.S.: Muscarinic receptor activation protects cells from apoptotic effects of DNA damage, oxidative stress, and mitochondrial inhibition. J. Biol. Chem., 2003; 278: 11086–11093

[30] Delacourte A.: Tauopathies: recent insights into old diseases. Folia Neuropathol., 2005; 43: 244–257

[31] Desmet K.D., Paz D.A., Corry J.J., Eells J.T., Wong-Riley M.T., Henry M.M., Buchmann E.V., Connelly M.P., Dovi J.V., Liang H.L., Henshel D.S., Yeager R.L., Millsap D.S., Lim J., Gould L.J., Das R., Jett M., Hodgson B.D., Margolis D., Whelan H.T.: Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. Photomed. Laser Surg., 2006; 24: 121–128

[32] Devanand D.P., Michaels-Marston K.S., Liu X., Pelton G.H., Padilla M., Marder K., Bell K., Stern Y., Mayeux R.: Olfactory deficits in patients with mild cognitive impairment predict Alzheimer's disease at follow-up. Am. J. Psychiatry, 2000; 157: 1399–1405

[33] DiMauro T.M., Attawia M., Lilienfeld S., Holy C.: Intranasal red light probe for treating Alzheimer's disease. Patent no: US 7,351,253 B2, date of patent 1 Apr. 2008

[34] Doty R.L.: Clinical studies of olfaction. Chem. Senses, 2005; 30(Suppl.1): i207–i209

[35] Doty R.L., Perl D.P., Steele J.C., Chen K.M., Pierce J.D.Jr., Reyes P., Kurland L.T.: Olfactory dysfunction in three neurodegenerative diseases. Geriatrics, 1991; 46(Suppl.1): 47–51

[36] Doty R.L., Reyes P.F., Gregor T.: Presence of both odor identification and detection deficits in Alzheimer's disease. Brain Res. Bull., 1987; 18: 597–600

[37] Eells J.T., Henry M.M., Summerfelt P., Wong-Riley M.T., Buchmann E.V., Kane M., Whelan N.T., Whelan H.T.: Therapeutic photobiomodulation for methanol-induced retinal toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003; 100: 3439–3444

[38] Ertekin-Taner N., Graff-Radford N., Younkin L.H., Eckman C., Baker M., Adamson J., Ronald J., Blangero J., Hutton M., Younkin S.G.: Linkage of plasma Aβ42 to a quantitative *locus* on chromosome 10 in late-onset Alzheimer's disease pedigrees. Science, 2000; 290: 2303–2304

[39] Esiri M.M., Wilcock G.K.: The olfactory bulbs in Alzheimer's disease. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 1984; 47: 56–60

[40] Fattal O., Budur K., Vaughan A.J., Franco K.: Review of the literature on major mental disorders in adult patients with mitochondrial diseases. Psychosomatics, 2006; 47: 1–7

[41] Flirski M., Sobów T.: W poszukiwaniu wiarygodnych biochemicznych markerów sporadycznej choroby Alzheimera. Aktualności Neurologiczne, 2004; 3: 121–126

[42] Frank R.A., Gesteland R.C., Bailie J., Rybalsky K., Seiden A., Dulay M.F.: Characterization of the sniff magnitude test. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg., 2006; 132: 532–536

[43] Gąsiorowska D., Korzeniowska K., Jabłecka A.: Homocysteina. Farmacja Współczesna 2008, 1: 169–175

[44] Gonzales-Lima F., Bruchey A.K.: Extinction memory improvement by the metabolic enhancer methylene blue. Learn. Mem., 2004; 11: 633–640

[45] Graves A.B., Bowen J.D., Rajaram L., McCormick W.C., McCurry S.M., Schellenberg G.D., Larson E.B.: Impaired olfaction as a marker for cognitive decline. Interaction with apolipoprotein E ε4 status. Neurology, 1999; 53: 1480–1487

[46] Green R.C., Cupples L.A., Kurz A., Auerbach S., Go R., Sadovnick D., Duara R., Kukull W.A., Chui H., Edeki T., Griffith P.A., Friedland R.P., Bachman D., Farrer L.: Depression as a risk factor for Alzheimer disease: the MIRAGE Study. Arch. Neurol., 2003; 60: 753–759

[47] Gregoire P.E.: Action of methylene blue on body temperature and metabolism. J. Exp. Med., 1931; 54: 827–845

[48] Hamel E., Nicolakakis N., Aboulkassim T., Ongali B., Tong X.K.: Oxidative stress and cerebrovascular dysfunction in mouse models of Alzheimer's disease. Exp. Physiol., 2008; 93: 116–120

[49] Hameroff S., Penrose R.: Orchestrated reduction of quantum coherence in brain microtubules: a model for consciousness. Mathematics Computers Simulation, 1996; 40: 453–480

[50] Hardy J., Selkoe D.J.: The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science, 2002; 297: 353–356

[51] Hirai K., Aliev G., Nunomura A., Fujioka H., Russel R.L., Atwood C.S., Johnson A.B., Kress Y., Vinters H.V., Tabaton M., Shimohama S., Cash A.D., Siedlak S.L., Harris P.L., Jones P.K., Petersen R.B., Perry G., Smith M.A.: Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. J. Neurosci., 2001; 21: 3017–3023

[52] Hyman B.T., Marzloff K., Arriagada P.V.: The lack of accumulation of senile plaques or amyloid burden in Alzheimer's disease suggest a dynamic balance between amyloid deposition and resolution. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 1993; 52: 594–600

[53] Irizarry M.C., McNamara M., Fedorchak K., Hsiao K., Hyman B.T.: APP(Sw) transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1997; 56: 965–973

[54] Ji Z.S., Miranda R.D., Newhouse Y.M., Weisgraber K.H., Huang Y., Mahley R.W.: Apolipoprotein E4 potentiates amyloid β peptide-induced lysosomal leakage and apoptosis in neuronal cells. J. Biol. Chem., 2002; 277: 21821–21828

[55] Joseph J.A., Shukitt-Hale B., Denisova N.A., Prior R.L., Cao G., Martin A., Taglialatela G., Bickford P.C.: Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. J. Neurosci., 1998; 18: 8047–8055

[56] Kang J.E., Lim M.M., Bateman R.J., Lee J.J., Smyth L.P., Cirrito J.R., Fujiki N., Nishino S., Holtzman D.M.: Amyloid-β dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle. Science, 2009; 326: 1005–1007

[57] Kanki T., Nakayama H., Sasaki N., Takio K., Hamasaki N., Kang D.: Mitochondrial nucleoid and transcription factor A. Ann. N.Y. Acad. Sci., 2004; 1011: 61–68

[58] Keaney J.F. Jr., Puyana J.C., Francis S., Loscalzo J.F., Stamler J.S., Loscalzo J.: Methylene blue reverses endotoxin-induced hypotension. Circ. Res., 1994; 74: 1121–1125

[59] Keil U., Hauptmann S., Bonert A., Scherping I., Eckert A., Müller W.E.: Mitochondrial dysfunction induced by disease relevant AβPP and tau protein mutations. J. Alzheimer Dis. 2006; 9: 139–146

[60] Kim M., Hersh L.B., Leissring M.A., Ingelsson M., Matsui T., Farris W., Lu A., Hyman B.T., Selkoe D.J., Bertram L., Tanzi R.E.: Decreased catalytic activity of the insulin-degrading enzyme in chromosome 10-linked Alzheimer disease families. J. Biol. Chem., 2007; 282: 7825–7832

[61] Koelzow H., Gedney J.A., Baumann J., Snook N.J., Bellamy M.C.: The effect of methylene blue on the hemodynamic changes during ischemia reperfusion injury in orthotopic liver transplantation. Anesth. Analg., 2002; 94: 824–829

[62] Kontush A.: Amyloid-β: an antioxidant that becomes a pro-oxidant and critically contributes to Alzheimer's disease. Free Radic. Biol. Med., 2001; 31: 1120–1131

[63] Kontush A., Berndt C., Weber W., Akopyan V., Arlt S., Schippling S., Beisiegel U.: Amyloid-β is an antioxidant for lipoproteins in cerebrospinal fluid and plasma. Free Radic. Biol. Med., 2001; 30: 119–128

[64] Korzcyn A.D., Chapman J.: Apolipoprotein E, dementia and strokes. J. Neurol. Sci., 2003; 206: 3–5

[65] Kovács T., Cairns N.J., Lantos P.L.: Olfactory centres in Alzheimer's disease: olfactory bulb is involved in early Braak's stages. Neuroreport, 2001; 12: 285–288

[66] Kowalski J., Olejniczak J., Bartosz G., Pawlicki L., Gburek J.: Aktywność antyoksydacyjna osocza u osób leczonych fluwastatyną i fenofibratem. Polski Przegląd Kardiologiczny, 2003; 5: 185–189

[67] Kwok E.S., Howes D.: Use of methylene blue in sepsis: a systematic review. J. Intensive Care Med., 2006; 21: 359–363

[68] Lampl Y., Zivin J.A., Fisher M., Lew R., Welin L., Dahlof B., Borenstein P., Andersson B., Perez J., Caparo C., Ilic S., Oron U.: Infrared laser therapy for ischemic stroke: a new treatment strategy: results of the NeuroThera Effectiveness and Safety Trial-1 (NEST-1). Stroke, 2007; 38: 1843–1849

[69] Lee H.G., Perry G., Moreira P.I., Garrett M.R., Liu Q., Zhu X., Takeda A., Nunomura A., Smith M.A.: Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? Trends Mol. Med., 2005; 11: 164–169

Electronic PDF security powered by www.IndexCopernicus.com

[70] Lee H.G., Zhu X., Castellani R.J., Nunomura A., Perry G., Smith M.A.: Amyloid-β in Alzheimer disease: the null *versus* the alternate hypotheses. J. Pharmacol. Exp. Ther., 2007; 321: 823–829

[71] Lewis J., Dickson D.W., Lin W.L., Chisholm L., Corral A., Jones G., Yen S.H., Sahara N., Skipper L., Yager D., Eckman C., Hardy J., Hutton M., McGowan E.: Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. Science, 2001; 293: 1487–1491

[72] Li C., Yousem D.M., Doty R.L., Kennedy D.W.: Neuroimaging in patients with olfactory dysfunction. Am. J. Roentgenol., 1994; 162: 411–418

[73] Lindsay J., Laurin D., Verreault R., Hébert R., Helliwell B., Hill G.B., McDowell I.: Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian study of health and aging. Am. J. Epidemiol., 2002; 156: 445–453

[74] Lovell M.A., Robertson J.D., Teesdale W.J., Campbell J.L., Markesbery W.R.: Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. J. Neurol. Sci., 1998; 158: 47–52

[75] Lustbader J.W., Cirilli M., Lin C., Xu H.W., Takuma K., Wang N., Caspersen C., Chen X., Pollak S., Chaney M., Trinchese F., Liu S., Gunn-Moore F., Lue L.F., Walker D.G., Kuppusamy P., Zewier Z.L., Arancio O., Stern D., Yan S.S., Wu H.: ABAD directly links Aβ to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. Science, 2004; 304: 448–452

[76] Maddalena A., Papassotiropoulos A., Müller-Tillmanns B., Jung H.H., Hegi T., Nitsch R.M., Hock C.: Biochemical diagnosis of Alzheimer disease by measuring the cerebrospinal fluid ratio of phosphorylated tau protein to β-amyloid peptide42. Arch. Neurol., 2003, 60: 1202–1206

[77] Mahley R.W., Weisgraber K.H., Huang Y.: Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006; 103: 5644–5651

[78] Mancuso M., Siciliano G., Filosto M., Murri L.: Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease: new developments. J. Alzheimers Dis., 2006; 9: 111–117

[79] Mandi G., Witte S., Meissner P., Coulibaly B., Mansmann U., Rengelshausen J., Schiek W., Jahn A., Sanon M., Wüst K., Walter-Sack I., Mikus G., Burhenne J., Riedel K.D., Schirmer H., Kouyaté B., Müller O.: Safety of the combination of chloroquine and metylene blue in healthy adult men with G6PD deficiency from rural Burkina Faso. Trop. Med. Int. Health, 2005; 10: 32–38

[80] Manelli A.M., Stine W.B., Van Eldik L.J., LaDu M.J.: ApoE and A β1-42 interactions: effects of isoform and conformation on structure and function. J. Mol. Neurosci., 2004; 23: 235–246

[81] Masters C.L., Beyreuther K.: Alzheimer's centennial legacy: prospects for rational therapeutic intervention targeting the Aβ amyloid pathway. Brain, 2006; 129: 2823–2839

[82] Mayer B., Brunner F., Schmidt K.: Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. Biochem. Pharmacol., 1993; 45: 367–374

[83] Meissner P.E., Mandi G., Coulibaly B., Witte S., Tapsoba T., Mansmann U., Rengelshausen J., Schiek W., Jahn A., Walter-Sack I., Mikus G., Burhenne J., Riedel K.D., Schirmer R.H., Kouyaté B., Müller O.: Methylene blue for malaria in Africa, results from a dose-finding study in combination with chloroquine. Malar. J., 2006; 5: 84–90

[84] Mesholam R.I., Moberg P.J., Mahr R.N., Doty R.L.: Olfaction in neurodegenerative disease: a meta-analysis of olfactory functioning in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Arch. Neurol., 1998; 55: 84–90

[85] Messier C.: Diabetes, Alzheimer's disease and apolipoprotein genotype. Exp Gerontol., 2003; 38: 941–946

[86] Mielke R., Kessler J., Szelies B., Herholz K., Wienhard K., Heiss W.D.: Normal and pathological aging – findings of positron-emission-tomography. J. Neural Transm., 1998; 105: 821–837

[87] Mishra A., Saito K., Barbash S.E., Mishra N., Doty R.L.: Olfactory dysfunction in leprosy. Laryngoscope, 2006; 116: 413–416

[88] Mitchell I.J., Heims H., Neville E.A., Rickards H.: Huntington's disease patients show impaired perception of disgust in the gustatory and olfactory modalities. J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci., 2005; 17: 119–121

[89] Mochizuki-Oda N., Kataoka Y., Cui Y., Yamada H., Heya M., Awazu K.: Effects of near-infra-red laser irradiation on adenosine triphosphate and adenosine diphosphate contents of rat brain tissue. Neurosci. Lett., 2002; 323: 207–210

[90] Morgan C.D., Covington J.W., Geisler M.W., Polich J., Murphy C.: Olfactory event-related potentials: older males demonstrate the greatest deficits. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol., 1997; 104: 351–358

[91] Morris M.C., Denis A.E., Bienias J.L., Tangney C.C., Bennett D.A., Wilson R.S., Aggarwal N., Schneider J.: Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. Arch. Neurol., 2003; 60: 940–946

[92] Munoz D.G., Feldman H.: Causes of Alzheimer's disease. CMAJ, 2000; 162: 65–72

[93] Nawroth J.C., Greer C.A., Chen W.R., Laughlin S.B., Shepherd G.M.: An energy budget for the olfactory glomerulus. J. Neurosci., 2007; 27: 9790–9800

[94] Nowak G., Szewczyk B., Wieronska J.M., Branski P., Palucha A., Pilc A., Sadlik K., Piekoszewski W.: Antidepressant-like effects of acute and chronic treatment with zinc in forced swim test and olfactory bulbectomy model in rats. Brain Res. Bull., 2003; 61: 159–164

[95] Nunomura A., Castellani R.J., Lee H.G., Moreira P.I., Zhu X., Perry G., Smith M.A.: Neuropathology in Alzheimer's disease: awaking from a hundred-year-old dream. Sci. Aging Know. Environ., 2006(8): pe10

[96] Nunomura A., Perry G., Aliev G., Hirai K., Takeda A., Balraj E.K., Jones P.K., Ghanbari H., Wataya T., Shimohama S., Chiba S., Atwood C.S., Petersen R.B., Smith M.A.: Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 2001; 60: 759–767

[97] Ohta S., Ohsawa I.: Dysfunction of mitochondria and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease: on defects in the cytochrome c oxidase complex and aldehyde detoxification. J. Alzheimers Dis., 2006; 9: 155–166

[98] Pearson R.C., Esiri M.M., Hiorns R.W., Wilcock G.K., Powell T.P.: Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in Alzheimer disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985; 82: 4531–4534

[99] Pedersen W.A., McMillan P.J., Kulstad J.J., Leverenz J.B., Craft S., Haynatzki G.R.: Rosiglitazone attenuates learning and memory deficits in Tg2576 Alzheimer mice. Exp. Neurol., 2006; 199: 265–273

[100] Perry G., Friedman R., Shaw G., Chau V.: Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987; 84: 3033–3036

[101] Peters J.M., Hummel T., Kratzsch T., Lötsch J., Skarke C., Frölich L.: Olfactory function in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: An investigation using psychophysical and electrophysiological techniques. Am. J. Psychiatry, 2003; 160: 1995–2002

[102] Planel E., Tatebayashi Y., Miyasaka T., Liu L., Wang L., Herman M., Yu W.H., Luchsinger J.A., Wadzinski B., Duff K.E., Takashima A.: Insulin dysfunction induces *in vivo* tau hyperphosphorylation through distinct mechanisms. J. Neurosci., 2007; 27: 13635–13648

[103] Pratico D., Delanty N.: Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. Am. J. Med., 2000; 109: 577–585

[104] Pratico D., Uryu K., Leight S., Trojanowski J.Q., Lee V.M.: Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. J. Neurosci., 2001; 21: 4183–4187

[105] Price J.L., Davis P.B., Morris J.C., White D.L.: The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging, 1991; 12: 295–312

[106] Raber J.: Androgens, ApoE, and Alzheimer's disease. Sci. Aging Knowledge Environ., 2004: re2

[107] Rake G.: The rapid invasion of the body through the olfactory mucosa. J. Exp. Med., 1937; 65: 303–315

[108] Reiman E.M., Caselli R.J., Yun L.S., Chen K., Bandy D., Minoshima S., Thibodeau S.N., Osborne D.: Preclinical evidence of Alzheimer's disease in persons homozygous for the epsilon 4 allele for apolipoprotein E. N. Engl. J. Med., 1996; 334: 752–758

[109] Richey P.L., Siedlak S.L., Smith M.A., Perry G.: Apolipoprotein E interaction with the neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer disease: implications for disease pathogenesis. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1995; 208: 657–663

[110] Rogaeva E., Premkumar S., Song Y., Sorbi S., Brindle N., Paterson A., Duara R., Levesque G., Yu G., Nishimura M., Ikeda M., O'Toole C., Kawarai T., Jorge R., Vilarino D., Bruni A.C., Farrer L.A., St.George-Hyslop P.H.: Evidence for an Alzheimer disease susceptibility *locus* on chromosome 12 and for further *locus* heterogeneity. JAMA, 1998; 280: 614–618

[111] Rojas J.C., Lee J., John J.M., Gonzalez-Lima F.: Neuroprotective effects of near-infrared light in an *in vivo* model of mitochondrial optic neuropathy. Neurobiol. Dis., 2008; 28: 13511–13521

[112] Salaris S.C., Babbs C.F., Voorhees W.D.3rd: Methylene blue as an inhibitor of superoxide generation by xantine oxidase. A potential new drug for attenuation of ischemia/reperfusion injury. Biochem. Pharmacol., 1991; 42: 499–506

Electronic PDF security powered by www.IndexCopernicus.com

[113] Samudralwar D.L., Diprete C.C., Ni B.F., Ehmann W.D., Markesbery W.R.: Elemental imbalances in the olfactory pathway in Alzheimer's disease. J. Neurol. Sci., 1995; 130: 139–145

[114] Santacruz K., Lewis J., Spires T., Paulson J., Kotilinek L., Ingelsson M., Guimaraes A., DeTure M., Ramsden M., McGowan E., Forster C., Yue M., Orne J., Janus C., Mariash A., Kuskowski M., Hyman B., Hutton M., Ashe K.H.: Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. Science, 2005; 309: 476–481

[115] Sheng J.G., Mrak R.E., Griffin W.S.: Interleukin 1α expression in brain regions in Alzheimer's disease: correlation with neurotic plaque distribution. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 1995; 54: 435

[116] Small G.W., Leuchter A.F., Mandelkern M.A., La Rue A., Okonek A., Lufkin R.B., Jarvik L.F., Matsuyama S.S., Bondareff W.: Clinical, neuroimaging, and environmental risk differences in monozygotic female twins appearing discordant for dementia of the Alzheimer type. Arch. Neurol., 1993; 50: 209–219

[117] Small G.W., Mazziotta J.C., Collins M.T., Baxter L.R., Phelps M.E., Mandelkern M.A., Kaplan A., La Rue A., Adamson C.F., Chang L.: Apolipoprotein E type 4 allele and cerebral glucose metabolism in relatives at risk for familial Alzheimer disease. JAMA, 1995; 273: 942–947

[118] Soininen H., Kosunen O., Helisalmi S., Mannermaa A., Paljärvi L., Talasniemi S., Ryynänen M., Riekkinen P.Sr.: A severe loss of choline acetyltransferase in the frontal cortex of Alzheimer patients carrying apolipoprotein ε4 allele. Neurosci. Lett., 1995; 187: 79–82

[119] Sorbi S., Bird E.D., Blass J.P.: Decreased pyruvate dehydrogenase complex activity in Huntington and Alzheimer brain. Ann. Neurol., 1983; 13: 72–78

[120] Stiasny-Kolster K., Clever S.C., Mőller J.C., Oertel W.H., Mayer G.: Olfactory dysfunction in patients with narcolepsy with and without REM sleep behaviour disorder. Brain, 2007; 130: 442–449

[121] Suzuki H., Park S.J., Tamura M., Ando S.: Effect of the long-term feeding of dietary lipids on the learning ability, fatty acid composition of brain stem phospholipids and synaptic membrane fluidity in adult mice: a comparison of sardine oil diet with palm oil diet. Mech. Ageing Dev., 1998; 101: 119–128

[122] Takeda A., Perry G., Abraham N.G., Dwyer B.E., Kutty R.K., Laitinen J.T., Petersen R.B., Smith M.A.: Overexpression of heme oxygenase in neuronal cells, the possible interaction with Tau. J. Biol. Chem., 2000; 275: 5395–5399

[123] Tourbier I.A., Doty R.L.: Sniff magnitude test: relationship to odor identification, detection, and memory tests in a clinic population. Chem. Senses, 2007; 32: 515–523

[124] Unger J., McNeill T.H., Moxley R.T. III, White M., Moss A., Livingston J.N.: Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain. Neuroscience, 1989; 31: 143–157

[125] Visarius T.M., Stucki J.W., Lauterburg B.H.: Inhibition and stimulation of long-chain fatty acid oxidation by chloroacetaldehyde and methylene blue in rats. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1999; 289: 820–824

[126] Vladimirov Y.A., Gorbatenkova E.A., Paramonov N.V., Azizova O.A.: Photoreactivation of superoxide dismutase by intensive red (laser) light. Free Radic. Biol. Med., 1988; 5: 281–286

[127] Vyhnalek M., Magerova H., Laczoa J., Hort J.: Olfactory discrimination testing does not differentiate between vascular dementia and Alzheimer's disease. J. Neurol. Sci., 2009; 283: 320

[128] Walsh D.M., Klyubin I., Fadeeva J.V., Cullen W.K., Anwyl R., Wolfe M.S., Rowan M.J., Selkoe D.J.: Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. Nature, 2002; 416: 535–539

[129] Wetter S., Murphy C.: Apolipoprotein E ε4 positive individuals demonstrate delayed olfactory event-related potentials. Neurobiol. Aging, 2001; 22: 439–447

[130] Whalley L.J.: Early-onset Alzheimer's disease in Scotland: environmental and familial factors. Br. J. Psychiatry Suppl., 2001, 40: s53–s59

[131] Wischik C.M., Bentham P., Wischik D.J.: Tau aggregation inhibitor (TAI) therapy with Rember™ arrests disease progression in mild and moderate Alzheimer's disease over 50 weeks. Alzheimer's Association International Conference on AD. Chicago 2008, Therapeutic Strategies 1: T167

[132] Wischik C.M., Crowther R.A.: Subunit structure of the Alzheimer tangle. Br. Med. Bull., 1986; 42: 51–56

[133] Wischik C.M., Edwards P.C., Lai R.Y., Roth M., Harrington C.R.: Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996; 93: 11213–11218

[134] Wong-Riley M.T., Liang H.L., Eells J.T., Chance B., Henry M.M., Buchmann E., Kane M., Whelan H.T.: Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. J. Biol. Chem., 2005; 280: 4761–4771

[135] Xu W., Qiu C., Gatz M., Pedersen N.L., Johansson B., Fratiglioni L.: Mid- and late-life diabetes in relation to the risk of dementia: a population-based twin study. Diabetes, 2009; 58: 71–77

[136] Ye S., Huang Y., Müllendorff K., Dong L., Giedt G., Meng E.C., Cohen F.E., Kuntz I.D., Weisgraber K.H., Mahley R.W.: Apolipoprotein (apo) E_4 enhances amyloid β peptide production in cultured neuronal cells: apoE structure as a potential therapeutic target. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005; 102: 18700–18705

[137] Zahniser N.R., Goens M.B., Hanaway P.J., Vinych J.V.: Characterization and regulation of insulin receptors in rat brain. J. Neurochem., 1984; 42: 1354–1362

[138] Zeviani M., Di Donato S.: Mitochondrial disorders. Brain, 2004; 127: 2153–2172

[139] Zhao W., Chen H., Xu H., Moore E., Meiri N., Quon M.J., Alkon D.L.: Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. J. Biol. Chem., 1999; 274: 34893–34902

[140] Zhu X., Perry G., Moreira P.I., Aliev G., Cash A.D., Hirai K., Smith M.A.: Mitochondrial abnormalities and oxidative imbalance in Alzheimer disease. J. Alzheimers Dis., 2006; 9: 147–153

[141] Zou K., Gong J.S., Yanagisawa K., Michikawa M.: A novel function of monomeric amyloid β-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. J. Neurosci., 2002; 22: 4833–4841

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

Electronic PDF security powered by www.IndexCopernicus.com