

Review article**Artykuł poglądowy**

© 2014 Instytut Psychiatrii i Neurologii. Wszelkie prawa zastrzeżone.

MARIOLA WOLANIN, BOŻENA KŁYSZ, ANNA CZŁONKOWSKA

Role of ceruloplasmin in neurodegenerative disorders*Rola ceruloplazminy w chorobach neurodegeneracyjnych*

Institute of Psychiatry and Neurology, Second Department of Neurology, Warsaw, Poland

ABSTRACT

Ceruloplasmin is the main protein involved in copper metabolism. Ceruloplasmin plays a significant role in iron metabolism; it facilitates oxidation ferrous ion to ferric ion and encourages binding ferric ion to transferrin and ferritin. Taking into account its iron oxidase activity, ceruloplasmin belongs to a ferroxidases subclass.

Ceruloplasmin activity is decreased in many neurodegenerative disorders: aceruloplasminemia, Alzheimer's disease and Parkinson's disease. This observation coexists with iron (ferric ion) deposits in many organs. In Alzheimer's disease, Parkinson's disease and aceruloplasminemia ferric ion accumulation results in apoptosis on free radicals damage pathway. In Wilson's disease, impaired intracellular copper transport results in low serum ceruloplasmin and tissue copper accumulation. All periods of mechanisms of damages of cells have not been explained so far. Further research is essential concerning the damage to free radicals neurons in neurodegenerative diseases and possible ways of treatment.

STRESZCZENIE

Ceruloplazmina jest głównym białkiem biorącym udział w metabolizmie miedzi. Odgrywa również znaczącą rolę w metabolizmie żelaza. Utlenia jony Fe^{2+} , umożliwiając połączenie się jonów Fe^{3+} z białkami transportującymi oraz magazynującymi – z tego względu zaliczana jest do ferroksoydaz.

W wielu chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak aceruloplazminemia, choroba Parkinsona, choroba Alzheimera, zaobserwowano związek pomiędzy obniżonym stężeniem ceruloplazminy w surowicy i odkładaniem się jonów Fe^{2+} w różnych narządach. Wskutek zwiększonego magazynowania Fe^{2+} dochodzi do oksydacyjnego uszkodzenia komórek i apoptozy. W chorobie Wilsona natomiast zaburzony jest wewnątrzkomórkowy transport miedzi, co prowadzi do obniżenia syntezy ceruloplazminy i odkładania się miedzi w tkankach. Nie wszystkie etapy mechanizmów uszkodzenia komórek zostały dotychczas wyjaśnione, dlatego też niezbędne są dalsze badania dotyczące wolnorodnikowego uszkodzenia neuronów w tych chorobach i możliwych sposobów farmakoterapii.

Key words: ceruloplasmin, iron, neurodegenerative disorders, free radicals, antioxidants

Słowa kluczowe: ceruloplazmina, żelazo, choroby neurodegeneracyjne, wolne rodniki, antyoksydanty

INTRODUCTION

Ceruloplasmin (EC 1.16.3.1, also referred to as copper oxidase or ferroxidase) belongs to the class of oxidoreductases. It was isolated for the first time by Holmberg and Laurell in 1944. It is alfa-2 globulin, with a molecular weight of 132 kDa (Bento et al. 2007). The concentration of ceruloplasmin in the serum of healthy persons is 25–45 mg/dl and reveals

daily variability; the highest values are observed in the morning (Johnson et al. 1992).

Ceruloplasmin is an acute phase protein and its level increases by 2–3-fold in various inflammatory conditions, in persons with myocardial infarction and with neoplasms.

Under physiological conditions, within the first 6 months of life, very low values of ceruloplasmin are observed in serum, and then they increase and reach

a maximum within 2–3 years of age. Since that age, the level of ceruloplasmin decreases and the values observed in early adolescence are comparable with the reference values for adults (Aliyazicioğlu et al. 2007).

Females achieve a higher concentration of ceruloplasmin in blood than males and it is most likely related to the presence of estrogens. It has been proven that absorption of copper is also higher in females than in males. Moreover, pregnancy, oral contraception or hormone replacement therapy, regardless of copper metabolism, result in an increase of concentration of ceruloplasmin (Sontakke et al. 2004; Johnson et al. 1992).

Ceruloplasmin is one of the antioxidative factors in plasma (Goldstein et al. 1982; Walshe JM 1963). It plays a very important role in securing the cells against the detrimental influence of free radicals, which are produced during oxidative stress. It was noticed in many studies that lowered concentration of ceruloplasmin causes accumulation of Fe^{2+} ions in astrocytes and it leads to apoptosis consequently (Gorman et al. 1996; Olivieri et al. 2011; Jin et al. 2011).

Lowered concentration of ceruloplasmin in Wilson's disease is observed. For a few decades, determination of i.e. ceruloplasmin activity is inseparably connected with diagnostics of this disease (Brewer, Askari 2005; Ala et al. 2007; Merle et al. 2009). However, many studies indicate that the lowered activity of ceruloplasmin also occurs in other neurodegenerative disorders: Alzheimer's disease, Parkinson's disease (Vassiliev et al. 2005; Bharucha et al. 2008) and aceruloplasminemia (Emerit et al. 2004; Kristinsson et al. 2012; Gorman et al. 1996).

Genetic expression of ceruloplasmin

The gene encoding ceruloplasmin is located on the long arm of chromosome 3 (3q23-q24) and it is expressed primarily in the hepatocytes and in the brain, but also in the lungs, the heart, the spleen, the kidneys, the testis and in the placenta (Hellman et al. 2002; de Bie et al. 2007). Membrane protein ATP7B, located in the endoplasmic reticulum of the hepatocytes, binds 6–8 atoms of copper to the molecule of apoceruloplasmin and holoceruloplasmin is formed (commonly referred as ceruloplasmin), which shows full enzyme activity. Then, holoceruloplasmin is excreted into the plasma (Fatemi et al. 2002). Changes in the structure of ATP7B results in the ineffective binding of copper into the molecule of apoceruloplasmin. Then, mainly apoceruloplasmin is produced, which shows a lowered activity and shorter half-life (de Bie et al. 2007). Lower activity

and shorter half-life of apoceruloplasmin are the result from decrease number of atoms of copper.

Ceruloplasmin is mainly produced in the liver. It bounds and transports about 90–95% of copper contained in the blood (Giurgea et al. 2005). Ceruloplasmin in the brain is produced in astrocytes and it is bound with glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Patel et al. 1997; Patel et al. 2002; Ke et al. 2007).

Methods to determine the activity or concentration of ceruloplasmin

In the diagnostics of diseases connected with disturbed production of ceruloplasmin, two methods of routine determination of this protein are available – enzymatic method and nefelometric method.

Enzymatic method is the oldest one; it was developed in the 1960s by Ravin. This method utilizes the enzymatic ability to oxidase p-phenylenediamine by ceruloplasmin (Ravin 1961). At the final stage of reaction, absorbance of the mixture is measured at the wave length of 530 nm. The multiplication of the values obtained from the measurement of absorbance by Holmberg-Laurell factor (87.5), gives the values in mg/dl, despite the fact that enzymatic activity is measured (Ravin 1961). This information is very important because enzymatic activity of ceruloplasmin in neurodegenerative disorders is lowered under *in vivo* conditions. The determination of enzyme activity is very important in diagnostics of neurodegenerative disorders, and, in the case of Wilson's disease, it may be helpful in establishing a diagnosis.

In nefelometric methods of determination of ceruloplasmin concentration, a monoclonal antibody against apoceruloplasmin and holoceruloplasmin is added into the evaluated serum. As a result of the antigen–antibody reaction, soluble complexes are produced, and then the intensity of light dispersed by produced molecules of immune complexes is measured. By determining the derivative of the light dispersion, protein concentration is established and the values are provided in mg/dl. Nefelometric method allows rapid determination of value of protein concentration and it reveals higher repeatability than enzymatic method (one), which is performed manually. However, in the case of nefelometric methods of determination of ceruloplasmin concentration, we are not able to precisely determine enzyme activity, because monoclonal antibody is directed not only against the precursory form of ceruloplasmin with a lower activity (apoceruloplasmin), but also against a full active form of enzyme (holoceruloplasmin).

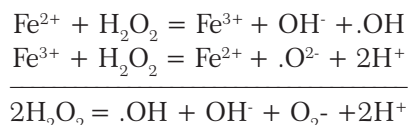
The role of ceruloplasmin in iron metabolism

The participation of ceruloplasmin in iron oxidation has not only significantly influence on the process of hematopoiesis, but also plays an important role in the normal functioning of the cells of the central nervous system. Lowered concentration (and also activity) of ceruloplasmin, which is synthesized in the brain as GPI-anchored form of ceruloplasmin, leads to disturbances in iron metabolism, accumulation of this element in the cells and production of free radicals, which consequently may lead to the cell death (Papanikolaou et al. 2005). Ceruloplasmin, due to ferroxidase activity, participates in securing of the neurons against the influence of free radicals: superoxide radical (O_2^-) and hydroxyl radical (OH). This activity is important because neurons are post-mitotic cells, which do not have the ability to regenerate (or which have this ability only to a minimum extent).

Iron is a cofactor in the synthesis of neurotransmitters, such as dopamine, norepinephrine and serotonin. It is also necessary in myelinogenesis with the presence of oligodendrocytes. Morris et al. noticed that concentration of iron in oligodendrocytes is higher than it is in nerve cells (Morris et al. 1992). Iron deficiency in the case of persons with demyelinating disease, such as multiple sclerosis, is related to disturbances in homeostasis of this element in the cells (He et al. 2007).

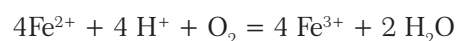
Iron absorbed in the intestines is in an oxidation state of 2+. Then, after a change in the oxidation state of Fe^{2+} into Fe^{3+} , it binds to apotransferrin, producing transfer protein holotransferrin (shorter name is transferrin). Then, it is released into circulation blood stream. Binding iron with iron storing protein, i.e. ferritin, also depends on the change in the oxidation state (from 2+ to 3+) (Sarkar et al. 2003; Roeser et al. 1970). Until recently, it was assumed that ceruloplasmin plays a key role in both processes. Currently, it is known that this is not ceruloplasmin, but its homolog, a membrane protein – hephaestin, which is responsible for oxidizing iron and the absorption of this element in the intestines (Anderson et al. 2002). Ceruloplasmin demonstrates an oxidase activity towards Fe^{2+} ions in the circulation, in astrocytes and the Schwann cells, facilitating the construction of this protein into the storage protein – apoferritin. In these cells, ceruloplasmin occurs in GPI-anchored form.

Fe^{2+} ions, which are not bound to the transport protein or storage protein, are highly toxic. In the presence of hydrogen peroxide (H_2O_2), Fe^{2+} ions initiate the production of free radicals, mainly hydroxyl radical (OH), in the Fenton reaction, which takes the following course (Altamura, Muckenthaler 2009):



A hydroxyl radical is one of the most reactive oxidants, which causes lipid peroxidation and structural changes in DNA and in proteins. These changes result in the death of cells in the apoptosis pathway.

In the nerve cells, a GPI-anchored form of ceruloplasmin participates in the process of iron oxidation. This is the process of a four-electron direct reduction of oxygen molecule to two molecules of water without the presence of hydrogen peroxide and an intermediate product, which occurs in the formula presented below:



For this reason, ceruloplasmin is classified as ferroxidase (Giurgea et al. 2005; Roeser et al. 1970). The excess of Fe^{2+} ions, which have not been linked to ferritin, is removed from the astrocytes in a form which is bound with transport protein – ferroportin 1 (also referred to as IREG1 – Iron REGulated transporter 1) (Ke, Qian 2007).

Transport of Fe^{2+} ions in the cells takes place through the divalent metal transporter (1–DMT1). Chinese authors (Ke, Qian, Jeong et al.) observed that the transfer of iron ions through the cerebrospinal fluid-brain barrier depends on the presence of DMT1 (*divalent metal transporter 1*) (Ke, Qian 2007; Jeong et al. 2003).

DISEASES RELATED TO LOWERED SYNTHESIS OF CERULOPLASMIN

Aceruloplasminemia

Aceruloplasminemia is an autosomal recessive disorder. Mutation in the gene encoding ceruloplasmin results in minimal production of this enzyme; for this reason, its activity is almost indeterminable (Hellman et al. 2002). Lowered activity of ceruloplasmin as ferroxidase makes oxidizing ions from Fe^{2+} to Fe^{3+} impossible. As a result of the inability of binding with ferritin, the accumulation of Fe^{2+} ions occurs. Excess of Fe^{2+} ions and lack of ferroxidase activity of ceruloplasmin initiates the Fenton reaction, which produces free radicals, damaging the cells.

In aceruloplasminemia, accumulation of Fe^{2+} ions in the following organs: brain, pancreas, liver, cornea occurs (Hellman et al. 2002). The first symptoms of

the disease mainly occur within the 4th–5th decade of life and they are result from damaging cells of the respective organs. A triad of the following symptoms: retinal degeneration, dementia and type 2 diabetes mellitus caused by damage of beta cells of the pancreas, which are producing insulin is very common (He at al. 2007).

Wilson's disease

Wilson's disease is the disease with disturbance in copper metabolism inherited in the autosomal recessive pattern. Mutation in the gene encoding ATPase7B results in the ineffective binding of copper ions into the molecule of apoceruloplasmin (Benett, Hahn 2011). The process fails to link 6–8 atoms of copper and the production of active forms of enzyme. Apoceruloplasmin reveals lowered activity and it disintegrates after about 5 hours, while active form – holoceruloplasmin – remains in circulation over approximately 5.5 days (Hellman at al. 2002). Due to the defective mechanisms of the elimination of excessive amount of copper through the biliary tracts (which also occurs with the presence of ATPase7B), the excessive accumulation of this element in hepatocytes takes place. After reaching threshold value, damage of the hepatic cells and release of copper, which is not bound with ceruloplasmin (referred to as free), to blood circulation takes place. Damage of the hepatic cells by copper leads to impairment of the hepatic function; sometimes, however, it results in the development of cirrhosis. Copper ions released into the blood initiate to form deposits in various organs: in the brain, the cornea, the kidneys or in the spleen, which leads to the develop of symptoms of the disease. In about half of cases of the patients with Wilson's disease, the first symptoms of the disease are related to the damage of the liver (of various intensities), and in another half – with damage to the central nervous system (neurological and mental) (Faa at al. 2001; Zimbrea, Schilsky 2014).

One of the elements of biochemical diagnostics of Wilson's disease, besides the determination of serum copper concentration, is the determination of ceruloplasmin activity in serum, which is lowered in persons with disease. Bruehlmeier at al. noticed that the low activity of ceruloplasmin in serum disturbs the metabolism of iron and results in the accumulation of this element in the brain (Bruehlmeier at al. 2000). The authors also observed the kinetics of the reactions of accumulation of iron ^{52}Fe isotope in the brain after its earlier intravenous administration. The content of accumulated iron was evaluated with positron emission tomography (PET). In patients with Wilson's

disease, an increased uptake of isotope was observed. The authors suggest that excessive accumulation of iron ions in this disease is caused by the replacement of copper-dependent enzymes involved in metabolic pathways, which take place in mitochondria, into iron-dependant enzymes (cytochromes). Therefore, an excessive accumulation of iron in the brain may result from an increased demand for this element. Also Litwin at al. emphasize a lowered concentration (as well as activity) of ceruloplasmin in patients with Wilson's disease, which results in abnormal metabolism of iron and accumulation of this element in the dentate nuclei of the cerebellum (Litwin at al. 2013c). The aforementioned observation confirms the participation of ceruloplasmin as ferroxidase in iron metabolism, and it may indicate an additional mechanism of damage to the nerve cells in this disease, despite an excessive accumulation of Cu^{2+} ions. Moreover, the authors point out that in evaluation with the magnetic resonance imaging method, there was a noticeable difference in the amount of accumulated Fe^{2+} ions between females and males. The higher content of Fe^{2+} ions in the brain in males comparing to females and more common occurrence of neurological symptoms were observed (Litwin at al. 2013b). Furthermore, two years earlier the neurological symptoms in males than in females was observed (Litwin at al. 2012a). It is believed that the lower content of Fe^{2+} ions in the brains of females is a result of protective effect of estrogens on the concentration of ceruloplasmin. Estrogens cause an increase in the concentration of ceruloplasmin, which oxidizes Fe^{2+} to Fe^{3+} , facilitating binding Fe^{3+} ions with the storage protein – ferritin.

Parkinson's disease

Parkinson's disease is the second of the most common neurodegenerative disease. It affects about 1.5% of persons over 60 years of age (Martínez-Hernández at al. 2011). It is related to progressive degeneration of dopaminergic neurons located in pigment cells of the substantia nigra in the brain stem and in the basal ganglia. In Parkinson's disease, the occurrence of intraneuronal eosinophilic cytoplasm inclusions – Lewy bodies, is characteristic. They contain many various compounds, i.e. protein alpha synuclein. It is postulated that the presence of iron stimulates cells to accumulate this protein (Salazar at al. 2008).

Salazar at al. studied the influence of MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridine) – active metabolite of neurotoxin MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) – on the transport of Fe^{2+} ions with the presence of DMT1 transporter (Salazar at

al. 2008). MPTP is a by-product of meperidine synthesis and it demonstrates affinity to dopaminergic neurons of nigrostriatal system. It was demonstrated in the studies that the disturbed function of the Fe^{2+} transporter, DMT1, by MPP^+ , resulted in the development of Parkinson's disease.

The crucial pathological change in Parkinson's disease is the occurrence of iron deposits in the cells of the substantia nigra. The cells die and they lose their pigmentation together with the disease progression. Many investigators indicate that such symptoms of the disease may result from lowered activity of ceruloplasmin and corresponding disturbances in iron metabolism in the nerve cells (Kristinsson at al. 2012; Jin at al. 2011).

Damage of the cells occurs as a result of increased production of free radicals, which consequently leads to apoptosis. Martínez-Hernández at al. proved that there is a negative correlation between the concentration (as well as activity) of ceruloplasmin and the presence of iron deposits in the brain (Martínez-Hernández at al. 2011). In addition, the authors suggested that the determination of ceruloplasmin activity in association with transcranial ultrasound indicates that hyperechogenicity caused by the presence of iron deposits in the substantia nigra of the brain, may be a specific marker for Parkinson's disease. This non-invasive evaluation may be helpful in the differentiation of Parkinson's disease from parkinsonian syndromes. Bharucha at al. emphasized the existence of this relationship between concentrations of ceruloplasmin and age of manifestation of the first symptoms of Parkinson's disease (Bharucha at al. 2008). The authors observed that among patients with a lowered concentration of ceruloplasmin, the first symptoms of the disease developed earlier compared to the patients, whose concentration of ceruloplasmin was higher. In both groups of patients, not only in patients, in whom the symptoms occurred earlier, but also in the group of the patients, in whom the symptoms of the disease occurred later, males constituted a majority (proportion of males to females was 45:17 and 24:5). A high incidence of Parkinson's disease among males was demonstrated in many studies (Van Den Eeden at al. 2003; Bharucha at al. 2008; Baldereschi at al. 2000; Shulman, Bhat 2006). Bartozkis at al. postulated that more common and earlier onset of Parkinson's disease in males is caused by the higher content of iron in their brains (Bartozkis et al. 2007). It is believed that this condition is caused by a lack of protective action of estrogens. It was further noticed that in females taking hormone replacement therapy, symp-

toms of Parkinson's disease were less intense comparing to females, who did not use hormonal replacement therapy (Saunders-Pullman at al. 1999). Also the risk of dementia within the course of Parkinson's disease is lower in females using hormone replacement therapy compared to females, who do not use hormone replacement therapy (Currie at al. 2004).

Arnal at al. noticed that the concentration of ceruloplasmin in Parkinson's disease increases in the moment, when the patient's condition worsens. At the same time, it was observed that the concentration of "free" copper (i.e. not bound with ceruloplasmin) in patients' serum (Arnal at al. 2010) increased. Kristinsson at al. suggested that an increased concentration of "free" copper may be caused by abnormal binding of this element into the molecule of apoceruloplasmin, which shows lowered activity. Increases in the concentration of ceruloplasmin may be a compensation mechanism in this situation compared to lowered activity of the enzyme. Furthermore, worsening of the patient's condition may be connected with the occurrence of inflammatory processes and damage to the organs, where the concentration of ceruloplasmin also becomes increased (Salazar at al. 2008).

Alzheimer's disease

In Alzheimer's disease, progressing disturbance in cognitive functions which mainly relates to memory is observed. It is the most common cause of dementia (Blennow at al. 2006). The studies carried out in the 1970s demonstrated that the deficit of cortical concentration of choline acetyltransferase, and then the decreased uptake of choline and the decreased secretion of acetylcholine is crucial in the development of the disease (Kozubski, Liberski 2008). Alzheimer's disease is characterized by the occurrence of extracellular amyloid plaques, which are also called senile plaques, neurofibrillary tangles, dystrophic neuritis and abnormal distribution of tau protein in the cell (Rivera-Mancía at al. 2010).

Etiopathogenesis of Alzheimer's disease is not fully known. One of many hypotheses is the accumulation of insoluble, resistant to proteolysis form of beta amyloid in the brain. Beta amyloid is produced as a result of beta and gamma secretases activity on the amyloid precursor protein (APP). APP is a transmembrane protein which occurs in the brain; however, its function is not clearly known (Rivera-Mancía at al. 2010). Beta and gamma secretases initiate a sequence of events defined as the "amyloid cascade", which results in the aggregation of amyloid in the senile plaques and in the brain vessels.

Lovell et al. noticed that persons with Alzheimer's disease demonstrate an accumulation of Fe^{2+} ions in the amyloid plaques and in the neurofibrillary tangles. Presence of Fe^{2+} ions initiates Fenton reaction, which produces free radicals, disintegrating the cell membrane. Moreover, the presence of free radicals may contribute to aggregation of proteins of beta amyloid (Lovell et al. 2008). Similar observations were also noted by Everett et al. Furthermore, these investigators also noticed that besides Fe^{2+} ions in deposits of beta amyloid, Fe^{3+} ions are present, and these ions may be reduced to Fe^{2+} ions and in this way intensify the production of free radicals (Everett et al. 2014).

In Alzheimer's disease, the abnormal interaction between proteins of beta amyloid and ceruloplasmin may take place, and may be an additional source of free radicals. For many years, studies regarding the concentration of copper and ceruloplasmin in serum of the patients have been conducted. Many investigators noticed that the concentration of ceruloplasmin in Alzheimer's disease is not lowered, but activity of this enzyme is lowered compared to the control group (Kristinsson et al. 2012; Squitti et al. 2008). In recent years, special attention to significantly higher concentrations of free copper in blood serum and in the brains of the patients with Alzheimer's disease and to disturbances in binding copper with ceruloplasmin is paid (Squitti et al. 2008). It was proven that excessive amounts of copper are deposited in the senile plaques and in the neurofibrillary tangles. Aforementioned reports are quite consistent because copper in free form penetrates the blood-brain barrier. In addition, some reports occurred, where the authors suggest that in Alzheimer's disease, the fact of abnormal binding of copper with ceruloplasmin may be crucial for copper metabolism. Squitti suggests that the genetic defect in the gene for ATP7B encoding ATP-ase7B is responsible for disrupted controlling of the concentration of free copper in the organism (Squitti 2012). However, it seems that the abnormal function of the gene, which is mainly related to the incidence of Wilson's disease, may also play some role in the development of Alzheimer's disease. It confirms earlier reports indicating that the level of ceruloplasmin in this disease may be normal, and its function may be disturbed. Therefore, it is very likely that lowered activity of ceruloplasmin and coexisting affinity of copper and iron ions to amyloid protein may lead to apoptosis of the cells as a result of oxidative damage.

The female gender is risk factor, which is an important and difficult to explain in late forms of Alzheimer's disease. It is estimated that females

suffer from this disease twice as frequently as males (Ferrari et al. 2013). In the perimenopausal age, there are hormonal changes in the organism of females (i.e. estrogen concentration decreases) and accompanying metabolic changes, inflammatory lesion and changes in cardiovascular system take place. All of them together are perceived as increasing risk of late form of Alzheimer's disease. The relationship between estrogens, female gender and Alzheimer's disease are undertaken in order to explain in many publication. It was observed that estrogens reveal neuroprotective effects and they retard the occurrence of the first symptoms of Alzheimer's disease (Carter et al. 2012; Jaffe et al. 1994). In addition *in vitro* studies shows that estradiol causes the degradation of APP into fragments, which do not contribute to the occurrence of beta amyloid aggregates (Jaffe et al. 1994). It was shown that the higher risk of development of the disease in females is associated with the gene of the androgen receptor (AR) located on the chromosome X, and especially polymorphic fragment in exon 1 with many repeats of CAG trinucleotide. However, no relationship between the number of repeats and risk of the disease was shown. It is speculated that this risk may be associated with inactivation of chromosome X and mosaicism in females (Ferrari et al. 2013). A gene of estrogen alpha receptor (ESR1) is the second gene important in etiopathogenesis of Alzheimer's disease. The studies has been performed in response to treatment with cholinesterase inhibitors depending on gender, genotype and polymorphism of ESR1 gene (Scacchi et al. 2014). Recently, it was also reported that important risk factor for Alzheimer's disease, which is allele of the gene of apolipoprotein E (APOE4) is also related with gender (Altmann et al. 2014). Preliminary reports shows higher risk of incidence in females. The cause is not known and requires further study, but it may relate to the pathology of tau protein.

TREATMENT OF THE DISEASES WITH DEFICIT OF CERULOPLASMIN – PLACE FOR IRON CHELATING AGENTS AND ANTIOXIDANTS

Aceruloplasminemia

Treatment of aceruloplasminemia is mainly based on metal chelating agents, which reduce deposits of iron occurring as a result of disturbance in the activity of ceruloplasmin. Deferoxamine is the drug with chelating activity, which chelates fer-

ric ions (Fe^{3+}). However, treatment effects are not satisfactory; the most likely is because iron accumulated in the organs is in an oxidation state of 2+ (Fe^{2+}) (Schipper 2012). There were also attempts to treat aceruloplasminemia by supplementation of ceruloplasmin deficit with infusion of fresh frozen plasma (dose 450 ml i.v. once a week, over 6 weeks) (Yonekawa et al. 1999). Improvement in neurological conditions was also observed after using oral zinc sulphate and iron chelating agent – deferasirox (Suzuki et al. 2013). Roberti et al. indicate that using this compound leads to the lowering of level of iron in the cells and it helps in relieving neurological symptoms of the diseases (Roberti et al. 2011).

Wilson's disease

An early start of treatment in Wilson's disease inhibits the progress of the diseases and reduces the intensity of symptoms. In asymptomatic patients, the early introduction of treatment prevents the occurrence of symptoms. Efficacy of the treatment depends on the systematic and continuous administration of the drugs. The drugs that are used in order to increase the elimination of copper from tissues, mainly the ones with the ability of chelating (d-penicillamine, trientine) or in order to inhibit its absorption in the gastrointestinal tract (zinc salts, tetrathiomolibden). In extreme cases of liver damage, it is necessary to transplant this organ.

Until now, the studies (on animal model) has evaluated the effective use of natural antioxidants, such as vitamin E, in therapy in order to relieve symptoms resulting from an oxidative stress, especially in the case of using treatment with zinc salts (in this case, the level of vitamin E is lowered) (Shen, Ji 2010). The beneficial effects of using vitamin E on reducing oxidative damage to the liver were observed (Sokol et al. 1996). Studies with the participation of patients with Wilson's disease have not been conducted so far.

Parkinson's disease

The treatment of Parkinson's disease is mainly based on relieving symptoms of the disease with the drugs reactivating dopaminergic system or inhibiting cholinergic system. The group of commonly recommended drugs includes: levodopa, agonists of dopamine receptors, inhibitors of enzymes catabolizing dopamine, such as monoamine oxidase type B inhibitors (MAO-B) and catechol-O-methyltransferase (COMT), amantadine, cholinolytic drugs. Currently, many clinical studies are conducted in order to evaluate the effectiveness of new substances on slowing down the progress of the disease as

well as stimulating processes of neuroregeneration. There were ineffective attempts to include istradefylline or antagonists of the adenosine receptor into therapy undertaken. Other compounds, pampempanel, antagonist of glutamine AMPA receptors, as clinical studies demonstrated, did not significantly influence the reduction of symptoms in patients with moderately advanced forms of Parkinson's disease and motor fluctuations (Rascol et al. 2012a). Significant hopes are related to pramipexole. In large randomized studies with the compound which is partial agonist of D2 receptor, agonist of 5-HT1A and $\alpha 1$ receptor and antagonist of $\alpha 2$ receptor, shortens *off* phase and prolongs *on* phase and does not cause dyskinesia comparing to levodopa were noticed (Rascol et al. 2012b). Also safinamide seems to be the compound positively influencing the reduction of dyskinesia as well as motor and extramotor symptoms of the disease (Gottwald and Aminoff 2008).

Also experimental trials has been performed, or even clinical ones with the use of gene therapy. Promising studies relate to spheramine, which is an example of dopaminergic retinal pigment epithelium suspended in gelatin microcarrier, and which is implanted into the striatum. Other examples of the gene therapy are attempts to introduce a gene of glutamic acid decarboxylase (AAV-GAD) on adenovirus vector to the hypothalamus and the gene encoding decarboxylating aromatic amino acids (AAV-AADC) to the striatum (Gottwald and Aminoff 2008).

A promising therapeutic strategy may be the use of deferiprone as the chelating agent for iron ions. Currently, 2nd phase clinical trials are conducted (ClinicalTrials.gov ID: NCT00943748).

It seems to be very likely that the administration of ceruloplasmin may also significantly influence the relief of symptoms in Parkinson's disease (Ayton et al. 2013). Ayton et al. studied metabolism of iron (after intraperitoneal injection of ceruloplasmin) in the brain of a mouse with genetic defect in production of ceruloplasmin and in mice with Parkinson's disease caused by administration of MPTP. In both groups, after administration of ceruloplasmin, it was observed that ceruloplasmin administered intraperitoneally transfers the blood-brain barrier. Moreover, it was noticed that among mice with Parkinson's disease caused by administration of MPTP, iron deposits in the brain were reduced after the administration of ceruloplasmin. MPTP and administered ceruloplasmin did not influence changes in content of iron in the liver.

Using antioxidants may be crucial in the therapy of Parkinson's disease. DATATOP study evaluated

neuroprotective efficacy of selegiline and vitamin E. It was demonstrated that vitamin E administered in the dose of 2000 units/day does not reveal any protective effect (Parkinson Study Group 1989). Many hopes, but also controversies are related to the studies regarding neuroprotective effect of rasagiline (Rascol at al. 2011). Studies regarding use of creatine were promising at the beginning, but clinical trials have not brought the expected results (Bender at al. 2008). Studies on the use of this compound in therapy are continued. In the prospective studies, it was noticed that the high concentration of uric acid significantly reduce the risk of occurrence of Parkinson's disease. Uric acid inhibits the occurrence of free radicals mainly by binding Fe^{2+} ions causing damage to the cells as a result of Fenton reaction, protection of lipids and superoxide dismutase as well as influencing the stabilization of calcium homeostasis and supporting functions of mitochondria (Bartosz 2006). The administration of uric acid in large doses to patients with Parkinson's disease contributed to slowing down the development of the disease. Risk of the occurrence of gout constitutes to the disadvantage of the administration of uric acid to patients (Jin at al. 2011). A promising drug was also coenzyme Q, however, large multicenter randomized, double-blind, placebo-controlled 3rd phase study did not confirm the efficacy of the administration of coenzyme Q to patients with Parkinson's disease (Beal at al. 2014).

Alzheimer's disease

The purpose of currently used drugs is to maintain the function of the cholinergic system (donepezil, rivastigmine and galantamin) and to inhibit the activity of stimulating amino-acids (memantina).

Attempts have been undertaken in order to treat chelating agents, such as derivatives of 8-hydroxyquinolines: clioquinol (CQ – clioquinol), HLA20, M30, VK28. Clioquinol was qualified into the 2nd phase of clinical trials (Prachayasittikul at al. 2013); however, the studies with the participation of humans were suspended due to increased accumulation of zinc and copper ions in the brain (Hegde at al. 2009).

Another chelating agent used in patients with Alzheimer's disease is deferoksamin. The drug reveals affinity to Fe^{3+} ions and aluminum, inhibiting production of beta amyloid. Deferoxamine significantly slows down progression of the disease. However, quite problematic is the manner of deferoxamine administration in the form of painful intramuscular injections twice daily (Bush 2002). The side effects of using this compound is iron deficiency anemia (Budimir 2011).

Previous attempts at using antioxidative treatment in Alzheimer's disease were not successful. Currently, some reports occurred regarding efficacy of melatonin in patients with dementia (de Jonghe at al. 2014). Compounds belonging to the family of hybrids melatonin-N, N-dibenzyl(N-methyl) amine reveal neurogenic, neuroprotective, antioxidizing and cholinergic action. In addition, they reveal the influence of reducing the accumulation of beta amyloid, they are minimally toxic and they are able to move into the cerebrospinal fluid. Due to this fact, they raise interest among investigators and there are some hopes for innovative treatment methods (López-Iglesias B. at al. 2014). There are also conducted studies on using antioxidizing properties of retinoids. It was demonstrated in animal studies that the administration of retinoids positively influences three-dimensional orientation and memory functions (Sodhi and Singh 2014). The ability to reduce oxidative stress, apoptosis and activity of polymerase 1 poly[ADP-ribose] (PARA-1) was also established for nicotinamide administered to experimental animals (Turunc-Bayrakdar 2014).

SUMMARY

Wilson's disease, aceruloplazminemia, Parkinson's disease and Alzheimer's disease, despite different etiology, characterized with lowered ferroxidase activity of ceruloplasmin. Each of these diseases also reveals progressing and irreversible damage of neurons as a result of occurrence of i.e. oxidative stress and production of free radicals, which excess will finally lead to apoptosis. Confirming an important role of ceruloplasmin and oxidative stress in pathogenesis of neurodegenerative disorders caused a large interest in studies regarding pharmacological compounds, which would turn out to be effective in treatment of these diseases by mechanism of action related with aforementioned metabolic pathways. Until now, despite the continuous conduction of the studies, they have not succeeded in terms of finding the "miracle" drug with an antioxidative action or related to metabolism of ceruloplasmin or metals excessively depositing in the brain of the patients. In addition, not all stages of the mechanism of the cell damage in listed diseases are explained. It is obvious that together with acquisition of new knowledge, a broader perspective occurs as well as hopes of finding an optimum method for treatment. For this reason, further studies are necessary regarding the causes of neuron damage in neurodegenerative disorders and possible method of pharmacotherapy.

WPROWADZENIE

Ceruloplazmina (EC 1.16.3.1, określana również jako oksydaza miedziowa lub ferroksoydaza) jest enzymem należącym do klasy oksydoreduktaz. Pierwszy raz została wyizolowana przez Holmberga i Laurella w 1944 roku. Jest alfa-2 globuliną, o ciężarze cząsteczkowym 132 kDa (Bento i wsp. 2007). U osób zdrowych stężenie ceruloplazminy w surowicy wynosi 25–45 mg/dl i wykazuje zmienność dobową – najwyższe wartości obserwowane są w godzinach porannych (Johnson i wsp. 1992).

Ceruloplazmina jest białkiem ostrej fazy – jej poziom wzrasta 2–3-krotnie w różnych stanach zapalnych, u osób z zawałem serca, nowotworami.

W warunkach fizjologicznych w ciągu pierwszych 6 miesięcy życia obserwuje się bardzo niskie wartości ceruloplazminy w surowicy krwi, które następnie ulegają podwyższeniu i osiągają maksimum w 2–3 roku życia. Od tego czasu poziom ceruloplazminy spada i w okresie wczesnomłodzieńczym obserwowane są już wartości porównywalne z wartościami referencyjnymi dla dorosłych (Aliyazicioğlu i wsp. 2007).

U kobiet stężenie ceruloplazminy we krwi jest wyższe niż u mężczyzn i najprawdopodobniej ma to związek z obecnością estrogenów. Wykazano, iż u kobiety wchłanianie miedzi jest wyższe niż u mężczyzn. Ponadto ciąża, doustna antykoncepcja lub hormonalna terapia zastępcza, niezależnie od metabolizmu miedzi, powodują wzrost stężenia ceruloplazminy (Sontakke i wsp. 2004; Johnson i wsp. 1992).

Ceruloplazmina jest jednym z czynników antyoksydacyjnych osocza (Goldstein i wsp. 1982; Walshe JM 1963). Enzym ten odgrywa bardzo istotną rolę w zabezpieczeniu komórek przed szkodliwym wpływem wolnych rodników, wytwarzanych w przebiegu stresu oksydacyjnego. W wielu badaniach zauważono, że obniżone stężenie ceruloplazminy powoduje gromadzenie się jonów Fe^{2+} w astrocytach i w konsekwencji apoptozę (Gorman i wsp. 1996; Olivieri i wsp. 2011; Jin i wsp. 2011).

Obniżone stężenie ceruloplazminy obserwuje się w chorobie Wilsona. Od kilku dekad oznaczanie między innymi aktywności ceruloplazminy jest nieodłącznie związane z diagnostyką tej choroby (Brewer, Askari 2005; Ala i wsp. 2007; Merle i wsp. 2009). Wiele badań wskazuje jednak, że obniżona aktywność ceruloplazminy występuje również w innych chorobach neurodegeneracyjnych: w chorobie Alzheimerera, w chorobie Parkinsona (Vassiliev i wsp. 2005; Bharucha i wsp. 2008) oraz w aceruloplazminemii (Emerit i wsp. 2004; Kristinsson i wsp. 2012; Gorman i wsp. 1996).

Ekspresja genetyczna ceruloplazminy

Gen kodujący ceruloplazminę znajduje się na długim ramieniu chromosomu 3 (3q23-q24) i ulega ekspresji głównie w hepatocytach i mózgu, ale również w płucach, sercu, śledzionie, nerkach, jądrach, łożysku (Hellman i wsp. 2002; de Bie i wsp. 2007). W wyniku działania białka błonowego ATP7B znajdującego się w retikulum endoplazmatycznym hepatocytów dochodzi do wbudowania 6–8 atomów miedzi i powstania cząsteczki holoceruloplazminy (nazywanej powszechnie ceruloplazminą) wykazującej pełną aktywność enzymatyczną. Następnie holoceruloplazmina wydzielana jest do osocza (Fatemi i wsp. 2002). Zmiany w strukturze ATP7B prowadzą do nieefektywnego wbudowywania miedzi do cząsteczki apoceruloplazminy. Powstaje wówczas głównie apoceruloplazmina, która wykazuje obniżoną aktywność i krótszy okres półtrwania (de Bie i wsp. 2007). Obniżona aktywność i krótszy czas połowicznego rozpadu wynikają ze zmniejszonej ilości wbudowanych atomów miedzi.

Ceruloplazmina wytwarzana jest głównie w wątrobie. Wiąże ona i transportuje około 90–95% miedzi obecnej we krwi (Giurgea i wsp. 2005). Ceruloplazmina obecna w mózgu wytwarzana jest w astrocytach i występuje w połączeniu z glikozylofosfatydyloinnozytolem (*glycosyl phosphatidylo inositol*, GPI) (Patel i wsp. 1997; Patel i wsp. 2002; Ke i wsp. 2007).

Metody oznaczania aktywności lub stężenia ceruloplazminy

W diagnostyce chorób związanych z zaburzeniami wytwarzania ceruloplazminy dostępne są dwie metody rutynowego oznaczania tego białka – metoda enzymatyczna oraz nefelometryczna.

Metoda enzymatyczna jest najstarsza – została opracowana w latach 60. XX wieku przez Ravina. W metodzie tej wykorzystuje się enzymatyczną zdolność utlenienia p-fenylo-diaminy przez ceruloplazminę (Ravin 1961). W końcowym etapie reakcji mierzona jest absorbanca mieszaniny przy długości fali 530 nm. Pomnożenie wartości uzyskanych z pomiaru absorbancji przez współczynnik Holmberga-Laurella (87,5) pozwala otrzymać wartości w mg/dl, pomimo że mierzona jest aktywność enzymatyczna (Ravin 1961). Informacja ta jest bardzo istotna, ponieważ w chorobach neurodegeneracyjnych w warunkach *in vivo* aktywność enzymatyczna ceruloplazminy jest obniżona. Określenie aktywności enzymu jest bardzo istotne w diagnostyce chorób neurodegeneracyjnych, a w przypadku choroby Wilsona może być pomocna w rozpoznaniu.

W nefelometrycznym oznaczaniu stężenia ceruloplazminy do badanej surowicy dodawane jest

przeciwciała monoklonalne skierowane przeciw apo- i holoceruloplazminie. W wyniku reakcji antygen–przeciwciało wytwarzane są rozpuszczalne kompleksy, a następnie mierzone jest natężenie światła rozproszonego przez wytworzone cząsteczki immunokompleksów. Poprzez oznaczenie pochodnej rozproszenia światła wyznaczane jest stężenie białka, a wartości podawane są w mg/dl. Metoda nefelometryczna pozwala na szybkie określenie wartości stężenia białka i charakteryzuje się większą powtarzalnością niż metoda enzymatyczna, która wykonywana jest manualnie. Jednakże w nefelometrycznym oznaczaniu stężenia ceruloplazminy nie możemy precyzyjnie ocenić aktywności enzymu, ponieważ przeciwciało monoklonalne skierowane jest zarówno przeciw prekursorowej formie ceruloplazminy o obniżonej aktywności (apoceruloplazmina), jak i wykazującej pełną aktywność formie enzymu (holoceruloplazmina).

Rola ceruloplazminy w metabolizmie żelaza

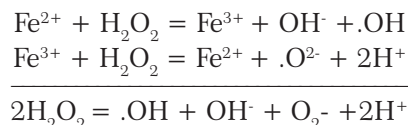
Udział ceruloplazminy w utlenianiu żelaza ma znaczący wpływ nie tylko na procesy hemopoety, ale również odgrywa istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu komórek ośrodkowego układu nerwowego. Obniżone stężenie (również aktywność) ceruloplazminy, syntetyzowanej w mózgu w połączeniu z GPI, powoduje zaburzenia w metabolizmie żelaza, odkładanie się tego pierwiastka w komórkach oraz wytwarzanie wolnych rodników, co w konsekwencji może doprowadzić do śmierci komórki (Papanikolaou i wsp. 2005). Ceruloplazmina dzięki aktywności ferroksozydazowej bierze udział w zabezpieczaniu neuronów przed wpływem wolnych rodników: rodnika ponadtlenkowego (O_2^-) oraz rodnika hydroksylowego (OH). Aktywność ta jest istotna, ponieważ neurony są komórkami postmitotycznymi, nie mającymi (lub posiadającymi tylko w stopniu minimalnym) zdolności do regeneracji.

Żelazo jest kofaktorem w syntezie neuroprzekazników, takich jak dopamina, norepinefryna i serotonina. Jest także niezbędne w procesie mielinogenezy z udziałem oligodendrocytów. Morris i wsp. zauważyli, że stężenie żelaza w oligodendrocytach jest wyższe niż w komórkach nerwowych (Morris i wsp. 1992). Niedobór żelaza u osób z chorobami demielinizacyjnymi, takimi jak stwardnienie rozsiane, związany jest z zaburzeniem homeostazy tego pierwiastka w komórkach (He i wsp. 2007).

Żelazo wchłaniane w jelitach jest na drugim stopniu utlenienia. Następnie po zmianie stopnia utlenienia Fe^{2+} na Fe^{3+} ulega przyłączeniu do apotransferyny, tworząc białko transportowe holotransferynę

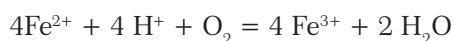
(nazywana w skrócie transferyną). Następnie zostaje uwolnione do krążenia. Połączenie żelaza z białkiem magazynującym żelazo – ferrytyną, również uwarunkowane jest zmianą stopnia utlenienia (z $2+$ na $3+$) (Sarkar i wsp. 2003; Roeser i wsp. 1970). Do niedawna przypuszczano, że ceruloplazmina odgrywa w obu procesach kluczową rolę. Obecnie wiadomo, że to nie ceruloplazmina, a jej homolog będący białkiem błonowym – hefastyna – odpowiada za utlenianie żelaza i wchłanianie tego pierwiastka w jelitach (Anderson i wsp. 2002). Ceruloplazmina zaś wykazuje zdolność oksydazową wobec jonów Fe^{2+} w krążeniu oraz w astrocytach i komórkach Schwanna, umożliwiając wbudowywanie tego pierwiastka do białka magazynującego – apoferrytyny. W komórkach tych ceruloplazmina występuje w połączeniu z GPI.

Jony Fe^{2+} niezwiązane z białkiem transportującym lub magazynującym są wysoce toksyczne. W obecności nadtlenku wodoru (H_2O_2) jony Fe^{2+} inicjują powstawanie wolnych rodników – głównie rodnika hydroksylowego ($\cdot OH$), w reakcji Fentona charakteryzującej się następującym przebiegiem (Altamura, Muckenthaler 2009):



Rodnik hydroksylowy jest jednym z najbardziej reaktywnych utleniaczy, które powodują peroksydację lipidów oraz zmiany strukturalne w DNA i białkach. W konsekwencji tych zmian dochodzi do śmierci komórek na drodze apoptozy.

W komórkach nerwowych ceruloplazmina w połączeniu z GPI bierze udział w procesie utleniania żelaza. Jest to proces czteroelektronowej, bezpośredniej redukcji cząsteczki tlenu do dwóch cząsteczek wody bez udziału nadtlenku wodoru jako produktu pośredniego przebiegający zgodnie z poniższym równaniem:



Z tego względu ceruloplazmina zaliczana jest do ferroksozydaz (Giurgea i wsp. 2005; Roeser i wsp. 1970). Nadmiar jonów Fe^{2+} , które nie zostały wbudowane do ferrytyny, usuwany jest z astrocytów w połączeniu z białkiem transportowym – ferroportyną 1 (określaną także jako IREG1 – *Iron REGulated transporter 1*) (Ke, Qian 2007).

Transport jonów Fe^{2+} w komórkach odbywa się przez transporter metali dwuwartościowych (*divalent metal transporter*, 1–DMT1). Chińscy badacze

(Ke, Qian, Jeong i wsp.) zaobserwowali, że przechodzenie jonów żelaza przez barierę mózg-płyn mózgowo-rdzeniowy uwarunkowane jest obecnością transportera DMT1 (*divalent metal transporter 1*) (Ke, Qian 2007; Jeong i wsp. 2003).

CHOROBY ZWIĄZANE Z OBNIŻENIEM SYNTEZY CERULOPLAZMINY

Aceruloplazminemia

Jest to zaburzenie dziedziczone w sposób autosomalny recesywny. Mutacja w genie kodującym ceruloplazminę skutkuje znikomym wytwarzaniem tego enzymu i tym samym prawie nieoznaczalną aktywnością (Hellman i wsp. 2002). Obniżona aktywność ceruloplazminy jako ferroksozydazy uniemożliwia utlenianie jonów Fe^{2+} do Fe^{3+} . Wskutek braku zdolności wiązania z ferrytyną dochodzi do gromadzenia się jonów Fe^{2+} . Nadmiar jonów Fe^{2+} oraz brak aktywności ferroksoydazowej ceruloplazminy zapoczątkowuje reakcję Fentona, w której powstają wolne rodniki uszkadzające komórki.

W aceruloplazminemii dochodzi do odkładania się jonów Fe^{2+} w: mózgu, trzustce, wątrobie, rogówce (Hellman i wsp. 2002). Pierwsze objawy choroby pojawiają się głównie w 4–5 dekadzie życia i wynikają z uszkodzenia komórek poszczególnych narządów. Bardzo często występuje triada objawów: zwyrodnienie siatkówki, otępienie oraz cukrzyca typu II spowodowana uszkodzeniem komórek beta trzustki produkujących insulinę (He i wsp. 2007).

Choroba Wilsona

Choroba Wilsona jest zaburzeniem metabolizmu miedzi dziedziczonym w sposób autosomalny recesywny. Mutacja w genie kodującym ATP-azę7B skutkuje nieefektywnym wbudowywaniem jonów miedzi do cząsteczki apoceruloplazminy (Benett, Hahn 2011). Nie dochodzi do wbudowania 6–8 atomów miedzi i wytworzenia aktywnej formy enzymu. Apoceruloplazmina wykazuje obniżoną aktywność i ulega rozpadowi po około 5 godzinach, podczas gdy aktywna forma – holoceruloplazmina – utrzymuje się w krążeniu około 5,5 doby (Hellman i wsp. 2002). Wskutek uszkodzonego mechanizmu wydalenia nadmiaru miedzi drogą kanalików żółciowych (zachodzącego również przy udziale ATP-azy7B), dochodzi do nadmiernego odkładania się tego pierwiastka w hepatocytach. Po osiągnięciu wartości progowej następuje uszkodzenie komórki wątrobowej i uwalnianie się miedzi niezwiązanej z ceruloplazminą (nazywanej wolną) do krwioobiegu. Uszkodzenie

przez miedź komórek wątrobowych doprowadza do zaburzeń funkcji wątroby, a z czasem do rozwoju marskości. Uwolnione do krwi jony miedzi zaczynają odkładać się w różnych narządach: mózgu, rogówce, nerkach, śledzionie, doprowadzając do wystąpienia objawów choroby. U około połowy pacjentów z chorobą Wilsona pierwsze objawy choroby związane są z uszkodzeniem wątroby (o różnym nasileniu), a w połowie z uszkodzeniem ośrodkowego układu nerwowego (neurologiczne i psychiatryczne) (Faa i wsp. 2001; Zimbrea, Schilsky 2014).

Jednym z elementów biochemicznej diagnostyki choroby Wilsona, oprócz oznaczania stężenia miedzi w surowicy, jest określanie aktywności ceruloplazminy w surowicy, która u osób chorych jest obniżona. Bruehlmeier i wsp. zauważyli, że niska aktywność ceruloplazminy w surowicy zaburza metabolizm żelaza i skutkuje magazynowaniem tego pierwiastka w mózgu (Bruehlmeier i wsp. 2000). Autorzy obserwowali kinetykę reakcji odkładania się izotopu żelaza ^{52}Fe w mózgu po jego wcześniejszym podaniu dożylnym. Badania zawartości zgromadzonego żelaza dokonywano za pomocą pozytronowej tomografii emisyjnej (*positron emission tomography*, PET). U chorych z chorobą Wilsona zaobserwowano zwiększony wychwyty izotopu. Autorzy sugerują, że nadmierne gromadzenie się jonów żelaza w tej chorobie spowodowane jest zastąpieniem enzymów miedziozależnych zaangażowanych w przemiany metaboliczne zachodzące w mitochondriach na enzymy zależne od żelaza (cytochromy). Nadmierne gromadzenie się żelaza w mózgu wynikać może zatem ze zwiększonego zapotrzebowania na ten pierwiastek. Również Litwin i wsp. zwracają uwagę na obniżone stężenie (także aktywność) ceruloplazminy u pacjentów z chorobą Wilsona, co skutkuje nieprawidłowym metabolizmem żelaza i odkładaniem się tego pierwiastka w jądrach zębatych mózdzku (Litwin i wsp. 2013c). Powyższa obserwacja potwierdza udział ceruloplazminy jako ferroksozydazy w metabolizmie żelaza i może wskazywać na dodatkowy, obok nadmiernego odkładania się jonów Cu^{2+} , mechanizm uszkodzenia komórek nerwowych w tej chorobie. Autorzy wskazują ponadto, że w badaniu za pomocą rezonansu magnetycznego zauważono różnice w ilości zgromadzonych jonów Fe^{2+} pomiędzy kobietami a mężczyznami. U mężczyzn wykazano wyższą zawartość jonów Fe^{2+} w mózgu w porównaniu z kobietami oraz częstsze występowanie objawów neurologicznych (Litwin i wsp. 2013b). Ponadto zaobserwowano, że objawy neurologiczne u mężczyzn pojawiały się średnio o dwa lata wcześniej niż u kobiet (Litwin i wsp. 2012a). Uważa się, że niższa zawartość jonów Fe^{2+} w mózgu kobiet

wynika z protekcyjnego wpływu estrogenów na stężenie ceruloplazminy. Estrogeny powodują zwiększenie stężenia ceruloplazminy, która utlenia Fe^{2+} do Fe^{3+} , ułatwiając w ten sposób połączenie się jonów Fe^{3+} z białkiem magazynującym ferrytyną.

Choroba Parkinsona

Choroba Parkinsona jest drugą pod względem częstości występowania chorobą neurodegeneracyjną. Dotyczy około 1,5% osób po 60. roku życia (Martínez-Hernández i wsp. 2011). Związana jest z postępującym zwyrodnieniem neuronów dopaminergicznych zlokalizowanych w barwnikonośnych komórkach istoty czarnej w pniu mózgu i w jądrach podstawy. W chorobie Parkinsona charakterystyczne jest występowanie intraneuralnych eozynofilnych wtrętów cytoplazmatycznych – ciał Lewy'ego. Zawierają one wiele różnych związków – m.in. w ich rdzeniu znajduje się białko – alfa synukleina. Postuluje się, że obecność żelaza stymuluje komórki do gromadzenia tego białka (Salazar i wsp. 2008).

Salazar i wsp. zbadali wpływ MPP⁺ (1-metylo-4-fenylpirydyna) – aktywnego metabolitu neurotoksyny MPTP (1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyna) – na transport jonów Fe^{2+} przy udziale transportera DMT1 (Salazar i wsp. 2008). MPTP jest ubocznym produktem syntezy meperydyny i ma powinowactwo do neuronów dopaminergicznych układu nigro-striatального. W badaniach wykazano, że zaburzenie funkcji transportera Fe^{2+} DMT1 przez MPP⁺ powodowało rozwój choroby Parkinsona.

Istotną zmianą patologiczną w chorobie Parkinsona jest występowanie złogów żelaza w komórkach istoty czarnej. Wraz z progresją choroby dochodzi do obumierania komórek oraz ich odbarwienia. Wielu badaczy wskazuje, że na takie objawy choroby może mieć wpływ obniżona aktywność ceruloplazminy i zaburzony w związku z tym metabolizm żelaza w komórkach nerwowych (Kristinsson i wsp. 2012; Jin i wsp. 2011).

Do uszkodzenia komórek dochodzi w wyniku wzmożonego wytwarzania wolnych rodników doprowadzających w konsekwencji do apoptozy. Martínez-Hernández i wsp. dowodzą, że istnieje ujemna korelacja między stężeniem (także aktywnością) ceruloplazminy a obecnością złogów żelaza w mózgu (Martínez-Hernández i wsp. 2011). Autorzy sugerują ponadto, że oznaczanie aktywności ceruloplazminy w połączeniu z USG przezczaszkowym wskazującym na hiperechogeniczność spowodowaną obecnością depozytów żelaza w istocie czarnej mózgu, może być swoistym markerem dla choroby Parkinsona. To nieinwazyjne badanie może być przydatne w różnicowaniu choroby Parkinsona od zespołów parkinsonow-

skich. Bharucha i wsp. zwracają uwagę na istnienie zależności między stężeniem ceruloplazminy a wiekiem pojawienia się pierwszych objawów choroby Parkinsona (Bharucha i wsp. 2008). Autorzy zaobserwowali, że wśród pacjentów z niższym stężeniem ceruloplazminy pierwsze objawy choroby pojawiały się wcześniej w porównaniu z chorymi, u których stężenie ceruloplazminy było wyższe. W obu grupach chorych, zarówno u pacjentów u których objawy choroby wystąpiły wcześniej, jak i w grupie chorych, u których objawy choroby występowały później, mężczyźni stanowili większość (proporcja mężczyzn do kobiet 45:17 oraz 24:5). Częstsze występowanie choroby Parkinsona wśród mężczyzn wykazano w wielu badaniach (Van Den Eeden i wsp. 2003; Bharucha i wsp. 2008; Baldereschi i wsp. 2000; Shulman, Bhat 2006). Bartozkis i wsp. postulują, że częstsze oraz wcześniej występowanie choroby Parkinsona wśród mężczyzn spowodowane jest wyższą zawartością żelaza w ich mózgach (Bartozkis i wsp. 2007). Uważa się, że przyczyną takiego stanu jest brak ochronnego działania estrogenów. Zauważono ponadto, że u kobiet przyjmujących hormonalną terapię zastępczą objawy choroby Parkinsona były mniej nasilone w porównaniu z kobietami, które nie stosowały terapii hormonalnej (Saunders-Pullman i wsp. 1999). Również ryzyko otępienia w przebiegu choroby Parkinsona u kobiet stosujących hormonalną terapię zastępczą jest niższe w porównaniu z kobietami nie stosującymi hormonalnej terapii zastępczej (Currie i wsp. 2004).

Arnal i wsp. zauważyli, że stężenie ceruloplazminy w chorobie Parkinsona ulega podwyższeniu w momencie pogorszenia się stanu chorego. W tym samym czasie obserwowano u chorych zwiększenie stężenia miedzi „wolnej” (niezwiązanej z ceruloplazminą) w surowicy (Arnal i wsp. 2010). Kristinsson i wsp. sugerują, że podwyższone stężenie miedzi „wolnej” może być spowodowane nieprawidłowym wbudowywaniem tego pierwiastka do cząsteczki apoceruloplazminy, która wykazuje obniżoną aktywność. Wzrost stężenia ceruloplazminy może być w tej sytuacji mechanizmem kompensacyjnym w porównaniu z obniżoną aktywnością enzymu. Ponadto pogorszenie stanu chorego może się wiązać z występowaniem procesów zapalnych i uszkodzeń narządów, w których stężenie ceruloplazminy również ulega podwyższeniu (Salazar i wsp. 2008).

Choroba Alzheimer

W chorobie Alzheimer obserwuje się postępujące zaburzenie funkcji poznawczych, głównie pamięci. Jest to najczęstsza przyczyna otępienia (Blennow i wsp. 2006). W badaniach prowadzonych w latach

70. XX w. wykazano, że istotny w rozwoju choroby jest deficyt korowych stężeń acetylotransferazy cholinowej, a następnie spadek wychwyty choliny i spadek wydzielania acetylocholin (Kozubski, Liberski 2008). Charakterystyczne w chorobie Alzheimera jest występowanie zewnątrzkomórkowych blaszek amyloidowych nazywanych także płytkami starczymi, wewnątrzkomórkowych zwyrodnień włóknkowych typu Alzheimera, dystroficznych neurytów oraz nieprawidłowe rozmieszczenie w komórce białka tau (Rivera-Mancía i wsp. 2010).

Etiopatogeneza choroby Alzheimera nie jest jeszcze do końca poznana. Jedną z wielu hipotez jej rozwoju jest odkładanie się w mózgu nierozpuszczalnych i odpornych na proteolizę form peptydu amyloidu beta. Amyloid beta powstaje w wyniku działania beta i gamma sekretazy na białko prekursorowe amyloidu (APP). APP jest transbłonowym białkiem występującym w mózgu, jednak jego funkcja nie jest do końca poznana (Rivera-Mancía i wsp. 2010). Beta i gamma sekretazy zapoczątkowują sekwencję zdarzeń określaną jako „kaskada amyloidowa”, w wyniku której dochodzi do agregacji amyloidu w płytkach starczych oraz w naczyniach mózgowych.

Lovell i wsp. zauważyli, że u osób z chorobą Alzheimera dochodzi do akumulacji jonów Fe^{2+} w blaszkach amyloidowych oraz w zwyrodnieniach włóknkowych. Obecność jonów Fe^{2+} zapoczątkowuje reakcję Fentona, w której wytwarzane są wolne rodniki dezintegrujące błonę komórkową. Ponadto obecność wolnych rodników może przyczyniać się do agregacji białek beta amyloidu (Lovell i wsp. 2008). Podobne obserwacje zanotowali Everett i wsp. Ponadto badacze ci zauważyli, że obok jonów Fe^{2+} w złogach beta amyloidu obecne są jony Fe^{3+} , które mogą być zredukowane do jonów Fe^{2+} i w ten sposób wzmocnić produkcję wolnych rodników (Everett i wsp. 2014).

W chorobie Alzheimera może zachodzić nieprawidłowa interakcja między białkami amyloidu beta i ceruloplazminą, co może być dodatkowym źródłem wolnych rodników. Od wielu lat prowadzone są badania nad stężeniem miedzi i ceruloplazminy w surowicy pacjentów. Wielu badaczy zauważyło, że stężenie ceruloplazminy w chorobie Alzheimera nie jest obniżone, natomiast niższa jest aktywność tego enzymu w porównaniu z grupą kontrolną (Kristinsson i wsp. 2012; Squitti i wsp. 2008). W ostatnich latach zwraca się szczególną uwagę na istotnie wyższe stężenie wolnej miedzi w surowicy krwi i mózgu pacjentów z chorobą Alzheimera oraz na zaburzenia wiązania się miedzi z ceruloplazminą (Squitti i wsp. 2008). Wykazano, że w płytkach starczych i zwyrodnieniach włóknkowych w nadmiernych ilościach odkładana

jest miedź. Wyżej wspomniane doniesienia są dość spójne, ponieważ miedź w postaci wolnej przenika przez barierę krew-mózg. Dodatkowo pojawiły się doniesienia, w których autorzy sugerują, że w chorobie Alzheimera istotny dla gospodarki miedziowej może być fakt nieprawidłowego wiązania miedzi do ceruloplazminy. Squitti wskazuje na defekt genetyczny w genie dla ATP7B kodującym ATP-azę7B, której funkcja związana jest z kontrolowaniem stężenia wolnej miedzi w organizmie (Squitti 2012). Wydaje się jednak, że nieprawidłowa funkcja genu, głównie związana z występowaniem choroby Wilsona, może odgrywać pewną rolę również w rozwoju choroby Alzheimera. Potwierdza to wcześniejsze doniesienia, wskazujące, że poziom ceruloplazminy w tej chorobie może być prawidłowy, a zaburzona jest jej funkcja. Bardzo prawdopodobne jest zatem, że obniżona aktywność ceruloplazminy i współistniejące pownowactwo jonów miedzi i żelaza do białek amyloidu może powodować apoptozę komórek w wyniku oksydacyjnego uszkodzenia.

Ważnym i trudnym do wyjaśnienia czynnikiem ryzyka dla postaci późnej choroby Alzheimera jest płeć żeńska. Szacuje się, że kobiety zapadają na nią dwa razy częściej niż mężczyźni (Ferrari i wsp. 2013). W wieku okołomenopauzalnym w organizmie kobiety mają miejsce przemiany hormonalne (między innymi zmniejszeniu ulega stężenie estrogenów) i towarzyszące im zmiany metaboliczne, zapalne i w układzie sercowo-naczyniowym. Wszystkie razem są postrzegane jako zwiększające ryzyko postaci późnej choroby Alzheimera. W wielu pracach próbuje się wyjaśnić związek między estrogenami, płcią żeńską i chorobą Alzheimera. Zaobserwowano, że estrogeny wykazują neuroprotektoryjny wpływ i opóźniają pojawienie się pierwszych objawów choroby Alzheimera (Carter i wsp. 2012; Jaffe i wsp. 1994). W badaniach *in vitro* zaobserwowano ponadto, że estradiol powoduje rozpad APP do fragmentów, z których nie powstają agregaty beta amyloidu (Jaffe i wsp. 1994). Wykazano, że z większym ryzykiem rozwoju choroby u kobiet związany jest gen receptora androgenowego (AR) zlokalizowany na chromosomie X, a zwłaszcza fragment polimorficzny w 1 eksonie, w którym znajduje się odcinek złożony z wielokrotnych powtórzeń trójnukleotydu CAG. Nie wykazano jednak związku między ilością powtórzeń a ryzykiem choroby. Spekuluje się, że ryzyko to może być związane z inaktywacją chromosomu X i mozaicyzmem u kobiet (Ferrari i wsp. 2013). Drugim genem ważnym w etiopatogenezie choroby Alzheimera jest gen receptora estrogenowego alfa (ESR1). Prowadzone są badania nad reakcją na leczenie inhibitorami

cholinesterazy w zależności od płci, genotypu oraz polimorfizmu genu ESR1 (Scacchi i wsp. 2014). Niedawno wykazano także, że istotny czynnik ryzyka choroby Alzheimera, jakim jest allel genu apolipoproteiny E (APOE4) również ma związek z płcią (Altmann i wsp. 2014). We wstępnych doniesieniach wskazuje się na większe ryzyko zachorowania u kobiet. Przyczyna nie jest jasna i wymaga dalszych badań, ale być może ma związek z patologią białka tau.

LECZENIE CHORÓB Z NIEDOBREM CERULOPLAZMINY – MIEJSCE LEKÓW CHELATUJĄCYCH ŻELAZO I ANTYOKSYDANTÓW

Aceruloplazminemia

Leczenie aceruloplazminemii opiera się głównie na stosowaniu leków chelatujących, pozwalających zmniejszyć depozyty żelaza powstające wskutek zaburzenia aktywności ceruloplazminy. Lekiem wykazującym taką aktywność jest deferoxamina mająca zdolność chelatowania jonów żelaza Fe^{3+} . Efekty leczenia nie są jednak zadowalające, prawdopodobnie dlatego, że żelazo gromadzone w narządach jest na drugim stopniu utlenienia (Fe^{2+}) (Schipper 2012). Podejmowano również próby leczenia aceruloplazminemii poprzez uzupełnienie niedoboru ceruloplazminy wlewami świeżego mrożonego osocza (w dawce 450 ml i.v. na tydzień, przez 6 tygodni) (Yonekawa i wsp. 1999). Poprawę stanu neurologicznego obserwowano również po zastosowaniu doustnego siarczynu cynku i chelatora żelaza – deferasiroxu (Suzuki i wsp. 2013). Roberti i wsp. wskazują, że stosowanie tego związku prowadzi do zmniejszenia poziomu żelaza w komórkach i pomaga w złagodzeniu objawów neurologicznych choroby (Roberti i wsp. 2011).

Choroba Wilsona

Wczesne rozpoczęcie leczenia w chorobie Wilsona pozwala zahamować postęp choroby i zmniejszyć nasilenie objawów. U chorych bezobjawowych wczesne wprowadzenie leczenia zapobiega wystąpieniu objawów. Skuteczność leczenia uwarunkowana jest regularnym, nieprzerwanym przyjmowaniem leków. Stosowane są leki zwiększające wydalanie miedzi z tkanek, głównie mające zdolność chelatowania (d-penicylamina, trentina) lub hamujące jej wchłanianie z przewodu pokarmowego (sole cynku, tetratiomolibden). W skrajnych przypadkach uszkodzenia wątroby konieczny jest przeszczep narządu.

Dotychczas zbadano (w modelu zwierzęcym) wpływ zastosowania w terapii naturalnych antyoksydantów, takich jak witamina E, na złagodzenie ob-

jawów wynikających ze stresu oksydacyjnego, szczególnie w przypadku zastosowania leczenia solami cynku (obniżony jest wówczas poziom witaminy E) (Shen, Ji 2010). Zaobserwowano korzystny wpływ stosowania witaminy E na zmniejszenie oksydacyjnego uszkodzenia wątroby (Sokol i wsp. 1996). Nie przeprowadzono dotychczas badań z udziałem chorych z chorobą Wilsona.

Choroba Parkinsona

Terapia choroby Parkinsona opiera się głównie na łagodzeniu objawów choroby lekami reaktywującymi układ dopaminergiczny lub hamującymi układ cholinergiczny. Do grupy leków powszechnie stosowanych należą: lewodopa, agoniści receptorów dopaminowych, inhibitory enzymów katabolizujących dopaminę, takie jak inhibitory monoaminooksydazy typu B (MAO-B) i katecholo-tleno-metylotransferazy (COMT), amantadyna, leki cholinolityczne. Obecnie prowadzonych jest wiele prób klinicznych badających wpływ nowych substancji na spowolnienie postępu choroby, jak i pobudzających proces neuroregeneracji. Podejmowano między innymi próby (nieskuteczne) włączenia do terapii istradefyliny czy antagonistów receptora adenozyliny. Inny związek, parempanel, będący antagonistą receptorów glutaminowych AMPA, jak wykazano w badaniach klinicznych, nie wpływał istotnie na zmniejszenie objawów u pacjentów ze średniozaawansowaną postacią choroby Parkinsona oraz fluktuacjami ruchowymi (Rascol i wsp. 2012a). Wielkie nadzieje związane są z pardoprunoksem. W przeprowadzonych dużych randomizowanych badaniach wykazano, że związek ten, będący częściowym agonistą receptora D2, agonistą receptora 5-HT1A i $\alpha 1$ oraz antagonistą receptora $\alpha 2$, skraca fazę *off* i wydłuża *on* oraz nie powoduje dyskinez w porównaniu do lewodopy (Rascol i wsp. 2012b). Również sanifamid wydaje się być związkiem wpływającym pozytywnie na zmniejszenie dyskinez oraz ruchowych i pozaruchowych objawów choroby (Gottwald i Aminoff 2008).

Podejmowane są również próby eksperymentalne, a nawet kliniczne z zastosowaniem terapii genowej. Obiecujące są badania nad sferaminą, która jest przykładem dopaminergicznych komórek barwnikowych nabłonka siatkówki zawieszonych w żelatynowym mikronośniku, który jest implantowany do prądkowia. Innymi przykładami terapii genowej są próby wprowadzania genu dekarboksylazy kwasu glutaminowego (AAV-GAD) na wektorze adenowirusowym do podwzgórza oraz genu kodującego dekarboksylazę aminokwasów aromatycznych (AAV-AADC) do prądkowia (Gottwald i Aminoff 2008).

Obiecującą strategią terapeutyczną może być zastosowanie deferipronu jako leku chelatującego jony żelaza. Obecnie prowadzone są badania kliniczne II fazy (ClinicalTrials.gov identyfikator: NCT00943748).

Wydaje się bardzo prawdopodobne, że podawanie ceruloplazminy również może mieć istotny wpływ na złagodzenie objawów choroby Parkinsona (Ayton i wsp. 2013). Ayton i wsp. zbadali metabolizm żelaza (po dootrzewnowym wstrzyknięciu ceruloplazminy) w mózgu myszy z genetycznym defektem wytwarzania ceruloplazminy oraz u myszy z chorobą Parkinsona wywołaną podaniem MPTP. W obu grupach po podaniu ceruloplazminy zaobserwowano, że dootrzewnowo podana ceruloplazmina przekracza barierę krew-mózg. Ponadto zauważono, że wśród myszy z chorobą Parkinsona wywołaną podaniem MPTP depozyty żelaza w mózgu zmniejszyły się po podaniu ceruloplazminy. MPTP oraz podana ceruloplazmina nie wywoływały zmian zawartości żelaza w wątrobie.

Istotne w terapii choroby Parkinsona może być zastosowanie antyoksydantów. W badaniu DATATOP oceniano skuteczność neuroprotekcijną selegiliny i witaminy E. Wykazano wówczas, że witamina E podawana w dawce 2000 j.m. na dobę nie wykazuje działania ochronnego (Parkinson Study Group 1989). Wiele nadziei, ale i kontrowersji, związanych jest z badaniami nad neuroprotekcijnym działaniem rasagiliny (Rascol i wsp. 2011). Badania z zastosowaniem kreatyny początkowo były obiecujące, ale próby kliniczne nie przyniosły spodziewanych rezultatów (Bender i wsp. 2008). Badania nad zastosowaniem tego związku w terapii są kontynuowane. W badaniach prospektywnych zauważono, że wysokie stężenie kwasu moczowego jest czynnikiem znacząco obniżającym ryzyko wystąpienia choroby Parkinsona. Kwas moczowy hamuje powstawanie wolnych rodników głównie poprzez wiązanie jonów Fe^{2+} powodujących uszkodzenie komórek w wyniku reakcji Fentona, ochronę lipidów i dysmutazy ponadtlenukowej, a także poprzez wpływ na stabilizację homeostazy wapniowej i wspomaganie funkcji mitochondriów (Bartosz 2006). Podawanie pacjentom z chorobą Parkinsona kwasu moczowego w dużych dawkach przyczyniło się do spowolnienia rozwoju choroby. Ujemną stroną podawania chorym kwasu moczowego jest ryzyko powstania dny moczanowej (Jin i wsp. 2011). Obiecującym lekiem był również koenzym Q, jednak duże wieloośrodkowe randomizowane badanie III fazy z placebo i podwójnie ślepą próbą nie potwierdziło skuteczności podawania koenzymu Q pacjentom z chorobą Parkinsona (Beal i wsp. 2014).

Choroba Alzheimerera

Obecnie stosowane leki mają na celu podtrzymanie funkcji układu cholinergicznego (donezepil, riwastygmina i galantamina) oraz hamowanie aktywności aminokwasów pobudzających (memantyna).

Podjęte zostały próby leczenia związkami chelatującymi, takimi jak: pochodne 8-hydroksychinolinoliny: klio chinol (CQ – clioquinol), HLA20, M30, VK28. Klio chinol został zakwalifikowany do II fazy badań klinicznych (Prachayasittikul i wsp. 2013), jednakże wstrzymano jego badania z udziałem ludzi z powodu zwiększonego gromadzenia się jonów cynku i miedzi w mózgu (Hegde i wsp. 2009).

Innym związkiem chelatującym stosowanym u pacjentów z chorobą Alzheimerera jest deferoksamina. Lek wykazuje powinowactwo do jonów Fe^{3+} oraz glinu, hamując w ten sposób powstawanie beta amyloidu. Deferoksamina znacząco spowalnia progresję choroby. Dostatecznie problematyczny jednak jest sposób podawania deferoksaminy w postaci bolesnych zastrzyków domięśniowych dwa razy dziennie (Bush 2002). Efektem ubocznym stosowania tego związku jest niedokrwistość z powodu niedoboru żelaza (Budimir 2011).

Dotychczasowe próby leczenia antyoksydacyjnego choroby Alzheimerera nie powiodły się. Obecnie pojawiają się doniesienia o możliwej skuteczności melatoniny u pacjentów z otępieniem (de Jonghe i wsp. 2014). Związki należące do rodziny hybrydów melatonin-N, N-dibenzyl(N-metyl)amin wykazują działanie neurogenne, neuroprotekcyjne, antyoksydacyjne i cholinergiczne. Dodatkowo mają one wpływ na zmniejszenie odkładania beta amyloidu, są mało toksyczne i mają zdolność przemieszczania się do płynu mózgowo-rdzeniowego. Z tego powodu wzbudzają wiele zainteresowań badaczy i są nadzieją na innowacyjne metody terapii (López-Iglesias B. i wsp. 2014). Prowadzone są również badania nad wykorzystaniem antyoksydacyjnych właściwości retinoidów. Wykazano na zwierzętach doświadczalnych, że podawanie retinoidów wpływa pozytywnie na orientację przestrzenną i funkcje pamięciowe (Sodhi i Singh 2014). Zdolności redukcji stresu oksydacyjnego, apoptozy i aktywności polimerazy 1 poli[ADP-rybozy] (PARA-1) wykazano również dla nikotynamidu podawanego zwierzętom doświadczalnym (Turunc-Bayrakdar 2014).

PODSUMOWANIE

Choroba Wilsona, aceruloplazminemia, choroba Parkinsona oraz choroba Alzheimerera pomimo różnej etiologii charakteryzują się obniżoną aktywnością

ferroksydazową ceruloplazminy. W każdej z tych chorób dochodzi również do postępującego i nieodwracalnego uszkodzenia neuronów na skutek występowania między innymi stresu oksydacyjnego i powstawania wolnych rodników, których nadmiar w efekcie doprowadzi do apoptozy. Potwierdzenie znaczącej roli ceruloplazminy i stresu oksydacyjnego w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych spowodowało duże zainteresowanie badaniami nad związkami farmakologicznymi, które poprzez mechanizm działania związane z wyżej wspomnianymi szlakami przemian mogłyby okazać się skuteczne w leczeniu tych chorób. Mimo ciągłego prowadzenia badań do chwili obecnej nie udało się znaleźć „cudownego” leku o działaniu antyoksydacyjnym lub związanym z metabolizmem ceruloplazminy bądź metali odkładających się w nadmiarze w mózgu chorych. Dodatkowo nie wszystkie etapy mechanizmu uszkodzenia komórek w wymienionych chorobach zostały wyjaśnione. Oczywiście jest, że z pozyskaniem nowej wiedzy wiążą się szersze perspektywy i nadzieje na znalezienie optymalnego sposobu leczenia. Dlatego konieczne są dalsze badania nad przyczynami uszkodzenia neuronów w chorobach neurodegeneracyjnych oraz możliwymi sposobami farmakoterapii.

Conflict of interests / Konflikt interesów:

The authors do not report any conflicts of interest.
Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

REFERENCES/PIŚMIENNICTWO:

- Ala A, Walker A, Ashkan K i wsp. Wilson's disease. *Lancet* 2007;2:397–408.
- Aliyazicioğlu Y, Değer O, Karahan C, Yildirmiş S, Küçüködük S. Reference values of cord blood transferrin, ceruloplasmin, alpha-1 antitrypsin, prealbumin, and alpha-2 macroglobulin concentrations in healthy term newborns. *Turk J Pediatr* 2007; 49:52–54.
- Altamura S, Muckenthaler MU. Iron toxicity in diseases of aging: Alzheimer's disease, Parkinson's disease and atherosclerosis. *J Alzheimers Dis*. 2009;16(4): 879–895.
- Altmann A, Tian L, Henderson VW, Greicius MD; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative Investigators. Sex modifies the APOE-related risk of developing Alzheimer disease. *Ann Neurol*. 2014;75(4): 563–573.
- Anderson GJ, Frazer DM, McKie AT, Vulpe CD. The ceruloplasmin homolog hephaestin and the control of intestinal iron absorption. *Blood Cells Mol Dis*. 2002;29(3): 367–375.
- Arnal N, Cristalli DO, de Alaniz MJ, Marra CA. Clinical utility of copper, ceruloplasmin, and metallothionein plasma determinations in human neurodegenerative patients and their first-degree relatives. *Brain Res*. 2010;1319:118–130.
- Baldereschi M, Di Carlo A, Rocca WA, Vanni P, Maggi S, Perisino E, Grigoletto F, Amaducci L, Inzitari D. Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. ILSA Working Group. Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurology* 2000;55:1358–1363.
- Bartosz G. *Druga twarz tlenu*. PWN, Warszawa 2006.
- Beal MF, Oakes D, Shoulson I, Henchcliffe C, Galpern WR, Haas R i wsp. A randomized clinical trial of high-dosage coenzyme q10 in early Parkinson disease: no evidence of benefit. *JAMA Neurol*. 2014;71(5): 543–552.
- Bender A, Samtleben W, Elstner M, Klopstock T. Long-term creatine supplementation is safe in aged patients with Parkinson disease. *Nutr Res*. 2008;28(3): 172–178.
- Bennett J, Hahn SH. Clinical molecular diagnosis of Wilson disease. *Semin Liver Dis*. 2011;31(3): 233–238.
- Bento I, Peixoto C, Zaitsev VN, Lindley PF. Ceruloplasmin revisited: structural and functional roles of various metal cation-binding sites. *Acta Cryst*. 2007;D63:240–248.
- Bharucha KJ, Friedman JK, Vincent AS, Ross ED. Lower serum ceruloplasmin levels correlate with younger age of onset in Parkinson's disease. *J Neurol*. 2008;255(12): 1957–1962.
- de Bie P, Muller P, Wijmenga C, Klomp LW. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. *J Med Genet*. 2007;44(11): 673–688.
- Blennow K, de Leon M J, Zetterberg H. Alzheimer's disease; *Lancet* 2006; 368:387–403.
- Brewer GJ, Askari FK. Wilson's disease: clinical management and therapy. *J Hepatol*. 2005;42:13–21.
- Bruehlmeier M, Leenders KL, Vontobel P, Calonder C, Antonini A, Weindl A. Increased Cerebral Iron Uptake in Wilson's Disease: A 52 Fe-Citrate PET Study. *J Nucl Med*. 2000;41:781–787.
- Budimir A. Metal ions, Alzheimer's disease and chelation therapy. *Acta Pharm*. 2011;61(1): 1–14.
- Bush AI. Metal complexing agents as therapies for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2002;23(6): 1031–1038.
- Carter CL, Resnick EM, Mallampalli M, Kalbarczyk A. Sex and gender differences in Alzheimer's disease: recommendations for future research. *J Womens Health (Larchmt)*. 2012;21(10): 1018–1023.
- Currie LJ, Harrison MB, Trugman JM, Bennett JP, Wooten GF. Postmenopausal estrogen use affects risk for Parkinson disease. *Arch Neurol*. 2004;61(6): 886–888.
- Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*. 2004;58(1): 39–46.
- Everett J, Céspedes E, Shelford LR, Exley C, Collingwood JF, Dobson J i wsp. Ferrous iron formation following the co-aggregation of ferric iron and the Alzheimer's disease peptide β -amyloid (1–42). *J R Soc Interface*. 2014;11(95): 20140165.
- Faa G, Lisci M, Caria MP, Ambu R, Sciort R, Nurchi VM i wsp. Brain copper, iron, magnesium, zinc, calcium, sulfur and phosphorus storage in Wilson's disease. *J Trace Elem Med Biol*. 2001;15:155–160.
- Fatemi N, Sarkar B. Molecular mechanism of copper transport in Wilson disease. *Environ Health Perspect*. 2002;110(5): 695–698.
- Ferrari R, Dawoodi S, Raju M, Thumma A, Hynan LS, Maaumi SH i wsp. Androgen receptor gene and sex-specific Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2013;34(8): 2077.
- Giurgea N, Constantinescu MI, Stanciu R, Suciuc S, Muresan A. Ceruloplasmin – acute-phase reactant or endogenous antioxidant? The case of cardiovascular disease. *Med Sci Monit*. 2005;11(2): RA48–51.
- Goldstein IM, Kaplan HB, Edelson HS, Weissmann G. Ceruloplasmin: an acute phase reactant that scavenges oxygen-derived free radicals. *Ann N Y Acad Sci*. 1982;389:368–79.
- Gorman AM, McGowan A, O'Neill C, Cotter T. Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration. *J Neurol Sci*. 1996;139:45–52.
- Gottwald MD, Aminoff MJ. New frontiers in the pharmacological management of Parkinson's disease. *Drugs Today*. 2008;44(7): 531–545.

31. He X, Hahn P, Iacovelli J, Wong R, King C, Bhisitkul R. i wsp. Iron homeostasis and toxicity in retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 2007;26(6): 649–673.
32. Hegde ML, Bharathi P, Suram A, Venugopal Ch, Jagannathan R, Poddar P i wsp. Challenges Associated with Metal Chelation Therapy in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2009; 17(3): 457–468.
33. Hellman NE, Gitlin JD. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:439–458.
34. Jaffe AB, Toran-Allerand CD, Greengard P, Gandy SE. Estrogen regulates metabolism of Alzheimer amyloid beta precursor protein. *J Biol Chem.* 1994;269(18): 13065–13068.
35. Jin L, Wang J, Zhao L, Jin H, Fei G, Zhang Yi wsp. Decreased serum ceruloplasmin levels characteristically aggravate nigral iron deposition in Parkinson disease. *Brain* 2011;134:50–58.
36. Jeong SY, David S. Glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is required for iron efflux from cells in the central nervous system. *J Biol Chem.* 2003;278(29): 27144–27148.
37. Johnson PE, Milne DB, Lykken GI. Effects of age and sex on copper absorption, biological half-life, and status in humans. *Am J Clin Nutr.* 1992; 56:917–925.
38. de Jonghe A, van Munster BC, de Rooij SE. Effectiveness of melatonin for sundown syndrome and delirium. *J Am Geriatr Soc.* 2014;62(2): 412.
39. Ke Y, Qian ZM. Brain iron metabolism: neurobiology and neurochemistry. *Prog Neurobiol.* 2007;83(3): 149–173.
40. Kozubski W, Liberski PP. *Neurologia, PZWL* 2008
41. Kristinsson J, Snaedal J, Tórsdóttir G, Jóhannesson T. Ceruloplasmin and iron in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: a synopsis of recent studies. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2012;(8): 515–521.
42. Litwin T, Gromadzka G, Członkowska A. Gender differences in Wilson's disease. *J Neurol Sci* 2012;312(1–2): 31–35. (a)
43. Litwin T, Gromadzka G, Członkowska A, Gołębowski M, Poniatowska R. The effect of gender on brain MRI pathology in Wilson's Disease. *Metab Brain Dis.* 2013;28:69–75. (b)
44. Litwin T, Gromadzka G, Szpak GM, Jabłonna-Salach K, Bulska E, Członkowska A. Brain metal accumulation in Wilson's disease. *J Neurol Sci.* 2013;329(1–2): 55–58. (c)
45. López-Iglesias B, Pérez C, Morales-García JA, Alonso-Gil S, Pérez-Castillo A, Romero A i wsp. New melatonin-N, N-dibenzyl(N-methyl) amine hybrids: potent neurogenic agents with antioxidant, cholinergic, and neuroprotective properties as innovative drugs for Alzheimer's disease. *J Med Chem.* 2014;57(9): 3773–3785.
46. Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci.* 1998;158(1): 47–52.
47. Martínez-Hernández R, Montes S, Higuera-Calleja J, Yescas P, Boll MC, Diaz-Ruiz A i wsp. Plasma ceruloplasmin ferroxidase activity correlates with the nigral sonographic area in Parkinson's disease patients: a pilot study. *Neurochem Res.* 2011;36(11): 2111–2115.
48. Merle U, Eisenbach C, Weiss KH, Tuma S, Stremmel W. Serum ceruloplasmin oxidase activity is a sensitive and highly specific diagnostic marker for Wilson's disease. *J Hepatol.* 2009;51(5): 925–930.
49. Morris CM, Candy JM, Oakley AE, Bloxham CA, Edwardson JA. Histochemical distribution of non-haem iron in the human brain. *Acta Anat (Basel).* 1992;144(3): 235–257.
50. Olivieri S, Conti A, Iannaccone S, Cannistraci CV, Campanella A, Barbariga M i wsp. Ceruloplasmin oxidation, a feature of Parkinson's disease CSF, inhibits ferroxidase activity and promotes cellular iron retention. *J Neurosci.* 2011;31(50): 18568–18577.
51. Parkinson Study Group. DATATOP: a multicenter controlled clinical trial in early Parkinson's disease. *Arch Neurol.* 1989;46(10): 1052–1060.
52. Parkinson Study Group QE3 Investigators. A randomized clinical trial of high-dosage coenzyme q10 in early Parkinson disease: no evidence of benefit. *JAMA Neurol.* 2014;71(5): 543–552.
53. Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 202(2): 199–211.
54. Patel BN, David S. A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes. *J Biol Chem.* 1997;272: 20185–20190. (a)
55. Patel BN, Dunn RJ, Jeong SY, Zhu Q, Julien JP, David S. Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury. *J Neurosci.* 2002;22(15): 6578–6586. (b)
56. Prachayasittikul V, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. *Drug Des Devel Ther.* 2013;7:1157–1178.
57. Ravin HA. An improved colorimetric enzymatic assay of ceruloplasmin. *J Lab Clin Med.* 1961;58:161–168.
58. Rascol O, Fitzer-Attas CJ, Hauser R, Jankovic J, Lang A, Langston JW i wsp. A double-blind, delayed-start trial of rasagiline in Parkinson's disease (the ADAGIO study): prespecified and post-hoc analyses of the need for additional therapies, changes in UPDRS scores, and non-motor outcomes. *Lancet Neurol.* 2011;10(5): 415–423.
59. Rascol O, Barone P, Behari M, Emre M, Giladi N, Olanow CW i wsp. Perampanel in Parkinson disease fluctuations: a double-blind randomized trial with placebo and entacapone. *Clin Neuropharmacol.* 2012;35(1): 15–20. (a)
60. Rascol O, Bronzova J, Hauser RA, Lang AE, Sampaio C, Theeuwes A i wsp. Pardoprunox as adjunct therapy to levodopa in patients with Parkinson's disease experiencing motor fluctuations: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, trial. *Parkinsonism Relat Disord.* 2012;18(4): 370–376. (b)
61. Rivera-Mancia S, Pérez-Neri I, Ríos C, Tristán-López L, Rivera-Espinosa L, Montes S. The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases. *Chem Biol Inter.* 2010;186(2): 184–199.
62. Roberti MF, Filho HMB, Gonçalves CH, Lima F. Aceruloplasminemia: a rare disease – diagnosis and treatment of two cases. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2011;33(5): 389–392.
63. Roeser HP, Lee GR, Nacht S, Cartwright GE. The role of ceruloplasmin in iron metabolism. *J Clin Invest.* 1970;49:2408–2417.
64. Salazar J, Mena N, Hunot S, Prigent A, Alvarez-Fischer D, Arredondo M i wsp. Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(47): 18578–18583.
65. Sarkar J, Seshadri V, Tripoulas NA, Ketterer ME, Fox PL. Role of ceruloplasmin in macrophage iron efflux during hypoxia. *J Biol Chem.* 2003;278(45): 44018–44024.
66. Saunders-Pullman R, Gordon-Elliott J, Parides M, Fahn S, Saunders HR, Bressman S. The effect of estrogen replacement on early Parkinson's disease. *Neurology.* 1999;52(7): 1417–1421.
67. Scacchi R, Gambina G, Broggio E, Corbo RM. Sex and ESR1 genotype may influence the response to treatment with donepezil and rivastigmine in patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2014;29(6): 610–615.
68. Schipper HM. Neurodegeneration with brain iron accumulation – clinical syndromes and neuroimaging. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(3): 350–360.
69. Shen L, Ji HF. Adjunctive vitamin E treatment in Wilson disease and suggestions for future trials. *Hepatology.* 2010;51(5): 1864–1865.
70. Shulman L.M., Bhat V. Gender disparities in Parkinson's disease. *Expert Rev. Neurother.* 2006;6:407–416.
71. Sokol RJ, McKim JM, Devereaux MW. α -Tocopherol ameliorates oxidant injury in isolated copper-overloaded rat hepatocytes. *Pediatr Res.* 1996;39:259–263.

72. Sontakke AN, More U. Changes in serum ceruloplasmin levels with commonly used methods of contraception. *Ind. J Clin Biochem.* 2004;19:102–104.
73. Sodhi RK, Singh N. Retinoids as potential targets for Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014;120:117–123
74. Squitti R, Quattrocchi CC, Salustri C, Rossini PM. Ceruloplasmin fragmentation is implicated in 'free' copper deregulation of Alzheimer's disease. *Prion.* 2008;2(1): 23–27.
75. Squitti R. Copper dysfunction in Alzheimer's disease: from meta-analysis of biochemical studies to new insight into genetics. *J Trace Elem Med Biol.* 2012;26(2–3): 93–96.
76. Suzuki Y, Yoshida K, Aburakawa Y, Kuroda K, Kimura T, Tera-da T i wsp. Effectiveness of oral iron chelator treatment with deferasirox in an aceruloplasminemia patient with a novel ceruloplasmin gene mutation. *Intern Med.* 2013, 52(13): 1527–1530.
77. Turunc Bayrakdar E, Uyanikgil Y, Kanit L, Koynu E, Yalcin A. Nicotiamide treatment reduces the level of oxidative stress, apoptosis, and PARP-1 activity in A β (1–42)-induced rat model of Alzheimer's disease. *Free Radic Res.* 2014;48(2): 146–158.
78. Walshe JM. Studies on the oxidase properties of ceruloplasmin: factors in normal and Wilson's-disease serum affecting oxidase activity. *J Clin Invest.* 1963;42(7): 1048–1053.
79. Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA, Nelson LM. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol.* 2003;157(11): 1015–1022.
80. Vassiliev V, Harris ZL, Zatta P. Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev.* 2005;49(3): 633–640.
81. Yonekawa M, Okabe T, Asamoto Y, Ohta M. A case of hereditary ceruloplasmin deficiency with iron deposition in the brain associated with chorea, dementia, diabetes mellitus and retinal pigmentation: administration of fresh-frozen human plasma. *Eur Neurol.* 1999;42(3): 157–162.
82. Zimbrea PC, Schilsky ML. Psychiatric aspects of Wilson disease: a review. *Gen Hosp Psychiatry.* 2014;36(1): 53–62.

Correspondence address / Adres od korespondencji:

Mariola Wolanin

Instytut Psychiatrii i Neurologii

II Klinika Neurologiczna

ul. Sobieskiego 9, 02-957 Warszawa, Poland

e-mail: mwolanin@ipin.edu.pl
