

Tadewsz Pietras, Peweł Górski

Czy preparaty miłorzębu mają znaczenie w opóźnieniu rozwoju otępienia?

Pracownia Geriatrii Kliniki Pneumonologii i Alergologii Akademii Medycznej w Łodzi

Streszczenie

Ekstrakt EGb 761 otrzymany z miłorzębu posiada korzystne działanie w chorobach neurodegeneracyjnych mózgu. Poprawia nieznacznie funkcje poznawcze w otępieniach i spowalnia ich przebieg. Uważa się, że biologiczne działanie składników preparatu EGb 761 związane jest z działaniem antyoksydacyjnym i hamowaniem procesu peroksydacji lipidów. Flawonoidy wyizolowane z preparatu mogą hamować aktywność monoaminooksydazy w mózgu i wpływać na kontrolę fosforylacji oksydatywnej w mitochondriach. Preparat EGb 761 jest użyteczny we wspomagającym leczeniu otępień.

Summary

Ginkgo biloba extracts such as EGb-761 have been suggested to have a multitude of beneficial effects on brain function, from enhancing cognitive function in dementia. Several mechanisms of action are useful in explaining how EGb 761 benefits patients with AD and other age-related, neurodegenerative disorders. The EGb 761 possesses antioxidant and free radical-scavenging activities and inhibit membrane lipid peroxidation. Flavonoids purchased from EGb 761 may inhibit the monoaminooxidase activity in brain and they increase the respiratory control ratio of brain mitochondria. EGb 761 is useful drug in dementia and other neurodegenerative diseases.

Wstęp

Rośliny stanowią bogate źródło różnorodnych substancji chemicznych wykorzystywanych przez nienaukową medycynę ludową. Wiele z tych substancji znalazło zastosowanie w medycynie klinicznej i przeszło pozytywnie kontrolowane badania kliniczne z podwójnie ślełą próbą. Wymienić tu należy choćby kardenolidy, alkaloidy *Vinca rosea*, pochodne taksyfoliny i wiele innych. Większość jednak preparatów roślinnych okazała się bądź nieszkodliwym placebo, bądź są nawet szkodliwe dla zdrowia i nie powinno się ich używać. Znaczna część surowców pochodzenia roślinnego nie przeszła kontrolowanych badań klinicznych, w związku z tym producenci surowców w ulotkach powołują się bądź na działanie substancji zawartych w surowcu, bądź na tradycje ludowe. Tymczasem rzeczywista skuteczność tych „leków” jest nieznana. Zapotrzebowanie na preparaty roślinne podyktowane jest często modą na „naturalność” spowodowaną brakiem zaufania wobec medycyny naukowej, lękiem przed współczesnymi placówkami ochrony zdrowia, a w sytuacjach kryzysowych bezradnością i myśleniem magicznym. Lęk ten w chwili obecnej pogłębia nieprawidłowa komunikacja pomiędzy personelem medycznym a pacjentami, wypalenie zawodowe lekarzy i pielęgniarek i tzw.

zespół błędnej adaptacji do instytucji totalnej, a takimi są współczesne szpitale i inne zinstytucjonalizowane całodobowe zakłady leczniczo-opiekuńcze (Sęk 2001). W zdehumanizowanym świecie opieki zdrowotnej leczenie metodami niekonwencjonalnymi i ziołowymi staje się alternatywą dla często bezdusznego, instytucjonalnego systemu opieki. W takich uwarunkowaniach psychologicznych rodzi się zapotrzebowanie na tzw. homeopatię i medycynę alternatywną. Zjawisko to jest społecznie szkodliwe, gdyż odbija się negatywnie na zdrowiu ludzi chorych. Przebadane leki roślinnego pochodzenia metodą podwójnie ślepej próby, jeśli są skuteczne, spełniają wymogi medycyny naukowej i budzą zaufanie ludzi głęboko wierzących w ziołolecznictwo i medycynę „naturalną”.

Od wielu lat duże zainteresowanie w leczeniu otępień budzi wyciąg z miłorzębu (*Ginkgo biloba*). Zainteresowanie to wynika z braku leków opóźniających rozwój choroby. Badania Sano i in. (1997) udowodniły co prawda, że tokoferol i selegilina (deprenyl) opóźniają postęp otępienia, ale skuteczność tychże leków nieznacznie, choć istotnie statystycznie, przekracza placebo. Inhibitory cholinesterazy omówione na łamach Farmakoterapii w Psychiatrii i Neurologii przez Kłoszewską (2001) poprawiają funkcje poznawcze i funkcjonowanie chorych, ale nie opóźniają rozwoju choroby i postępującej deterioracji intelektualnej. Wyciąg z miłorzębu EGb 761 przebadano metodą podwójnie ślepej próby stąd warto zastanowić się, czy leki oparte na bazie tego wyciągu można stosować u chorych z otępieniem. Wyciągi z miłorzębu od lat stosowane były w tradycyjnej medycynie ludowej chińskiej i japońskiej.

Miłorząb dwuklapkowy (*Ginkgo biloba*) jest interesującą rośliną z punktu widzenia systematyki roślin. Należy do monotypowego rodzaju ujmowanego w randze klasy miłorzębowych wśród roślin nagozalążkowych. Jest paleoendemitem – reliktem bogatej w gatunki grupy roślin nagozalążkowych żyjących w erze paleozoicznej i mezozoicznej (Bowe i in. 2000). Z punktu widzenia fitochemicznego obecność biflawonoidów zbliża go do roślin szpilkowych (drzew iglastych) (Ramaswamy 1970). Sposób rozmnażania i porównywanie sekwencji konserwatywnych ewolucyjnie genów wskazuje na pokrewieństwo miłorzębu z sagowcami (Bowe i in. 2000).

Wiele preparatów roślinnych uważanych za bardzo skuteczne nie wytrzymało próby czasu i weryfikacji przy pomocy rzetelnych klinicznych badań naukowych. Skład preparatów roślinnych nigdy nie jest znany, stąd ich bezmyślne stosowanie przez lekarzy przy braku udowodnionego działania klinicznego może przynieść więcej strat, niż korzyści. Artykuł stanowi krytyczną próbę podsumowania wiedzy na temat preparatów z miłorzębu.

Kliniczne dowody skuteczności wyciągu z miłorzębu w otępieniu

Jedynym dowodem skuteczności działania leku są randomizowane badania kliniczne z podwójnie ślepa próbą. Wszelkie badania biochemiczne lub badania na zwierzętach mogą stanowić tylko przesłankę do podjęcia oceny potencjalnego

leku metodą badań klinicznych. Pierwsze kontrolowane badania kliniczne przeprowadzili pod koniec lat osiemdziesiątych Niemcy (Hofferberth 1989). W badaniu tym chorzy z umiarkowanym otępieniem otrzymywali przez 8 tygodni 120 mg (3×40 mg) wyciągu z miłorzębu albo placebo. Przed i po eksperymencie oceniano sprawność intelektualną chorych dwoma testami psychometrycznymi przed, po 4 i po 8 tygodniach badania: *Wiener Determination Test*, *Number Connection Test* i *Number Connection Test*. Stwierdzono nieznaczną, choć istotną statystycznie różnicę pomiędzy grupą placebo, a grupą leczoną na korzyść tej drugiej (Hofferberth 1989). W 1997 roku na łamach czasopisma JAMA ukazały się wyniki wieloośrodkowego badania klinicznego nad wyciągiem z miłorzębu w leczeniu otępienia w chorobie Alzheimera i otępienia naczyniowego (Le Bars i in. 1997). Wyciąg z miłorzębu (120 mg/dobę) albo placebo podawano chorym z otępieniem w stopniu umiarkowanym i ciężkim przez 52 tygodnie. Stan chorych oceniano w 12, 26 i 52 tygodniu przy pomocy badania klinicznego i skal psychometrycznych: *Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive (ADAS-Cog)*, *Geriatric Evaluation by Relative's Rating Instrument (GERRI)*, oraz *Clinical Global Impression of Change (CGIC)*. Spośród 309 chorych zakwalifikowanych do badania, do punktu końcowego dotrwało 202. Stwierdzono różnice statystyczne w wynikach skal *ADAS-Cog* ($p < 0,004$) i *GERRI* ($p < 0,005$) pomiędzy otrzymującymi lek a placebo (Le Bars i in. 1997).

Mix i in. (2000) przebadali 48 chorych z udowodnionymi neuropsychologicznymi deficytami funkcji poznawczych w wieku od 55 do 86 lat. Chorzy przez 6 tygodni otrzymywali 180 mg/dobę preparat EGb 761 metodą podwójnie ślepej próby. Chorych przed i po badaniu oceniano przy pomocy baterii testów neuropsychologicznych – Testu Stroopa (*Stroop Color and Word Test Color-Naming Task*). Autorzy stwierdzili niewielkie różnice pomiędzy chorymi przyjmującymi lek a grupą pacjentów otrzymującą placebo w niektórych podtestach wymienionej baterii testów neuropsychologicznych (Mix i in. 2000). Zarzutem metodologicznym wobec badania jest zbyt krótki okres obserwacji chorych. Otępienia to choroba, w której obserwowana deterioracja intelektualna postępuje zazwyczaj dość powoli. Okres 6 tygodni może być zbyt krótki na zauważenie zmian.

Wettstain (2002) porównywał skuteczność opóźniania deterioracji intelektualnej chorych z otępieniem stosujących preparaty miłorzębu i inhibitory cholinesterazy. Stwierdził porównywalny efekt obu grup leków w stosunku do grupy placebo u chorych z łagodnym i umiarkowanym otępieniem. W 2002 roku le Bars i in. (2002) opublikowali wyniki 52 tygodniowego wieloośrodkowego badania z podwójnie ślepą próbą nad działaniem w otępieniu wyciągu z miłorzębu EGb 761 w dawce 120 mg na dobę. Do oceny funkcji poznawczych i funkcjonowania chorych przed, w czasie badania i po użyto trzech skal psychometrycznych *ADAS-Cog*, *MMSE (Mini Mental State Examination)*, i skali *GERRI* (le Bars i in. 2002). Z badań wynika, że chorzy z łagodnym i umiarkowanym otępieniem przyjmujący preparaty miłorzębu wykazywali, w porównaniu z grupą otrzymującą placebo, nieznacznie lepsze funkcjonowanie społeczne ($p = 0,001$) i mniejsze upośledzenie funkcji poznawczych ($p = 0,02$) (le Bars i in. 2002).

Przedstawione powyżej badania nie wyczerpują wszystkich opisanych w piśmiennictwie prób klinicznych. Przedstawiono je w pracy, gdyż są wykonane na dużych grupach, poprawnie metodologicznie i opublikowane w liczących się czasopismach. Należy podkreślić, że wyciąg z miłorzębu znacznie lepiej przebadano klinicznie niż tokoferol i selegilinę. Obu tym lekom poświęcono, jak dotychczas, jedno bardzo poprawnie przeprowadzone badanie wykonane na dużej grupie (Sano i in. 1997).

Próby wytłumaczenia korzystnego działania preparatu EGb 761 w otępieniu

Potwierdzona kliniczna skuteczność wyciągu z miłorzębu rodzi pytanie o biochemiczne mechanizmy opóźniania rozwoju otępienia. Wszystkie prace dotyczące molekularnych i fizjologicznych mechanizmów działania składników wyciągu z miłorzębu mogą mieć znaczenie w wytłumaczeniu ochronnego działania leku na deteriorację funkcji poznawczych w otępieniu. Wyciąg z miłorzębu jest preparatem złożonym z wielu substancji w tym głównie flawonoidów typowych dla miłorzębu (24%) i terpenów (6%). Biologiczne mechanizmy działania flawonoidów są pozornie powszechnie znane. Zapomina się jednak, że grupa ta jest niejednorodna, a badań dotyczących poszczególnych związków nie można uogólniać nawet na związki pokrewne.

Preparat EGb 761 bezpośrednio zmiata reaktywne postacie tlenu, tak jak każdy preparat o dużej zawartości flawonoidów (Bidi i in. 2001, Sahikama i in. 2002). EGb 761 zmiata anionorodnik nadadtlenkowy (Pincemail i in. 1989) w stężeniu 200 µg/ml. Hamuje również wytwarzanie anionorodnika nadadtlenkowego przez oksydazę ksantynową, co ma bardzo ważne znaczenie w niedokrwieniu i reperfuzji (Du i in. 1999). Niedokrwienie i reperfuzja, a zwłaszcza związany z tym proces aktywacji oksydazy ksantynowej jest jedną z molekularnych mechanizmów rozwoju otępienia naczyniowego i udarów (Du i in. 1999). Podawanie myszom preparatu EGb 761 lub selegiliny minimalizowało uszkodzenia mózgu wywołane doświadczalnym niedokrwieniem (Unal i in. 2001). Należy jednak sceptycznie podejść do ochronnego działania na mózg tzw. zmiataczy wolnych rodników, ponieważ tylko tokoferol wykazuje jakiegokolwiek działanie opóźniające rozwój otępienia (Chow i in. 1999, Pryor 2000).

Bidi i in. (2001) wykazali, że flawonoidy z miłorzębu indukują w mózgach gryzoni aktywność enzymów zmiatających reaktywne postacie tlenu – katalazy i dysmutazy nadadtlenkowej. Podobne właściwości indukowania aktywności enzymów antyoksydacyjnych w tkankach posiada inny lek o potwierdzonych właściwościach opóźniania rozwoju otępienia. Jest to selegilina (Kushleika i in. 1996).

Zawarty w wyciągu z miłorzębu kampferol, apigenina i chryzyna są silnymi inhibitorami izoenzymów A i B monoaminooksydazy (MAO-*monoaminoxidase*) (Sloley i in. 2000). Wszystkie trzy związki, a zwłaszcza kampferol silniej hamują MAO-A niż MAO-B. Hamowaniem mitochondrialnej MAO-B tłumaczy się opóźnianie rozwoju otępienia przez selegilinę (Chrisp i in. 1991, Kitani i in. 1994

Leanz i in. 2002). Monoaminoooksydaza jest jednym ze źródeł nadtlenu wodoru w mitochondriach. Nadtlenek wodoru uruchamia stres oksydacyjny zależny od mitochondriów odpowiedzialny za apoptozę i zanik komórek nerwowych (Fiskum i in. 1999, Markesbery 1999a i b, Markesbery i in. 1999). Odmienne wyniki badań podają (Porsolt i in. 2000). Nie stwierdzili oni wpływu preparatu EGb 761 na aktywność monoaminoooksydazy. Interesującego spostrzeżenia dokonał zespół kierowany przez Pardon (Pardon i in. 2000). W procesie starzenia się mózgu u ssaków rośnie aktywność obu izoenzymów monoaminoooksydazy. Uważa się, że wzrost ten jest jedną z przyczyn częstego występowania w populacji ludzi starych depresji, choroby Parkinsona i otepień. Inhibitory MAO są jako leki korzystne we wszystkich trzech wymienionych chorobach. Podawanie myszom preparatu EGb 761 hamowało wzrost aktywności MOA-B w starzejących się mózgach (Pardon i in. 2000). Być może dobroczynne działanie wyciągu z miłorzębu polega na hamowaniu ekspresji białka MAO-B. Z drugiej strony podawanie ludziom preparatu EGb 761 przez miesiąc w dawce 120 mg/dobę nie wpłynęło na aktywność MAO-A i MAO-B mierzoną przy pomocy pozytronowej tomografii emisyjnej w mózgu (Fowler i in. 2000). Związek pomiędzy wyciągiem z miłorzębu a aktywnością MAO pozostaje nadal nierozwiązany.

Kobayashi i in. (2000) opisali, że flawonoidy z miłorzębu hamują cytotoksyczność komórek nerwowych wywołaną glutaminianem. Kwas glutaminowy w ośrodkowym układzie nerwowym pełni rolę neuroprzekaźnika. Uwolniony z synaps w nadmiarze odpowiedzialny jest za niektóre efekty cytotoksyczne, w tym napływ wapnia i aktywację enzymów proteolitycznych zależnych od wapnia (Harman 2002). Saponara i in. (1998) opisali, że biflawonoidy z miłorzębu: amentoflawon, bilobetyna, sekwojaflawon i isogingkogentyna silnie hamują fosfodiesterazę cAMP. Campos-Toimil i in. (2000) udowodnili, że wyciąg z miłorzębu hamuje aktywność IV izoenzymu fosfodiesterazy, podobnie jak rolipram – lek rozkurczający naczynia i wykazujący właściwości przeciwdepresyjne. Neuroprotektoryjne działanie wyciągu z miłorzębu trudno tłumaczyć hamowaniem fosfodiesterazy, bowiem właściwości takie posiadają np. preparaty teofiliny, czy sildenafil nie wykazujące działania opóźniającego rozwój otepień. Bastinnetto i in. (2000) opisali ochronne działanie wyciągu z miłorzębu na komórki hipokampa. Hipokamp jest częścią mózgowia odpowiedzialną za powstawanie śladów pamięciowych. Należy do struktur szczególnie podatnych na uszkodzenia i jako jeden z pierwszych zakrętów ulega uszkodzeniu w chorobie Alzheimerera (Bastinnetto i in. 2000). Wyciąg z miłorzębu zmiata bezpośrednio tlenek azotu NO – neuromediator odpowiedzialny w nadmiarze za uszkodzenie hipokampa (Bastinnetto i in. 2000). Bilobalidy zawarte w wyciągu są silnymi inhibitorami kinazy białkowej C i kanałów wapniowych typu L (Bastinnetto i in. 2000). Bilobalidy i terpenoidy zawarte w wyciągu silnie hamują fosfolipazę A_2 w hipokampie przez co ochraniają narząd ten przed enzymatyczną peroksydacją lipidów i „zalewem” komórek przez mediator leukotrienowe i prostaglandynowe (Bastinnetto i in. 2000). Niektórzy protektoryjne działanie tokoferolu na ośrodkowy układ nerwowy wiążą z hamowaniem przez witaminę E kinazy białkowej C i kanałów wapniowych (Tasinato i in. 1995,

Azzi i in. 2002). Baek i in. (1999) zauważyli, że bilobetyna – biflawonoid zawarty w tkankach miłorzębu, hamuje fosfolipazę A_2 , ekspresję cyklooksygenazy izoenzymu drugiego, oraz indukowalnej syntazy tlenu azotu. Wpływ na hamowanie indukcji syntazy tlenu azotu potwierdził Cheon i in. (2000). Zauważono również, że biflawonoidy z miłorzębu hamują uwalnianie fosfolipidów z uszkodzonych błon podczas niedokrwienia mózgu (Klein i in. 1997).

Ważnym odkryciem wydaje się być wpływ biflawonoidów z ekstraktu miłorzębu na aktywność enzymów łańcucha oddechowego (Tendi i in. 2002). Flawonoidy te zwiększają ekspresję mRNA dla podjednostek kompleksu I łańcucha oddechowego (Tendi i in. 2002). W chwili obecnej uważa się, że zmniejszenie aktywności enzymów łańcucha oddechowego jest jedną z głównych przyczyn otępień – kompleksu I w przebiegu choroby Parkinsona i choroby rozsianych ciałek Lewy'ego, oraz kompleksu IV w przebiegu choroby Alzheimer'a (Davis i in. 1997, de la Monte i in. 2000, Greenamyre i in. 2001). Nadmierne wytwarzanie reaktywnych postaci tlenu przez uszkodzony łańcuch oddechowy indukuje apoptozę zależną od mitochondriów (Davis i in. 1997, de la Monte i in. 2000), aktywuje procesy proteolizy mogące doprowadzić do nieprawidłowego cięcia proteolitycznego białka prekursorowego betaamyloidu (Dickson 1997), oraz indukuje proces peroksydacji lipidów, który w nadmiarze uszkadza komórki nerwowe (Janero 1990, Halliwell 1992, Mark i in. 1997). Chandrasekaran i in. (2001) zauważyli, że preparat EGb 761 chroni ośrodkowy układ gryzoni przed niedokrwieniem i reperfuzyją. Zjawisko to może tłumaczyć ochronną rolę wyciągów z miłorzębu na powstawanie i rozwój otępienia naczyniowego (Chandrasekaran i in. 2001). W czasie niedokrwienia mózgu w hipokampie uszkodzeniu ulega funkcjonowanie łańcucha oddechowego, a szczególnie obniża się zawartość podjednostek kompleksu IV łańcucha oddechowego – oksydazy cytochromu C. Wyciąg z miłorzębu wpływa na zaburzoną ekspresję mRNA dla podjednostki III oksydazy cytochromu C kodowanej przez genom mitochondrialny (Chandrasekaran i in. 2001).

Wykryto, że białko betaamyloidu indukuje apoptozę u hodowanych *in vitro* komórek nerwowych PC 12 (Yao i in. 2001). Betaamyloid uszkadza również te komórki drogą wytwarzania reaktywnych postaci tlenu (Yao i in. 2001). Dodany do hodowli tych komórek preparat EGb 761, wbrew oczekiwaniom, nie hamował ani apoptozy, ani wytwarzania reaktywnych postaci tlenu przez betaamyloid. Działał jednak ochronnie hamując wytwarzanie rozpuszczalnych neurotoksycznych ligandów indukowanych obecnością betaamyloidu (Yao i in. 2001). Inne wyniki otrzymali z kolei Zhou i in. (2000). Udowodnili, że bilobalidy z miłorzębu w stężeniu 25 μM hamują apoptozę indukowaną przez reaktywne postaci tlenu (układ ksantyna/oksydaza ksantynowa) w komórkach PC 12. Autorzy stwierdzili zmniejszoną ekspresję produktu onkogenu c-myc i białka p53 pod wpływem bilobalidów (Zhou i in. 2000). Inne badania z użyciem technik biologii molekularnej potwierdzają hamujący wpływ bilobalidów na ekspresję czynnika transkrypcyjnego AP-1 (Mizuno i in. 1996). Bastinnetto i in. (2000) zauważył, że betaamyloid, dodany do hodowli komórek hipokampa indukuje ich uszkodzenie. EGb 761 w stężeniu 10–50 $\mu\text{g/ml}$, hamował uszkodzenie komórek hipokampa

indulowane przez peptydy 25–35 betaamyloidu, 1–42 betaamyloidu i 1–40 betaamyloidu (numery oznaczają aminokwas początkowy i końcowy fragmentu białka betaamyloidu liczone od strony końca N) (Bastianetto i in. 2000). EGb 761 pozbawiony terpenoidów (same biflawonoidy) wykazywał takie same właściwości ochronne. Wskazuje to na dominującą rolę flawonoidów w ochronnym działaniu wyciągu z miłorzębu na komórki nerwowe i na wpływ tych flawonoidów na regulację genetyczną lub na oddziaływanie z czynnikami transkrypcyjnymi. Ważnym potwierdzeniem tego jest obserwacja, że EGb 761 osłabia wytwarzanie białek szoku termicznego (białka HSP 72) w mózgu szczura pod wpływem hipertermii (Westman i in. 2000).

Zakończenie

W artykule pominięto omówienie korzystnego działania wyciągu z miłorzębu na serce, zwłaszcza w niedokrwieniu/reperfuzji, i wiele innych badań klinicznych nad zastosowaniem preparatu EGb 761 w medycynie. Skoncentrowano się wyłącznie na otępieniach i działaniem wyciągu z miłorzębu na ośrodkowy układ nerwowy.

Kontrolowane badania kliniczne wskazują na skuteczność preparatu EGb 761 w opóźnianiu rozwoju otępienia. Skuteczność ta jest jednak niewielka, choć stosunkowo dobrze udowodniona. Z wyciągiem miłorzębu przeprowadzono znacznie więcej badań z podwójnie ślepą próbą, niż z tokoferolem czy selegiliną. Otępienia to choroby postępujące, stąd nawet minimalne opóźnienie rozwoju choroby powinno być celem terapii farmakologicznej.

W chwili obecnej trudno wypowiadać się co do mechanizmu działania preparatu EGb 761. Bez wątplenia badania nad wyciągiem z miłorzębu przyczynią się do lepszego poznania molekularnych podstaw rozwoju tej ciężkiej choroby. Odkrycie mechanizmu odpowiedzialnego za opóźnianie rozwoju choroby przyczyni się w przyszłości do poszukiwania nowych grup leków stosowanych w profilaktyce i leczeniu otępień.

Piśmiennictwo

1. Azzi A., Ricciarelli R., Zingg J.M.: Non-antioxidant molecular functions of alpha-tocopherol (vitamin E). *F.E.B.S. Lett.* 2002, 519, 8–10
2. Baek S.H., Yun S.S., Kwon T.K., Kim J.R., Chang H.W., Kwak J.Y., Kim J.H., Kwun K.B.: The effects of two new antagonists of secretory PLA2 on TNF, iNOS, and COX-2 expression in activated macrophages. *Shock* 1999, 12, 473–478
3. Bastianetto S., Ramassamy C., Dore S., Christen Y., Poirier J., Quirion R.: The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta-amyloid. *Eur. J. Neurosci.* 2000, 12, 1882–1890
4. Bastianetto S., Zheng W.H., Quirion R.: The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: involvement of its flavonoid constituents and protein kinase C. *J. Neurochem.* 2000, 74, 2268–2277

5. le Bars P.L., Katz M.M., Berman N., Itil T.M., Freedman A.M., Schatzberg A.F.: A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of an extract of *Ginkgo biloba* for dementia. North American EGB Study Group. *JAMA* 1997, 278, 1327–32
6. le Bars P.L., Velasco F.M., Ferguson J.M., Dessain E.C., Kieser M., Hoerr R.: Influence of the severity of cognitive impairment on the effect of the *Ginkgo biloba* extract EGb 761 in Alzheimer's disease. *Neuropsychobiology* 2002, 45, 19–26
7. Bridi R., Crossetti F.P., Steffen V.M., Henriques A.T.: The antioxidant activity of standardized extract of *Ginkgo biloba* (EGb 761) in rats. *Phytother. Res.* 2001, 15, 449–451
8. Bowe L.M., Coat G., dePamphilis C.W.: Phylogeny of seed plants based on all three genomic compartments: extant gymnosperms are monophyletic and Gnetales' closest relatives are conifers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000, 97, 4092–4097
9. Campos-Toimil M., Lugnier C., Droy-Lefaix M.T., Takeda K.: Inhibition of type 4 phosphodiesterase by rolipram and *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) decreases agonist-induced rises in internal calcium in human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000, 20, E34–E40
10. Chandrasekaran K., Mehrabian Z., Spinnewyn B., Drieu K., Fiskum G.: Neuroprotective effects of bilobalide, a component of the *Ginkgo biloba* extract (EGb 761), in gerbil global brain ischemia. *Brain Res.* 2001, 922, 282–292
11. Cheon B.S., Kim Y.H., Son K.S., Chang H.W., Kang S.S., Kim H.P.: Effects of prenylated flavonoids and biflavonoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production from the mouse macrophage cell line RAW 264.7. *Planta Med.* 2000, 66, 596–600
12. Chow C.K., Ibrahim W., Wei Z., Chan A.C.: Vitamin E regulates mitochondrial hydrogen peroxide generation. *Free Radic. Biol. Med.* 1999, 27, 580–587
13. Chrisp G., Mammen G.J., Sorkin E.M.: Selegiline: a review of its pharmacology, symptomatic benefits and protective potential in Parkinson's disease. *Drug Aging* 1991, 1, 228–248
14. Davis R.E., Miller S., Hermstadt C., Ghosh S.S., Fahy E., Shinobu L., Galasko D., Thal L.J., Beal M.F., Howell N., Parker W.D. Jr.: Mutations in mitochondrial cytochrome c oxidase genes segregate with late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997, 29, 4526–4531
15. Dickson D.W.: The pathogenesis of senile plaques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1997, 56, 321–339
16. Du G., Willet K., Mouithys-Mickalad A., Sluse-Goffart C.M., Droy-Lefaix M.T., Sluse F.E.: EGb 761 protects liver mitochondria against injury induced by in vitro anoxia/reoxygenation. *Free Radic. Biol. Med.* 1999, 27, 596–604
17. Fiskum G., Murphy A.N., Beal M.F.: Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1999, 19, 351–369
18. Fowler J.S., Wang G.J., Volkow N.D., Logan J., Franceschi D., Franceschi M., MacGregor R., Shea C., Garza V., Liu N., Ding Y.S.: Evidence that *Ginkgo biloba* extract does not inhibit MAO A and B in living human brain. *Life Sci.* 2000, 55, PL141–PL146
19. Greenamyre J.T., Sherer T.B., Betarbet R., Panov A.V.: Complex I and Parkinson's disease. *I.U.B.M.B. Life* 2001, 52, 135–141
20. Halliwell B.: Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 1992, 59, 1609–1623
21. Harman D.: Alzheimer's disease: role of aging in pathogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002, 959, 385–395
22. Hofferberth B.: The effect of *Ginkgo biloba* extract on neurophysiological and psychometric measurement results in patients with psychotic organic brain syndrome. A double-blind study against placebo. *Arzneimittelforschung* 1989, 8, 918–22
23. Janero D.R.: Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.* 1990, 9, 515–540
24. Kitani K., Kanai S., Carillo M.C., Ivy G.O.: (–) Deprenyl increases the life span as activities of superoxide dismutase and catalase but not of glutathione peroxidase in selective brain regions in fischer rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1994, 717, 60–70

25. Klein J., Chatterjee S.S., Loffelholz K.: Phospholipid breakdown and choline release under hypoxic conditions: inhibition by bilobalide, a constituent of Ginkgo biloba. *Brain Res.* 1997, 755, 347–350
26. Kłoszewska I.: Inhibitory acetylcholinoesterazy w leczeniu choroby Alzheimerera. *Farmakoterapia w Psychiatrii i Neurologii* 2001, 4, 361–369
27. Kobayashi M.S., Han D., Packer L.: Antioxidants and herbal extracts protect HT-4 neuronal cells against glutamate-induced cytotoxicity. *Free Radic. Res.* 2000, 32, 115–124
28. Kushleika J., Checkoway H., Woods J.S., Moon J.-D., Smith-Weller T., Franklin G.M., Swanson P.D.: Selegiline and lymphocyte superoxide dismutase activities in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 1996, 39, 378–381
29. Lenaz G., Bovina C., D'Aurelio M., Fato R., Formiggini G., Genova M.L., Giuliano G., Pich M.M., Paolucci U., Castelli G.P., Ventura B.: Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002, 959, 199–213
30. Mark R.J., Lovell M.A., Markesbery W.R., Uchida K., Mattson M.P.: A role for 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid beta-peptide. *J. Neurochem.* 1997, 68 255–264
31. Markesbery W.R.: Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 1997, 23, 134–147
32. Markesbery W.R.: The role of oxidative stress in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 1999, 56, 1449–1452
33. Markesbery W.R., Carney J.M.: Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 1999, 9, 133–146
34. Mix J.A., Crews W.D. Jr.: An examination of the efficacy of Ginkgo biloba extract EGb761 on the neuropsychologic functioning of cognitively intact older adults. *J. Altern. Complement. Med.* 2000, 6, 219–229
35. Mizuno M., Droy-Lefaix M.T., Packer L.: Ginkgo biloba extract EGb 761 is a suppresser of AP-1 transcription factor stimulated by phorbol 12-myristate 13-acetate. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1996, 39, 395–401
36. de la Monte S.M., Luong T., Neely T.R., Robinson D., Wands J.R.: Mitochondrial DNA damage as a mechanism of cell loss in Alzheimer's disease. *Lab. Invest.* 2000, 80, 1323–1353
37. Pardon M.C., Joubert C., Perez-Diaz F., Christen Y., Launay J.M., Cohen-Salmon C.: In vivo regulation of cerebral monoamine oxidase activity in senescent controls and chronically stressed mice by long-term treatment with Ginkgo biloba extract (EGb 761). *Mech. Ageing Dev.* 2000, 113, 157–168
38. Pincemail J., Dupuis M., Nasr C., Hans P., Haag-Berrurier M., Anton R., Deby C.: Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of Ginkgo biloba extract. *Experientia* 1989, 45, 708–12
39. Porsolt R.D., Roux S., Drieu K.: Evaluation of a Ginkgo biloba extract (EGb 761) in functional tests for monoamine oxidase inhibition. *Arzneimittelforschung* 2000, 50, 232–235
40. Pryor A.A.: Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Radic. Biol. Med.* 2000, 28, 141–164
41. Ramaswamy A.S.: Pharmacological action of the biflavonoids from the gymnosperms with special reference to Ginkgo biloba, L. A survey. *J. Indian Med. Assoc.* 1970, 55, 163–165
42. Sakihama Y., Cohen M.F., Grace S.C., Yamasaki H.: Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 2002, 177, 67–80
43. Sano M., Ernesto C., Thomas R.G., Klauber M.R., Schaffer K., Grundman M., Woodbury P., Growdon J., Cotman C.W., Pfeiffer E., Schneider L.S. Thal L.: A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 1997, 36, 1216–1222
44. Saponara R., Bosisio E.: Inhibition of cAMP-phosphodiesterase by biflavones of Ginkgo biloba in rat adipose tissue. *J. Nat. Prod.* 1998, 61, 1386–1387

45. Sęk H.: Wprowadzenie do psychologii klinicznej. Wydawnictwo Naukowe Scholar, Warszawa 2001
46. Sloley B.D., Urichuk L.J., Morley P., Durkin J., Shan J.J., Pang P.K., Coutts R.T.: Identification of kaempferol as a monoamine oxidase inhibitor and potential neuroprotectant in extracts of Ginkgo biloba leaves. *J. Pharm. Pharmacol.* 2000, 52, :451–459
47. Tasinato A., Boscoboinik D., Bartoli G.M., Maroni P., Azzi A.: D-alpha-tocopherol inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation occurs at physiological concentrations, correlates with protein kinase C inhibition, and is independent of its antioxidant properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995, 92, 12190–12194
48. Tendi E.A., Bosetti F., Dasgupta S.F., Stella A.M., Drieu K., Rapopor S.I.: Ginkgo biloba extracts EGb 761 and bilobalide increase NADH dehydrogenase mRNA level and mitochondrial respiratory control ratio in PC12 cells. *Neurochem. Res.* 2002, 27, 319–323
49. Unal I., Gursoy-Ozdemir Y., Bolay H., Soylemezoglu F., Saribas O., Dalkara T.: Chronic daily administration of selegiline and EGb 761 increases brain's resistance to ischemia in mice. *Brain Res* 2001, 917, 174–181
50. Westman J., Drieu K., Sharma H.S.: Antioxidant compounds EGB-761 and BN-520 21 attenuate heat shock protein (HSP 72 kD) response, edema and cell changes following hyperthermic brain injury. An experimental study using immunohistochemistry in the rat. *Amino Acids* 2000, 19, 339–350
51. Wettstein A.: Cholinesterase inhibitors and Ginkgo extracts – are they comparable in the treatment of dementia? Comparison of published placebo-controlled efficacy studies of at least six months' duration. *Phytomedicine* 2000, 6, 393–401
52. Yao Z., Drieu K., Papadopoulos V.: The Ginkgo biloba extract EGb 761 rescues the PC12 neuronal cells from beta-amyloid-induced cell death by inhibiting the formation of beta-amyloid-derived diffusible neurotoxic ligands. *Brain Res.* 2001, 889, 181–190
53. Zhou L.J., Zhu X.Z.: Reactive oxygen species-induced apoptosis in PC12 cells and protective effect of bilobalide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000, 293, 982–988