

*Tadeusz Pietras, Paweł Górski*

## **Znaczenie tokoferolu i deprenylu w leczeniu otępień**

Pracownia Geriatrii Kliniki Pneumonologii i Alergologii Akademii Medycznej w Łodzi

### **Streszczenie**

Uważa się, że stres oksydacyjny związany z mitochondriami odgrywa ważną rolę w patogenezie otępień. Anionorodnik ponadtlenkowy wytwarzany w mitochondriach indukuje proces peroksydacji lipidów, syntezę nadtlenu wodoru i odkładanie się blaszek betaamyloidu. Tokoferol – inhibitor mitochondrialnej peroksydacji lipidów i deprenyl (selegilina) inhibitor monoaminooksydazy B ochraniają lipidy mózgowia przed stresem oksydacyjnym indukowanym przez mitochondria. Kontrolowane badania kliniczne potwierdziły skuteczność tokoferolu (2000 IU/dobę) i deprenylu (10 mg/dobę) u chorych z umiarkowanym otępieniem. Leki te spowalniają deteriorację intelektualną u chorych.

### **Summary**

Many lines of evidence suggest that mitochondrial oxidative stress is important in pathogenesis of dementias. Superoxide anion generated by mitochondria induces lipid peroxidation, synthesis of hydrogen peroxide and betaamyloid plaques formation. Tocopherol the inhibitor of lipid peroxidation and deprenyl the inhibitor of monoaminooxidase prevent the oxidative injury of human brain mitochondria. A placebo-controlled, clinical trial of tocopherol and deprenyl in subjects with moderately advanced Alzheimer disease indicated, that group treated with tocopherol (2000 IU) or deprenyl (10 mg) may slow functional and mental deterioration.

### **Wstęp**

W starzejących się społeczeństwach bogatych krajów zachodnich wzrasta odsetek osób z otępieniem. Otępienia stanowią (Klasyfikacja 2000) niejednorodną grupę zaburzeń, których wspólną cechą jest upośledzenie funkcji poznawczych z dysfunkcją pamięci jako objawem osiowym. U podłoża otępień leżą różne procesy neurodegeneracyjne doprowadzające do zmniejszenia ilości komórek nerwowych i synaps. Najczęściej zanik mózgowia związany jest z odkładaniem się patologicznych złogów białek (Heininger 2000). Białka tworzące złogi mają często tendencję do tworzenia drugorzędowej struktury beta. W otępieniu w przebiegu choroby Alzheimera (F00) odkłada się białko powstałe z białka prekursorowego dla betaamyloidu (Heininger 2000). W przebiegu zakaźnych pasażowalnych betaamyloidoz takich, jak choroba Creutzfeldta-Jacoba (F02.1) odkłada się zmienione konformacyjnie białko o strukturze beta (Heininger 2000). Przyjmuje ono zmienioną konformację skłonną do tworzenia złogów pod wpływem innych cząsteczek tego samego zmienionego konformacyjnie białka (Heininger 2000). Złogi alfa-synukleiny pod postacią ciałek Lewy'ego spotyka się w otępieniu

rozsianych ciałek Lewy'ego (nie ujętego w klasyfikacji ICD-10 pod osobnym numerem i należące dotychczas do kategorii F00) i w przebiegu choroby Parkinsona (F02.3) (McKeith 2000). Złogi białka tau są typowe dla otępień czołowo-skroniowych (F02.0) (Neary i in. 2000). Złogi białka huntingtontiny występują w otępieniu w chorobie Huntingtona (F02.2) (Heiniger 2000). Istnieje grupa otępień bez typowych złogów, np. otępienie naczyniowe (F01) lub otępienie w przebiegu zakażenia wirusem nabytego zespołu upośledzenia odporności (F02.4).

Patogeneza poszczególnych rodzajów otępień nie jest znana. Prawdopodobnie są to zaburzenia o złożonej etiologii. Wbrew powszechnej opinii, nie wiadomo czy odkładanie się złogów jest przyczyną otępień, czy skutkiem patobiochemicznych procesów, które równolegle do odkładania się białek doprowadzają do uszkodzenia mózgowia objawiającego się powstaniem deficytów funkcji poznawczych, w tym zaburzeń pamięci (Markesbery 1999, Heininger 2000).

Brak dostatecznej wiedzy na temat patogenyzy otępień jest przyczyną braku leków hamujących rozwój choroby. Dostępne na rynku leki prokognitywne z grupy inhibitorów acetylocholinoesterazy działają wyłącznie objawowo poprawiając przeżywalność cholinergiczną i opóźniając postępujące upośledzenie sprawności funkcji poznawczych (Cummings i in. 2000, Samuel i in. 2000). Na łamach Farmakoterapii w Psychiatrii i Neurologii tę grupę leków omówiła Kłoszevska (2001). Duże nadzieje wiąże się z każdym lekiem opóźniającym przebieg choroby. Przedstawiona praca stanowi próbę podsumowania wiedzy na temat stosowania tokoferolu i deprenylu (selegiliny) w opóźnianiu rozwoju choroby. Skuteczność tych leków w otępieniu jest kontrowersyjna, i mimo istnienia kontrolowanych prób klinicznych w podwójnie ślepych próbach, słabo udokumentowana. Leki te są jednak tanie i stosowane w monoterapii nie wywołują zagrażających życiu objawów niepożądanych. Wielu lekarzy ogólnych i psychiatrów stosuje je z powodu bezradności. Sądzimy, że warto podsumować rzetelne dane naukowe na temat działania tych leków w otępieniu.

### **Wyniki kontrolowanych badań klinicznych nad wpływem tokoferolu i selegiliny na progresję otępienia**

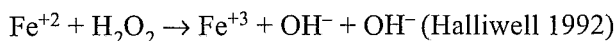
Na wiele lat przed ukazaniem się kontrolowanych badań klinicznych podejrzewano, że tokoferol – błonowy antyoksydant lipofilny i deprenyl – inhibitor izoenzymu B monoaminooksydazy (MAO) mogą opóźnić postęp otępienia. Dopiero badania zespołu kierowanego przez Sano (1997) jednoznacznie wykazały skuteczność takiej terapii. Badanie zostało przeprowadzone w podwójnie ślepej próbie. Badaniu poddano grupę 341 pacjentów z otępieniem nasilonym w umiarkowanym stopniu. Chorzy w losowo dobranych grupach otrzymywali przez dwa lata placebo (84 osoby), tokoferol w dawce 2000 jednostek/dobę (85 osób), selegilinę w dawce 10 mg/dobę (87 osób), oraz selegilinę i tokoferol (85 osób) (Sano i in. 1997). Za pierwotne oceny końcowe uznano zgon chorego, konieczność ciągłego przebywania w domu opieki, utratę zdolności dwu z trzech podstawowych czyn-

ności życia codziennego (samodzielnego spożywanie posiłków, ubierania się i korzystania z toalety). Wtórne analizy objęły wyniki testów oceniających sprawność poznawczą, wykonywanie podstawowych czynności niezbędnych w samodzielnym życiu, zachowanie, oraz objawy pozapiramidowe. W trzech grupach badanych w stosunku do placebo stwierdzono istotne wydłużenie czasu pojawienia się punktu końcowego. W grupie placebo wyniósł on 440 dni, tokoferolu 670 dni, selegiliny 655 dni, a obu leków razem 585 dni. Po dwóch latach obserwacji większy odsetek chorych mieszkających we własnym domu stwierdzono tylko w grupie przyjmujących tokoferol (Sano i in. 1997). Z badań tych wynika, że tokoferol i selegilina spowalniają postęp choroby w średnio zaawansowanym stadium (Sano i in. 1997). Jest to jak dotąd jedyne badanie w podwójnie ślepej próbie udowadniające skuteczność obu leków w opóźnianiu postępu otępienia. Wykonano wiele kontrolowanych badań klinicznych nad skutecznością tokoferolu w chorobach serca, co podsumował w swojej pracy Pryor (2000). Podobnie, jak w pracy Sano i in. (1997), większość badań kardiologicznych potwierdza nieznacznie lepsze działanie tokoferolu niż placebo, oraz istotną statystycznie ochronną rolę tokoferolu w profilaktyce wtórnej choroby niedokrwiennej serca (Pryor 2000). Autor podkreśla niewielką szkodliwość tokoferolu i stosunkowo niski koszt leku (Pryor 2000). Z powodu działania przeciwmiażdżycowego (tokoferol) i przeciwparkinsonowskiego (selegilina), w obliczu bezradności wobec postępującej choroby, oba leki wydają się być cennym uzupełnieniem postępowania farmakologicznego w otępieniu. Potwierdzenie skuteczności wymaga dalszych kontrolowanych badań klinicznych i wyznacza dalsze kierunki w badaniach podstawowych nad otępieniem.

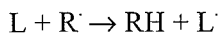
### **Biochemiczna rola tokoferolu w organizmie człowieka**

Tokoferol jest lipofilną substancją wbudowującą się w błony biologiczne. Jego fizjologiczną rolą jest hamowanie procesu peroksydacji lipidów indukowaną przez reaktywne postacie tlenu (Chow 1991). Reaktywne postacie tlenu (ROS – *reactive oxygen species*) powstają w wyniku metabolizmu tlenu. Lipidy stanowią ok. 60 % suchej masy mózgowia tworząc błony biologiczne i osłonki mielinowe. Fosfolipidy – podstawowy składnik błon, mają dołączone kwasy tłuszczowe wielonienasycone (PUFA – *polyunsaturated fatty acids*) przy pomocy wiązania estrowego do węgla Sn1 i Sn2 glicerolu (Horrobin 1998, Horrobin 1998). Od kwasów tych zależy płynność błon i temperatura topnienia, oraz funkcjonowanie błonowych białek integralnych, a wśród nich ważne dla funkcjonowania mózgu kanały jonowe i receptory metabotropowe (Horrobin 1998). PUFA uwalniane są z fosfolipidów dzięki działaniu fosfolipaz (fosfolipaza A<sub>1</sub> i fosfolipaza A<sub>2</sub>) stając się prekursorami cyklicznych endonadtlenków, prostaglandyn, leukotrienów i lipoksyn – dużej grupy mediatorów działających miejscowo. Genetycznie uwarunkowana nadmierna aktywność fosfolipazy A<sub>2</sub> (chromosom 1) wiąże się z nieprawidłowym rozwojem płatów czołowych i skroniowych (Horrobin 1998a, Horrobin

1998b). Mutacja ta odgrywa prawdopodobnie rolę w nieprawidłowym funkcjonowaniu modułu językowego (dysleksja) i w patogenezie schizofrenii (Horrobin 1992, Horrobin 1998a, Horrobin 1998b). PUFA można podzielić w zależności od długości łańcucha, ilości wiązań nienasyconych i od położenia tychże wiązań w łańcuchu (kwasy n-9 ( $\omega$ -9), n-6 ( $\omega$ -6) i n-3 ( $\omega$ -3)) (Horrobin 1992). Cyfra przy literze n lub  $\omega$  oznacza umiejscowienie pierwszego wiązania podwójnego licząc od ostatniego węgla łańcucha alifatycznego (Horrobin 1992). PUFA mimo ważnej funkcji fizjologicznej, ulegają łatwo procesowi autooksydacji pod wpływem ROS (Janero 1991). Proces ten nazywa się peroksydacją wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (LP – *lipid peroxidation*) (Janero 1991, De Zwart i in. 1999). Reakcja LP przebiega lawinowo, ma charakter typowej reakcji łańcuchowej (Janero 1991, De Zwart i in. 1999). Oznacza to, iż raz zainicjowana reakcja nawet w obrębie jednej cząsteczki doprowadza do wyczerpania dużej części cząsteczki kwasu tłuszczowego (Janero 1991, De Zwart i in. 1999). LP przebiega w trzech etapach – inicjacji, propagacji i terminacji (Janero 1991, De Zwart i in. 1999). Przez inicjację procesu LP rozumie się wolnorodnikowe reakcje chemiczne, które zapoczątkowują lawinową reakcję utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych. W organizmie człowieka proces peroksydacji rozpoczynają ROS, do których należą tlen singletowy, anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^-$ ), rodnik hydroksylowy ( $HO^\cdot$ ) i nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ) jedyna reaktywna postać tlenu nie będąca wolnym rodnikiem (Halliwell 1992). Wchodzi on jednak w reakcję z dwuwartościowymi kationami żelazowymi (tzw. reakcja Fentona) dając najbardziej reaktywny rodnik  $HO^\cdot$ :



Proces **inicjacji** przedstawia równanie:

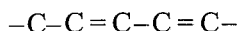


L – nienasycony kwas tłuszczowy

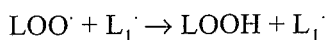
$L^\cdot$  – rodnik kwasu tłuszczowego

$R^\cdot$  – reaktywna postać tlenu

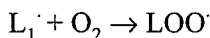
Reakcję **propagacji** procesu LP rozpoczyna reakcja rodnika nienasyconego kwasu tłuszczowego ( $L^\cdot$ ) z tlenem, dając rodnik nadtlenu lipidów ( $LOO^\cdot$ ), w którym wiązanie podwójne pomiędzy atomami węgla tworzą charakterystyczny układ sprzężony:



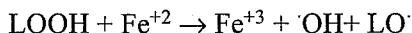
Rodniki nadtlenu ( $LOO^\cdot$ ) reagują z kolejnymi nienasyconymi kwasami tłuszczowymi ( $L_1$ ) dając ponownie rodnik nienasyconego kwasu tłuszczowego ( $L_1^\cdot$ ) oraz nadtlenek lipidów ( $LOOH$ ):



Rodnik nienasyconego kwasu tłuszczowego reaguje ponownie z tlenem:

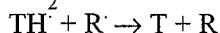
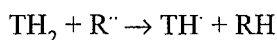


Nadtlenki lipidów w obecności jonów  $Fe^{+2}$  wchodzi w reakcję przypominającą reakcję Fentona dając rodnik oksyalkoholowy ( $LO \cdot$ ) i hydroksylowy ( $\cdot OH$ ):



Powstałe rodniki ponownie reagują z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi wzmocniając lawinowy proces propagacji peroksydacji lipidów (Janero 1991, De Zwart i in. 1999). Reakcja przebiegałaby do wyczerpania substratów, niemniej dwa rodniki o przeciwstawnych spinach reagują ze sobą dając neutralne produkty. Zjawisko to nazywany **terminacją** procesu peroksydacji lipidów, gdyż hamuje ona lawinowy tor przebiegu i doprowadza do samowygaszenia. W czasie terminacji powstają liczne produkty uboczne o długim okresie półtrwania i to one decydują o toksyczności nadmiernie intensywnej LP dla komórek ośrodkowego układu nerwowego (Janero 1991, De Zwart i in. 1999). Powstają krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe i alkohole, węglowodory alifatyczne, w tym pentan i heksan, cykliczne endonadtlenki, aldehydy w tym dialdehyd malonowy (MDA *malondialdehyde*,  $COH-CH_2-COH$ ). Jest on często oznaczany w materiale biologicznym ze względu na barwną reakcję zachodzącą w środowisku kwaśnym w temperaturze wrzenia wody z kwasem tiobarbiturowym (*thiobarbituric acid* – TBA) (Janero 1994). W mianownictwie biochemicznym produkty reakcji aldehydów (w tym dialdehydu malonowego) z kwasem tiobarbiturowym określa się jako produkty TBA – reaktywne i uważa za marker procesu peroksydacji lipidów (Janero 1994). 4-hydroksynonenal powstający w procesie LP uważany obecnie za najbardziej szkodliwą toksynę uszkadzającą komórkę nerwową (Toranzo i in. 1994).

Tokoferol hamuje proces peroksydacji lipidów poprzez reagowanie z anionorodnikiem ponadtlenkowym ( $O_2^{\cdot -}$ ), poprzez wygaszanie tlenu singletowego i poprzez reakcję z pośrednimi produktami procesu LP:



$TH_2$  – tokoferol,  $TH^{\cdot}$  – rodnik tokoferylowy, T utleniony tokoferol,  $R^{\cdot}$  – rodnik powstały w reakcji LP, R – cząstka alifatyczna obojętna chemicznie.

Redukcję rodnika tokoferylowego i utlenionego tokoferolu przeprowadza enzym reduktaza tokoferylowa i kwas askorbinowy (Chow 1991).

Tokoferol posiada również inne działanie biologiczne nie związane z ochroną błon. Zespół kierowany przez Azzi'ego odkrył, że d-alfa-tokoferol jest naturalnym inhibitorem kinazy białkowej A (Tasinato i in. 1995, Azzi i in. 2002). Właściwości takiej nie posiadają inne tokoferole (np. beta-tokoferol). Regulacja aktywności kinazy białkowej A posiada ogromne znaczenie w przekazywaniu sygnału w ośrodkowym układzie nerwowym. Dawki tokoferolu przekraczające 1000 mg/dobę wypierają witaminę K z połączeń białkowych i działają przeciwzakrzepowo (Kappus i in. 1992).

## Próba wyjaśnienia działania tokoferolu jako substancji hamującej stres oksydacyjny wewnątrz mitochondriów

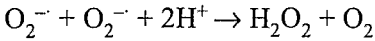
Nadmierne wytwarzanie ROS przez mitochondria może być uważane za potencjalną przyczynę rozwoju otępień (Markesbery 1997). Wytwarzanie ROS przez mitochondria rośnie z wiekiem, a to może doprowadzać do odkładania złogów białek takich, jak betaamyloid czy synukleina i wtórnie do rozwoju otępienia (Markesbery i in. 1999). Już w latach osiemdziesiątych zwrócono uwagę, że przypadki otępień o późnym początku (pomiędzy 60 a 80 rokiem życia) częściej są dziedziczone ze strony matki (Fiskum i in. 1999). Zaobserwowano spadek aktywności enzymów łańcucha oddechowego u chorych z różnymi rodzajami otępienia z towarzyszącym równoległym wzrostem wytwarzania przez mitochondria ( $O_2^-$ ) (Parker i in. 1989, Parker i in. 1994). Stwierdzono, że w mitochondriach wyizolowanych z mózgow zmarłych z powodu AD maleje aktywność oksydazy cytochromu C (CO) przy prawidłowej ilości białka enzymu i jego podjednostek cytochromów a i  $a_3$ . Świadczy to o uszkodzonej sprawności katalitycznej enzymów łańcucha oddechowego przy prawidłowej biosyntezie podjednostek CO (Parker i in. 1994). Davis i in. (1997) stwierdził, że mutacje w genach mitochondrialnych kodujących podjednostkę pierwszą oksydazy cytochromu C (CO-1) i podjednostkę drugą (CO-2) występuje u 60% chorych na chorobę Alzheimera i tylko u około 20% osób zdrowych. Nie stwierdzono różnic ) pomiędzy zdrowymi a chorymi w ilości mutacji w genie kodującym podjednostkę trzecią (CO-3) (Davis i in. 1997). Wszystkie mutacje w podjednostkach CO-1 i CO-2 dotyczą transbłonowego fragmentu cząsteczki białka zakotwiczonego enzym w błonie mitochondrialnej (Lenaz i in. 2002). Związek mutacji w genach kodujących CO-1 i CO-2 z chorobą Alzheimera wydaje się tym bardziej prawdopodobny, że w przypadku synukleinopatii (choroby rozsianych ciałek Lewy'ego) nie stwierdzono częstszego występowania tych mutacji, niż u osób zdrowych (Lenaz i in. 2002). Mitochondria ze zmutowaną formą oksydazy cytochromu C wytwarzają znacznie więcej  $O_2^-$ , niż mitochondria z prawidłową aktywnością enzymu (Lenaz i in. 2002). Oksydaza cytochromu C należy do sprawnych enzymów wytwarzającym niewiele  $O_2^-$  (Harman 2002). W warunkach fizjologicznych tylko 4% tlenu w mitochondriach jest niekompletnie zredukowane do  $O_2^-$  (Harman 2002). Szczególnie dużo  $O_2^-$  wytwarza w warunkach fizjologicznych kompleks I łańcucha oddechowego (Barrientos i in. 1999). Również uszkodzenie aktywności kompleksu I łańcucha oddechowego (wywołane mutacjami genów kodujących dwie podjednostki tego enzymu w mitochondrialnym DNA) uważane jest za czynnik ryzyka otępienia w chorobie Alzheimera, oraz otępienia z ciałkami Lewy'ego i przede wszystkim choroby Parkinsona (Barrientos i in. 1999). Inną mutacją w mitochondrialnym DNA związaną z otępieniem jest mutacja w nukleotydzie 4336 w regionie kodującym tRNA<sup>gln</sup> (Shoffner i in. 1993). Mutacja ta występuje u 5,2% chorych i u 0,7% zdrowych (Hutchin i in. 2001).

Mitochondria są unikalnymi organellami w komórkach ssaków, gdyż zawierają własne koliste DNA o długości około 16,5 kb (Lee i in. 1997). Koduje ono

22 cząsteczki tRNA, dwie cząsteczki rRNA i 13 polipeptydów. Polipeptydy te stanowią podjednostki enzymów łańcucha oddechowego (Lee i in. 1997). Siedem podjednostek kompleksu I łańcucha oddechowego spośród około 40 kodowanych jest przez DNA mitochondrialny i trzy spośród trzynastu jednostek oksydazy cytochromu C (Lee i in. 1997). Kompleks II kodowany jest wyłącznie przez genom jądrowy, zaś spośród 10 peptydów kompleksu III tylko jeden kodowany jest przez DNA mitochondrialny (Lee i in. 1997). Mitochondria zużywają większość dostarczanego do komórek tlenu. Niestety, mimo dużej sprawności katalitycznej enzymów łańcucha oddechowego, część tlenu przekształca się w wyniku procesów katalizowanych przez enzymy łańcucha w ROS (Lee i in. 1997). W warunkach fizjologicznych mitochondria są głównym źródłem wewnątrz komórki  $O_2^-$  i nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ) (Lee i in. 1997). Stężenie  $O_2^-$  i  $H_2O_2$  jest utrzymywane w komórce ssaków na stałym niskim poziomie dzięki enzymom rozkładającym ROS i nieenzymatycznym antyutleniaczom zawartym w błonach i we frakcjach rozpuszczalnych (Harman 2002). Wynosi ono  $10^{-12}$ – $10^{-11}$  M dla  $O_2^-$  i  $10^{-9}$ – $10^{-7}$  M dla  $H_2O_2$  (Lee i in. 1997, Harman 2002). ROS wytwarzane są głównie przez kompleks I i w znacznie mniejszym stopniu przez kompleks III (Lee i in. 1997). Kompleks IV katalizuje reakcję bardzo sprawnie bez wytwarzania ROS (Lee i in. 1997). Niestety, mimo sprawnych reakcji zmiatania ROS przez antyutleniacze z wiekiem wytwarzanie ROS zwiększa się (Markesbery i in. 1999). Prace Sohal jednoznacznie udowodniły, że wraz z wiekiem zwierzęcia zwiększa się wytwarzanie ROS przez mitochondria w tym  $H_2O_2$  i  $O_2^-$  (Sohal 1993). W mitochondriach starzejących się organizmów ROS wytwarzane są przez wszystkie kompleksy enzymatyczne łańcucha oddechowego, w tym przez oksydazę cytochromu C (Sohal 1993). Typową cechą mitochondriów izolowanych od starych zwierząt jest spadek aktywności kompleksu oksydazy cytochromu C z równoległym wzrostem wytwarzania ROS przez ten enzym (Sohal 1993, Markesbery 1999). Wytwarzanie przez enzymy mitochondrialne ROS naraża DNA mitochondrialny na powstawanie mutacji, bowiem DNA w mitochondriach jest słabiej chronione przed uszkodzeniami (brak histonów i białek wiążących DNA) (de la Monte i in. 2000). Powstaje mechanizm błędnego koła, gdyż mutacje powstające na skutek reakcji ROS z DNA uszkadzają funkcjonowanie białek łańcucha oddechowego. Uszkodzony łańcuch oddechowy wytwarza więcej ROS indukujących mutacje w DNA mitochondrialnym. Mechanizm ten działający na zasadzie sprzężenia zwrotnego dodatniego szybko doprowadza do uszkodzenia komórki.

Nasuwa się pytanie, dlaczego zwiększone wytwarzanie ROS przez mitochondria doprowadza do rozwoju otępienia. Uszkodzone mitochondria są głównym i stałym źródłem ROS w komórce nerwowej, komórce o intensywnym metabolizmie tlenowym (Markesbery i in. 1999). Wbrew powszechnym opiniom, fagocytarna oksydaza NADPH odgrywa znacznie mniejszą rolę w wytwarzaniu ROS, niż enzymy mitochondrialne (Shimohama i in. 2000). Podobnie oksydaza ksantynowa ważne źródło anionorodnika ponadlenkowego ( $O_2^-$ ) aktywowana jest w procesach niedokrwienia i reperfuzyjji ośrodkowego układu nerwowego (Hashimoto i in. 2002). Zjawisko to odgrywa ważną rolę w patogenezie otępień naczyniowych

i udarów (Hashimoto i in. 2002). ROS uwalniane z mitochondriów, a głównie nadtlenek wodoru swobodnie dyfundujący przez błony, aktywują czynniki transkrypcyjne *NF-kB* i *AP-1*, kinazy białkowe serynowo/treoninową *Akt* i *JNK-1*, fosfatazę białkową tyrozynową (Pani i in. 2001). Kinaza *Akt* i czynnik *NF-kB* wpływają na ekspresję białka hamującego rozwój nowotworów p53 (Pani i in. 2001). Białko p53 indukuje mitochondrialny izoenzym dysmutazy ponadtlenkowej MnSOD (Pani i in. 2001). Dysmutaza katalizuje reakcję:



zwiększając wytwarzanie nadtlenku wodoru (Pani i in. 2001). Uszkodzone przez ROS mitochondria pękają głównie na skutek LP zmieniającej właściwości błon. Uszkodzone mitochondria uwalniają cytochrom C do cytoplazmy, który indukuje apoptozę komórek nerwowych i komórek glejowych (programowaną śmierć komórki) (Yang i in. 1998, Pani i in. 2001). Apoptoza indukowana przez ROS to prawdopodobnie jedna z przyczyn zaniku neuronów w otępieniu. Nadmiar ROS i produkty LP sprzyjają wytrącaniu się złogów betaamyloidu (Nixon i in. 2000). Na temat biochemicznych mechanizmów wpływu ROS i produktów LP na tworzenie złogów betaamyloidu wiadomo stosunkowo niewiele. Uszkodzenie błony biologiczne przez  $\text{H}_2\text{O}_2$  otwiera kanały wapniowe (Nixon i in. 2000). Napływający wapń aktywuje kalpainy, kinazę białkową C, kinazę zależną od kalmoduliny wpływające na cięcie proteolityczne białek i dysfunkcje cytoszkieletu (Nixon i in. 2000). Być może kaskada enzymów proteolitycznych wpływa na odpowiednią aktywację sekretaz skutkującą wytrącaniem złogów (Nixon i in. 2000). Kalpainy uważane są za główny czynnik amyloidogenny! ROS, dialdehyd malonowy i 4-hydroksynonenal aktywują lizosomalne i ubikwitynozależne cięcie proteolityczne tworzące złogi białek o strukturze beta (Aksenov i in. 1998, Aksenova i in. 1999, Nixon i in. 2000). Należy podkreślić, że nieprawidłowe cięcie proteolityczne białka prekursorowego amyloidu przez beta- i gamma-sekretazę jest główną i jedyną dobrze udokumentowaną teorią powstawania choroby Alzheimera (Dickson 1997). Każdy czynnik wpływający na wewnątrzkomórkową proteolizę może mieć ważne znaczenie w patogenezie choroby. Ciekawostką jest, że wytworzone złogi białek o strukturze beta w ośrodkowym układzie nerwowym indukują silnie stres oksydacyjny, co jest dobrze udokumentowane (Varadarajan i in. 2000). Złogi białek chelatują kationy metali grup przejściowych, w tym dwuwartościowe żelazo, które wchodząc w reakcję Fentona silnie nasila stres oksydacyjny (Mark i in. 1997, Varadarajan i in. 2000, Tabner i in. 2002). Podsumowując mitochondria jako źródło ROS stymulują odkładanie się złogów białek o strukturze beta poprzez wpływ na wewnątrzkomórkowe procesy proteolizy. Same złogi indukują również stres oksydacyjny nasilający już istniejące uszkodzenie i stymulujący odkładanie się kolejnych porcji złogów (Mark i in. 1997, Varadarajan i in. 2000). Powstaje kolejny mechanizm błędnego koła, a otępienia są chorobami postępującymi, których progresji w chwili obecnej nie można zatrzymać (Varadarajan i in. 2000).

Tokoferol ochrania błony mitochondrialne przed LP i zmiata wewnątrzmitochondrialny  $\text{O}_2^{\cdot -}$  (Grundman 2000). Jako jedyna substancja przerywa błędne



koło rozwoju otępienia związane z mitochondriami, co potwierdziły pośrednio badania kliniczne Sano i in. (1997). Tokoferol jest najsilniejszym antyoksydantem wewnątrzmitochondrialnym hamującym zarówno LP, jak i reagującym z ROS. Stężenie tokoferolu w warunkach prawidłowych jest 10 krotnie wyższe w błonach mitochondrialnych, niż w innych błonach i lipidach w tym lipoproteinach osocza (Chow i in. 1999, Grundman 2000). Świadczy to jednoznacznie o mitochondrialnym punkcie uchwytu działania tokoferolu (Grundman 2000). Udowodniono również, że tokoferol hamuje LP błonowych wywołowaną przez odkładanie się złogów betaamyloidu (Yatin i in. 1999). Tokoferol zmniejsza wytwarzanie  $H_2O_2$  przez mitochondria zmiatając ROS bez wytworzenia dyfundującego przez błony  $H_2O_2$  (Chow i in. 1999). Tokoferol ochrania lipidy osocza przed LP, co ma ważne znaczenie w profilaktyce miażdżycy i marginalne znaczenie w przypadku otępień wywołanych odkładaniem się złogów. Duża jednak część otępień to otępienia naczyniowe lub mieszane, a tu przeciwmiażdżycowe działanie tokoferolu może mieć istotne znaczenie w profilaktyce i opóźnieniu rozwoju choroby (Pryor 2000).

### **Próba wyjaśnienia działania selegiliny jako inhibitora monoaminooksydazy B**

Selegilina (deprenyl) jest selektywnym i nieodwracalnym inhibitorem monoaminooksydazy izoenzymu B (MAO-B) stosowanym w leczeniu choroby Parkinsona, depresji starczej i otępieniu (Kitani i in. 1994). Mechanizm działania leku wydaje się być bardziej złożony, niż tokoferolu. Udowodniono, że oprócz hamowania MAO-B lek ten działa na wychwyty zwrotny dopaminy i noradrenaliny hamując równoległe niektóre receptory serotonergiczne (Chrisp i in. 1991). Działaniem receptorowym nie można tłumaczyć neuroprotektynnego działania selegiliny w otępieniu, gdyż wiele innych leków działających poprzez oddziaływanie na receptory nie wpływa na rozwój otępienia! Hamowanie MAO-B zlokalizowanej w zewnętrznej błonie mitochondriów zmniejsza wytwarzanie przez te organella  $H_2O_2$ , co prawdopodobnie ma ważne znaczenie w spowalnianiu postępu choroby i przypomina częściowo działanie tokoferolu. Istnieją badania przeprowadzone na zwierzętach, w których udowodniono, że podawanie przez 18 miesięcy szczurom selegiliny w dawce 0.5 mg/kg trzy razy w tygodniu zwiększa aktywność w hipokampie, korze mózgowej, prądkowiu i w substancji czarnej aktywność katalazy i obu izoenzymów SOD – cytoplazmatycznej z miedzią i cynkiem w centrum aktywnym (CuZn-SOD) i mitochondrialnej z manganem (Mn-SOD) (Kitani i in. 1994, Lai i in. 1994). Zespół tych trzech enzymów skutecznie chroni komórkę przed ROS. Podobnie u ludzi chorych na chorobę Parkinsona leczonych selegiliną stwierdzono znaczny wzrost aktywności CuZnSOD i MnSOD w limfocytach krwi obwodowej w porównaniu z aktywnością enzymów w limfocytach pobranych od chorych leczonych innymi lekami (Kushleika i in. 1996). Być może równoległa indukcja obu izoenzymów SOD i katalazy rozkładającej  $H_2O_2$ , z równoczesną inhibicją MAO-B ochrania uszkodzone mitochondria przed ROS i pośrednio przed następczą LP. Działanie to

również przypomina ochronną rolę tokoferolu. Thomas i in. (2000) zauważył, że deprenyl zwiększa wytwarzanie w ośrodkowym układzie nerwowym tlenku azotu w obszarach mózgu odpowiedzialnych za funkcjonowanie pamięci, rozszerza tętnice mózgowie. Tokoferol zmniejsza wytwarzanie NO w tych obszarach i tym, być może, można tłumaczyć mniejszy efekt kliniczny podawania tokoferolu i deprenylu razem, niż każdego z nich osobno. Ostatnie metaanalizy dokonane na podstawie kilku badań klinicznych podważają skuteczność i przydatność selegiliny w leczeniu otępień (Wilcock i in. 2002). Wymaga to wyjaśnienia metodą wieloletnich badań klinicznych, które rozpoczęto w 2000 roku (Thomas i in. 2000).

## Zakończenie

Tokoferol i deprenyl (selegilina) są nowymi lekami budzącymi nadzieję na powstrzymaniu rozwoju otępień. Jeśli nawet przyszłe badania podważą skuteczność tych leków, to na pewno badania nad mitochondrialnym stresem oksydacyjnym w otępieniu mają niepodważalny aspekt poznawczy i przyczynią się do lepszego zrozumienia tej ciężkiej choroby.

## Piśmiennictwo

1. Aksenov M.Y., Aksenova M.V., Markesbery W.R., Butterfield D.A.: Amyloid beta-peptide (1–40)-mediated oxidative stress in cultured hippocampal neurons. Protein carbonyl formation, CK BB expression, and the level of Cu, Zn, and Mn SOD mRNA. *J. Mol. Neurosci.* 1998, 10, 181–192
2. Aksenova M.V., Aksenov M.Y., Markesbery W.R., Butterfield D.A.: Aging in a dish: age-dependent changes of neuronal survival, protein oxidation, and creatine kinase BB expression in long-term hippocampal cell culture. *J. Neurosci. Res.* 1999, 58, 308–317
3. 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
4. Barrientos A., Mořaes C.T.: Titrating the effect of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 19188–19197
5. Chow C.K.: Vitamin E and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 1991, 11, 215–232
6. Chow C.K., Ibrahim W., Wei Z., Chan A.C.: Witamin E regulates mitochondrial hydrogen peroxide generation. *Free Radic. Biol. Med.* 1999, 27, 580–587
7. 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
8. Cummings J.L., Donubue J.A., Brooks R.L.: The relationship between donepezil and behavioral disturbances in patients with Alzheimer's disease. *J. Geriatr. Psychiatry* 2000, 8, 134–140
9. 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
10. DeZwart L.L., Meerman J.H.N., Commandeur J.N.M., Vermeulen N.P.E.: Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free. Radic. Biol. Med.*, 1999, 26, 202–226
11. Dickson D.W.: The pathogenesis of senile plaques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1997, 56, 321–339
12. 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

13. Grundman M.: Vitamin E and Alzheimer disease: the basis for additional clinical trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000, 71 (suppl), 630S–636S
14. Halliwell B.: Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 1992, 59, 1609–1623
15. Harman D.: Alzheimer's disease: role of aging in pathogenesis. *Ann. N. Y. A. Sci.* 2002, 959, 385–395
16. Hashimoto Y., Niiikura T., Ito Y., Kita Y., Terashita K., Nishimoto I.: Neurotoxic mechanisms by Alzheimer's disease-linked N141I mutant presenilin 2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002, 300, 736–745
17. Heinger K.: A unifying hypothesis of Alzheimer's disease. III. Risk factors. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* 2000, 15, 1–70
18. Horrobin D.F.: Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. *Prog. Lipid. Res.* 1992, 31, 163–194
19. Horrobin D.F.: Schizophrenia: the illness that made us human. *Medical Hypothesis* 1998, 50, 269–288
20. Horrobin D.F.: The membrane phospholipid hypothesis as a biochemical basis for the neurodevelopmental concept of schizophrenia. *Schizophr. Res.* 1998, 30, 193–208
21. Hutchin T.P., Lench N.J., Arbuzova S., Markham A.F., Mueller R.F.: Maternally inherited hearing impairment in a family with the mitochondrial DNA A7445G mutation. *Eur. J. Hum. Genet.* 2001, 9, 56–58
22. 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
23. Kappus H., Diplock A.T.: Tolerance and safety of vitamin E: a toxicological position report. *Free Radic. Biol. Med.* 1992, 13, 55–74
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. Klasyfikacja zaburzeń psychicznych i zaburzeń w zachowania w ICD-10. Opisy kliniczne i wskazówki diagnostyczne. Uniwersyteckie Wydawnictwo Medyczne „Vesalius” Instytut Psychiatrii i Neurologii Kraków–Warszawa 2000
26. Kłoszewska I.: Inhibitory acetylocholinoesterazy w leczeniu choroby Alzheimerera. *Farmakoterapia w Psychiatrii i Neurologii* 2001, 4, 361–369
27. 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
28. Lai C.T., Zuo D.M., Yu P.H.: Is brain superoxide dismutase activity increased following chronic treatment with l-deprenyl? *J. Neural. Transm.* 1994 (suppl), 41, 221–229
29. Lee C.M., Weindruch R., Aiken J.M.: Age-associated alterations of the mitochondrial genome. *Free Radic. Biol. Med.* 1997, 22, 1259–1269
30. 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
31. 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
32. Markesbery W.R.: Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic. Bio. Med.* 1997, 23, 134–147
33. Markesbery W.R.: The role of oxidative stress in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 1999, 56, 1449–1452
34. Markesbery W.R., Carney J.M.: Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 1999, 9, 133–146
35. McKeith I.G.: Clinical Lewy body syndromes. *Ann. N.Y.A. Sci.* 2000, 920, 1–8

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. Neary D., Snowden J.S., Mann D.M.A.: Classification and description of frontotemporal dementias. *Ann. N. Y. A. Sci.* 2000, 920, 46–51
38. Nixon R.A., Cataldo A.M., Mathews P.M.: The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: a review. *Neurochem. Res.* 2000, 25, 1161–1172
39. Pani G., Bedogni B., Colavitti R., Anzevino R., Borrello S., Galeotti T.: Cell compartmentalization in redox signaling. *I. U. B. M. B. Life* 200, 52, 7–16
40. Parker W.D., Boyson S.J., Parks J.: Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 1989, 26, 719–723
41. Parker W.D., Parks J., Filley C.M., Kleinschmidt-DeMasters B.K.: Electron transport chain deficits in Alzheimer's disease brain. *Neurology* 1994, 44, 1090–1096
42. Pryor A.A.: Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Radic. Biol. Med.* 2000, 28, 141–164
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. Samuel W., Caligiuri M., Galasko D., Lacro J., Marini M., McClure F.S., Warren K., Jeste D.V.: Better cognitive and psychopathologic response to donepezil in patients prospectively diagnosed as dementia with Lewy bodies: a preliminary study. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 2000, 15, 794–802
45. Shimohama S., Tanino H., Kawakami N., Okamura N., Kodama H., Yamaguchi T., Hayakawa T., Nunomura A., Chiba S., Perry G., Smith M.A., Fujimoto S.: Activation of NADPH oxidase in Alzheimer's disease brains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 273, 5–9
46. Shoffner J.M., Brown M.D., Torroni A., Lott M.T., Cabell M.F., Mirra S.S., Beal M.F., Yang C.C., Gearing M., Salvo R.: Mitochondrial DNA variants observed in Alzheimer disease and Parkinson disease patients. *Genomics* 1993, 17, 171–184
47. Sohal R.S.: Aging, cytochrome oxidase activity, and hydrogen peroxide release by mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 1993, 14, 583–588
48. Tabner B.J., Turnbull S., El-Agnaf O.M., Allsop D.: Formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals from a beta and alpha-synuclein as a possible mechanism of cell death in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2002, 32, 1076–1083
49. 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
50. Thomas T. Monoamine oxidase-B inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2000, 21, 343–348
51. Thomas R.G., Berg J.D., Sano M., Thal L.: Analysis of longitudinal data in an Alzheimer's disease clinical trial. *Stat. Med.* 2000, 19, 1433–1440
52. Toranzo E.G.D., Castro J.A.: Reaction of 4-hydroxynonenal with some thiol-containing radioprotective agents or their active metabolites. *Free Radic. Biol. Med.* 1994, 17, 605–607
53. Varadarajan S., Yatin S., Aksenova M., Butterfield D.A.: Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J. Struct. Biol.* 2000, 130, 184–208
54. Wilcock G.K., Birks J., Whitehead A., Evans S.J.: The effect of selegiline in the treatment of people with Alzheimer's disease: a meta-analysis of published trials. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 2002, 17, 175–183
55. Yang J.C., Cortopassi G.A.: Induction of the mitochondrial permeability transition causes release of the apoptogenic factor cytochrome c. *Free Radic. Biol. Med.* 1998, 24, 624–631
56. Yatin S.M., Aksenov M., Butterfield D.A.: The antioxidant vitamin E modulates amyloid beta-peptide-induced creatine kinase activity inhibition and increased protein oxidation: implications for the free radical hypothesis of Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* 1999, 24, 427–435