

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Karolina Spisak

**Polimorfizmy znacznikowe genów enzymów systemu
antyoksydacyjnego jako czynniki ryzyka choroby Alzheimerera
w populacji polskiej.**

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. med. Agnieszka Słowik

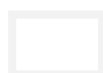
Pracę wykonano w Klinice Neurologii Szpitala Uniwersyteckiego
w Krakowie

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. med. Andrzej Szczudlik

Kraków, 2012

1. Wstęp.....	4
1.1 Definicja i epidemiologia choroby Alzheimera.....	4
1.2 Środowiskowe i genetyczne uwarunkowania choroby Alzheimera.....	5
1.3 Etiopatogeneza choroby Alzheimera.....	13
1.3.1 Hipoteza kaskady amyloidowej.....	14
1.3.2 Hipoteza dysfunkcji cholinergiczej.....	16
1.3.3 Dysfunkcja synaps.....	16
1.3.4 Zaburzenia homeostazy cholesterolu.....	17
1.3.5 Zaburzenia homeostazy jonów wapnia.....	18
1.3.6 Zaburzenia funkcji mitochondriów i siateczki endoplazmatycznej.....	19
1.3.7 Rola apoptozy.....	19
1.3.8 Rola procesów zapalnych.....	20
1.4 Stres oksydacyjny. Definicja, mechanizmy i wpływ na układ nerwowy.....	20
1.5 Enzymy systemu antyoksydacyjnego. Peroksydaza glutationu-1 i dysmutazy ponadtlenkowe: SOD1 i SOD2.....	25
1.5.1 Dysmutazy ponadtlenkowe SOD1 i SOD2.....	25
1.5.2 Peroksydaza glutationu-1: GPx-1.....	27
1.6 Badania systemu antyoksydacyjnego w AD.....	28
1.7 Uzasadnienie badania.....	36
2. Cel badania.....	37
3. Materiał i metody badawcze.....	38
3.1 Materiał badawczy.....	38
3.1.1 Grupa badania.....	38
3.1.2 Grupa kontrolna.....	38
3.2 Metody.....	39
3.2.1 Metodyka procedur diagnostycznych przeprowadzona u chorych kwalifikowanych do badania.....	39
3.2.1.1 Kryteria włączenia do badania.....	39
3.2.1.2 Kryteria wykluczenia.....	40
3.2.2 Wybór polimorfizmów.....	40
3.2.3 Metodyka badań laboratoryjnych.....	41
3.2.4 Analiza statystyczna.....	42

4. Wyniki.....	44
4.1 Charakterystyka demograficzna u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej.....	44
4.2 Polimorfizm rs4998557 genu <i>SOD1</i> a ryzyko zachorowania na AD.....	46
4.3 Polimorfizm rs1041740 genu <i>SOD1</i> a ryzyko zachorowania na AD.....	48
4.4 Polimorfizm rs2070424 genu <i>SOD1</i> a ryzyko zachorowania na AD.....	50
4.5 Polimorfizm rs2855116 genu <i>SOD2</i> a ryzyko zachorowania na AD.....	53
4.6 Polimorfizm rs5746136 genu <i>SOD2</i> a ryzyko zachorowania na AD.....	55
4.7 Polimorfizm rs4880 genu <i>SOD2</i> a ryzyko zachorowania na AD.....	57
4.8 Polimorfizm rs3448 genu <i>GPx-I</i> a ryzyko zachorowania na AD.....	59
4.9 Polimorfizm rs1050450 genu <i>GPx-I</i> a ryzyko zachorowania na AD.....	61
4.10 Polimorfizm rs1800668 genu <i>GPx-I</i> a ryzyko zachorowania na AD.....	63
4.11 Polimorfizm genu <i>APOE</i> a ryzyko choroby Alzheimera.....	65
4.12 Testowanie interakcji między badanymi polimorfizmami rs2070424 genu <i>SOD1</i> oraz genu <i>APOE</i>	67
5. Dyskusja.....	69
5.1 Związek badanych polimorfizmów z ryzykiem zachorowania na chorobę Alzheimera.....	69
5.2 Związek innych polimorfizmów genów układu antyoksydacyjnego z ryzykiem zachorowania na chorobę Alzheimera.....	72
5.3 Związek badanych i innych polimorfizmów genów układu antyoksydacyjnego z ryzykiem wystąpienia innych chorób zwyrodnieniowych układu nerwowego....	73
5.4 Badania polimorfizmów genów układu antyoksydacyjnego w innych chorobach, których patogenezą jest ze stresem oksydacyjnym.....	75
5.5 Trudności metodyczne badań oceniających znaczenie genetycznych czynników ryzyka.....	85
6. Wnioski.....	90
7. Streszczenia.....	91
7.1 Streszczenie w języku polskim.....	91
7.2 Streszczenie w języku angielskim.....	93
8. Piśmiennictwo.....	96
Spis tabel.....	128



1. Wstęp

1.1 Definicja i epidemiologia choroby Alzheimerera

Choroba Alzheimerera (ang. *Alzheimer's Disease – AD*) jest chorobą zwyrodnieniową ośrodkowego układu nerwowego. Charakteryzuje się ona postępującym deficytem pamięci i innych funkcji poznawczych, takich jak np. ocena sytuacji, zdolność uczenia się i myślenia. Ponadto u pacjentów chorych na AD często występują zaburzenia zachowania. Wraz z postępującym zaawansowaniem choroby dochodzi do pogarszania się umiejętności komunikacyjnych oraz znacznego obniżania się zdolności radzenia sobie z czynnościami życia codziennego, co prowadzi do stopniowej utraty samodzielności. W badaniu neuropatologicznym mózgu chorych na AD najbardziej charakterystycznymi zmianami są: blaszki amyloidowe, zwyrodnienie włóknkowe, dystroficzne aksony oraz utrata neuronów i synaps [Blennow, de Leon, Zetterberg, 2006].

Choroba Alzheimerera jest najczęstszą przyczyną otępienia w społeczeństwach zachodnich. Szacuję się, że obecnie na świecie na otępienie choruje 35.6 milionów ludzi [Prince i Jackson, 2009]. Przewiduje się, że liczba osób dotkniętych otępieniem podwoi się w ciągu 20. lat [Qiu, Kivipelto, von Strauss, 2009]. Dane epidemiologiczne donoszą, że w USA około 5.4 miliona osób choruje na AD, w tej grupie około 5,2 miliona to osoby powyżej 65 roku życia, a około 200 tys. to osoby w wieku poniżej 65 roku życia [Alzheimer's Association Report, 2011 Alzheimer's Disease Facts and Figures].

Na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań szacuje się, że w Polsce objawy otępienia występują u około 500 tysięcy osób, z czego około 200 tysięcy to osoby chore na AD [Siuda i wsp., 2009; Talarowska i wsp., 2011]. W 1999 roku opublikowano wyniki badania rozpowszechnienia zespołu otępiennego w warszawskiej gminie Mokotów. Wśród 1000 losowo wybranych osób w wieku pomiędzy 65. a 84. rokiem życia przeprowadzono badanie MMSE (ang. *Mini-Mental State Examination*) u 893. osób. Stwierdzono, że zespół otępienny występuje u 1,9% osób w grupie wiekowej

65-69 lat, 5,8% osób w grupie 70 – 74 lata, 8,6% osób w grupie 75 – 79 lat i 16,5% osób w grupie 80 - 84 lata [Gabryelewicz, 1999].

1.2 Środowiskowe i genetyczne uwarunkowania choroby Alzheimera

Choroba Alzheimera posiada różnorodną etiologię i złożoną, wieloczynnikową patogenezę. Uważa się, że na rozwój AD mają wpływ zarówno czynniki środowiskowe i uwarunkowania genetyczne [Cutler i Mattson, 2006]. Do najważniejszych czynników ryzyka zalicza się: starszy wiek, przebyty uraz głowy, naczyniowe czynniki ryzyka, niski poziom wykształcenia, ograniczone kontakty społeczne w starszym wieku a także pracę o niskim poziomie skomplikowania zadań. Wśród czynników ryzyka wymienia się również czynniki zapalne i toksyczne oraz niestosowanie hormonoterapii zastępczej i małą aktywność fizyczną.

Biorąc pod uwagę wyniki badań epidemiologicznych dotyczących AD, które wykazują, że wraz z wiekiem wzrasta odsetek osób dotkniętych tą chorobą, można uznać wiek za czynnik ryzyka AD [Bachman i wsp., 1993]. Z prowadzonych badań wynika, że pomiędzy 65 a 85 rokiem życia zachorowalność na AD podwaja się co 5 lat [Ritchie i wsp., 2002]. Corrada i wsp. obserwowali 330 osób powyżej 90. roku życia oceniając u nich występowanie objawów zespołu otępiennego. Stwierdzono, że zapadalność na otępienie zwiększa się z wiekiem i wynosi 12,7% na rok w grupie wiekowej 90 – 94 lat, 21,2% w grupie 95-99 lat i 40,7% w grupie osób powyżej 100 roku życia [Corrada i wsp., 2010].

Badania dowodzą, że niski poziom wykształcenia, niski status ekonomiczny jak również mała aktywność społeczna zwiększają ryzyko zachorowania na AD. W jednym z badań przez 3 lata obserwowano 931 osób powyżej 75 roku życia, u których w chwili włączenia do badania nie stwierdzano otępienia. Po zakończeniu obserwacji u 101 badanych rozpoznano otępienie, w tym u 76 osób zdiagnozowano AD. W analizie jednoczynnikowej wykazano, że niski poziom wykształcenia i niski status socjoekonomiczny stanowią czynnik ryzyka AD, natomiast w łącznej analizie tych parametrów tylko niski poziom edukacji stanowił niezależny czynnik ryzyka

zachorowania na AD [Karp i wsp., 2004]. W innym badaniu Fratiglioni i wsp. obserwowali 1203 osoby przez 3 lata i stwierdzili, że ubogie życie społeczne zwiększa ryzyko zachorowani na otępienie o 60% [Fratiglioni i wsp., 2000].

Obserwacja 1740 badanych w wieku powyżej 65 lat wykazała, że regularna aktywność fizyczna jest czynnikiem, który opóźnia rozwój otępienia i AD. W czasie 6 lat obserwacji 158 osób zachorowało na otępienie, z czego AD zdiagnozowano u 107 badanych. W grupie osób, wykonujących ćwiczenia fizyczne 3 razy w tygodniu lub częściej otępienie występowało z częstością 13 na 1000 osobolat, podczas gdy w grupie badanych, którzy wykonywali ćwiczenia rzadziej niż 3 razy w tygodniu, 19,7 na 1000 osobolat. W grupie ograniczonej do chorych na AD uzyskano podobne wyniki [Larson i wsp., 2006; Rovio i wsp., 2005].

Liczne badania (epidemiologiczne, neuroobrazowe i neuropatologiczne) potwierdzają tezę, o korelacji między naczyniowymi czynnikami ryzyka a zwiększonym ryzykiem zachorowania na otępienie i AD. Dotyczy to palenia papierosów, otyłości, hipercholesterolemii, nadciśnienia tętniczego, cukrzycy, przebytego „niemego klinicznie” zawału mózgu czy zmian w istocie białej mózgu o typie leukoarajozy.

Pierwsze opublikowane badania dotyczące wpływu palenia papierosów na ryzyko wystąpienia otępienia wykazało około dwukrotnie niższy odsetek chorych na AD wśród osób palących papierosy [Fratiglioni i wsp., 2000]. Spowodowane to było najprawdopodobniej krótszym czasem przeżycia osób palących papierosy, co spowodowało mniejszą liczbę palaczy wśród badanych chorych na AD. W kolejnych badaniach, m.in. dużym badaniu populacyjnym *The Rotterdam Study*, w którym przez ponad 2 lata obserwowano 6870 osób powyżej 55 roku życia, stwierdzono że palacze papierosów mają znacznie większe ryzyko zachorowania na otępienie (OR=2,2, 95%CI: 1,3–3,6) i AD (OR=2,3, 05%CI: 1,3–4,1). Wykazano, że zależność ta dotyczy szczególnie osób nie będących nosicielami allelu $\epsilon 4$ genu apolipoproteiny E (*APOE*) [Ott i wsp., 1998]. Większe ryzyko zachorowania na AD oraz szybszy postęp narastania zaburzeń funkcji poznawczych w skali roku wykazano również w metaanalizie

opublikowanej w 2007 roku. Włączono do niej 19 badań, które łącznie objęły 26.374 uczestników, których obserwowano przez 2 do 30 lat [Anstey i wsp., 2007].

Badania dotyczące związku między spożywaniem alkoholu a ryzykiem otępienia wykazały, że nadużywanie alkoholu w średnim wieku dwukrotnie podnosi ryzyko zachorowania na otępienie i AD; zależność ta jest szczególnie silnie wyrażona u nosicieli allelu $\epsilon 4$ genu *APOE* [Anttila i wsp., 2004]. Natomiast w badaniu Huanga i wcześniej przytaczanym *The Rotterdam Study* stwierdzono, że niewielkie lub umiarkowane spożywanie alkoholu znamienne korelowało ze zmniejszeniem ryzyka wystąpienia otępienia [Huang i wsp., 2002; Ruitenberg i wsp., 2002].

Otyłość (BMI >30 kg/m²) w średnim wieku jest związana ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na otępienie, w tym na AD. W jednym z badań przez 21 lat obserwowano 1449 osób między 65 a 79 rokiem życia i wykazano, że otyłość w średnim wieku powoduje ponad dwukrotnie większe ryzyko zachorowania na otępienie (OR=2,4; 95%CI: 1,2-5,1). Stwierdzono również, że współwystępowanie innych naczyniowych czynników ryzyka takich jak nadciśnienie tętnicze i hipercholesterolemia potraja to ryzyko [Kivipelto i wsp., 2005]. Jednocześnie badania dowodzą korelacji między większą utratą masy ciała a następującym po niej wystąpieniem objawów AD w porównaniu do osób zdrowych [Buchman i wsp., 2005; Johnson i wsp., 2006]. Wyniki te potwierdza m.in. badanie porównawcze przeprowadzone u 15 osób z AD, 15 osób z rozpoznaniem łagodnych zaburzeń poznawczych (ang. *mild cognitive impairment* – *MCI*) oraz 15 osób zdrowych. Stwierdzony został istotnie niższy wskaźnik BMI u chorych na AD ($p=0,001$). Najbardziej prawdopodobną przyczyną utraty masy ciała są zmiany trybu życia spowodowane rozwojem choroby, jednak związek masy ciała z otępieniem nie jest do końca jasny [Ciobica i wsp., 2011].

W dużych kohortowych badaniach epidemiologicznych wielokrotnie badano wpływ wartości ciśnienia tętniczego skurczowego i rozkurczowego oraz stosowania leków przeciwnadciśnieniowych na rozwój otępienia. Wyniki tych badań wskazują, że wysokie wartości ciśnienia tętniczego krwi (przede wszystkim skurczowego) występujące w średnim wieku związane są ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na

otępienie [Launer i wsp., 2000; Kivipelto i wsp., 2001; Ciobica i wsp., 2011]. Jednakże część badań nie wykazała związku między podwyższonymi wartościami ciśnienia tętniczego krwi a ryzykiem rozwoju AD [Morris i wsp., 2001]. W niektórych ponadto badaniach stwierdzono odwrotną zależność [Guo i wsp., 1997; Qui i wsp., 2003].

Również badania oceniające związek między stosowaniem leków przeciwnadciśnieniowych a ryzykiem wystąpienia AD dostarczają niespójnych informacji. W jednym z badań nie stwierdzono, aby stosowanie blokerów kanałów wapniowych powodowało zmniejszenie ryzyka zachorowania na AD [Yasar i wsp., 2005]. Natomiast w badaniu *The Cache County Study* analizowano wpływ leczenia lekami przeciwnadciśnieniowymi (inhibitory konwertazy angiotensyny, beta-blokery, blokery kanałów wapniowych lub diuretyki) na ryzyko rozwoju AD i wykazano, że stosowanie jakichkolwiek leków obniżających ciśnienie tętnicze krwi zmniejsza istotnie ryzyko wystąpienia AD. Szczególnie korzystny wpływ stwierdzono w przypadku stosowania diuretyków oszczędzające potas [Khachaturian i wsp., 2006]. Wielokrotnie udokumentowano zależność między dłuższym czasem leczenia przeciwnadciśnieniowego a mniejszym ryzykiem zachorowania na AD [Peila i ws., 2006; Haag i wsp., 2009]. Według aktualnych poglądów ochronne działanie leków przeciwnadciśnieniowych polega na spowalnianiu rozwoju miażdżycy, korzystnym wpływie na przepływ mózgowy i zmniejszeniu nasilenia zmian naczyniopochodnych w mózgu [Qiu i wsp., 2005; Hoffman i wsp., 2009; Nagai i wsp., 2010].

Wykazano również, że związek między poziomem cholesterolu całkowitego we krwi a ryzykiem zachorowania na otępienie jest niejednoznaczny. Stwierdzono, że podniesiony poziom cholesterolu we krwi u osób w średnim wieku powoduje wzrost ryzyka zachorowania na otępienie i AD. Z drugiej jednak strony samoistne obniżanie się poziomu cholesterolu całkowitego we krwi u osób starszych może świadczyć o rozwijającej się chorobie, a nawet być markerem dla AD i otępienia [Solomon i wsp., 2007; Mielke i wsp., 2005]. Wyniki badań oceniających związek pomiędzy stosowaniem leków obniżających poziom lipidów we krwi z ryzykiem wystąpienia otępienia dostarczają sprzecznych informacji. Niektóre z prac donoszą o ochronnym działaniu statyn na rozwój AD [Rockwood i wsp., 2002; Jick i wsp., 2000]. Inne zaś nie

wykazują związku między stosowaniem statyn a rozwojem AD [Rea i wsp., 2005; Zandi i wsp., 2005].

W kilku badaniach wykazano, że cukrzyca jest czynnikiem ryzyka zarówno otępienia naczyniopochodnego, jak i otępienia o podłożu zwyrodnieniowym [Arvanitakis i wsp., 2004; Akomolafe i wsp., 2006; Irie i wsp., 2008; Biessels i wsp., 2006; Xu i wsp., 2007]. Przykładowo w badaniu Xu i wsp. stwierdzono, że zaburzenia metabolizmu glukozy już na wcześniejszym etapie (stan przedcukrzycowy) zwiększają ryzyko zachorowania na AD.

Choroby naczyniowe serca, mózgu i naczyń obwodowych zwiększają ryzyko wystąpienia AD, co wykazano w wielu badaniach. Przykładowo w 2003 roku opublikowano wyniki badania przeprowadzonego u 1766 osób bez otępienia w wieku powyżej 65 lat. Po 7 latach obserwacji zdiagnozowano zespół otępienny u 212 badanych, w tym AD stwierdzono u 181 osób. Wykazano, że ryzyko względne zachorowania na AD było 1,6 raza większe w grupie badanych z przebyłym udarem mózgu. Dodatkowo istotnie wzrastało w przypadku współwystępowania innych naczyniowych czynników ryzyka takich jak nadciśnienie tętnicze (OR= 2,3; 95%CI: 1,4-3,6), cukrzyca (OR=4,6; 95%CI: 2,2-9,5) czy choroby serca (OR=2,0; 95%CI: 1,2-3,2) [Honig i wsp., 2003].

Wiele badań prowadzonych wśród starszych pacjentów wykazało związek między podniesionym poziomem wskaźników zapalnych, na przykład hsCRP [Schimt i wsp., 2002], czy IL-1 i TNF- α [Tan i wsp., 2007], a większym ryzykiem zachorowania na AD.

Podczas gdy wpływ czynników zapalnych na ryzyko zachorowania na AD został udowodniony, to wyniki badań dotyczących ochronnego działania niesterydowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) nie są jednoznaczne. W 2004 roku opublikowano metaanalizę, w której wzięto pod uwagę 11 badań i stwierdzono, że NLPZ powodują zmniejszenie ryzyka zachorowania na AD [Szekely i wsp., 2004]. Natomiast dane uzyskane w dużym wielośrodkowym randomizowanym i kontrolowanym placebo

badaniu *Alzheimer's Disease Anti-Inflammatory Prevention Trial (ADAPT)* nie potwierdzają ochronnego działania NLPZ. Ponadto w badaniu tym wykazano, że stosowanie takiego leczenia powoduje większe ryzyko rozwoju AD [Martin i wsp., 2008].

U osób spożywających wodę z dużą zawartością aluminium ($\geq 0,1$ mg/dzień) stwierdzono istotne pogorszenie funkcji poznawczych [Rondeau i wsp., 2009].

Dane dotyczące wpływu hormonalnej terapii zastępczej (HTZ) podczas menopauzy na ryzyko wystąpienia otępienia są niejednoznaczne [Janicki i Schupf, 2010]. Niektóre badania nie potwierdzają takiego związku, podczas gdy inne wykazują, że jej stosowanie powoduje mniejsze ryzyko zachorowania na AD [Kawas i wsp., 1997; Zandi i wsp., 2002].

Również pod względem uwarunkowań genetycznych AD stanowi heterogenną jednostkę chorobową. Wykazano, że około 5 – 10% wszystkich chorych na AD to osoby z postacią rodzinną choroby o wczesnym początku, dziedziczną się autosomalnie dominująco. Resztę, czyli około 90 – 95 % chorych na AD, stanowią chorzy z postacią o późnym początku, która występuje najczęściej sporadycznie. W tych przypadkach zidentyfikowano istnienie tzw. genetycznych czynników ryzyka [Kowalska, 2009]. Postać AD o wczesnym początku i autosomalnie dominującym typie dziedziczenia w 50% przypadków związana jest z mutacjami w genie białka prekursora amyloidu (ang. *amyloid precursor protein, APP*), genie preseniliny 1 (ang. *Presenilin-1, PSEN1*) oraz genie preseniliny 2 (ang. *Presenilin-2, PSEN2*) [Kowalska i wsp., 2009].

Mutacje genu *APP* są odpowiedzialne za około 5% przypadków postaci rodzinnej (ang. *familial Alzheimer's disease – FAD*) o wczesnym początku [Van Broeckhoven, 1995]. U około 30 – 50% chorych z FAD stwierdzono mutacje w genie *PSEN1* [Campion, i wsp., 1995], a niewielki odsetek chorych na FAD o wczesnym początku to nosiciele mutacji w genie *PSEN2* (od 1 do około 5%) [Cruts i wsp., 1998; Kowalska, 2009]. W Polsce przebadano 40 chorych z rozpoznaniem FAD. Kryteriami włączenia było rozpoznanie AD o wczesnym początku u przynajmniej jednego krewnego pierwszego

stopnia i średni wiek zachorowania $52,8 \pm 8,2$ lat. Oceniano obecność mutacji w genach *APP*, *PSEN1* i *PSEN2* u zakwalifikowanych do badania chorych. U 17% uczestników badania wykryto mutacje w badanych genach: cztery mutacje w genie *PSEN1* (P117R, M139V, H163R i I213F), dwie w genie *APP* (T714A, V715A) oraz jedną nową mutację w genie *PSEN2* (Q228L) [Zekanowski i wsp., 2003]. Mutacje w genach *APP*, *PSEN1* i *PSEN2* mają niewielki lub żaden wpływ na ryzyko zachorowania na AD o późnym początku [Bertram i wsp., 2007; Harold i wsp., 2009].

Do niedawna jedynym udowodnionym genetycznym czynnikiem ryzyka AD o późnym początku było nosicielstwo przynajmniej jednego allelu $\epsilon 4$ genu *APOE*, a czynnikiem protekcyjnym allelu $\epsilon 2$ tego genu [Saunders i wsp., 1993; Corder i wsp., 1993; Schmechel i wsp., 1993; Strittmatter i wsp., 1993]. Polimorfizm *APOE* charakteryzuje 6 różnych wariantów genu zlokalizowanego na chromosomie 19. (19q13.31) [Seripa i wsp., 2009]: 3 homozygotyczne ($\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 4/\epsilon 4$) i 3 heterozygotyczne ($\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 4$). W zależności od kombinacji alleli powstają białka różniące się obecnością argininy lub cysteiny w pozycji odpowiednio 112 i 158 dając: izoformę *APOE* $\epsilon 2$ (cys112,cys158), *APOE* $\epsilon 3$ (cys112, arg158) oraz *APOE* $\epsilon 4$ (arg112, arg158) [Nickerson i wsp., 2000]. Obecność jednego allelu $\epsilon 4$ zwiększa 2-4 krotnie ryzyko wystąpienia AD o późnym początku i około 12-krotnie w przypadku homozygoty $\epsilon 4$ [Farrer i wsp., 1997; Bertram i wsp., 2007]. Białko *APOE* w organizmie uczestniczy w metabolizmie lipidów, głównie w transporcie i przemianach cholesterolu. Również w ośrodkowym układzie nerwowym najpewniej bierze udział w dystrybucji lipidów i rozpuszczalnych związków lipidowych pomiędzy komórkami mózgu i płynem mózgowo-rdzeniowym [Holtzman i wsp., 2012].

Patomechanizm odpowiedzialny za zwiększanie ryzyka zachorowania na AD przez *APOE* nie jest w pełni znany [Poirer i wsp., 2008]. Obecnie wyniki badań sugerują, że rola *APOE* w rozwoju AD polega głównie na jego wpływie na metabolizm i dystrybucję $A\beta$ [Kim i wsp., 2009]. Po wyprodukowaniu w mózgu przez astrocyty i mikroglej *APOE* podlega procesowi lipidacji, a następnie po połączeniu z $A\beta$, w zależności od izoformy, powoduje jego odkładanie w postaci plak amyloidowych lub

dystrybucję do płynu mózgowo-rdzeniowego. Badania wykazują, że APOE może nasilać zdolności mikrogleju i astrocytów do uprzątnięcia A β [Jiang i wsp., 2008], a także kontrolować transport A β przez barierę krew-mózg [Bell i wsp., 2007]. Uważa się również, że APOE wpływa na inne procesy potencjalnie związane z rozwojem AD takie jak: przekąźnictwo synaptyczne, neuroplastyczność, neurotoksyczność, hiperfosforylacja białka tau oraz procesy zapalne w centralnym systemie nerwowym [Holtzman i wsp., 2012]. Mechanizm ten jest obecnie wykorzystywany w badanych lekach na AD. Opublikowane ostatnio w *Science* wyniki badania oceniającego skuteczność bexarotenu, który jest agonistą RXRs (ang. *retinoid X receptors*) – czynników transkrypcyjnych biorących udział w ekspresji APOE. Na modelu zwierzęcym AD wykazano, że doustna podaż tej substancji powoduje zwiększone usuwanie rozpuszczalnej formy A β oraz zmniejszenie się rozmiaru plak amyloidowych i nasilenia deficytów funkcji poznawczych [Cramer i wsp., 2012].

Wykonano wiele badań, w których stwierdzono możliwy wpływ różnych wariantów genetycznych w ponad 500 różnych genach na ryzyko wystąpienia AD o późnym początku [Hollingworth i wsp., 2011]. W większości, wpływ poszczególnych wariantów na ryzyko choroby jest minimalny. Z tego wynika przekonanie, że wystąpienie choroby może być skutkiem współdziałania wielu wariantów ryzyka o niskiej penetracji [Avramopoulos 2009; Bertram i Tanzi 2009].

Poszukiwania genetycznych czynników ryzyka AD o późnym początku umożliwiają trzy metody: analiza znaczenia wybranych genów kandydatów (ang. *candidate gene approach*), analiza sprzężeń (ang. *linkage analysis*) i przeszukiwanie całego genomu w celu wykrycia wariantów ryzyka (ang. *genome-wide association study, GWAS*). Ta ostatnia metoda dzięki rozwojowi technologii ma od niedawna coraz większe zastosowanie i umożliwia równoczesną analizę milionów wariantów genetycznych [Barrett i Cardon, 2006; Pe'er i wsp., 2006]. W 2010 roku przeprowadzono metaanalizę czterech badań GWAS dotyczących AD [Seshadri i wsp., 2010]. Wykazano wpływ czterech, oprócz APOE, wariantów genetycznych na ryzyko rozwoju AD o późnym początku: *CLU* (na chromosomie 8), *CRI* (na chromosomie 1), *PICALM* (na

chromosomie 11) i *BINI* [Harold i wsp., 2009; Lambert i wsp., 2009; Ling i wsp., 2012]. Aktualne informacje dotyczące genów będących potencjalnymi czynnikami ryzyka AD są zamieszczane w internetowej bazie danych: www.alzgene.org.

W badaniach genetycznych w populacji polskiej wykazano, że polimorfizmy genów, wcześniej określone jako potencjalny czynnik ryzyka AD w innych populacjach, nie mają związku z ryzykiem zachorowania na AD w omawianej populacji. Sytuacja taka dotyczy m.in.: genu *alfa2-makroglobuliny* [Styczyńska i wsp., 2001.], genu *MTHFR* [Religa i wsp., 2003], genu *saitohin (STH)* [Pepłońska i wsp., 2003], genu *interleukiny-1 (-511 CT)* [Klimkowicz- Mrowiec i wsp., 2009] i *interleukiny-6 (-174C/G)* [Klimkowicz-Mrowiec i wsp., 2010], genu *CYP46* [Golanska i wsp., 2005], genu *PINI* [Maruszak i wsp., 2009], genu *PON1* i *PON2* [Klimkowicz- Mrowiec i wsp., 2011], genu *PS1* i *PS2* [Gacia i wsp., 2008; Żekanowski i wsp., 2005; Kowalska i wsp., 2004; Żekanowski i wsp., 2004]. Potwierdzono natomiast związek polimorfizmu *APOE* z ryzykiem wystąpienia AD [Kowalska i wsp., 1998; Styczyńska i wsp., 2003] oraz polimorfizmów genów: *PRNP* i *PRND* [Golańska i wsp., 2004.], *MI29V* [Gacia i wsp., 2006], *UBQLN1* [Golan i wsp., 2008.], *NPCI* [Erickson i wsp., 2008] oraz genu *APBB2* [Golańska i wsp., 2008].

1.3 Etiopatogeneza choroby Alzheimera

Nie jest do końca znana etiopatogeneza AD. Wiadomo, że w mózgu chorych na AD obecne są dwa białka patologiczne: β -amyloid ($A\beta$) oraz hiperfosforylowane białko tau, które powodują zanik neuronów i upośledzenie ich funkcji. Proces ich powstawania najlepiej tłumaczy hipoteza kaskady amyloidowej zaproponowana na początku lat dziewięćdziesiątych [Hardy i Higgins, 1992; Selkoe, 1991]. Z amyloidogenezą współlistnieją inne procesy patologiczne, takie jak stres oksydacyjny, przewlekły proces zapalny, zaburzenia kanałów jonowych i zaburzenia neurotransmisji (hipoteza cholinergiczna).

1.3.1 Hipoteza kaskady amyloidowej

Od czasu pierwszego opisu otępienia starczego przez Aloisa Alzheimerera w 1907 roku [Jarvik i Greenson, 1987] blaszki amyloidowe (ang. *amyloid plaques*) i zwyrodnienie włóknkowe neuronów typu Alzheimerera (ang. *neurofibrillary tangles, NFTs*) stanowią charakterystyczne zmiany patomorfologiczne występujące w AD [Newell i wsp., 1999]. Zgodnie z hipotezą kaskady amyloidowej odkładanie się w mózgu nierozpuszczalnych i opornych na proteolizę złogów peptydu A β jest początkowym procesem prowadzącym do zwyrodnienia włóknkowego, utraty neuronów i, w konsekwencji, otępienia. Do sformułowania hipotezy kaskady amyloidowej doprowadziły dwie kluczowe obserwacje. Po pierwsze odkrycie, iż to A β stanowi główny składnik blaszek amyloidowych [Glennner i Wong, 1984] oraz, po drugie, odkrycie mutacji w genach *APP* [Goate i wsp., 1991], *PSEN1* i *PSEN2* [Levy-Lahad i wsp., 1995; Sherrington i wsp., 1995] u rodzin, w których występowała AD o wczesnym początku. Powyższe obserwacje doprowadziły do zinterpretowania obecności A β w blaszkach amyloidowych jako efektu tych mutacji, prowadzącego w konsekwencji do śmierci neuronów i otępienia.

β -amyloid powstaje w wyniku proteolizy β APP, które jest białkiem syntetyzowanym we wszystkich typach tkanek. Cząsteczka APP podlega licznym procesom obróbki, między innymi serii specyficznych cięć przy pomocy proteaz zwanych sekretazami (α -, β -, γ -, ϵ - sekretazy). Za powstawanie neurotoksycznego A β odpowiedzialne są β - i γ -sekretazy [Haass i wsp., 2012; De Strooper, 2012].

W postaci rodzinnej AD przyczyną nieprawidłowego metabolizmu APP może być występowanie mutacji w genach *APP* oraz w genach *PSEN1* i *PSEN2* kodujących białka odpowiedzialne za aktywność sekretaz. W genie *APP* wykryto do tej pory 32 mutacje, które zidentyfikowano w 86 rodzinach [Abe i wsp., 2012]. Występują one w eksonach 16 i 17 genu *APP* kodujących region β -amyloidu w pobliżu miejsc rozpoznawanych przez sekretazy, co potwierdza ich znaczenie w procesie powstawania A β . Mutację K/M670/671N/L stwierdzono w pobliżu miejsca cięcia APP przez β -sekretazę (Met671) [Mullan i wsp., 1992]. W pobliżu miejsca rozpoznawanego przez

α -sekretazę (Lys687) wykryto mutację A692G [Hendriks i wsp., 1992] i E693G [Nilsberth i wsp., 2001]. Najwięcej mutacji wykryto w regionie działania γ -sekretaży (Ile712 oraz Thr714) np. V715A, V715M, I716V, I716T, V717I, V717F, V717G, V717L [Kowalska, 2004].

Znaczna większość wykrytych mutacji zaburza proces endoproteolizy APP prowadząc do wzrostu produkcji $A\beta$, a zwłaszcza amyloidogennego $A\beta_{42}$ [Citron i wsp., 1992]. Wykazano, że podwójna mutacja K/M670/671N/L zwiększa 10-krotnie produkcję zarówno $A\beta_{42}$, jak i $A\beta_{40}$ [Kowalska, 2004]. Wpływ na wzrost produkcji $A\beta$, poprzez oddziaływanie na aktywność sekretaz, mają preseniliny biorące udział w przekazywaniu sygnałów w różnych szlakach komórkowych, m.in. Notch, WNT/ β -kateniny oraz wchodzące w skład centrum katalitycznego odpowiedzialnego za aktywność γ -sekretaży. Mutacje presenilin, których wykryto już 178 w genie *PSEN1* u 392 rodzin i 14 w genie *PSEN2* u 23 rodzin [Abe i wsp., 2012], poprzez subtelne zmiany konformacyjne mogą zaburzać wzajemne oddziaływania białek [Esler i wsp., 2002] powodując wzmożoną produkcję $A\beta_{42}$ [De Strooper i wsp., 1998; Chavez-Gutierrez i wsp., 2012].

Podczas gdy rola $A\beta$ nie budzi wątpliwości w patogenezie przypadków rodzinnych AD, to nie jest ona tak jednoznaczna w przypadkach sporadycznych AD [Reitz, 2012], w których etiopatogeneza jest słabiej poznana i najprawdopodobniej oparta na współdziałaniu wielu czynników zarówno genetycznych (np. wariant $\epsilon 4$ genu *APOE*), jak i niegenetycznych (np. wpływ hormonów, patologia mikrokrążenia). Wśród przesłanek przemawiających przeciwko hipotezie kaskady amyloidowej na szczególną uwagę zasługują dwie: po pierwsze możliwość, że blaszki amyloidowe i zwyrodnienie włóknkowe są efektem neurodegeneracji, a nie jej przyczyną oraz, po drugie, nie jest oczywiste czy i w jaki sposób złogi $A\beta$ prowadzą do powstawania zwyrodnienia włóknkowego.

U osób po urazie głowy stwierdzono obecność $A\beta$ o podobnej dystrybucji jak w AD [Gentleman i wsp., 1993], co sugeruje, że zwiększona ekspresja APP jest reakcją na uszkodzenie neuronów [Roberts i wsp., 1994], prowadzącą do większego odkładania się

A β . W związku z tym zaproponowano rozwiązanie, według którego w AD zwiększona produkcja APP może być reakcją na proces chorobowy. Celem tejże produkcji wydaje się być podtrzymanie funkcji neuronów i ich przeżycie [Regland i wsp., 1992].

1.3.2 Hipoteza dysfunkcji cholinergicznej

W procesie rozwoju AD dysfunkcja układu cholinergicznego jest uważana za jedno z pierwszych zjawisk zwiastujących rozwój choroby. W procesie tym dochodzi do zaniku i zaburzenia funkcji neuronów cholinergicznym w przodomózgowiu oraz zmniejszenia aktywności acetylotransferazy (ChAT) i acetylocholinesterazy (AChE) w mózgu chorych na AD [Auld i wsp., 2002]. Ponadto udokumentowano zmniejszone uwalnianie acetylocholin, jej zwiększony wychwyty oraz upośledzone wiązanie z receptorami nikotynowymi i, w mniejszym stopniu, muskarynowym [Teaktong i wsp., 2004; Warpman, Nordberg, 1995; Nordberg, 1994; Nordberg i wsp., 1995].

1.3.3 Dysfunkcja synaps

Już na wczesnym etapie rozwoju AD, nawet przed powstaniem plak amyloidowych, stwierdza się zmniejszenie ilości synaps i upośledzenie ich funkcji [Walsh i wsp., 2004]. Obecnie uważa się, że dysfunkcja synaps jest wynikiem toksycznego działania A β , którego oligomery wykazują szczególnie silne powinowactwo do zakończeń synaptycznych neuronów hipokampa [Lacor i wsp., 2004]. W badaniach przeprowadzonych na myszach transgenicznym stwierdzono znamienne spadki ilości zakończeń presynaptycznych korelujący ze wzrostem rozpuszczalnych form A β , które następnie odkładają się w postaci plak amyloidowych [Mucke i wsp., 2000].

1.3.4 Zaburzenia homeostazy cholesterolu

W procesie rozwoju AD zwiększony poziom cholesterolu wpływa na produkcję oraz odkładanie A β w postaci plak amyloidowych [Reiss i wsp., 2004], czego potwierdzeniem jest również obecność APOE i cholesterolu w klasycznych blaszkach amyloidowych [Burns i wsp., 2003]. W badaniach na myszach transgenicznym potwierdzono związek pomiędzy dietą bogatą w tłuszcze a wysoką zawartością A β [Refolo i wsp., 2001]. Wykazano również, że cholesterol ma związek ze zdolnością wiązania A β z błonami komórkowymi i jego cytotoksycznością [Subasinghe i wsp., 2003]. Niektóre badania dowodzą, że to A β może indukować powstawanie cytotoksycznych metabolitów cholesterolu, co sprzyja oksydacji cholesterolu do 7 β -hydroksycholesterolu, który ma działanie proapoptyczne [Nelson i wsp., 2005]. Potwierdzonym naukowo jest fakt, iż głównym czynnikiem wpływającym na homeostazę cholesterolu w układzie nerwowym jest APOE; wykazano ponadto, że izoforma ϵ 4 charakteryzuje się większą tendencją do wiązania z A β niż ϵ 3 [Puglielli i wsp., 2003]. Cholesterol znajdujący się w centralnym systemie nerwowym jest produkowany głównie przez komórki glejowe a jego metabolizm jest regulowany niezależnie od tkanek obwodowych. Produktami oksydacji łańcucha bocznego cholesterolu są oksysterole, które mogą być transportowane przez barierę krew-mózg. W neuronach przy pomocy enzymu cytochromu P-450 (CYP46A1) powstaje 24-hydroksycholesterol, który po przekroczeniu bariery krew-mózg jest dalej metabolizowany w wątrobie, natomiast w tkankach obwodowych eliminacja cholesterolu odbywa się poprzez oksydację do 27-hydroksycholesterolu przez enzym CYP27A1 [Vaya i Schipper, 2007]. Ponieważ neurony są głównym źródłem 24-hydroksycholesterolu to jego poziom w surowicy odzwierciedla liczbę aktywnych metabolicznie komórek nerwowych w mózgu. W chorobach neurodegeneracyjnych stwierdzono obniżony poziom 24-hydroksycholesterolu w surowicy [Björkhem i wsp., 2009]. Mniej niż 1% 24-hydroksycholesterolu trafia do płynu mózgowo-rdzeniowego, gdzie jego poziom koreluje z uszkodzeniem neuronów i ich utratą. W płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z chorobami neurodegeneracyjnymi np. AD stwierdzono podwyższony poziom tego oksysterolu. Powstający w tkankach obwodowych

27-hydroksycholesterol jest transportowany do centralnego systemu nerwowego. U pacjentów chorych na AD stwierdzono podwyższone wartości 27-hydroksycholesterolu w płynie mózgowo-rdzeniowym i uważa się, że może on stanowić połączenie pomiędzy hipercholesterolemią i AD [Leoni i Caccia, 2011].

1.3.5 Zaburzenia homeostazy jonów wapnia

Wyniki badań wskazują, że jony wapnia uczestniczą w procesie uszkodzania synaps i neuronów w AD. Stwierdzono przykładowo, że zaburzenia homeostazy jonów wapnia występują u chorych na sporadyczną i rodzinną postać AD oraz u myszy transgeniczných, co może mieć znaczenie w patogenezie AD [Eckert i wsp., 2001]. W innym badaniu Xiao i wsp. wykazali, że neurony zawierające zwyrodnienie włóknikowe charakteryzuje się podniesionym poziomem jonów wapnia oraz proteaz wapnio-zależnych i kinaz aktywowanych wapniem [Xiao i wsp., 1996]. Wyniki badań dowodzą również, że mutacje w genach *PSEN* skutkują zwiększoną wrażliwością neuronów na działanie A β , apoptozę oraz na ekscytotoksyczność. Procesy te związane są z zaburzeniami homeostazy wapniowej w siateczce endoplazmatycznej oraz aktywacją enzymów biorących udział w gospodarce wapniowej (kalpaina, kaspaza-12) [Chan i wsp., 2002]. Ponadto stwierdzono, że w ich przebiegu dochodzi do zmiany w receptorach rianodynowych [Chan i wsp., 2000] a także w działaniu białka Herp, stabilizującego homeostazę wapniową w siateczce endoplazmatycznej [Chan i wsp., 2004]. Uważa się również, że w AD z jednej strony zaburzenia wewnątrzneuronalnej gospodarki jonów wapnia mogą powodować wzrost syntezy A β 42 [Gabuzda i wsp., 1994], a z drugiej A β powoduje aktywację stresu oksydacyjnego, co prowadzi do zaburzeń homeostazy jonów wapnia [Mattson i wsp., 2003].

1.3.6 Zaburzenia funkcji mitochondriów i siateczki endoplazmatycznej

Dotychczas uzyskane dane dowodzą, że gospodarka energetyczna mózgu chorych na AD jest wyraźnie zaburzona, a dysfunkcja mitochondriów odgrywa bardzo ważną rolę w procesie rozwoju tej choroby [Hansson i wsp., 2004]. Z jednej strony A β może powodować wzmożoną produkcję wolnych rodników, który to mechanizm może uszkadzać mitochondria [Arias i wsp., 2002], a z drugiej strony zaburzenia metabolizmu w mitochondriach mogą indukować amyloidogenny szlak obróbki β APP [Gabuzda i wsp., 1994]. Mitochondria pozostają w ścisłym związku z siateczką endoplazmatyczną pod względem położenia i funkcji. Niektóre badania wskazują na związek pomiędzy śmiercią neuronów u chorych na AD a uszkodzeniem siateczki endoplazmatycznej [Boya i wsp., 2002]. Stwierdzono, że osoby posiadające mutacje w genach *PSEN1* i *PSEN2* mają osłabioną tzw. odpowiedź na nieprawidłowo złożone białka (UPR, ang.: *Unfolded Protein Response*), która stanowi jeden z mechanizmów obronnych wobec czynników uszkadzających siateczkę endoplazmatyczną. W wyniku tego w siateczce endoplazmatycznej gromadzą się nieprawidłowo złożone białka [Paschen i wsp., 2003].

1.3.7 Rola apoptozy

Na podstawie badań uważa się, że część neuronów u chorych na AD obumiera na drodze apoptozy, czego potwierdzeniem jest: obecność pofragmentowanego DNA w mózgach pacjentów [Shimohama, 2000], obecność aktywowanych form kaspazy-3, -8, i -9 [Yuan i wsp., 2000] oraz zmiana ekspresji genów związanych ze śmiercią komórkową takich jak Bcl-2 [Mattson, 2000]. Za jeden z czynników indukujących śmierć neuronów na drodze apoptozy uważa się A β . W kilku badaniach wykazano, że A β aktywuje wewnątrz- i zewnątrzpochodne ścieżki apoptozy, w których uczestniczą mitochondria, siateczka endoplazmatyczna oraz transbłonowy układ sygnalizacyjny [Aly i wsp., 2004; Nakagawa i wsp., 2000; Agostinho i wsp., 2003; Li i wsp., 2004]. Uważa się, że A β może indukować apoptozę poprzez wzrost wewnątrzkomórkowego

stężenia jonów wapnia i aktywację kalpajny [Boland i wsp., 2003], aktywację kinaz wpływających na ekspresję genów apoptozy [Troy i wsp., 2001], aktywację kaspazy-3 przez wiązanie A β do zewnątrzkomórkowej domeny receptora p75NTR [Hashimoto i wsp., 2004], a także przez zwiększenie liczby kanałów chlorkowych (CLIC1) i wzrost ich przepuszczalności [Novarino i wsp., 2004]. Jednocześnie stwierdzono, że apoptoza stymuluje procesy sprzyjające powstawaniu patologicznych złogów A β [Gervais i wsp., 1999].

1.3.8 Rola procesów zapalnych

W niektórych badaniach epidemiologicznych stwierdzono zmniejszenie ryzyka zachorowania na AD dzięki przewlekłemu stosowaniu NLPZ [Stewart i wsp., 1997]. Ustalono także, że komórki mikrogleju pozostające w związku z plakami wykazują nadekspresję prozapalnych receptorów oraz białek powierzchniowych, a w sąsiedztwie plak amyloidowych stwierdzono również podniesiony poziom białek ostrej fazy (białka P, białka c-reaktywnego) oraz inhibitorów proteaz (α 1-antychymotrypsyny, α 1-antytrypsyny), które są wskaźnikami aktywnego procesu zapalnego [Tuppo i wsp., 2005; Bamberger i wsp., 2002]. Stwierdzono również, że fibrylarna postać A β indukuje syntezę i uwalnianie przez mikroglej prozapalnych cytokin (IL-1, IL-6, TNF- α) oraz chemokin [Yates i wsp., 2000].

1.4 Stres oksydacyjny. Definicja, mechanizmy i wpływ na układ nerwowy.

Stres oksydacyjny jest to stan nierównowagi pomiędzy nasileniem reakcji prowadzących do generacji reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species* – ROS), a reakcjami związanymi z ich usuwaniem. Stres oksydacyjny spowodowany przez reaktywne formy tlenu jest powiązany z procesem starzenia się oraz z licznymi chorobami związanymi z wiekiem [Harman, 1956; Andersen, 2004]. Reaktywne formy

tłenu są produktami kolejnych stopni reakcji redukcji cząsteczki tlenu i powstają w wyniku jej niepełnego przebiegu. Do form tych należą rodniki tlenowe (tlen singletowy, ozon, anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy, rodnik nadtlenkowy) i nadtlenek wodoru. Z powodu obecności niesparowanych elektronów rodniki są bardzo nietrwałe i wysoce reaktywne. Dążąc do sparowania elektronów zabierają elektrony innym cząsteczkom przekształcając je w wolne rodniki [Chauhan, 2006]. Reaktywne formy tlenu są zarówno szkodliwe, jak i korzystne dla organizmów. Stanowią one integralny składnik przekazywania komórkowego i są kluczowe dla prawidłowego wzrostu i metabolizmu [Finkel i Holbrook, 2000]. Fakt ten tłumaczy niewielki poziom stresu oksydacyjnego w komórkach, który jest niezbędny i utrzymywany przy pomocy mechanizmów systemu antyoksydacyjnego takich jak katalaza (CAT) czy dysmutaza nadtlenkowa (SOD) [Genestra, 2007; Andreyev i wsp., 2005].

Do mechanizmów obronnych przeciwko wolnym rodnikom zalicza się niedopuszczenie do reakcji wolnych rodników i ich pochodnych z substancjami biologicznymi, mechanizmy naprawcze, czyli przerwanie wolnorodnikowych i nierodnikowych reakcji oksydacji, jak również mechanizmy usuwające produkty reakcji wolnych rodników pochodnych wraz z ich pochodnymi [Mangialasche i wsp., 2009].

System antyoksydacyjny (ang. *antioxidant defense system* – ADS) człowieka tworzą endo- i egzogenne substancje, które hamują tworzenie wolnych rodników lub powodują ich przemianę w nieaktywne pochodne. Niektóre z tych substancji mają właściwości enzymatyczne. Najważniejsze z nich to: dysmutazy nadtlenkowe, CAT i peroksydaza glutationu-1 (GPx-1). Inne znane enzymy ADS to także: inne selenoproteiny, reduktaza glutationu, a także tioredoksyny. Do substancji tworzących ADS należą również białka osocza krwi, które wiążąc jony metali przejściowych zmniejszają nasilenie reakcji prowadzących do powstawania wolnych rodników, np. albumina, ferrytyna, transferyna, ceruloplazmina. Pozostałe substancje tworzące ADS to antyoksydanty egzogenne, np. witamina E, witamina C, beta-karoten [Augustyniak, 2004].

Enzymy antyoksydacyjne metabolizują wolne rodniki lub produkty pośrednie (np. H_2O_2) do mniej toksycznych lub nietoksycznych produktów. Dysmutazy nadtlenkowe to enzymy odpowiedzialne za detoksyfikację wolnych rodników ponadtlenkowych ($2O_2^{\circ} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$). Wyróżnia się trzy izoformy dysmutazy nadtlenkowej (SOD): CuZnSOD, MnSOD i EC-SOD (*ang. extra cellular SOD*). Pierwsza izoforma występuje w cytoplazmie, druga w mitochondriach, podczas gdy trzecia pozakomórkowo. Peroksydaza glutationu-1 jest to enzym, który katalizuje reakcje usuwania nadtlenków organicznych i nieorganicznych z ustroju za pomocą glutationu ($H_2O_2 + GPX = 2H_2O + GSSG$). Pełni ona także rolę białka magazynującego selen (30% całej puli tego pierwiastka w organizmie zawarte jest w GPx-1). Katalaza jest obecna głównie w peroksysomach. Jest zbudowana z czterech identycznych podjednostek. Każda z nich zawiera w centrum aktywnym grupę hemową oraz cząsteczkę NADPH. Wykazuje ona dwie aktywności: katalazową i peroksydazową. Przy dużym stężeniu nadtlenku wodoru jej główną funkcją jest aktywność katalazowa ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$), natomiast przy małym stężeniu aktywność peroksydazowa, której substratami są związki o charakterze donorów wodoru, np. etanol, metanol, fenol i inne [Lewiński i Sewerynek, 2000].

Aktualnie uważa się, że stres oksydacyjny stanowi istotny element etiopatogenezy AD, a powstawanie plak amyloidowych może być zarówno jego przyczyną, jak i konsekwencją [Murakami i wsp., 2011]. Dotychczasowe badania na temat stresu oksydacyjnego w AD skupiały się głównie na ocenie znaczenia wolnych rodników w patomechanizmie tej choroby. Nie rozstrzygnięto jak dotąd czy nadprodukcja wolnych rodników i, w konsekwencji, nadmierna oksydacja białek, DNA i lipidów jest główną przyczyną stresu oksydacyjnego w tej chorobie, czy też stres ten jest wynikiem upośledzenia funkcji systemu antyoksydacyjnego lub obu tych mechanizmów równocześnie [Gałęcka i wsp., 2008].

Skutkiem stresu oksydacyjnego jest niekorzystna dla organizmu nadprodukcja wolnych rodników, które są odpowiedzialne za peroksydację lipidów, oksydację białek i DNA. Mózg jest szczególnie narażony na te modyfikacje oksydacyjne [Albarracin i wsp.,

2012]. Wynika to z dużego zużycia tlenu, dużej zawartości wolnych kwasów tłuszczowych, szczególnie narażonych na peroksydację, oraz stosunkowo niewielkiej zawartości enzymów antyoksydacyjnych [Valko i wsp., 2007; Floyd i Hensley, 2002; Beta i wsp., 1997]. Centralny system nerwowy jest szczególnie wrażliwy na oksydację także ze względu na wysoką zawartość metali (Ca, Fe, Zn, Mn oraz Cu) i askorbinianów, które mają działanie prooksydacyjne i katalizują łatwo wolne rodniki tlenowe [Zarkovic, 2003]. Ponadto metabolizm mózgu jest oparty na utlenianiu glukozy w mitochondriach w cyklu Krebsa i łańcuchu oddechowym [Vaishnavi i wsp., 201]. 90-98% reaktywnych form tlenu jest redukowanych przez łańcuch oddechowy w trakcie metabolizmu tlenowego [Skulachev, 1998]. Szacuje się, że około 2% tlenu zużywane podczas metabolizmu tlenowego jest przekształcanych do anionorodnika ponadtlenkowego. Procent ten wzrasta w uszkodzonych i starych mitochondriach [Liu i wsp., 2002; Grivennikova i wsp., 2006; Muller i wsp., 2004].

Stres oksydacyjny uszkadza elementy komórki powodując zmiany właściwości błony komórkowej, takich jak przepuszczalność, transport jonów, aktywność enzymów w konsekwencji prowadząc do śmierci komórki [Bandopadhyay, 1999].

Hipoteza, według której neurodegeneracja jest spowodowana stresem oksydacyjnym proponuje wyjaśnienie, według którego nadmiar wolnych rodników prowadzi do śmierci komórki nerwowej poprzez kumulację uszkodzeń w mitochondriach [Albarracin i wsp., 2012]. Uważa się, że uszkodzenie mitochondrialnego DNA i białek prowadzi do dwóch szkodliwych efektów: zwiększa uwalnianie reaktywnych form tlenu w mitochondriach i zmniejsza syntezę ATP [Jellinger, 2003]. To upośledzenie metabolizmu energetycznego mitochondriów prowadzi do zmniejszenia poziomu ATP, zaburzenia potencjału błonowego i zachwiania równowagi wapniowej [Annunziato i wsp., 2003]. Mitochondria mają dużą zdolność do sekwestrowania wapnia, co jest kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania neuronów [Babcock i Hille, 1998; Rizzuto i wsp., 2000; Nicholls, 2002]. W wielu chorobach neurodegeneracyjnych (AD, choroba Parkinsona, choroba Huntingtona i stwardnienie zanikowe boczne) obserwowano zaburzenia równowagi wapniowej, wysokie poziomy reaktywnych form tlenu, mutacje mitochondrialnego DNA i obniżenie funkcjonowania łańcucha oddechowego

[Swerdlow i Khan, 2009; Banerjee i wsp., 2009; Esteves i wsp., 2008; Almeida i wsp., 2008; Petri i wsp., 2006; Dupuis i wsp., 2004]. Nadmierna aktywacja receptorów NMDA, spowodowana zwiększonym poziomem zewnątrzkomórkowego glutaminianu, może prowadzić do zaburzeń homeostazy wapniowej, co skutkuje śmiercią neuronów w chorobach degeneracyjnych w mechanizmie ekscytotoksyczności [Hardingham, 2009]. W procesie tym dochodzi do otwarcia niespecyficznych kanałów białkowych w błonie mitochondrialnej (ang. *MTP - mitochondrial transition pore*) w skutek przeładowania wapniem, szczególnie w obecności stresu oksydacyjnego, niedoboru energetycznego i depolaryzacji błony mitochondrialnej [Mancuso i wsp., 2006]. Przez otwarte kanały swobodnie przechodzą cząsteczki o rozmiarach do 1,5 kDa, co, poprzez wzrost ciśnienia osmotycznego, prowadzi do obrzęku mitochondriów i przerwania ciągłości błony zewnętrznej. Dochodzi do uwolnienia do cytozolu proapoptycznych białek takich jak cytochrom c, co skutkuje aktywacją kaskady kaspaz prowadzącą do apoptozy [Valko i wsp., 2007; Martinou i Green, 2001; Hengartner, 2000]. Ostatnio stwierdzono, że czynnik transkrypcyjny Nrf2 (ang. *NF - E2- related factor 2*) chroni neurony przed podwyższonym poziomem wewnątrzkomórkowego wapnia, stresem oksydacyjnym i dysfunkcją mitochondriów. Nrf2 bierze udział w aktywacji mechanizmów antyoksydacyjnych takich jak ekspresja zmiataczy wolnych rodników i enzymów cytoprotekcyjnych [Scapagnini i wsp., 2011]. Wykazano ponadto zmniejszenie ekspresji Nrf2 w chorobach neurodegeneracyjnych i ochronny wpływ jego nadekspresji na śmierć komórek i procesy neurodegeneracyjne [Scapagnini i wsp., 2011; De Vries i wsp., 2008].

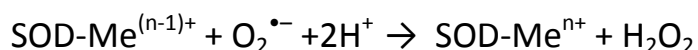
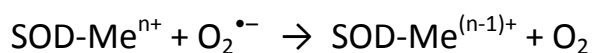
Wiadomo, że w chorobach neurodegeneracyjnych obserwuje się śmierć neuronów. Nie jest jednak do końca rozstrzygnięte czy dochodzi do tego na drodze apoptozy czy nekrozy [Raina i wsp., 2001; Perry i wsp., 1998; Zhu i wsp., 2006]. Zwykle system antyoksydacyjny jest na tyle sprawny, że jest w stanie obronić organizm przed niekorzystnymi efektami nadprodukcji wolnych rodników. Niestety wraz z wiekiem wydolność tego systemu się zmniejsza i w warunkach podwyższonego stresu oksydacyjnego powstaje nadmiar wolnych rodników, które u niektórych osób sprzyjają

powstawaniu chorób związanych z wiekiem, np. chorób zwyrodnieniowych czy chorób naczyniowych mózgu lub nowotworów [Lin i Beal, 2006].

1.5 Enzymy systemu antyoksydacyjnego: Peroksydaza glutationu-1 i dysmutazy ponadtlenkowe SOD1 i SOD2.

1.5.1 Dysmutazy ponadtlenkowe SOD1 i SOD2

W 1969 roku po raz pierwszy opisano dysmutazy ponadtlenkowe, które stanowią istotny element komórkowego i pozakomórkowego systemu antyoksydacyjnego [McCord i Fridovich, 1969]. Dysmutazy ponadtlenkowe należą do klasy oksydoreduktaz i są metaloenzymami będącymi produktami aktywności różnych genów. U człowieka zidentyfikowano trzy izoformy tego enzymu: cynkowo-miedziowa dysmutaza ponadtlenkowa (Cu-ZnSOD, SOD1), manganowa dysmutaza ponadtlenkowa (MnSOD, SOD2) oraz zewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa (EC-SOD, SOD3) [Skólmowska i Kmiec, 2011]. Działanie tego enzymu polega na katalizowaniu reakcji dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru i wody [Wójcicka i Bełtowski, 2001]. Reakcja ta jest dwuetapowa: pierwszy etap to redukcja jonu metalu z jednoczesnym uwolnieniem cząsteczki tlenu, drugi etap stanowi utlenienie jonu metalu przy udziale anionorodnika ponadtlenkowego i wodoru z nadtlaniem wodoru jako produktem [Culotta i wsp., 2006].



Gen cynkowo-miedziowej dysmutazy ponadtlenkowej jest zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 21 w pozycji 22.1 (21q22.1) [Minc i wsp., 1999]. SOD1 to

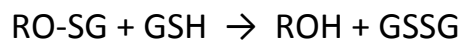
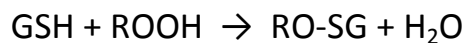
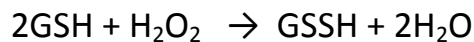
enzym o masie 32 kD, występujący w postaci dimerycznej, którego każda podjednostka ma masę około 16 kD i jest zbudowana z 151 reszt aminokwasowych. W podjednostkach występują fragmenty β , które pozwalają na utworzenie wiązań wodorowych. W organizmie ludzkim SOD1 występuje w komórkach wątroby, jąder, nerek, w erytrocytach oraz w komórkach ośrodkowego układu nerwowego. Zlokalizowana jest przede wszystkim w cytoplazmie, ale znajduje się również w jądrach komórkowych, lizosomach, peroksysomach oraz w wewnątrzłonowej przestrzeni mitochondriów [Wong i wsp., 2000]. Dużą odporność na fizyczną i chemiczną denaturację zawdzięcza SOD1 jon cynku, który stabilizuje strukturę trzeciorzędową enzymu, natomiast miedź jest niezbędna do reakcji usuwania anionorodnika nadtlenkowego i znajduje się w centrum katalitycznym enzymu [Gałęcka i wsp., 2008]. W sprawnym działaniu enzymu bierze udział wytworzony przez aminokwasy gradient pola elektrycznego, mostki disiarczkowe i białka chaperonowe [Bartosz, 2003]. Badania wykazały, że aktywność SOD1 to około 50-80% całkowitej aktywności dysmutaz nadtlenkowych [Faraci i Didion, 2004]. Stwierdza się, że nadekspresja enzymu chroni przed aktywacją kaspaz [Guo i wsp., 2001], natomiast obniżenie jego aktywności powoduje m.in. śmierć neuronów i progresję nowotworów na drodze stresu oksydacyjnego [Wang i wsp., 2004].

Gen SOD2 jest zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 6 w pozycji 25.3 (6q25.3) [Wiener i wsp., 2007]. Enzym kodowany jest przez genom jądrowy i syntetyzowany w postaci białka prekursorowego. SOD2 to enzym o masie 98 kD będącym tetramerem i posiadającym jony manganu w centrum aktywnym. Występuje głównie w macierzy mitochondrialnej, niewielkie jego ilości stwierdzono w przestrzeniach zewnątrzkomórkowych i peroksysomach. Z uwagi na swoją lokalizację stanowi pierwszą barierę chroniącą komórkę przed anionorodnikiem nadtlenkowym [Woźniak i Czyż, 2008]. Wykazano, że brak genu kodującego SOD2 jest letalny, a brak pozostałych form enzymu skutkuje poważnymi zaburzeniami w funkcjonowaniu organizmu [Huang i wsp., 2001]. Badania wykazują, że szok osmotyczny oraz działanie związków generujących anionorodnik nadtlenkowy

zwiększają aktywność SOD2 [Culotta i wsp., 2006; Czarna i Jarmuszkiewicz, 2006; Johnson i Giulivi, 2005].

1.5.2 Peroksydaza glutationu-1: GPx-1

Gen GPx-1 jest zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 3 w pozycji 21.3 (3p21.3) [Kiss i wsp., 1997]. GPx-1 jest enzymem zależnym od glutationu i mającym zdolność redukcji nadtlenków nieorganicznych (H_2O_2) i kilku polarnych nadtlenków organicznych (ROOH), włączając w to nadtlenki kwasów tłuszczowych. W reakcjach jako produkt pośredni powstaje kwas selenowy.



GPx-1 jest selenoperoksydazą, co oznacza, że w miejscu aktywnym zawiera selen pod postacią selenocysteiny. Do grupy selenoperoksydaz oprócz GPx-1 (czyli cytozolowej peroksydazy glutationu) należy: żołądkowo – jelitowa peroksydaza glutationowa (GPOx-2), plazmatyczna peroksydaza glutationowa (GPx-3), peroksydaza glutationowa wodoronadtlenków lipidów (GPx-4) oraz jądrowa peroksydaza glutationowa (spGPx) [Gałęcka i wsp., 2008]. GPx-1 jest enzymem o masie 85 kD złożonym z czterech podjednostek.

1.6 Badania systemu antyoksydacyjnego w AD

Badania wskazują, że stres oksydacyjny odgrywa znamioną rolę w etiopatogenezie AD. Fakt, że wiek jest istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju AD popiera tę teorię, ponieważ uszkodzenia spowodowane przez ROS mogą kumulować się latami [Benzi i Moretti, 1995]. Kwestia czy powstawanie patologicznych złogów A β jest przyczyną, czy konsekwencją stresu oksydacyjnego nie jest rozstrzygnięta. Na podstawie dotychczasowych badań można wnioskować, że A β stymuluje procesy stresu oksydacyjnego i jednocześnie stres oksydacyjny może indukować amyloidogenezę [Gabuzda i wsp., 1994].

Zarówno w badaniach *post mortem* na mózgach chorych na AD, jak i w płynie mózgowo-rdzeniowym we krwi oraz w moczu stwierdzono obecność markerów stresu oksydacyjnego [Butterfield i wsp., 2001]. Markery stresu oksydacyjnego stanowią produkty powstające w wyniku działania wolnych rodników na obecne w organizmie cząsteczki lipidów, białek, DNA i RNA. Za biomarkery uważa się charakterystyczne substancje będące wskaźnikami prawidłowych lub patologicznych procesów biologicznych, które można obiektywnie zmierzyć [Dalle-Donne i wsp., 2006].

Lipidy są bardzo wrażliwe na szkodliwe działanie wolnych rodników, a głównym efektem ich peroksydacji jest zaburzenie funkcjonowania błon, których są składnikami [Mangialasche i wsp., 2009]. Markerami peroksydacji lipidów są na przykład: 4 hydroksy-nonenal (HNE), metylomalonyldialdehyd (MDA), izoprostany (F2-izoprostany), neuroprostany (F4– neuroprostany) oraz końcowe produkty peroksydacji lipidów reagujące z kwasem tiobarbiturowym (TBARs) [Cherubini i wsp., 2005]. Metylomalonyldialdehyd i HNE za pomocą oddziaływań kowalentnych mogą wpływać na funkcjonowanie białek, upośledzać funkcjonowanie mitochondrialnego łańcucha oddechowego, powodując zwiększenie produkcji wolnych rodników tlenowych [Mangialasche i wsp., 2009]. Uważa się, że bardzo czułym markerem peroksydacji lipidów jest 8-izoprostaglandyna-F-2 (8-iso-PGF₂), którą charakteryzuje duża stabilność, możliwość oznaczenia w płynach biologicznych i brak wrażliwości na modyfikacje przez lipidy zawarte w diecie [Roberts i Morrow, 2000]. W badaniu

przeprowadzonym na 10 mózgach chorych na AD i 9 mózgach osób z grupy kontrolnej stwierdzono podwyższony poziom TBARs we wszystkich badanych obszarach kory, przy czym najbardziej istotną różnicę stwierdzono w korze skroniowej. Oceniano również aktywność enzymów antyoksydacyjnych i wykazano istotne obniżenie aktywności SOD w korze czołowej i skroniowej oraz katalazy w korze skroniowej [Marcus i wsp., 1998]. Lovell i wsp. w 1997 roku opublikowali badanie przeprowadzone na płynie mózgowo-rdzeniowym pobranym z komór mózgu 19 osób chorych na AD i 13 osób z grupy kontrolnej, w którym stwierdzili podwyższony poziom HNE u pacjentów w porównaniu do kontroli [Lovell i wsp., 1997]. W innym badaniu pobrano pośmiertnie płyn mózgowo-rdzeniowy z komór mózgu od 4 osób z rozpoznaniem prawdopodobnej AD oraz od 3 osób bez cech otępienia i innych neurologicznych chorób, które stanowiły grupę kontrolną. Stwierdzono istotnie wyższy poziom F2-izoprostanów w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych na AD (110 +/- 12 pg/ml) w porównaniu do grupy kontrolnej (64 +/- 8 pg/ml) ($p < 0,05$) [Roberts i wsp., 1998]. Oceniano również poziom MDA w surowicy u chorych na AD i MCI. Przykładowo w badaniu opublikowanym w 2010 roku, które przeprowadzono u 30 chorych na AD i u 29 osób z grupy kontrolnej, stwierdzono istotnie wyższe wartości MDA u pacjentów [Gustaw-Rothenberg i wsp., 2010]. Wyniki te potwierdzono m.in. w badaniu, do którego zakwalifikowano 33 osoby z rozpoznaniem MCI, 29 osób z AD i 26 osób zdrowych. Wykazano podwyższony poziom MDA w surowicy pacjentów z MCI i AD w porównaniu do grupy kontrolnej i stwierdzono również istotnie wyższe wartości tego markera u chorych na AD w porównaniu do chorych na MCI [Torres i wsp., 2011]. Nie wszystkie badania potwierdzają istnienie takiej patologii, np. Lyras i wsp., 1997 przebadali mózgi chorych na AD i osób z grupy kontrolnej nie stwierdzając istotnej różnicy poziomu MDA pomiędzy badanymi grupami [Lyras i wsp., 1997]. Wykazano również związek pomiędzy peroksydacją lipidów i genotypem *APOE* stwierdzając podwyższony poziom TBARs u chorych na AD będących nosicielami allelu $\epsilon 4$ genu [Ramassamy i wsp., 1999; Ramassamy i wsp., 2000].

W korze mózgowej chorych z AD, w porównaniu do kontroli, badanie za pomocą chromatografii cieczerwowej wykazało podwyższony poziom 8 hydroksy

2 deoksyguanozyny (8-OHdG), markera oksydacji DNA [Mecocci i wsp., 1994]. Wyniki te zostały potwierdzone m. in badaniem immunocytochemicznym [Nunomura i wsp., 1999]. Grupa badaczy pod kierownictwem Lovella również stwierdziła podwyższony poziom 8-OHdG u chorych na AD. Z mózgów 8 chorych na AD i 8 osób stanowiących grupę kontrolną wyekstrahowano mitochondrialne (mtDNA) i jądrowe DNA (nDNA), stwierdzając istotnie wyższy poziom 8-OHdG w korze czołowej, skroniowej i ciemieniowej chorych na AD. Jednocześnie wykazali 10-krotnie większą oksydację zasad mtDNA niż nDNA [Wang i wsp., 2005]. W następnym badaniu ci sami badacze oceniali marker oksydacji DNA u pacjentów z rozpoznaniem MCI i po zbadaniu mózgów 8 osób z MCI i 6 osób z grupy kontrolnej stwierdzili podwyższony poziom 8-OHdG u osób z rozpoznaniem MCI [Wang i wsp., 2006]. W artykule przeglądowym dotyczącym wolnych rodników i procesu starzenia się Barja przytacza badania na zwierzętach, w których stwierdzano wyraźnie wyższy poziom 8-OHdG w tDNA niż w nDNA, co dokumentuje większą wrażliwość mtDNA na stres oksydacyjny [Barja, 2004]. Spowodowane to jest brakiem histonów, dużą gęstością informacji (brak intronów), niewielką odległością od błony wewnętrznej mitochondriów, gdzie produkowane są ROS oraz ograniczonymi mechanizmami naprawczymi [Mangialasche i wsp., 2009; Wallace, 2005; LeDoux i wsp., 2007]. Efektem uszkodzeń DNA jest produkcja nieprawidłowych białek i zaburzone funkcjonowanie komórki.

Badania dowodzą, że RNA jest bardziej wrażliwe na działanie stresu oksydacyjnego niż DNA. Jest to spowodowane w większości jednoliniową budową i brakiem ochronnego wpływu wiązań wodorowych i histonów [Nunomura i wsp., 1999]. Uszkodzenia mogą dotyczyć zarówno obszarów kodujących jak i niekodujących RNA powodując produkcje nieprawidłowych białek i zaburzenia regulacji ekspresji genów [Nunomura i wsp., 2009]. Wiadomo, że niekodujące RNA, w tym microRNA (około 22 nukleotydów), biorą udział w rozwoju układu nerwowego, a następnie w utrzymaniu homeostazy i prawidłowego funkcjonowania zróżnicowanych komórek (m. in neuroplastyczność i reakcja na stres egzo- i endogenny) [Mehler i Mattick, 2006]. Coraz więcej danych przemawia za udziałem microRNA w patogenezie chorób

neurodegeneracyjnych w tym AD [Nelson i wsp., 2008]. Za marker oksydacji RNA uważa się 8 hydroksyguanozynę (8-OHG) [Fiala i wsp., 1989]. We wspomnianym wcześniej badaniu Nunomury i wsp. wykazano nie tylko podwyższony poziom markera oksydacji DNA, ale również markera oksydacji RNA u chorych na AD w porównaniu do kontroli. Zanalizowano również pełne spektrum zasad, które uległy oksydacji istwierdzono, że uszkodzenie dotyczy głównie cytoplazmatycznego RNA [Nunomura i wsp., 1999]. Ta sama grupa badaczy wykazała również, że ilościowo wyrażone uszkodzenie spowodowane stresem oksydacyjnym u chorych na AD jest największe na początku choroby i spada w miarę jej trwania [Nunomura i wsp., 2001]. Również badania wykorzystujące inne metody potwierdziły zwiększony poziom 8-OHG u osób chorych na AD w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej [Shan i wsp., 2003]. Abe i wsp. mierzyli poziom 8-OHG w płynie mózgowo-rdzeniowym i w surowicy u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej i oceniali ich związek z czasem trwania i nasileniem otępienia. Stwierdzili około 5-krotnie większe stężenie 8-OHG w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych na AD w porównaniu do kontroli i jego spadek w miarę postępu otępienia. Potwierdza to, że do oksydacji RNA dochodzi na wczesnym etapie choroby. Poziom markera oksydacji RNA w surowicy nie różnił się znacząco w badanych grupach [Abe i wsp., 2002].

Większość badań potwierdza też zwiększoną w AD oksydację białek mierzoną głównie poziomem grup karbonylowych w mózgu od chorych na AD [McIntosh i wsp., 1997]. Wykazano również podniesiony poziom innych markerów oksydacji białek (3-nitrotyrozyny i 3,3'-dityrozyny) u chorych na AD w porównaniu do osób z grupy kontrolnej. Badanie zostało przeprowadzone na próbkach pobranych pośmiertnie z mózgu 11 chorych na AD i 5 osób bez cech otępienia. Stwierdzono istotnie (5-8 krotnie) wyższe poziomy 3-nitrotyrozyny i 3,3'-dityrozyny zarówno mózgu chorych na AD, jak i w płynie mózgowo-rdzeniowym pobranym z komórek mózgu [Hensley i wsp., 1998]. Oksydacji mogą ulegać wszystkie aminokwasy tworzące białka, jednak najbardziej na nią narażone są te zawierające siarkę i pierścień aromatyczny [Stadtman i Levine, 2003]. Większość uszkodzonych aminokwasów nie podlega procesom naprawczym, a białka je zawierające ulegają degradacji przez proteasomy

20S [Mangialasche i wsp., 2009]. W badaniach nie stwierdzono różnicy w ilości proteasomów u chorych na AD, MCI a grupa kontrolną' wykazano natomiast upośledzone ich funkcjonowanie we wczesnych stadiach AD [Cecarini i wsp., 2007].

W ostatnio przeprowadzonym badaniu mózgu chorych na MCI lub AD stwierdzono nie tylko podwyższony poziom markerów stresu oksydacyjnego, który korelował z wynikami MMSE, ale także obniżony poziom enzymów stresu oksydacyjnego. Ansari i Scheff zbadali pośmiertnie korę czołową 8 osób z MCI, 4 z łagodną postacią AD, 9 z AD i 10 osób, które nie prezentowały przed zgonem cech otępienia. Stwierdzili oni podniesiony poziom markerów stresu oksydacyjnego (m. in. TBARs, grupy karbonylowe, 3-nitrotyrozyny) w badanych próbkach przy jednoczesnym zmniejszeniu aktywności enzymów antyoksydacyjnych takich jak GPx, SOD i katalazy. Nie wiadomo czy zmniejszenie aktywności tych enzymów powoduje zwiększenie stresu oksydacyjnego czy nadprodukcja wolnych rodników powoduje zużycie enzymów antyoksydacyjnych [Ansari i Scheff, 2010]. Na nieco większym materiale przeprowadzono podobne badanie włączając do niego 15 osób z MCI, 15 z AD i 15 kontroli. Materiał biologiczny stanowiła krew pobrana od uczestników badania, której analiza biochemiczna wykazała zmniejszenie ochrony antyoksydacyjnej (GPx i SOD) oraz podwyższony poziom markera peroksydacji lipidów (MDA) [Padurariu i wsp., 2010]. W 2003 roku przeprowadzono badanie na 25 pacjentach z rozpoznaniem MCI, 63 pacjentach z rozpoznaniem AD i 52 osobach z grupy kontrolnej oznaczając szerokie spektrum nieenzymatycznych i enzymatycznych antyoksydantów m.in. witaminy C, A, E, karotenoidów, aktywność osoczowej i czerwonekrwinkowej SOD i osoczowej GPx. Stwierdzono obniżony poziom i aktywność badanych antyoksydantów zarówno u pacjentów z MCI jak i z AD w porównaniu do osób z grupy kontrolnej [Rinaldi i wsp., 2003]. Również inne badania potwierdzają obniżony poziom nieenzymatycznych antyoksydantów u chorych na AD, np. w badaniu na 20 chorych na AD i 23 osobach z grupy kontrolnej stwierdzono obniżony poziom witaminy A i E u pacjentów natomiast zmierzona aktywność SOD1 i GPx w erytrocytach nie różniła się istotnie statystycznie w obu badanych grupach [Bourdel- Marchasson i wsp., 2001].

Podczas, gdy dane dotyczące poziomu nieenzymatycznych antyoksydantów są spójne, tzn., że ich poziom jest obniżony, to wyniki badań dotyczących poziomu i aktywności enzymatycznych antyoksydantów są niejednoznaczne. Casado i wsp. przebadali 150 osób (50 chorych na AD, 50 chorych na otępienie naczyniopochodne i 50 osób z grupy kontrolnej, dobranych pod względem wieku i płci) oznaczając u nich aktywność SOD, GPx, katalazy i reduktazy glutationowej w próbce krwi. Wykazali obniżone aktywności badanych enzymów u chorych na AD i otępienie naczyniopochodne w porównaniu do grupy kontrolnej, przy czym różnica była większa w przypadku osób z rozpoznaniem AD i najslabiej wyrażona dla katalazy [Casado i wsp., 2008]. W innym badaniu stwierdzono obniżenie aktywności SOD1 i katalazy w korze mózgowej 10 chorych na AD w porównaniu do 9 osób z grupy kontrolnej, bez wyraźnej różnicy w aktywności GPx [Marcus i wsp., 1998]. W 2005 roku ta sama grupa badaczy sprawdzała ekspresję genu *SOD2* w hipokampie 8 chorych na AD i 7 osób z grupy kontrolnej i wykazała, że jest większa w mózgach chorych na AD [Marcus i wsp., 2005]. W jednym z przytoczonych wcześniej badań nie zaobserwowano różnicy w aktywności enzymów antyoksydacyjnych pomiędzy osobami z AD i z grupy kontrolnej [Bourdel- Marchasson i wsp., 2001], natomiast część badaczy donosi nawet o ich podwyższonej aktywności u chorych na AD, co z kolei można tłumaczyć jako kompensacyjny wzrost w odpowiedzi na zwiększoną produkcję wolnych rodników. Wykazano na przykład zwiększoną aktywność GPx [Martin-Aragon i wsp., 2009] i katalazy [Repetto i wsp., 1999] u chorych na AD, a także zmiany w aktywności enzymów antyoksydacyjnych u chorych na MCI [Sultana i wsp., 2008].

Badano również na myszach transgenicznym zależność pomiędzy aktywnością SOD1 a toksycznością i akumulacją β -amyloidu. Stwierdzono m.in., że upośledzona aktywność SOD1 jest związana ze wzrostem amyloidogenego rozpadu białka APP [Schuessel i wsp., 2005], nadekspresja SOD1 może redukować toksyczność i odkładanie A β [Turner i wsp., 2004], a niedobór SOD1 zwiększa oligomeryzację A β i upośledzenie pamięci [Murakami i wsp., 2011].

Dumont i wsp. stwierdzili u myszy z nadekspresją SOD2 większą odporność na A β , spowolnienie tworzenia się plak, i większą ich degradację oraz mniejszy deficyt

pamięci [Dumont i wsp., 2009]. W najnowszych badaniach potwierdzono, że uszkodzenie neuronów spowodowane stresem oksydacyjnym wynika ze zmniejszenia aktywności SOD2, co przyspiesza wystąpienie zaburzeń zachowania u myszy będących zwierzęcym modelem AD. Dokładny mechanizm, w jakim redukcja SOD2 promuje uszkodzenie neuronów przez A β , nie jest jasny, jednak badanie to dowodzi, że redukcja SOD2 prowadzi do utraty integralności neuronów na początkowym etapie choroby [Lee i wsp., 2012].

Gatta i wsp. badali ekspresję genu SOD1 u pacjentów z MCI i AD i stwierdzili u nich znacząco wyższy poziom SOD1 mRNA w porównaniu do osób z grupy kontrolnej, co sugeruje, że stres oksydacyjny powoduje zwiększoną nadekspresję genu SOD1 w odpowiedzi na nadmierną produkcję ROS [Gatta i wsp., 2009].

Pomimo, że wydolność enzymów ADS była przedmiotem badań w różnych chorobach zwyrodnieniowych mózgu (najbardziej systematyczne badania były prowadzone w AD), to ich wyniki nie pozwalają na stwierdzenie, jaki jest profil zaburzeń systemu antyoksydacyjnego w tej chorobie. Jak dotąd opisano wiele różnych wariantów funkcjonowania systemu antyoksydacyjnego w AD:

- A) Brak zmian aktywności wszystkich enzymów [Fernandes i wsp., 1999];
- B) Wzrost aktywności wszystkich enzymów [Aksenow i wsp., 1998];
- C) Spadek aktywności wszystkich enzymów [Marcus i wsp., 1998];
- D) Zmiana aktywności tylko jednego lub dwu enzymów [Famulari i wsp., 1996].

Odmienność uzyskiwanych wyników mogła być spowodowana następującymi czynnikami:

- A) Wykonywaniem badań na różnym materiale biologicznym (wykazano np., że aktywność GPx-1 w osoczu u chorych z AD jest wyższa niż w grupie kontrolnej,

ale aktywność tego enzymu w erytrocytach tych chorych nie różni się od osób grupy kontrolnej) [Ceballos-Picot i wsp., 1996];

- B) Wykonywaniem badań u chorych z różnym stopniem zaawansowania choroby (stwierdzono np., że aktywność enzymów antyoksydacyjnych w AD koreluje z nasileniem zaburzeń funkcji poznawczych i jest inna na początku choroby niż w jej schyłkowym etapie) [Zafrilla i wsp., 2006];
- C) Wykonywaniem badań aktywności enzymów w homogenatach pobranych z różnych struktur mózgu i rdzenia [Gsell i wsp., 1995];
- D) Brakiem uwzględniania w badaniach różnych czynników środowiskowych i genetycznych, które, jak wiadomo, mogą modyfikować aktywność tych enzymów.

Większość badań enzymów ADS przeprowadzonych do tej pory skupiała się na oznaczaniu aktywności enzymów antyoksydacyjnych u chorych na AD i MCI u osób z grup kontrolnych. W literaturze znaleźć można niewiele badań ukierunkowanych na ocenę znaczenia polimorfizmów genów ADS dla ryzyka AD.

Dotychczas opublikowano dwa badania dotyczące znaczenia polimorfizmu genu *CAT* (C262T, rs1001179) dla ryzyka rozwoju AD. W badaniach tych uczestniczyło łącznie 379 chorych na AD i 551 osób zdrowych z grupy kontrolnej. W obu badaniach nie stwierdzono istotnych różnic w częstości występowania tego polimorfizmu pomiędzy grupą chorych na AD, a grupą kontrolną [Goulas i wsp., 2002; Capurso i wsp., 2008].

Opublikowano jedno badanie oceniające wpływ czterech polimorfizmów w genie *SOD2* (rs2758346, r4880, rs2855116 i rs5746136) na ryzyko zachorowania na AD, w którym wykazano ich związek z ryzykiem wystąpienia choroby [Wiener i wsp., 2007].

W przypadku polimorfizmów genu *GPx-1* w jednej pracy opublikowanej w 2012 roku stwierdzono, że polimorfizm rs1050450 nie ma wpływu na ryzyko zachorowania na AD [Cardoso i wsp., 2012].

Zgodnie z przedstawioną wyżej hipotezą stres oksydacyjny i związana z nim zwiększona ilość ROS wpływają na starzenie się organizmu. W Danii przebadano kohortę 1650 osób i oceniano u nich wpływ polimorfizmu rs4880 genu *SOD2* i rs1050450 genu *GPx-1* na proces starzenia się i długość życia. Wykazano mniejszą śmiertelność u osób będących nosicielami allelu C polimorfizmu rs4880 ($p=0,002$) lub allelu T polimorfizmu rs1050450 ($p=0,008$), a także synergistyczny efekt tych alleli ($p=0,001$) [Soerensen i wsp., 2009].

1.7 Uzasadnienie badania

Powodem podjęcia badania na temat znaczenia polimorfizmów genów *SOD1*, *SOD2* i *GPx-1* w AD jest zaangażowanie enzymów kodowanych przez te geny w działanie antyoksydacyjne. Dotychczas w analizie AD opublikowano zaledwie kilka badań na ten temat wykonanych na niewielkim materiale.

W prezentowanym badaniu zaplanowano przeanalizowanie znaczenia trzech polimorfizmów znacznikowych dla każdego z badanych genów, czyli polimorfizmów, które pozwalają na identyfikację haplotypu, tzn. zestawu wariantów genetycznych dziedziczącego się razem. Wybrane do badania polimorfizmy okazały się być już udokumentowanymi czynnikami ryzyka różnych, innych niż AD, chorób, których patomechanizm jest powiązany ze stresem oksydacyjnym. Warto podkreślić, że w odniesieniu do niektórych ze wspomnianych mechanizmów udowodniono znaczenie funkcjonalne, tzn. wykazano, że determinują one aktywność lub stężenie kodowanego białka. Przykładowo genotyp z allelem T polimorfizmu rs4880 genu *SOD2* powoduje zwiększenie aktywności enzymu [Bastaki i wsp., 2006]. W przypadku polimorfizmów genu *GPx-1* wykazano, że genotyp CC polimorfizmu rs3448 genu związany jest

z wyższą aktywnością enzymu w porównaniu do genotypów CT i TT [Mansego i wsp., 2011], natomiast allel T polimorfizmu rs1050450 genu *GPx-1* związany jest z mniejszą aktywnością tego enzymu [Hamanishi i wsp., 2004].

2. Cel badania

Ocena znaczenia polimorfizmów znacznikowych (ang. *tag polymorphisms*) wybranych enzymów endogenego systemu antyoksydacyjnego, tzn. dyzmutazy nadtlenkowej zależnej od jonów miedzi i cynku (CuZnSOD, SOD1: rs1041740, rs4998557, rs2070424), dyzmutazy nadtlenkowej zależnej od jonów manganu (MnSOD, SOD2: rs2855116, rs5746136, rs4880) i peroksydazy glutationu-1 (GPx-1: rs3448, rs1050450, rs1800668) u chorych na prawdopodobną AD i w grupie kontrolnej. Polimorfizmy znacznikowe zostały wybrane z bazy HapMap Project przy założeniu $MAF \geq 0.1$ i $r^2 \geq 0,8$.

3. Materiał i metody badawcze

3.1 Materiał badawczy

Badanie zostało przeprowadzone u 400 chorych z rozpoznaniem klinicznie prawdopodobnej AD i u 402 osób z grupy kontrolnej. Wszyscy zakwalifikowani uczestnicy byli powyżej 60 roku życia, wyrazili świadomą pisemną zgodę na udział w badaniu, należeli do rasy kaukaskiej i byli polskiego pochodzenia.

3.1.1 Grupa badana

Do badania rekrutowano osoby wśród kolejnych pacjentów z rozpoznaniem klinicznie prawdopodobnej AD, którzy byli diagnozowani i leczeni w Poradni Zaburzeń Pamięci Kliniki Neurologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie w latach 2009 – 2011 oraz w Klinice Neurologii i Epileptologii Szpitala Uniwersyteckiego w Łodzi. Diagnozę prawdopodobnej AD postawiono według kryteriów NINCDS-ADRDA. Kryteria włączenia i wykluczenia spełniło 400 chorych na AD.

3.1.2 Grupa kontrolna

Do grupy kontrolnej włączono osoby, które były samodzielne w życiu codziennym, nie podawały zaburzeń pamięci, miały negatywny wywiad w kierunku chorób neurologicznych oraz u których nie stwierdzono objawów w badaniu neurologicznym. Osoby te były rekrutowane wśród pracowników Kliniki Neurologii UJ CM i ich rodzin, współmałżonków lub opiekunów pacjentów chorych na AD, współmałżonków pacjentów leczonych w Klinice Neurologii z powodu innych chorób niż AD, innych osób odwiedzających, pacjentów innych oddziałów i poradni Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie, głównie oddziałów ortopedycznych i chirurgicznych oraz studentów Uniwersytetu Trzeciego Wieku Ignatianum w Krakowie. Każda z osób należąca do

grupy kontrolnej miała wypełnioną ankietę, w której odnotowane zostały dane demograficzne i informacje na temat współistniejących schorzeń. Uzyskane w ten sposób informacje zostały zgromadzone w komputerowej bazie danych.

Badania genetyczne zostało wykonane na wyizolowanym DNA. W tym celu od pacjentów chorych na AD i od osób z grupy kontrolnej włączonych do badania pobrano 5ml krwi żyłnej, która stanowiła materiał biologiczny.

Do badania wykorzystano materiał gromadzony przez kilka lat w ramach projektu „Genetyka molekularna chorób układu nerwowego związanych z wiekiem – bank materiału genetycznego”, na które zgodę wyraziła Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Jagiellońskiego (opinia nr KBET/54/B/2007).

3.2 Metody

3.2.1. Metodyka procedur diagnostycznych przeprowadzona u chorych kwalifikowanych do badania

3.2.1.1 Kryteria włączenia do badania

Rozpoznanie prawdopodobnej AD u pacjentów leczonych w Poradni Zaburzeń Pamięci Kliniki Neurologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie stawiano zgodnie z kryteriami NINCDS-ADRDA. U każdego chorego wykonano i uwzględniono:

- A) Wywiad zebrany od pacjenta i jego rodziny bądź opiekuna wskazujący na występowanie od przynajmniej 6 miesięcy zaburzeń licznych funkcji poznawczych o postępującym przebiegu, których nasilenie powoduje istotne zaburzenia w funkcjonowaniu zawodowym i społecznym oraz znaczące pogorszenie dotychczasowego funkcjonowania;

- B) Badanie neurologiczne, na podstawie którego wykluczano występowanie objawów pozapiramidowych, deficytów ogniskowych oraz zaburzeń świadomości;
- C) Badania neuropsychologiczne, oceniające pamięć, mowę, prakcję, gnozę oraz funkcje wykonawcze (planowanie, organizację, porządkowanie, abstrakcyjne myślenie),
- D) Badanie neuroobrazowe głowy oraz wyniki badań laboratoryjnych (pełna morfologia krwi, OB, glukoza, elektrolity, kreatynina, aminotransferazy, TSH lub inne testy oceniające funkcję tarczycy, witamina B12, kwas foliowy, VDRL, badanie moczu), na podstawie których wykluczono inne niż AD przyczyny otępienia.

3.2.1.2 Kryteria wykluczenia

Do badania nie zakwalifikowano osób, które nie wyraziły pisemnej zgody na udział w badaniu. Wykluczono osoby, u których zaburzenia poznawcze miały nagły początek i stosunkowo wcześnie w przebiegu choroby pojawiły się zaburzenia równowagi, drgawki i zaburzenia zachowania. Do badania nie zostali również zakwalifikowani chorzy, u których w badaniu neurologicznym w początkowym okresie choroby stwierdzono deficyty ogniskowe (niedowład połowiczy, zaburzenia czucia, ubytki w polu widzenia) oraz objawy pozapiramidowe. Pacjenci, u których MRI głowy wskazywał na podejrzenie obecności zmian zapalnych lub ognisk naczyniopochodnych nie byli włączani do badania.

Do badania nie włączono również osób, u których stwierdzono współistniejące choroby mogące przebiegać z zaburzeniami funkcji poznawczych, takie jak: wodogłowie normotensyjne, krwihak wewnątrzczaszkowy, guz, choroba Parkinsona, choroba Huntingtona, znacznie nasiloną depresję, choroby układowe (kiła układu nerwowego, HIV), toksyczne lub zaburzenia metaboliczne (niedoczynność tarczycy, hiperkalcemia, niedobór witaminy B12, niedobór kwasu foliowego, niacyny).

3.2.2 Wybór polimorfizmów

Miejsca w sekwencji DNA, w których jednostki różnią się pojedynczą zasadą nazywane są polimorfizmami pojedynczych nukleotydów (ang. *SNPs - single nucleotide polymorphisms*). SNPs leżące na tym samym chromosomie obok siebie dziedziczą się w zestawach. Zestaw SNPs który dziedziczy się jako zestaw sprzężonych ze sobą alleli nazywamy haplotypem. Haplotypy mogą składać się z wielu SNPs, ale tylko kilka wystarczy do zidentyfikowania haplotypu. Polimorfizmy umożliwiające identyfikację haplotypów nazywane są polimorfizmami znacznikowymi.

Identyfikacja polimorfizmów znacznikowych jest możliwa dzięki udokumentowaniu nierównowagi sprzężeń w ludzkim genomie, co oznacza, że sąsiadujące polimorfizmy dziedziczą się razem jako haplotypy. W pierwszym etapie identyfikacji polimorfizmów znacznikowych sekwencjonuje się wybrany gen lub fragment genomu w celu scharakteryzowania struktury haplotypu, w drugim etapie identyfikuje się polimorfizmy znacznikowe charakteryzujące określony haplotyp, a w trzecim etapie analizuje się znaczenie polimorfizmów znacznikowych dla danej choroby. Ta metoda pozwala na dokładną analizę wybranego fragmentu genomu i jednocześnie znacznie obniża koszty badania [<http://www.hapmap.org/>].

Analizowano 9 polimorfizmów znacznikowych wybranych enzymów endogenego systemu antyoksydacyjnego, tzn. dyzmutazy nadtlenkowej zależnej od jonów miedzi i cynku (CuZnSOD, SOD1: rs1041740, rs4998557, rs2070424), dyzmutazy nadtlenkowej zależnej od jonów manganu (MnSOD, SOD2: rs2855116, rs5746136, rs4880) i peroksydazy glutationu-1 (GPx-1: rs3448, rs1050450, rs1800668).

3.2.3 Metodyka badań laboratoryjnych

Z materiału biologicznego, który stanowiło 5 ml krwi żyłnej pobranej od uczestników badania i zabezpieczone w Laboratorium Genetycznym Kliniki Neurologii CM UJ,

wyzolowano leukocytarne DNA przy użyciu zestawu QIAamp DNA Blood Mini kit firmy QIAGEN.

Wszystkie 9 polimorfizmów zostało oznaczone przy pomocy reakcji łańcuchowej polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (ang. Real-Time Polymorphism Chain Reaction, RT-PCR) za pomocą aparatu TaqMan7900 z zastosowaniem protokołu badania podanego przez firmę Applied Biosystems. Do oznaczeń wykorzystano zestaw firmy Applied, który zawierał TaqMan Universal PCR Master Mix i specyficzne pary sond znakowanych fluorochromami VIC i FAM oraz startery. Reakcja była przeprowadzona w końcowej objętości 10 μ l. Proces amplifikacji prowadzony był według schematu: 10 minut w 95 °C, 40 cykli przez 15 sekund w 95 °C i przez 1 minutę w temperaturze 60°C. Automatyczną analizę polimorfizmów wykonano przy użyciu oprogramowania firmy Applied Biosystems. W przypadkach wątpliwych powtarzano wyniki przynajmniej jednokrotnie i używano programu TaqMan Genotyper Software 1.0 celem automatycznej identyfikacji polimorfizmów. Następnie wyniki uzyskanych analiz wprowadzano do komputerowej bazy danych.

3.2.4 Analiza statystyczna

W odniesieniu do każdego badanego polimorfizmu zarówno w grupie pacjentów, jak i w grupie kontrolnej sprawdzono zgodność z równowagą Hardy-Weinberga za pomocą testu χ^2 . Związek badanych polimorfizmów z ryzykiem choroby analizowano w modelu dominującym recesywnym i addytywnym. Oceniano także różnice częstości występowania badanych alleli w grupie chorych na AD i w grupie kontrolnej. Dla porównania rozkładu genotypów i alleli w badanych grupach użyto testu χ^2 . Wpływ badanych polimorfizmów na ryzyko choroby po uwzględnieniu wieku i płci badano za pomocą analizy regresji logistycznej. Potencjalną różnicę w rozkładzie płci między grupami sprawdzono testem χ^2 , a w rozkładzie wieku testem t-studenta. Ze względu na równoczesne testowanie znaczenia 10 różnych wariantów genetycznych (trzy polimorfizmy genu *SOD1*, trzy polimorfizmy genu *SOD2* i jeden genu *APOE*),

uwzględniono korektę Bonferoniego i za próg istotności statystycznej przyjęto wartość $p < 0,005$.

4. Wyniki

4.1. Charakterystyka demograficzna u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej

Kryteria włączenia do badania spełniło 400 osób chorych na AD. Wiek pacjentów w czasie postawienia rozpoznania wahał się od 60 do 93 lat (średnia wieku: $74,47 \pm 6,9$ lat). W grupie chorych na AD było 250 kobiet (62,5%). Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 402 osoby w wieku od 60 do 94 lata (średnia wieku: $70,89 \pm 8,00$ lat). W grupie tej było 240 kobiet (59,7%). Rozkład płci w grupie chorych na AD i w grupie kontrolnej był porównywalny (test chi-kwadrat, $p = 0,416$) (Tabela 1). Osoby chore na AD były istotnie starsze od osób z grupy kontrolnej (test t – Studenta, $p < 0,001$).

Tabela 1. Rozkład płci w grupie chorych na AD i w grupie kontrolnej

	Płeć				Ogółem	
	Mężczyźni		Kobiety		N	%
	N	%	N	%		
Grupa kontrolna	162	51,92	240	48,98	402	50,12
Pacjenci	150	48,08	250	51,02	400	49,88
Ogółem	312	100,00	490	100,00	802	100,00

$$\chi^2 (1) = 0,66; p = 0,416$$

p dokładne Fishera = 0,426

Z powodu istotnej różnicy wieku między badanymi grupami wszystkie analizy związku badanych polimorfizmów z ryzykiem zachorowania na AD testowano także za pomocą analizy regresji logistycznej uwzględniającej dane demograficzne.

Pomimo wielokrotnych powtórzeń u niektórych osób zarówno z grupy kontrolnej, jak i z grupy chorych na AD nie udało się uzyskać wyniku planowanych oznaczeń genetycznych (Tabela 2). Wszystkie wątpliwe wyniki zostały powtórzone przynajmniej raz.

Tabela 2. Liczba próbek, w których nie udało się określić genotypu

Gen	Polimorfizm	Liczba osób, u których nie określono genotypu	
		AD	Grupa kontrolna
SOD 1	rs4998557	9	0
	rs1041740	13	2
	rs2070424	50	34
SOD 2	rs2855116	48	12
	rs5746136	34	6
	rs4880	13	9
GPx-1	rs3448	6	4
	rs1050450	1	7
	rs1800668	19	18

4.2. Polimorfizm rs4998557 genu *SOD1* a ryzyko zachorowania na AD

Analiza regresji logistycznej uwzględniająca wpływ wieku i płci wykazała, że polimorfizm rs4998557 genu *SOD1* ma wpływ na ryzyko zachorowania na AD w modelu addytywnym, na poziomie istotności równym 0,044. Natomiast model regresji logistycznej wykonany na allelach A i G w dwóch badanych grupach uwzględniający wpływ wieku i płci wykazał wpływ tego polimorfizmu na poziomie istotności równym 0,042. Ze względu na równoczesne testowanie wielu hipotez dla prezentowanego badania uwzględnienie korekty Bonferroniego, co pozwoliło ustalić poziom istotności statystycznej na 0,005. Z tego powodu uzyskany wynik nie można uznać za istotny statystycznie. Pozostałe testowane modele (dominujący i recesywny) także takiej zależności nie wykazały (Tabela 3).

Tabela 3. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs4998557 genu *SOD1* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej

	Chorzy na AD n=391 (49,31)	Grupa kontrolna n=402 (50,69)	p OR (95% CI)	P OR (95% CI)
Genotypy				
AA n (%)	3 (0,77%)	9 (2,24%)	0,151* 0,78 (0,55-1,10)	0,080** 0,73 (0,51-1,04)
AG n (%)	73 (18,67%)	86 (21,39%)	0,090# 0,34 (0,09-1,26)	0,117## 0,35 (0,09-1,31)
GG n (%)	315 (80,56%)	307 (76,37%)	0,081§ 1,32 (0,97-1,79)	0,044§§ 1,39 (1,01-1,91)
Allele				
A n (%)	79 (10,10%)	104 (12,94%)	0,077‡ 1,32 (0,97-1,80)	0,042‡‡ 1,40 (1,01-1,92)
G n (%)	703 (89,90%)	700 (87,06%)		

- * Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), którym testowano efekt allelu A w modelu dominującym (AA + AG vs GG) na ryzyko wystąpienia AD (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ** Model regresji logistycznej testujący efekt allelu A w modelu dominującym (AA + AG vs GG) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- # Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), którym testowano efekt allelu A w modelu recesywnym (AA vs AG + GG) na ryzyko wystąpienia AD (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ## Model regresji logistycznej testujący efekt allelu A w modelu recesywnym (AA vs AG + GG) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- § Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (*Cochran–Armitage trend test*) w obu badanych grupach (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- §§ Model regresji logistycznej testujący wpływ badanego polimorfizmu w modelu addytywnym (GG vs AG vs AA) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ‡ Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach A i G w dwóch badanych grupach: chorych na A i w grupie kontrolnej.
- ‡‡ Model regresji logistycznej wykonany na allelach A i G w dwóch badanych grupach: AD i grupie kontrolnej uwzględniający wpływ wieku i płci

4.3 Polimorfizm rs1041740 genu *SOD1* a ryzyko zachorowania na AD

Zarówno analiza jednoczynnikowa, jak i analiza wieloczynnikowa uwzględniająca wpływ wieku i płci w żadnym z testowanych modeli dziedziczenia nie wykazały związku polimorfizmu rs1041740 genu *SOD1* z ryzykiem wystąpienia AD (Tabela 4).

Tabela 4. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs1041740 genu *SOD1* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej

	Chorzy na AD n=387 (49,17)	Grupa kontrolna n=400 (50,83))	p OR (95% CI)	P OR (95% CI)
Genotypy				
CC n (%)	233 (60,21%)	236 (59,00%)	0,370* 0,75 (0,41-1,40)	0,413** 0,77 (0,41-1,45)
CT n (%)	130 (33,59%)	145 (36,25%)	0,730# 1,05 (0,79-1,40)	0,858## 1,03 (0,77-1,38)
TT n (%)	24 (6,20%)	19 (4,75%)	0,954§ 1,01 (0,80-1,27)	0,869§§ 1,02 (0,80-1,30)
Allele				
C n (%)	596 (77,00%)	617 (77,13%)	0,954‡ 1,01 (0,80-1,27)	0,868‡‡ 1,02 (0,80-1,30)
T n (%)	178 (23,00%)	183 (22,88%)		

- * Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), którym testowano efekt allelu C w modelu dominującym (CC + CT vs TT) na ryzyko wystąpienia AD (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ** Model regresji logistycznej testujący efekt allelu C w modelu dominującym (CC + CT vs TT) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- # Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), którym testowano efekt allelu C w modelu recesywnym (CC vs CT + TT) na ryzyko wystąpienia AD (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ## Model regresji logistycznej testujący efekt allelu C w modelu recesywnym (CC vs CT + TT) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- § Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (*Cochran–Armitage trend test*) w obu badanych grupach (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- §§ Model regresji logistycznej testujący wpływ badanego polimorfizmu w modelu addytywnym (TT vs CT vs CC) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ‡ Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach C i T w dwóch badanych grupach: chorych na AD i w grupie kontrolnej.
- ‡‡ Model regresji logistycznej wykonany na allelach C i T w dwóch badanych grupach: AD i grupie kontrolnej uwzględniający wpływ wieku i płci.

4.4 Polimorfizm rs2070424 genu *SOD1* a ryzyko zachorowania na AD

Zarówno analiza jednoczynnikowa, jak i analiza regresji logistycznej uwzględniająca wpływ wieku i płci wykazały, że polimorfizm rs2070424 genu *SOD1* ma wpływ na ryzyko zachorowania na AD, przy czym uzyskano następujące wyniki. W analizie jednoczynnikowej w modelu recesywnym na poziomie istotności równym 0,008, w modelu addytywnym na poziomie istotności równym 0,005 i w teście χ^2 wykonanym na allelach A i G na poziomie istotności równym 0,006. W analizie regresji logistycznej uwzględniająca wpływ wieku i płci w modelu recesywnym na poziomie istotności równym 0,002, w modelu addytywnym na poziomie istotności równym 0,001 i w modelu regresji logistycznej wykonanym na allelach A i G w dwóch badanych grupach uwzględniając wpływ wieku i płci na poziomie istotności równym 0,002. Ze względu na równoczesne testowanie wielu hipotez dla prezentowanego badania uwzględnienie korekty Bonferroniego pozwoliło ustalić poziom istotności statystycznej na 0,005. Po uwzględnieniu korekty Bonferroniego uzyskane wyniki można uznać za istotne statystycznie (Tabela 5). Analizę trzeba jednak traktować ostrożnie z powodu zerowych liczebności genotypu GG w grupie chorych na AD.

Tabela 5. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs2070424 genu *SOD1* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej

	Chorzy na AD n=350 (48,75)	Grupa kontrolna n=368 (51,25)	p OR (95% CI)	p OR (95% CI)
Genotypy				
AA n (%)	299 (85,43%)	286 (77,72%)	0,091* ---	---**
AG n (%)	51 (14,57%)	79 (21,47%)	0,008# 1,68 (1,14-2,47)	0,002## 1,86 (1,25-2,78)
GG n (%)	0 (,00%)	3 (,82%)	0,005§ 0,58 (0,40-,85)	0,001§§ 0,53 (0,36-,78)
Allele				
A n (%)	649 (92,71%)	651 (88,45%)	0,006‡ 0,60 (0,42-0,87)	0,002‡‡ 0,55 (0,38-0,80)
G n (%)	51 (7,29%)	85 (11,55%)		

* Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), którym testowano efekt allelu A w modelu dominującym (AA + AG vs GG) na ryzyko wystąpienia AD (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).

** Model regresji logistycznej testujący efekt allelu A w modelu dominującym (AA + AG vs GG) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).

- # Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), którym testowano efekt allelu A w modelu recesywnym (AA vs AG + GG) na ryzyko wystąpienia AD (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ## Model regresji logistycznej testujący efekt allelu A w modelu recesywnym (AA vs AG + GG) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- § Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (*Cochran–Armitage trend test*) w obu badanych grupach (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- §§ Model regresji logistycznej testujący wpływ badanego polimorfizmu w modelu addytywnym (GG vs AG vs AA) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ‡ Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach A i G w dwóch badanych grupach: chorych na AD i w grupie kontrolnej.
- ‡‡ Model regresji logistycznej wykonany na allelach A i G w dwóch badanych grupach: chorych na AD i w grupie kontrolnej, uwzględniający wpływ wieku i płci.

4.5 Polimorfizm rs2855116 genu *SOD2* a ryzyko zachorowania na AD

Zarówno analiza jednoczynnikowa, jak i analiza wieloczynnikowa uwzględniająca wpływ wieku i płci w żadnym z testowanych modeli dziedziczenia nie wykazały związku polimorfizmu rs2855116 genu *SOD2* z ryzykiem wystąpienia AD (Tabela 6).

Tabela 6. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs2855116 genu *SOD2* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej

	Chorzy na AD n=352 (47,44%)	Grupa kontrolna n=390 (52,56)	p OR (95% CI)	P OR (95% CI)
Genotypy				
AA n (%)	108 (30,68%)	105 (26,92%)	0,804* 1,04 (0,74-1,46)	0,530** 1,12 (0,79-1,58)
AC n (%)	161 (45,74%)	190 (48,72%)	0,258# 1,20 (0,87-1,65)	0,151## 1,27 (0,92-1,76)
CC n (%)	83 (23,58%)	95 (24,36%)	0,394§ 0,92 (0,75-1,12)	0,205§§ 0,88 (0,71-1,08)
Allele				
A n (%)	377 (53,55%)	400 (51,28%)	0,382‡ 0,91 (0,74-1,12)	0,194‡‡ 0,87 (0,71-1,07)
C n (%)	327 (46,45%)	380 (48,72%)		

* Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), którym testowano efekt allelu A w modelu dominującym (AA + AC vs CC) na ryzyko wystąpienia AD (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).

- ** Model regresji logistycznej testujący efekt allelu A w modelu dominującym (AA + AC vs CC) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- # Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), którym testowano efekt allelu A w modelu recesywnym (AA vs AC + CC) na ryzyko wystąpienia AD (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ## Model regresji logistycznej testujący efekt allelu A w modelu recesywnym (AA vs AC + CC) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- § Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (*Cochran–Armitage trend test*) w obu badanych grupach (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- §§ Model regresji logistycznej testujący wpływ badanego polimorfizmu w modelu addytywnym (CC vs AC vs AA) na ryzyko wystąpienia AD uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ‡ Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach A i C w dwóch badanych grupach: chorych na AD i w grupie kontrolnej.
- ‡‡ Model regresji logistycznej wykonany na allelach A i C w dwóch badanych grupach: chorych na AD i w grupie kontrolnej, uwzględniający wpływ wieku i płci.

4.6. Polimorfizm rs5746136 genu *SOD2* a ryzyko zachorowania na AD

Zarówno analiza jednoczynnikowa, jak i analiza wieloczynnikowa uwzględniająca wpływ wieku i płci w żadnym z testowanych modeli dziedziczenia nie wykazały związku polimorfizmu rs5746136 genu *SOD2* z ryzykiem wystąpienia AD (Tabela 7).

Tabela 7. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs5746136 genu *SOD2* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej

	Chorzy na AD n=366 (48,03)	Grupa kontrolna n=396 (51,97)	p OR (95% CI)	p OR (95% CI)
Genotypy				
CC n (%)	178 (48,63%)	205 (51,77%)	0,903* 1,03 (0,64-1,66)	0,951** 0,98 (0,61-1,60)
CT n (%)	152 (41,53%)	151 (38,13%)	0,387# 0,88 (0,66-1,17)	0,129## 0,80 (0,59-1,07)
TT n (%)	36 (9,84%)	40 (10,10%)	0,551§ 1,07 (0,86-1,32)	0,242§§ 1,14 (0,91-1,42)
Allele				
C n (%)	508 (69,40%)	561 (70,83%)	0,541‡ 1,07 (0,86-1,33)	0,230‡‡ 1,15 (0,92-1,44)
T n (%)	224 (30,60%)	231 (29,17%)		

- * Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), którym testowano efekt allelu C w modelu dominującym (CC + CT vs TT) na ryzyko wystąpienia AD (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ** Model regresji logistycznej testujący efekt allelu C w modelu dominującym (CC + CT vs TT) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- # Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), którym testowano efekt allelu C w modelu recesywnym (CC vs CT + TT) na ryzyko wystąpienia AD (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ## Model regresji logistycznej testujący efekt allelu C w modelu recesywnym (CC vs CT + TT) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- § Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (*Cochran–Armitage trend test*) w obu badanych grupach (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- §§ Model regresji logistycznej testujący wpływ badanego polimorfizmu w modelu addytywnym (TT vs CT vs CC) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ‡ Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach C i T w dwóch badanych grupach: chorych na AD i w grupie kontrolnej.
- ‡‡ Model regresji logistycznej wykonany na allelach C i T w dwóch badanych grupach: chorych na AD i w grupie kontrolnej, uwzględniający wpływ wieku i płci.

4.7 Polimorfizm rs4880 genu *SOD2* a ryzyko zachorowania na AD

Zarówno analiza jednoczynnikowa, jak i analiza wieloczynnikowa uwzględniająca wpływ wieku i płci w żadnym z testowanych modeli dziedziczenia nie wykazały związku polimorfizmu rs4880 genu *SOD2* z ryzykiem wystąpienia AD (Tabela 8).

Tabela 8. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs4880 genu *SOD2* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej

	Chorzy na AD n=387 (49,62%)	Grupa kontrolna n=393 (50,38%)	p OR (95% CI)	p OR (95% CI)
Genotypy				
AA n (%)	101 (26,10%)	95 (24,17%)	0,961* 0,99 (0,72-1,36)	0,714** 1,06 (0,77-1,47)
AG n (%)	182 (47,03%)	193 (49,11%)	0,535# 1,11 (0,80-1,53)	0,390## 1,16 (0,83-1,61)
GG n (%)	104 (26,87%)	105 (26,72%)	0,732§ 0,97 (0,80-1,17)	0,457§§ 0,93 (0,76-1,13)
Allele				
A n (%)	384 (49,61%)	383 (48,73%)	0,727‡ 0,97 (0,79-1,18)	0,449‡‡ 0,92 (0,75-1,13)
G n (%)	390 (50,39%)	403 (51,27%)		

- * Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), którym testowano efekt allelu A w modelu dominującym (AA + AG vs GG) na ryzyko wystąpienia AD (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ** Model regresji logistycznej testujący efekt allelu A w modelu dominującym (AA + AG vs GG) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- # Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), którym testowano efekt allelu A w modelu recesywnym (AA vs AG + GG) na ryzyko AD (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ## Model regresji logistycznej testujący efekt allelu A w modelu recesywnym (AA vs AG + GG) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- § Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (*Cochran–Armitage trend test*) w obu badanych grupach (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- §§ Model regresji logistycznej testujący wpływ badanego polimorfizmu w modelu addytywnym (GG vs AG vs AA) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ‡ Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach A i G w dwóch badanych grupach: chorych na AD i w grupie kontrolnej.
- ‡‡ Model regresji logistycznej wykonany na allelach A i G w dwóch badanych grupach: chorych na AD i w grupie kontrolnej, uwzględniający wpływ wieku i płci.

4.8 Polimorfizm rs3448 genu *GPx-1* a ryzyko zachorowania na AD

Zarówno analiza jednoczynnikowa, jak i analiza wieloczynnikowa uwzględniająca wpływ wieku i płci w żadnym z testowanych modeli dziedziczenia nie wykazały związku polimorfizmu rs3448 genu *GPx-1* z ryzykiem wystąpienia AD (Tabela 9).

Tabela 9. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs3448 genu *GPx-1* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej

	Chorzy na AD n=394 (49,75%)	Grupa kontrolna n=398 (50,25)	p OR (95% CI)	p OR (95% CI)
Genotypy				
CC n (%)	216 (54,82%)	237 (59,55%)	0,969* 0,99 (0,57-1,72)	0,965** 1,01 (0,57-1,79)
CT n (%)	151 (38,32%)	134 (33,67%)	0,179# 0,82 (0,62-1,09)	0,198## 0,83 (0,62-1,10)
TT n (%)	27 (6,85%)	27 (6,78%)	0,278§ 1,13 (0,90-1,42)	0,313§§ 1,13 (0,89-1,42)
Allele				
C n (%)	583 (73,98%)	608 (76,38%)	0,269‡ 1,14 (0,91-1,43)	0,305‡‡ 1,13 (0,89-1,43)
T n (%)	205 (26,02%)	188 (23,62%)		

- * Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), którym testowano efekt allelu C w modelu dominującym (CC + CT vs TT) na ryzyko wystąpienia AD (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ** Model regresji logistycznej testujący efekt allelu C w modelu dominującym (CC + CT vs TT) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- # Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), którym testowano efekt allelu C w modelu recesywnym (CC vs CT + TT) na ryzyko wystąpienia AD (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ## Model regresji logistycznej testujący efekt allelu C w modelu recesywnym (CC vs CT + TT) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- § Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (*Cochran–Armitage trend test*) w obu badanych grupach (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- §§ Model regresji logistycznej testujący wpływ badanego polimorfizmu w modelu addytywnym (TT vs CT vs CC) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ‡ Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach C i T w dwóch badanych grupach: chorych na AD i w grupie kontrolnej.
- ‡‡ Model regresji logistycznej wykonany na allelach C i T w dwóch badanych grupach: chorych na AD i w grupie kontrolnej, uwzględniający wpływ wieku i płci.

4.9 Polimorfizm rs1050450 genu *GPx-1* a ryzyko zachorowania na AD

Zarówno analiza jednoczynnikowa, jak i analiza wieloczynnikowa uwzględniająca wpływ wieku i płci w modelu dominującym, wykazały że polimorfizm rs1050450 genu *GPx-1* ma wpływ na ryzyko wystąpienia AD na poziomie istotności równym odpowiednio 0,014 i 0,024. Ze względu na równoczesne testowanie wielu hipotez dla prezentowanego badania uwzględnienie korekty Bonferroniego pozwoliło ustalić poziom istotności statystycznej na 0,005. Po uwzględnieniu korekty Bonferroniego uzyskane wyniki można uznać za istotne statystycznie (Tabela 10).

Tabela 10. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs1050450 genu *GPx-1* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej

	Chorzy na AD n=399 (50,25%)	Grupa kontrolna n=395 (49,75%)	p OR (95% CI)	P OR (95% CI)
Genotypy				
CC n (%)	188 (47,12%)	183 (46,33%)	0,014* 1,97 (1,14-3,42)	0,024** 1,92 (1,09-3,39)
CT n (%)	190 (47,62%)	173 (43,80%)	0,824# 1,03 (0,78-1,36)	0,851## 1,03 (0,77-1,37)
TT n (%)	21 (5,26%)	39 (9,87%)	0,223§ 0,87 (0,70-1,09)	0,265§§ 0,88 (0,70-1,10)
Allele				
C n (%)	566 (70,93%)	539 (68,23%)	0,242‡ 0,88 (0,71-1,09)	0,286‡‡ 0,89 (0,71-1,11)
T n (%)	232 (29,07%)	251 (31,77%)		

- * Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), którym testowano efekt allelu C w modelu dominującym (CC + CT vs TT) na ryzyko wystąpienia AD (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ** Model regresji logistycznej testujący efekt allelu C w modelu dominującym (CC + CT vs TT) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- # Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), którym testowano efekt allelu C w modelu recesywnym (CC vs CT + TT) na ryzyko wystąpienia AD (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ## Model regresji logistycznej testujący efekt allelu C w modelu recesywnym (CC vs CT + TT) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- § Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (*Cochran–Armitage trend test*) w obu badanych grupach (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- §§ Model regresji logistycznej testujący wpływ badanego polimorfizmu w modelu addytywnym (TT vs CT vs CC) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ‡ Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach C i T w dwóch badanych grupach: chorych na AD i w grupie kontrolnej.
- ‡‡ Model regresji logistycznej wykonany na allelach C i T w dwóch badanych grupach: chorych na AD i w grupie kontrolnej, uwzględniający wpływ wieku i płci.

4.10 Polimorfizm rs1800668 genu *GPx-1* a ryzyko zachorowania na AD

Zarówno analiza jednoczynnikowa, jak i analiza wieloczynnikowa uwzględniająca wpływ wieku i płci w żadnym z testowanych modeli dziedziczenia nie wykazały związku polimorfizmu rs1800668 genu *GPx-1* z ryzykiem wystąpienia AD (Tabela 11).

Tabela 11. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs1800668 genu *GPx-1* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej

	Chorzy na AD n=381 (49,80%)	Grupa kontrolna n=384 (50,20%)	p OR (95% CI)	p OR (95% CI)
Genotypy				
AA n (%)	33 (8,66%)	46 (11,98%)	0,409* 0,89 (0,67-1,18)	0,439** 0,89 (0,66-1,19)
AG n (%)	164 (43,04%)	164 (42,71%)	0,132# 0,70 (0,43-1,12)	0,208## 0,73 (0,45-1,19)
GG n (%)	184 (48,29%)	174 (45,31%)	0,189§ 1,15 (0,93-1,43)	0,245§§ 1,14 (0,91-1,42)
Allele				
A n (%)	230 (30,18%)	256 (33,33%)	0,186‡ 1,16 (0,93-1,43)	0,242‡‡ 1,14 (0,91-1,43)
G n (%)	532 (69,82%)	512 (66,67%)		

- * Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), którym testowano efekt allelu A w modelu dominującym (AA + AG vs GG) na ryzyko wystąpienia AD (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ** Model regresji logistycznej testujący efekt allelu A w modelu dominującym (AA + AG vs GG) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- # Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), którym testowano efekt allelu A w modelu recesywnym (AA vs AG + GG) na ryzyko wystąpienia AD (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ## Model regresji logistycznej testujący efekt allelu A w modelu recesywnym (AA vs AG + GG) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- § Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (*Cochran–Armitage trend test*) w obu badanych grupach (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- §§ Model regresji logistycznej testujący wpływ badanego polimorfizmu w modelu addytywnym (GG vs AG vs AA) na ryzyko wystąpienia AD, uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa chorych na AD i grupa kontrolna).
- ‡ Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach A i G w dwóch badanych grupach: chorych na AD i w grupie kontrolnej.
- ‡‡ Model regresji logistycznej wykonany na allelach A i G w dwóch badanych grupach: chorych na AD i w grupie kontrolnej, uwzględniający wpływ wieku i płci.

4.11 Polimorfizm genu *APOE* a ryzyko choroby Alzheimera

Zarówno analiza jednoczynnikowa, jak i analiza wieloczynnikowa uwzględniająca wpływ wieku i płci wykazały związek genotypu $\epsilon_4\epsilon_4$ i genotypów z allelem ϵ_4 genu *APOE* ($\epsilon_3\epsilon_4$ i $\epsilon_4\epsilon_4$ i $\epsilon_4\epsilon_2$) z ryzykiem zachorowania na AD (Tabela 12). Potwierdza to liczne wcześniejsze doniesienia dokumentujące, że allel ϵ_4 genu *APOE* jest czynnikiem ryzyka zachorowania na AD.

Tabela 12. Rozkład genotypów polimorfizmu genu *APOE* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej.

	AD (N=350) (55,64%)	Grupa kontrolna (N=279) (44,36%)	OR (95% CI) (p)	OR (95% CI) (p)
$\epsilon_2\epsilon_2$	0 (0,00%)	3 (1,08%)	3,11 (2,21-4,36) ($<0,001$)* brak ¹ ($<0,001$)# 1,80 (1,55-2,10) ($<0,001$)§	3,30 (2,32-4,68) ($<0,001$)** brak ¹ (--)# 1,84 (1,58-2,16) ($<0,001$)§§
$\epsilon_2\epsilon_3$	20 (5,71%)	38 (13,62%)		
$\epsilon_3\epsilon_3$	145 (41,43%)	164 (58,78%)		
$\epsilon_2\epsilon_4$	6 (1,71%)	13 (4,66%)		
$\epsilon_3\epsilon_4$	154 (44,00%)	61 (21,86%)		
$\epsilon_4\epsilon_4$	25 (7,14%)	0 (0,00%)		

¹ zerowa liczebność komórki $\epsilon_4\epsilon_4$ w grupie kontrolnej, iloraz szans niemożliwy do policzenia; poziom *p* przybliżony

- * Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt dominujący allelu ϵ_4 ($\epsilon_4\epsilon_4 + \epsilon_3\epsilon_4 + \epsilon_2\epsilon_4$ vs. $\epsilon_3\epsilon_3 + \epsilon_2\epsilon_3 + \epsilon_2\epsilon_2$) w obu badanych grupach (grupa AD i grupa kontrolna).
- ** Model regresji logistycznej testujący wpływ efektu dominującego allelu ϵ_4 ($\epsilon_4\epsilon_4 + \epsilon_3\epsilon_4 + \epsilon_2\epsilon_4$ vs. $\epsilon_3\epsilon_3 + \epsilon_2\epsilon_3 + \epsilon_2\epsilon_2$) na ryzyko AD uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa AD i grupa kontrolna).
- # Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt recesywny allelu ϵ_4 ($\epsilon_4\epsilon_4$ vs. $\epsilon_3\epsilon_4 + \epsilon_2\epsilon_4 + \epsilon_3\epsilon_3 + \epsilon_2\epsilon_3 + \epsilon_2\epsilon_2$) w obu badanych grupach (grupa AD i grupa kontrolna).
- ## Model regresji logistycznej testujący wpływ efektu recesywnego allelu ϵ_4 ($\epsilon_4\epsilon_4$ vs. $\epsilon_3\epsilon_4 + \epsilon_2\epsilon_4 + \epsilon_3\epsilon_3 + \epsilon_2\epsilon_3 + \epsilon_2\epsilon_2$) na ryzyko zachorowania na AD uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa AD i grupa kontrolna).
- § Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (Cochran–Armitage trend test) w obu badanych grupach (grupa AD i grupa kontrolna).
- §§ Model regresji logistycznej testujący wpływ efektu addytywnego ($\epsilon_3\epsilon_3$ vs. $\epsilon_3\epsilon_4$ vs. $\epsilon_4\epsilon_4$) na ryzyko zachorowania na AD uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa AD i grupa kontrolna).

Tabela 13. Rozkład alleli polimorfizmu genu *APOE* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej

	AD (N=700)	Grupa kontrolna (N=558)	
ε2	26 (3,71%)	57 (10,22%)	p < 0,001
ε3	464 (66,29%)	427 (76,52%)	
ε4	210 (30,00%)	74 (13,26%)	

Test χ^2 (dwa stopnie swobody, tabela 3x2) wykonany na allelach ε2, ε3, ε4 w dwóchbadanych grupach: AD i grupie kontrolnej.

4.12 Testowanie interakcji między badanymi polimorfizmami rs2070424 genu *SOD1* oraz genu *APOE*

Przeprowadzone analizy wykazały, że polimorfizm rs2070424 genu *SOD1*, po uwzględnieniu korekty Bonferroniego, jest istotnie związany z ryzykiem zachorowania na AD. Ponieważ nie stwierdzono interakcji między polimorfizmami rs2070424 genu *SOD1* i polimorfizmem genu *APOE* ($p > 0,05$), wpływ obu tych polimorfizmów na ryzyko AD testowano za pomocą modelu regresji logistycznej. Analiza regresji logistycznej uwzględniająca wpływ genotypu genu *APOE* oraz wiek i płeć wykazała, że polimorfizm rs2070424 genu *SOD1* jest związany z ryzykiem zachorowania na AD w modelu recesywnym na poziomie istotności równym 0,002 (Tabela 14) i w modelu addytywnym na poziomie istotności równym 0,001 (Tabela 15). Po zastosowaniu

korekty Bonferroniego i obniżeniu progu istotności statystycznej dla prezentowanego badania do 0,005 wynik pozostaje pozytywny.

Tabela 14. Analiza regresji logistycznej w modelu recesywnym uwzględniająca wpływ wieku, płci, allelu $\epsilon 4$ genu *APOE* i polimorfizmu rs2070424 genu *SOD1*

	OR	95%CI	P
Wiek	1,08	1,05-1,10	<,001
Płeć	1,19	0,82-1,74	0,359
Genotyp z allelem $\epsilon 4$ genu <i>APOE</i>	3,95	2,66-5,86	<,001
rs2070424 - recesywny	0,47	0,30-0,75	,002

Tabela 15. Analiza regresji logistycznej w modelu addytywnym uwzględniająca wpływ wieku, płci, allelu $\epsilon 4$ genu *APOE* i polimorfizmu rs2070424 genu *SOD1*

	OR	95%CI	P
Wiek	1,08	1,05-1,10	<,001
Płeć	1,19	0,81-1,73	,370
Genotyp z allelem $\epsilon 4$ genu <i>APOE</i>	3,93	2,65-5,84	<,001
rs2070424 - addytywny	0,47	0,30-0,74	0,001

5. Dyskusja

5.1 Związek badanych polimorfizmów z ryzykiem zachorowania na chorobę Alzheimera

W prezentowanym badaniu stwierdzono, że 3 spośród 9 analizowanych polimorfizmów genów *SOD1*, *SOD2* i *GPx-1* mają związek z ryzykiem zachorowania na AD, jednak ten związek po uwzględnieniu korekty Bonferroniego utrzymał się tylko w jednym przypadku. W odniesieniu do pierwszego z nich, polimorfizmu rs4998557 genu *SOD1*, analiza regresji logistycznej uwzględniająca wpływ wieku i płci wykazała związek z ryzykiem zachorowania na AD w modelu addytywnym na poziomie istotności równym 0,044 (wynik nieistotny po korekcie Bonferroniego). Natomiast model regresji logistycznej wykonany na allelach A i G, uwzględniający wpływ wieku i płci, wykazał związek tego polimorfizmu z ryzykiem choroby na poziomie istotności równym 0,042. Zarówno analiza jednoczynnikowa, jak i analiza wieloczynnikowa uwzględniająca wpływ wieku i płci w modelu dominującym, wykazały, że kolejny polimorfizm, rs1050450 genu *GPx-1*, związany jest z ryzykiem wystąpienia AD na poziomie istotności równym odpowiednio 0,014 i 0,024 (wynik nieistotny po korekcie Bonferroniego).

Z kolei polimorfizm rs2070424 genu *SOD1* ma wpływ na ryzyko zachorowania na AD w analizie jednoczynnikowej w modelu recesywnym na poziomie istotności równym 0,008, w modelu addytywnym na poziomie istotności równym 0,005 i w teście χ^2 wykonanym na allelach A i G na poziomie istotności równym 0,006. Natomiast w analizie regresji logistycznej uwzględniającej wpływ wieku i płci w modelu recesywnym na poziomie istotności równym 0,002, w modelu addytywnym na poziomie istotności równym 0,001 i w modelu regresji logistycznej wykonanym na allelach A i G, na poziomie istotności równym 0,002 (wyniki istotne statystycznie po korekcie Bonferroniego).

W prezentowanym badaniu potwierdzono, że allel $\epsilon 4$ genu *APOE* jest czynnikiem ryzyka zachorowania na AD. Stwierdzono istotnie częstsze występowanie tego allelu

u chorych na AD w porównaniu do osób z grupy kontrolnej ($p < 0,001$). Ponadto przeprowadzona analiza regresji logistycznej uwzględniająca wpływ allelu $\epsilon 4$ genu *APOE* oraz wiek i płeć wykazała, że polimorfizm rs2070424 genu *SOD1* jest związany z ryzykiem zachorowania na AD w modelu recesywnym na poziomie istotności równym 0,002 i w modelu addytywnym na poziomie istotności równym 0,001. Ze względu na to, że w prezentowanym badaniu wykonywano równoczesną analizę 10 polimorfizmów (trzech polimorfizmów genu *SOD1*, trzech polimorfizmów genu *SOD2*, trzech polimorfizmów genu *GPx-1* i jednego genu *APOE*) obliczono, stosując korektę Bonferroniego, że granica poziomu istotności dla prezentowanego badania wynosi 0,005. W tym kontekście jedynie wpływ polimorfizmu rs2070424 genu *SOD1* na ryzyko rozwoju AD można zostać uznany za istotny.

Aktualna wiedza na temat polimorfizmu rs2070424 genu *SOD1*, jego wpływu na aktywność enzymu i znaczenia dla ryzyka chorób jest skąpa. Tylko w jednym z opublikowanych do tej pory badań oceniano wpływ tego polimorfizmu na aktywność *SOD1*. W badaniu tym nie wykazano wpływu genotypu polimorfizmu rs2070424 genu *SOD1* na aktywność *SOD1* i zmierzona aktywność enzymu wynosiła $47,35 \pm 19,94$ U/ml u osób z genotypem AA, $46,44 \pm 16,13$ U/ml u osób z genotypem AG i $46,65 \pm 14,76$ U/ml u osób z genotypem GG [Liu i wsp., 2010].

Do tej pory ukazało się niewiele prac analizujących znaczenie polimorfizmów genów *SOD1*, *SOD2* i *GPx-1* w rozwoju choroby Alzheimera. W badaniu przeprowadzonym przez Wienera i wsp., i opublikowanym w 2007 roku, oznaczono cztery polimorfizmy: rs2758346, r4880, rs2855116 i rs5746136 genu *SOD2* u chorych na AD (trzy ostatnie badano także w prezentowanej pracy) [Wiener i wsp., 2007]. Do badania włączono 203 rodziny wybrane wśród uczestników badania przeszukiwania genomu prowadzonego przez *National Institute of Mental Health –AD Genetics Initiative* (NIMH-ADGI). W każdej rodzinie były wśród rodzeństwa przynajmniej dwie osoby chore na AD i jedna osoba zdrowa. Średnia wieku wystąpienia objawów choroby wynosiła $70,9 \pm 7,4$ lat i na każdą rodzinę przypadało średnio 2,18 osób chorych. Dodatkowo, wśród badanych rodzin wydzielono podgrupę osób z rozpoznaniem AD o późnym początku (po 65 r.ż.), którą stanowiły 142 rodziny ze średnią wieku wystąpienia objawów

73,5±5,7 lat. W tej podgrupie na każdą rodzinę przypadało 2,21 osób chorych. W badaniu tym wykazano związek trzech badanych polimorfizmów z ryzykiem wystąpienia AD. Stwierdzono, że polimorfizmy rs2758346, rs4880 oraz rs2855116 w modelu dominującym mają wpływ na ryzyko AD na poziomie istotności równym odpowiednio 0,01, 0,03 i 0,03. Po ograniczeniu analizy do grupy chorych na AD o późnym początku stwierdzono, że wszystkie 4 badane polimorfizmy miały istotny wpływ na rozwój AD (poziom istotności wynosił 0,03 dla wszystkich 4 polimorfizmów) [Wiener, 2007]. W prezentowanej pracy doktorskiej nie wykazano związku tych polimorfizmów z ryzykiem AD. Niestety, brak dostępu do surowych danych w publikacji Wienera uniemożliwił wykonanie meta-analizy uwzględniającej jego wyniki i wyniki własne.

Ostatnio opublikowano badanie przeprowadzone u 28 osób chorych na AD i 29 osób z grupy kontrolnej zamieszkujących Brazylię. W badaniu tym Cardoso i wsp. oceniali wpływ polimorfizmu rs1050450 genu *GPx-1*, innego polimorfizmu badanego w prezentowanej pracy, na ryzyko rozwoju AD, a także aktywność kodowanego enzymu w erytrocytach oraz poziom selenu. Dystrybucja genotypów w grupie chorych na AD i w grupie kontrolnej nie różniła się. Nie wykazano również zależności pomiędzy genotypami a aktywnością GPx-1. Stwierdzono natomiast niższy poziom selenu we krwi chorych na AD z genotypem Pro/Pro w porównaniu do osób z grupy kontrolnej z tym samym genotypem [Cardoso i wsp., 2012]. Badanie to było przeprowadzone na bardzo niewielkich grupach badawczych. Z tego powodu nie można jednoznacznie wnioskować, że badany polimorfizm ma lub nie ma wpływu na ryzyko choroby. Z kolei wyniki prezentowanej pracy doktorskiej wykazały związek tego polimorfizmu z ryzykiem AD, który przestał być istotny po zastosowaniu korekty Bonferroniego. Nie wykonano meta-analizy wyników badania własnego i wyników Cardoso, ponieważ te dwie populacje różnią się etnicznie, Brazylię zamieszkują głównie potomkowie Portugalczyków i Hiszpanów (ang. *Hispanic white*).

W 2007 roku opublikowano wyniki dużego badania, którego celem była ocena wpływu 325 polimorfizmów 109 genów na funkcje poznawcze. Oznaczenia genetyczne zostały przeprowadzone w dwóch grupach uczestników. Pierwszą z nich stanowiły osoby

urodzone w 1921 roku, u których przeprowadzono testy oceniające funkcje poznawcze w wieku 11 i 79 lat, natomiast drugą osobę urodzone w 1936 roku, u których przeprowadzono testy oceniające funkcje poznawcze w wieku 11 i 64 lat. Kryteriami wykluczenia były objawy zespołu otępiennego i wynik testu MMSE poniżej 24 punkty. W badaniu tym wykazano związek polimorfizmu rs2830102 genu *APP* z poziomem funkcji poznawczymi. Wśród badanych polimorfizmów, które nie miały wpływu na funkcje poznawcze był polimorfizm rs3448 genu *GPx-1* [Harris i wsp., 2007], badany także w prezentowanej pracy. W przypadku tego polimorfizmu w prezentowanym badaniu nie stwierdzono jego związku z ryzykiem AD.

5.2 Związek innych polimorfizmów genów układu antyoksydacyjnego z ryzykiem zachorowania na chorobę Alzheimera

Zaledwie dwa badania analizowały znaczenie innych, niż przebadane w prezentowanej pracy, polimorfizmów genów białek układu antyoksydacyjnego jako czynników ryzyka AD. W obu analizowano znaczenie tego samego polimorfizmu rs1001179 genu katalazy. Do pierwszego badania z 2002 roku włączono 137 osób z rozpoznaniem AD, w tym 41 mężczyzn i 96 kobiet. W grupie badanych średni wiek wystąpienia objawów wynosił $77,0 \pm 9,7$ lat, z czego u 15 osób objawy wystąpiły poniżej 65 roku życia. Grupę kontrolną stanowiło 130 osób, w tym 39 mężczyzn i 91 kobiet. Warunkiem włączenia do grupy kontrolnej był prawidłowy wynik testu MMSE. Średnia wieku grupy kontrolnej wynosiła $83,7 \pm 8,6$ lat. W badaniu tym nie stwierdzono różnicy w dystrybucji genotypów i alleli pomiędzy badanymi grupami i tym samym nie wykazano wpływu polimorfizmu rs1001179 genu katalazy na ryzyko rozwoju AD [Goulas i wsp., 2002].

Drugie badanie opublikowane przez Capurso i wsp. w 2007 roku przeprowadzono u 242 pacjentów z rozpoznaniem sporadycznej postaci AD (145 kobiet i 97 mężczyzn), których średni wiek wystąpienia objawów wynosił 70 ± 8 lat. W grupie chorych było 185 pacjentów z rozpoznaniem AD o późnym początku ze średnią wieku wystąpienia objawów wynoszącą $75,2 \pm 5,9$ i 57 pacjentów z rozpoznaniem AD o wczesnym

początku (<65r.ż.) ze średnią wieku wystąpienia objawów wynoszącą $56,5\pm 5,5$ lat. Grupa kontrolna stanowiła 351 osób ze średnią wieku wynoszącą $76,5\pm 5,8$ lat i 70 osób ze średnią wieku $40,8\pm 13,9$ lat, co stanowiło łącznie 421 osób niespokrewnionych z pacjentami i dobranych pod względem wieku, płci i rasy. Kryteriami wykluczenia z grupy kontrolnej było rozpoznanie otępienia lub innej przewlekłej choroby neurologicznej, zaburzeń psychiatrycznych przebiegających z zaburzeniami funkcji poznawczych, choroby naczyniowej mózgu, nefropatii lub końcowego stadium choroby nerek. W tym badaniu również nie wykazano różnicy w dystrybucji genotypów i alleli pomiędzy badanymi grupami, również po podziale na grupy z AD o wczesnym i późnym początku, co potwierdza wcześniejsze doniesienie [Capurso i wsp., 2007].

Podsumowując, badania kliniczno-kontrolne oceniające znaczenie polimorfizmów genów układu antyoksydacyjnego w AD są nieliczne. Poza badaniem stanowiącym prezentowaną pracę doktorską opublikowano 4 inne. Prezentowane badanie jest wykonane na największym dotychczas materiale badanych: 400 chorych na AD i 402 osoby z grupy kontrolnej. Także przedstawia wyniki analizy największej liczby polimorfizmów (dziewięć), podczas gdy jeden z pozostałych autorów przebadał cztery polimorfizmy (Wiener i wsp, 2007), a trzech po jednym (Cardoso i wsp, 2012; Goulas i wsp 2002; Capurso i wsp, 2008).

5.3 Związek badanych i innych polimorfizmów genów układu antyoksydacyjnego z ryzykiem wystąpienia innych chorób zwyrodnieniowych układu nerwowego

Polimorfizmy będące przedmiotem analizy w prezentowanej pracy oraz inne polimorfizmy genów enzymów układu antyoksydacyjnego były także badane w innych chorobach zwyrodnieniowych układu nerwowego. Podobnie jak w AD, prace oceniające znaczenie tych wariantów genetycznych dla ryzyka innych chorób zwyrodnieniowych są nieliczne, a ich wyniki negatywne. Badania te były prowadzone

na mało licznych grupach chorych, co niestety uniemożliwia wyciąganie jednoznacznych wniosków.

Przykładowo, w chorobie Parkinsona (PD) badano znaczenie polimorfizmów genów *SOD1* i *SOD2*, natomiast brak jest prac dotyczących polimorfizmów genów *GPx-1* i katalazy w tej jednostce chorobowej. W badaniu opublikowanym w 2001 roku Farin i wsp. badali warianty genetyczne *SOD1* i *SOD2* u 45 osób z idiopatyczną chorobą Parkinsona i u 49 osób z grupy kontrolnej, nie stwierdzając różnic między badanymi grupami. Następnie, na większym materiale wykonano oznaczenia polimorfizmu rs4880 genu *SOD2*. Grupę badanych stanowiło 155 osób z rozpoznaniem PD, w tym było 93 mężczyzn i 62 kobiety, a średnia wieku osób w tej grupie wynosiła 69 lat. Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 231 osób ze średnią wieku wynoszącą 69 lat, w tym 148 mężczyzn i 83 kobiety. W badaniu stwierdzono brak różnicy w dystrybucji genotypów pomiędzy osobami chorymi na PD, a osobami z grupy kontrolnej [Farin i wsp., 2001].

W 2010 roku opublikowano badanie prowadzone w 5 krajach europejskich na temat znaczenia genetycznych, środowiskowych i zawodowych czynników ryzyka choroby Parkinsona. W badaniu oceniano m.in. wpływ polimorfizmów związanych z metabolizmem składników dymu tytoniowego i neurotransmisji dopaminergicznej z PD. Do badania włączono 767 osób z rozpoznaniem PD i 1989 osób z grupy kontrolnej. Od wszystkich uczestników zebrano informacje dotyczące palenia papierosów. Jednym z badanych polimorfizmów był rs4880 genu *SOD2*. W badaniu nie wykazano znaczenia tego polimorfizmu dla ryzyka choroby Parkinsona [De Palma i wsp., 2010].

Dotychczas wykonano wiele badań oceniających znaczenie genu *SOD1* w innej chorobie zwyrodnieniowej układu nerwowego, tzn. w stwardnieniu bocznym zanikowym. W tej chorobie wykryto, że liczne mutacje w genie *SOD1* są odpowiedzialne za wystąpienie choroby. Nie badano natomiast, czy warianty genetyczne genu *SOD1* są czynnikami jej ryzyka.

Odkąd na początku lat 90. ubiegłego wieku opisano po raz pierwszy mutację genu *SOD1* występującą w 15-20% przypadków postaci rodzinnej SLA, trwają badania, które pozwoliły na zidentyfikowanie ponad 130 mutacji tego genu [Andersen i wsp., 2007]. Postać kliniczna, wiek zachorowania oraz przebieg choroby są determinowane przez mutacje genu *SOD1*. Wykazano na przykład, że mutacje punktowe A4V (Ala4→Val) i I113T determinują szybki przebieg choroby, a średni czas przeżycia wynosi około 2 lata, natomiast mutacje G37R i H46R związane są ze średnim przeżyciem wynoszącym około 18 lat [Ratovitski i wsp., 1999]. Z kolei mutacja D90A (Asp90→Ala) może być dziedziczona autosomalnie recesywnie lub dominująco, charakteryzuje się niecałkowitą penetracją genu i została zidentyfikowana również w sporadycznych przypadkach SLA [Parton i wsp., 2002].

5.4 Badania polimorfizmów genów układu antyoksydacyjnego w innych chorobach, których patogeneza związana jest ze stresem oksydacyjnym

Stres oksydacyjny jest istotnym elementem patogenezy nie tylko chorób zwyrodnieniowych układu nerwowego, ale także nowotworów i chorób naczyniowych, czyli chorób, których ryzyko wzrasta wraz z wiekiem. Z tego powodu zasadne jest przeanalizowanie znaczenia wariantów genetycznych układu antyoksydacyjnego badanych w prezentowanej pracy także w chorobach nowotworowych i naczyniowych, tym bardziej, że prace w chorobach zwyrodnieniowych są nieliczne, przeprowadzone na niewielkim materiale (prezentowana praca jest dotychczas największa) i nie pozwalają na jednoznaczną ocenę znaczenia genetyki układu antyoksydacyjnego dla ich rozwoju. Wydaje się, że przeprowadzenie meta-analzy wyników badań wykonanych w chorobach o podobnym patomechanizmie (stres oksydacyjny) mogłoby pozwolić na określenie znaczenia wariantów genetycznych determinujących patomechanizm choroby a nie samą chorobę.

Ostatnio podobne podejście do analizy danych genetycznych zaprezentowali Ikram i wsp [Ikram i wsp., 2010]. Wykonali oni badanie, którego celem było wykrycie

polimorfizmów ryzyka dla patologicznych zmian w mikrokrążeniu siatkówki charakterystycznych dla różnych chorób sercowo-naczyniowych, np. nadciśnienia tętniczego, choroby niedokrwiennej serca, cukrzycy i udaru mózgu. Autorzy tej pracy wykazali istnienie 4 polimorfizmów powiązanych z szerokością żyłek siatkówki. W badaniach replikacyjnych wykryto zaś fakt, że jeden z tych polimorfizmów (rs10774625) na chromosomie 12q24 jest czynnikiem ryzyka choroby niedokrwiennej serca i nadciśnienia tętniczego.

Znaczenie polimorfizmu rs4998557 genu *SOD1* było badane jeden raz u chorych z rozpoznaniem raka żołądka i trzykrotnie u chorych na raka piersi. W odniesieniu do raka żołądka stwierdzono, że allel A jest czynnikiem ryzyka tej choroby i u nosicieli przynajmniej jednego allelu A istnieje 3.01 razy większe ryzyko jej rozwoju w porównaniu do nosicieli genotypu GG [Yi i wsp., 2010]. W badaniach oceniających znaczenie tego polimorfizmu dla ryzyka raka piersi uczestniczyło łącznie 11215 pacjentów i 6860 osób z grupy kontrolnej. Żadne z omawianych badań nie wykazało związku pomiędzy badanym polimorfizmem a ryzykiem rozwoju raka piersi i przeżywalnością po tej diagnozie [Udler i wsp., 2007; Oestergaard i wsp., 2006; Cebrian i wsp., 2006]. Polimorfizm ten nie był dotychczas badany w chorobach naczyniowych.

Ukazały się dwa badania na temat znaczenia polimorfizmu rs5746136 genu *SOD2* w chorobach nowotworowych. W jednej z prac sprawdzano związek 64 polimorfizmów genów biorących udział w metabolizmie alkoholu i stresie oksydacyjnym z ryzykiem rozwoju nowotworów głowy i szyi. Do badania włączono 1227 osób z rozpoznaniem nowotworu i 1325 osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną. Stwierdzono, że allel T polimorfizmu rs5746136 genu *SOD2* związany jest z ryzykiem rozwoju raka krtaniowej części gardła (OR=2,1, 95%CI: 1,2-3,7) i allel A polimorfizmu rs4342445 genu *SOD2* ma wpływ na występowanie nowotworów jamy ustnej (OR=1,3, 95%CI: 1,1-1,6) [Hakenewerth i wsp., 2011]. Wyniki drugiego badania u chorych na raka prostaty były negatywne [Abe i wsp., 2011].

Opublikowano 33 prace dotyczące znaczenia polimorfizmu rs4880 genu *SOD2* w rozwoju nowotworów, z czego 14 było negatywnych, 16 było pozytywnych, a w 3 badaniach stwierdzono pośredni związek polimorfizmu z badaną chorobą. W dwóch badaniach stwierdzono związek pomiędzy polimorfizmem rs4880 genu *SOD2* i rakiem płuc. W 2008 roku opublikowano pracę dotyczącą raka niedrobnokomórkowego płuc u palaczy. Do badania włączono 335 osób z rozpoznaniem tego nowotworu potwierdzonym przez dwóch patomorfologów i 413 osób stanowiących grupę kontrolną. Zbadano 105 polimorfizmów 31 genów biorących udział w metabolizmie związków rakotwórczych zawartych w dymie tytoniowym. Wśród pozytywnych wyników znalazł się polimorfizm rs4880 genu *SOD2*. Wykazano, że nosiciele allelu Ala mają większe ryzyko rozwoju raka niedrobnokomórkowego płuc (OR=1,90, 95%CI: 1,29-2,79, p=0,01) [Zienolddiny i wsp., 2008]. W badaniu opublikowanym rok później przeprowadzonym u 100 chorych z rozpoznaniem raka płuc i u 50 zdrowych osób z grupy kontrolnej również stwierdzono związek pomiędzy polimorfizmem rs4880 a ryzykiem rozwoju nowotworu. W analizie statystycznej wykazano, że częstość występowania innego allelu tego genu, allelu Val (OR=1,297, 95%CI: 1,095-1,536) i genotypu Val/Val (OR=7,00, 95%CI: 2,282- 21,476) była istotnie większa w grupie chorych w porównaniu do grupy kontrolnej [Zejnilovic i wsp., 2009].

W badaniu przeprowadzonym u 90 pacjentów z rozpoznaniem złośliwego międzybłoniaka opłucnej i u 395 osób stanowiących grupę kontrolną stwierdzono, że nosiciele genotypu Ala/Ala mają większe ryzyko zachorowania na ten nowotwór (OR=3,07, 95%CI: 1,55-6,05, p=0,001). Silniejszy związek pomiędzy polimorfizmem rs4880 genu *SOD2* i ryzykiem rozwoju złośliwego międzybłoniaka opłucnej stwierdzono u pacjentów nie narażonych na azbest [Landi i wsp., 2007].

W przypadku raka prostaty w 2 badaniach stwierdzono istotną zależność pomiędzy polimorfizmem rs4880 genu *SOD2* a ryzykiem zachorowania. Kang i wsp. przebadali 1320 chorych z rozpoznaniem raka prostaty i 1842 osób z grupy kontrolnej dobranych pod względem wieku, rasy i czasu który minął od pierwszego badania przesiewowego. Stwierdzono, że allel Ala jest czynnikiem ryzyka raka prostaty (Val/Ala vs Val/Val: OR=1,17, 95%CI: 0,97-1,42; Ala/Ala vs Val/Val: OR=1,28, 95%CI: 1,03-1,60; p=0,03)

[Kang i wsp., 2007]. Takie same wnioski płyną z badania przeprowadzonego przez zespół pod kierownictwem Coopera w 2008 roku na populacji Szwecji. DNA do badań zostało pobrane od 2975 osób z rozpoznaniem raka prostaty i od 1896 osób z grupy kontrolnej. Stwierdzono, że osoby będące nosicielami przynajmniej jednego allelu Ala mają prawie o 20% zwiększone ryzyko zachorowania na raka prostaty w porównaniu do osób będących homozygotą Val/Val (OR=1,19, 95%CI: 1,03-1,37, p=0,02) [Cooper i wsp., 2008]. W innym badaniu nie stwierdzono bezpośredniego wpływu polimorfizmu rs4880 genu *SOD2* na ryzyko wystąpienia raka prostaty. Wykazano natomiast, że ten polimorfizm modyfikuje związek pomiędzy klinicznie agresywnym rakiem prostaty a ilością spożywanego żelaza na poziomie istotności p=0,02 [Choi i wsp., 2008].

Trzy badania potwierdzają związek pomiędzy polimorfizmem rs4880 genu *SOD2* a ryzykiem zachorowania na raka trzustki. Do badania opublikowanego w 2008 roku zakwalifikowano 122 osoby, u których rozpoznano raka trzustki i 331 osób dobranych pod względem płci, wieku, a w analizie dodatkowo brano pod uwagę wywiad w kierunku spożywania alkoholu i palenia papierosów. Stwierdzono, że osoby będące nosicielami genotypu Val/Val mają większe ryzyko zachorowania na raka trzustki (OR=1,96, 95%CI: 1,0-3,8, p=0,04) [Wheatley-Price i wsp., 2008]. W badaniu opublikowanym w 2011 roku stwierdzono, że osoby będące nosicielami jednej albo dwóch kopi allelu Val mają 43% mniejsze ryzyko zachorowania na raka trzustki w porównaniu do osób będących homozygotą Ala/Ala [Zhang i wsp., 2011].

W jednym badaniu analizowano związek pomiędzy polimorfizmami *SOD1* i *SOD2* a ryzykiem zachorowania na raka żołądka. Zakwalifikowano 145 pacjentów ze zdiagnozowanym stanem przedrakowym żołądka, 140 pacjentów z rozpoznaniem rakiem żołądka i 147 zdrowych osób stanowiących grupę kontrolną. Wykazano, że allel Ala zwiększa ryzyko zachorowania na ten nowotwór (OR=2,85, 95%CI: 1,66-4,89, p<0,001). Ponadto stwierdzono, że dodatni wywiad rodzinny w połączeniu z genotypem zawierającym przynajmniej jeden allel Ala skutkowało zwiększonym ryzykiem złośliwego charakteru stanu przedrakowego żołądka (OR=7,71, 95%CI: 2,10-28,22) [Yi i wsp., 2010].

Również w przypadku raka wątrobowokomórkowego dowiedziono związku pomiędzy polimorfizmem rs4880 genu *SOD2* a ryzykiem zachorowania. Wykazano, że osoby będące nosicielami przynajmniej jednego allelu Ala miały większe ryzyko zachorowania na raka wątrobowokomórkowego ($p=0,02$) i zgonu ($p=0,02$) [Nahon i wsp., 2009]. W 2011 roku opublikowano meta-analizę badań nad związkiem polimorfizmów różnych genów z ryzykiem zachorowania na raka wątrobowokomórkowego. Do meta-analizy włączono tylko te polimorfizmy, których znaczenie oceniano przynajmniej trzykrotnie. W przypadku polimorfizmu rs4880 meta-analiza wykazała, że allel Ala zwiększa ryzyko zachorowania na raka wątrobowokomórkowego w modelu dominującym (OR=1,97, 95%CI: 1,35-2,87) [Jin i wsp., 2011].

W badaniach genetycznych nad rakiem jelita grubego i odbytu nie wykazano bezpośredniego wpływu polimorfizmu rs4880 genu *SOD2* na rozwój choroby, ale stwierdzono, że wchodzi on w interakcje z polimorfizmami genów *GPx-4* i *TXNRD2* modyfikując ryzyko zachorowania na nowotwór. Przebadano 832 pacjentów i 705 kontroli i na podstawie wyników postawiono hipotezę, że interakcje pomiędzy dwoma *loci* odzwierciedlają funkcjonalne interakcje pomiędzy produktami genów [Meplan i wsp., 2010]. Wśród przeprowadzonych 4 badań dotyczących znaczenia polimorfizmów genów układu oksydacyjnego, tylko w jednym stwierdzono wpływ polimorfizmu rs4880 na ryzyko rozwoju chłoniaka nieziarniczego [Wang i wsp., 2006; Farawela i wsp., 2012; Lan i wsp., 2007; Lightfoot i wsp., 2006].

Oceniano również znaczenie polimorfizmów genów układu antyoksydacyjnego w raku piersi. W badaniu z 2006 roku przeprowadzonym u 1262 kobiet z rozpoznaniem raku piersi i 1533 zdrowych kobiet wykazano, że polimorfizm rs4880 genu *SOD2* samodzielnie nie wpływa na ryzyko rozwoju nowotworu. Natomiast w jednoczesnej analizie polimorfizmu rs4880 genu *SOD2* i polimorfizmu rs1050450 genu *GPx-1* stwierdzono zwiększone ryzyko zachorowania na raka piersi u kobiet będących jednocześnie nosicielkami genotypów Ala/Ala i Leu/Leu (OR=1,87, 95%CI: 1,09-3,19, $p=0,03$) [Cox i wsp., 2006]. Najnowsze badanie oceniające wpływ polimorfizmów układu oksydacyjnego na prognozę u pacjentek z rozpoznaniem raku piersi zostało

przeprowadzone u 321 kobiet. Wykazano, że osoby z genotypem Ala/Ala mają istotnie krótszy czas przeżycia bez progresji choroby w grupie chorych leczonych cyklofosfamidem. Zależności tej nie wykazano w przypadku pacjentek leczonych hormonalnie [Hubackova i wsp., 2012]. W opublikowanej w 2010 roku metaanalizie wykazano, że polimorfizm rs4880 genu *SOD2* nie jest związany z ryzykiem zachorowania na raka piersi. Analizę statystyczną przeprowadzono na 9710 chorych i 11041 zdrowych osobach z 17 włączonych badań i nie stwierdzono związku pomiędzy tym polimorfizmem a rakiem piersi w modelu addytywnym (Ala/Ala vs Val/Val: OR=1,091, 95%CI: 0,969-1,229), dominującym (Ala/Ala +Ala/Val vs Val/Val: OR=1,045, 95%CI: 0,961-1,136) ani w recesywnym (Ala/Ala vs Val/Val+ Ala/Val: OR 1,027, 95%CI: 0,956- 1,102) [Ma i wsp., 2010].

Przeprowadzono również badanie oceniające wpływ polimorfizmu rs4880 genu *SOD2* na ryzyko zachorowania na nowotwory układu nerwowego. Do badania włączono 362 osoby z rozpoznaniem glejaka, 134 osoby z rozpoznaniem oponiaka i 69 osób z rozpoznaniem schwannomy nerwu przedstonkowo – ślimakowego oraz 494 osoby zdrowe stanowiące grupę kontrolną. Wykazano, że allel Ala zwiększa ryzyko wystąpienia schwannomy nerwu przedstonkowo- ślimakowego (OR(CT/CC)=2,0, 95%CI: 1,0-4,2; OR(CT)=2,1, 95%CI: 1,0-4,5; OR(CC)=1,9, 95%CI: 0,8-4,6, p= 0,2) [Rajaraman i wsp., 2008].

W 2008 roku opublikowano także metaanalizę, do której włączono 13 publikacji dotyczących związku polimorfizmu rs4880 genu *SOD2* z różnymi nowotworami. W analizie wykorzystano w sumie 7366 osób z rozpoznaniem nowotworu i 9102 osoby zdrowe stanowiące grupę kontrolną. Nie wykazano związku polimorfizmu rs4880 z ryzykiem zachorowania na raka piersi (OR=0,98, 95%CI: 0,90-1,07) ani z ryzykiem wystąpienia choroby nowotworowej ogólnie (OR=1,02 95%CI: 0,91-1,14) [Bag i Bag, 2008].

Oprócz chorób nowotworowych polimorfizm rs4880 genu *SOD2* był również badany w chorobach naczyniowych, głównie w chorobie wieńcowej i w powikłaniach naczyniowych u chorych na cukrzycę. Tian i wsp. przeprowadzili badanie u 269 osób

z chorobą wieńcową o wczesnym początku, u 278 pacjentów z chorobą wieńcową o późnym początku i 299 zdrowych osób z grupy kontrolnej. Wykazano związek allelu C ze zmniejszonym ryzykiem wystąpienia choroby wieńcowej o wczesnym początku (odpowiednio $OR=0,60$, $95\%CI: 0,41-0,87$ i $OR=0,59$, $95\%CI: 0,40-0,87$). Nie obserwowano takiej zależności w przypadku choroby wieńcowej o późnym początku. W tym samym artykule zamieszczono również meta-analizę wykonaną na 8 badaniach włączając w to badanie autorów. Stwierdzono istotny wpływ allelu C na zmniejszenie ryzyka choroby wieńcowej o wczesnym początku w modelu dominującym ($OR=0,69$, $95\%CI: 0,61-0,78$), recesywnym ($OR=0,64$, $95\%CI: 0,50-0,82$) i addytywnym ($OR=0,73$, $95\%CI: 0,65-0,80$) [Tian i wsp., 2012].

W innym badaniu oceniano związek między polimorfizmem rs4880 a ryzykiem rozwoju choroby wieńcowej u osób chorych na cukrzycę. Stwierdzono, że genotyp TT jest związany ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia choroby wieńcowej u kobiet chorujących na cukrzycę ($OR=2,22$, $95\%CI: 1,17-4,24$, $p=0,01$) [Jones i wsp., 2010]. Flekac i wsp. oceniali związek pomiędzy polimorfizmami genów układu antyoksydacyjnego a powikłaniami naczyniowymi w cukrzycy u 120 pacjentów chorujących na cukrzycę typu 1 i 306 pacjentach chorujących na cukrzycę typu 2. Stwierdzono, że cukrzyca jest gorzej kontrolowana u chorych z genotypem TT i że polimorfizm rs4880 ma związek z występowaniem makroangiopatii u pacjentów z cukrzycą ($p<0,05$) [Flekac i wsp., 2008]. W 2011 roku opublikowano metaanalizę dotyczącą badań polimorfizmu rs4880 genu *SOD2* w cukrzycy i jego wpływu na występowanie mikroangiopatii cukrzycowej. Do analizy włączono 17 badań i wykazano, że allel C wykazuje protekcyjny wpływ na ryzyko wystąpienia mikroangiopatii cukrzycowej w modelu dominującym ($OR=0,788$, $95\%CI: 0,860-0,914$), recesywnym ($OR=0,808$, $95\%CI: 0,685-0,953$) i addytywnym ($OR=0,828$, $95\%CI: 0,751-0,913$) [Tian i wsp., 2011].

Opublikowano 30 badań dotyczących znaczenia polimorfizmu rs1050450 genu *GPx-1* w rozwoju nowotworów z czego 15 było negatywnych, 12 było pozytywnych, a w 3 badaniach stwierdzono niebezpośredni związek polimorfizmu z ryzykiem zachorowania na badany nowotwór. U 213 pacjentów z rozpoznany rakiem pęcherza

moczowego i u 209 zdrowych osób oznaczono polimorfizmy genów układu antyoksydacyjnego. Stwierdzono, że genotyp Pro/Leu związany jest z większym ryzykiem zachorowania na raka pęcherza moczowego u osób będących jego nosicielami w porównaniu do genotypu Pro/Pro (OR=2,63, 95%CI: 1,45-4,75, p=0,001). Ponadto okazało się, że genotyp Pro/Leu związany był ze stopniem zaawansowania guza (T₁ vs T₂₋₄: OR=2,58, 95%CI: 1,07-6,18, p=0,034) [Ichimura i wsp., 2004]. W innym badaniu stwierdzono, że genotyp Leu/Leu związany jest z większym ryzykiem zachorowania na ten nowotwór (OR=1,67, 95%CI: 1,17-2,40, p=0,005) [Kucukgergin i wsp., 2011].

W przypadku chłoniaków nieziarnicznych Lightfoot i wsp. wykazali niewielki związek pomiędzy polimorfizmem rs1050450 a ryzykiem zachorowania [Lightfoot i wsp., 2006]. W badaniu z 2012 roku wykazano, że osoby będące nosicielami genotypu Leu/Leu mają większe ryzyko zachorowania na chłoniaka B-komórkowego (OR=3,3, 95%CI: 1,4-7,4, p=0,004) [Farawela i wsp., 2012].

Ukazały się 3 prace dotyczące wpływu polimorfizmu rs1050450 genu *GPx-1* na ryzyko rozwoju raka płuc. W 2000 roku przebadano 315 chorych i 315 zdrowych osób i stwierdzono, że genotypy Pro/Leu i Leu/Leu (odpowiednio: OR=1,8, 95%CI: 1,2-2,8; OR=2,3 95%CI: 1,3-3,8, p<0,001) są związane z zachorowaniem na ten nowotwór [Ratnasinghe i wsp., 2000]. To samo zagadnienie zbadano w 2007 roku i wykazano, że allel T związany jest z mniejszym ryzykiem zachorowania na raka płuc w porównaniu do allelu C (OR=0,60, 95%CI: 0,35-1,05) [Raaschou-Nielsen i wsp., 2007]. Podobnych wyników dostarczyło następne badanie, w którym stwierdzono, że nosiciele allelu Leu mieli istotnie mniejsze ryzyko zachorowania na raka płuc (OR=0,6, 95%CI: 0,4-0,8, p=0,02) i osobno w grupie palaczy (OR=0,3, 95%CI: 0,1-0,8, p=0,012) [Rosenberger i wsp., 2008].

W jednej pracy zamieszczono wyniki badania związku polimorfizmu rs1050450 genu *GPx-1* z nowotworami skóry. Wykazano, że genotyp Leu/Leu związany jest z 2-krotnie większym ryzykiem wystąpienia czerniaka skóry (OR=2,14, 95%CI: 1,22-3,72) [He i wsp., 2010].

Związek pomiędzy polimorfizmem rs1050450 a ryzykiem zachorowania na raka prostaty udokumentowano w jednej pracy. W badaniu przeprowadzonym u 82 pacjentów i 123 zdrowych osób stwierdzono, że allel Leu wykazuje protekcyjny efekt na ryzyko zachorowania na ten nowotwór (OR=0,38, 95%CI: 0,20-0,75, p=0,004) [Arsova-Sarafinowska i wsp., 2009]. Natomiast Steinbrecher i wsp. nie potwierdzili wpływu tego polimorfizmu na ryzyko wystąpienia raka prostaty, ale stwierdzili jego modyfikujący wpływ na poziom selenu, którego wpływ na ryzyko zachorowania na rak prostaty jest sugerowany [Steinbrecher i wsp., 2010].

W badaniach nad rakiem piersi przeprowadzonym u 377 kobiet, u których zdiagnozowano ten nowotwór i 377 osobach zdrowych stwierdzono, że nosicielki allelu T polimorfizmu rs1050450 genu *GPx-1* mają 1.43 razy większe ryzyko zachorowania na raka piersi [Ravn-Haren i wsp., 2006]. Wpływu tego pojedynczego polimorfizmu nie potwierdzili inni badacze na większym materiale (1262 chorych i 1533 zdrowych osób). Wykazali natomiast, że osoby będące nosicielami jednocześnie genotypu Ala/Ala *SOD2* i Leu/Leu *GPx-1* mają większe ryzyko wystąpienia tego nowotworu (OR=1,87, 95%CI: 1,09-3,19) [Cox i wsp., 2006].

W 2011 roku opublikowano metaanalizę opartą na 31 badaniach dotyczących związku pomiędzy polimorfizmem rs1050450 genu *GPx-1* a ryzykiem zachorowania na nowotwór. Łączna liczba uczestników tych badań wynosiła 14372 osoby z rozpoznaną chorobą nowotworową i 18 081 osób zdrowych stanowiących grupy kontrolne. Wyniki analizy wskazują, że nosiciele allelu Leu (Pro/Leu i Leu/Leu) w modelu dominującym mają większe ryzyko zachorowania na nowotwór (OR=1,12, 95%CI: 1,02-1,23) [Chen i wsp., 2011].

Oprócz chorób nowotworowych polimorfizm rs1050450 genu *GPx-1* był również badany w chorobach naczyniowych. Wyniki badania przeprowadzonego na 265 osobach chorujących na chorobę wieńcową i 265 zdrowych osobach dobranych pod względem wieku i płci dowodzą, że nosiciele allelu Leu (genotypy Leu/Leu i Leu/Pro) mają istotnie wyższe ryzyko wystąpienia choroby wieńcowej w porównaniu do nosicieli genotypu Pro/Pro (OR=2,02, 95%CI: 1,27-3,22) [Tang i wsp., 2008]. W innym badaniu

oceniano stopień miażdżycy tętnic wieńcowych u chorych z rozpoznaną cukrzycą typu 2 w związku z polimorfizmem rs1050450 i stwierdzono, że wskaźnik uwapnienia tętnic wieńcowych jest istotnie wyższy u osób będących nosicielami genotypu Pro/Leu w porównaniu do osób z genotypem Pro/Pro ($p=0,006$) [Nemoto i wsp., 2007]. Okazuje się również, że polimorfizm ten wpływa na ryzyko restenozy po stentowaniu naczyń wieńcowych. Istotną zależność wykazano w modelu dominującym (OR=2,1, 95%CI: 1,2-3,8, $p=0,01$) i addytywnym (OR=2,1, 95%CI: 1,1-3,7, $p=0,02$) [Oguri i wsp., 2007].

U pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 wykazano również związek między wariantami polimorfizmu rs1050450 genu *GPx-1* a grubością kompleksu intima-media w tętnicach szyjnych. Średnia grubość kompleksu intima-media w tętnicy szyjnej wspólnej była istotnie większa u osób z genotypem Pro/Leu w porównaniu do osób z genotypem Pro/Pro ($p=0,0028$) [Hamanishi i wsp., 2004]. W celu określenia czy czynniki genetyczne wpływają na rozwój tętniaka aorty przebadano 88 pacjentów chorujących na nadciśnienie tętnicze i tętniaka aorty oraz 1263 osoby z nadciśnieniem tętniczym, u których nie stwierdzono tętniaka aorty. Wykazano, że polimorfizm rs1050450 ma związek z ryzykiem rozwoju tętniaka aorty u osób z nadciśnieniem tętniczym w modelu dominującym (OR=0,34, 95%CI: 0,12-0,78, $p=0,0225$) [Kato i wsp., 2008]. Badania nad tym polimorfizmem były również prowadzone na pacjentach z krwotokiem śródmózgowym. Do badania zakwalifikowano 192 osoby z pierwotnym krwotokiem śródmózgowym i 197 osób zdrowych dobranych pod względem wieku i płci. Wykazano istotny związek pomiędzy genotypami zawierającymi allel T a całą grupą chorych (OR=1,53, 95%CI: 1,02-2,29) oraz z płatowym pierwotnym krwotokiem śródmózgowym (OR=2,36, 95%CI: 1,31-4,26). Zależności tej nie stwierdzono w grupie chorych na niepłatowy pierwotny krwotok śródmózgowy [Pera i wsp., 2008].

W badaniu dotyczącym genetycznych czynników ryzyka raka przełyku oznaczono 63 polimorfizmy różnych genów. Wykazano związek polimorfizmu rs1800668 genu *GPx-1* z ryzykiem rozwoju raka przełyku (OR=1,57, 95%CI: 0,76-3,26, $p<0,05$) [Xie i wsp., 2005]. Wśród pozostałych 3 prac dotyczących związku polimorfizmu rs1800668 genu *GPx-1* z ryzykiem zachorowania na nowotwór 2 były negatywne, a w jednym

polimorfizm był czynnikiem modyfikującym inny czynnik ryzyka [Bhatti i wsp., 2009; Rajaraman i wsp., 2008; Peters i wsp., 2008].

W żadnym przypadku nie wykazano natomiast związku polimorfizmów rs2070424 genu SOD1 [Rajaraman i wsp., 2008; Kang i wsp., 2007; Udler i wsp., 2007; Oestergaard i wsp., 2006; Cebrian i wsp., 2006], rs1041740 genu SOD1, rs2855116 genu SOD2 i rs3448 genu GpX1 [Mavaddat i wsp., 2009; Udler i wsp., 2007, Oestergaard i wsp., 2006; Cebrian i wsp., 2006; Peters i wsp., 2008] z ryzykiem chorób nowotworowych i naczyniowych.

Podsumowując, przedstawione prace wskazują, że niektóre z badanych w prezentowanej pracy polimorfizmów są istotnymi czynnikami ryzyka niektórych nowotworów, czy też chorób naczyniowych. Najwięcej danych opublikowano na temat związku dwóch polimorfizmów z ryzykiem nowotworów: rs4880 genu *SOD2* i rs1050450 genu *GPX1*. W większości wskazują one, że taki związek istnieje. Te dwa polimorfizmy nie wykazały związku z ryzykiem AD w prezentowanej pracy. Z kolei polimorfizm rs2070424 genu SOD1, jedyny wykazujący pozytywny związek z ryzykiem AD w prezentowanej pracy nie jest czynnikiem ryzyka ani choroby nowotworowej ani żadnej choroby naczyniowej. Z tego powodu nie przeprowadzono metaanalizy wyników badań genetycznych w chorobach, które mają pewne wspólne aspekty patomechanizmu (stres oksydacyjny).

5.5 Trudności metodyczne badań oceniających znaczenie genetycznych czynników ryzyka

Badania kliniczno – kontrolne, które stanowiły sposób prezentacji wyników własnych oraz liczne wyniki innych autorów zaprezentowane powyżej są najczęściej stosowaną metodą pozwalającą na wykrywanie genetycznych wariantów ryzyka różnych chorób. Ten sposób badania jest niestety obciążony dużym ryzykiem uzyskania wyników fałszywie pozytywnych lub fałszywie negatywnych. Często zdarza się, że pozytywne

wyniki uzyskane w pierwszym badaniu kliniczno – kontrolnym rzadko są powtarzane w niezależnych populacjach [Lohmueller i wsp., 2003]. Tak też zdarzyło się w prezentowanej pracy. W przytaczanym wyżej badaniu przeprowadzonym przez Wienera i wsp. oznaczono cztery polimorfizmy: rs2758346, r4880, rs2855116 i rs5746136 genu SOD2 u chorych na AD, z których trzy ostatnie badano w prezentowanej pracy. W pracy Wienera i wsp. [Wiener i wsp., 2007] stwierdzono, że polimorfizmy rs2758346, rs4880 oraz rs2855116 w modelu dominującym mają wpływ na ryzyko AD na poziomie istotności równym odpowiednio 0,01, 0,03 i 0,03, a po ograniczeniu analizy do grupy chorych na AD o późnym początku wszystkie 4 badane polimorfizmy miały istotny wpływ na rozwój AD (poziom istotności wynosił 0,03 dla wszystkich 4 polimorfizmów) [Wiener i wsp., 2007]. W prezentowanej pracy natomiast te polimorfizmy nie miały istotnego związku z zachorowaniem na AD.

Trudności replikacyjne mogą być efektem zbyt małej liczby uczestników badań kliniczno-kontrolnych, zjawiska odmienności genetycznej lub fenotypowej oraz interakcji gen – czynnik środowiskowy.

W związku z tym istotne jest, aby genetyczne badania kliniczno – kontrolne prowadzić na możliwie jak największej liczbie uczestników [Lohmueller i wsp., 2003]. Niestety, pozyskanie do takich badań wystarczająco dużej liczby chorych jest często bardzo trudne w jednym ośrodku. W przypadku prezentowanej pracy DNA od 50 chorych pochodziło z ośrodka łódzkiego [Klinika Neurologii i Epileptologii Szpitala Uniwersyteckiego w Łodzi].

Innym powodem trudności potwierdzenia wyników uzyskiwanych w genetycznych badaniach kliniczno – kontrolnych może być odmienność genetyczna (ang. *genetic heterogeneity*) [Van Vught i wsp., 2005]. Przykładem tego zjawiska w AD może być występowanie takiego samego fenotypu u osób, które mają różne mutacje genu *PSEN1*. Stwierdzono przykładowo, że mutacje takie, jak np. L85P, P117L, P117S genu *PSEN1* powodują wystąpienie zaburzeń funkcji poznawczych bardzo wcześnie, bo przed 30 rokiem życia. Natomiast zaburzenia zachowania takie jak lęk, halucynacje czy urojenia

związane są z mutacjami w genie *PSEN1* takimi jak np. M146I, M146L, L250S czy R269H [Larner i Doran 2006].

Z kolei przykładem zjawiska odmienności fenotypowej w AD może być wpływ jednej z mutacji genu *PSEN2*, Asn141Ile na przebieg rodzinnej postaci AD. U członków rodzin, wśród których występuje ta mutacja wiek zachorowania waha się od 40 aż do 75 lat. Z tego powodu podejrzewa się, że istnieją inne czynniki poza tą mutacją, które wpływają na przebieg choroby. W badaniu przeprowadzonym na 9 rodzinach, u których zidentyfikowano mutację Asn141Ile w genie *PSEN2* wykazano, że genotypy *APOE* istotnie wpływają na wiek wystąpienia objawów choroby [Wijsman i wsp., 2005].

Współdziałanie wariantów polimorficznych genów z czynnikami środowiskowymi może być kolejnym powodem trudności powtarzalności wyników pozytywnych uzyskanych w genetycznych badaniach kliniczno – kontrolnych. Uważa się, że czynniki środowiskowe mogą wpływać na ekspresję genów, a z drugiej strony genotyp może modyfikować osobniczą podatność jednostki na działanie środowiska. Wyniki dużego populacyjnego badania, *The Rotterdam Study*, zostały opublikowane w 1998r. w czasopiśmie *Lancet*. W badaniu brało udział 6870 osób powyżej 55 roku życia bez cech otępienia w chwili włączenia do badania. Uczestników badania podzielono na trzy grupy pod względem wywiadu nikotynowego: nigdy niepalących, palących kiedykolwiek w przeszłości oraz palących aktualnie. Następnie po ponad dwóch latach obserwacji objawy otępienia stwierdzono u 146 osób, w tym AD rozpoznano u 105 osób. Stwierdzono znacznie większe ryzyko zachorowania na otępienie u palaczy w porównaniu z osobami nigdy nie palącymi. Nie stwierdzono tej zależności u nosicieli allelu $\epsilon 4$ genu *APOE*, natomiast u osób nie będących nosicielami tego allelu zależność była szczególnie silnie wyrażona [Ott i wsp., 1998].

Biorąc pod uwagę przytoczone powyżej argumenty, aby znacząco zwiększyć szanse na uzyskanie wiarygodnych, powtarzalnych wyników, badania powinny być prowadzone na bardzo dużych grupach uczestników o podobnym fenotypie z uwzględnieniem wpływu czynników środowiskowych.

Z uwagi na powyższe ograniczenia badań kliniczno – kontrolnych coraz większą rolę w ocenianiu znaczenia wariantów polimorficznych jako czynników ryzyka nabiera wprowadzona w ostatnich kilku latach metoda przeszukiwania całego genomu ludzkiego (GWAS). Metoda ta nie zakłada wstępnie hipotezy badawczej. Za czynniki dokumentujące wynik pozytywny takich badań uważa się odpowiednio dużą grupę badawczą, nawet 10 000 osób, różnicę częstości występowania wariantów genetycznych między chorymi i grupą kontrolną na poziomie istotności statystycznej poniżej 10^{-8} oraz powtórzenie w niezależnych populacjach pozytywnego wyniku [Mullen i wsp. 2009]. Wykonanie takich badań jest możliwe tylko dzięki ścisłej międzynarodowej współpracy.

Do tej pory opublikowano 20 badań GWAS u chorych na AD. Tylko 3 z tych badań zostały wykonane u więcej niż 10000 pacjentów i osób z grupy kontrolnej razem [Harold i wsp., 2009; Seshadri i wsp., 2010; Hollingworth i wsp., 2011]. Wymagany dla badań GWAS poziom istotności $p < 10^{-8}$ w pierwszym etapie (ang. *discovery sample*) uzyskano w 7 badaniach [Seshadri i wsp., 2010; Hu i wsp., 2009; Wijsman i wsp., 2011; Naj i wsp., 2011; Reiman i wsp., 2007; Lambert i wsp., 2009; Harold i wsp., 2009], natomiast wyniki powtórzono na niezależnych populacjach w 15 badaniach.

Wszystkie trzy warunki jakości dla badań GWAS zostały spełnione w dwóch badaniach. W pierwszym z nich opublikowanym w 2009 roku Harold i wsp. wykonali oznaczenia u prawie 12000 uczestników uzyskując poziom istotności dla wyników pozytywnych poniżej 10^{-8} i potwierdzili wynik pozytywny w niezależnych populacjach [Harold i wsp., 2009]. Drugie badanie opublikowane w 2010 roku zostało przeprowadzone na ponad 17000 osób i również spełniło warunek poziomu istotności i replikacji wyników [Seshadri i wsp., 2010].

W badaniach tych, poza potwierdzeniem znaczenia polimorfizmu genu *APOE* w AD, wykazano również, że warianty genetyczne genu *CLU* (zwanego również *APOJ*), *PICALM*, *BINI* oraz genu *EXOC3L2*, wykazują związek z ryzykiem zachorowania na AD.

Gen *CLU* koduje białko zwane klasteryną, wykazujące ekspresję we wszystkich tkankach ssaków. Udokumentowano również wzrost jego ekspresji w procesach patologicznych przebiegających w układzie nerwowym, takich jak np. uraz czy stan zapalny. W warunkach patologicznych białko to związane jest z amyloidem i w AD stwierdzono jego występowanie w plakach amyloidowych. Uważa się, że klasteryna wchodzi w interakcje z β -amyloidem chroniąc przed agregacją i formując kompleksy zdolne do przekraczania bariery krew- mózg [Calero, 2000].

Gen *PICALM* koduje białko o tej samej nazwie. Ulega ono ekspresji we wszystkich tkankach, a szczególnie w neuronach. Pomimo, że rola tego białka nie jest do końca poznana to wykazano że bierze ono udział w procesie endocytozy mediowanej klatryną (ang. *Clathrin – mediated endocytosis, CME*). Proces ten odpowiedzialny jest za dystrybucję wielu cząsteczek, takich jak składniki pokarmowe, czynniki wzrostu czy neurotransmitery. W niedawno opublikowanych badaniach na modelu zwierzęcym AD (myszy Tg2576) wykazano istotnie podwyższony poziom białka *PICALM*, co potwierdza znaczenie procesu endocytozy mediowanej klatryną w patomechanizmie AD i wzmacnia doniesienia badań GWAS dotyczące roli genu *PICALM* jako czynnika ryzyka rozwoju tej choroby [Thomas i wsp., 2011].

Z procesem endocytozy jest związane również białko kodowane przez gen *BIN1*. Występuje ono w kilku izoformach m.in. specyficznej dla mózgu i udokumentowano, że niektóre izoformy zaangażowane są w proces endocytozy synaptycznej mediowanej dynaminą [Wigge i wsp., 1998]. W badaniach na modelu zwierzęcym AD (myszy Tg2576), poprzez stwierdzenie obniżonego poziomu dynaminy-1 w neuronach hipokampu, wykazano istotną rolę procesu endocytozy mediowanej dynaminą w rozwoju AD [Kelly i wsp. 2005]. Białko kodowane przez gen *EXOC3L2* związane jest z egzocytozą białek i lipidów, co jest kluczowe dla wzrostu i utrzymania integralności neuronów [Barkefors i wsp., 2011]. Żadne z dotychczas opublikowanych badań GWAS u chorych na AD nie udokumentowało znaczenia wariantów genetycznych w genach *SOD1*, *SOD2* i *GPx-1* dla ryzyka tej choroby.

6. Wnioski

- 1) W prezentowanej pracy wykazano, że polimorfizm rs2070424 genu *SOD1* jest czynnikiem ryzyka AD w modelu addytywnym i recesywnym regresji logistycznej uwzględniającej wpływ wieku, płci i allelu $\epsilon 4$ genu *APOE*.
- 2) Analiza materiału własnego wykazała istotny związek polimorfizmu rs4998557 genu *SOD1* z ryzykiem zachorowania na AD w modelu addytywnym regresji logistycznej uwzględniającej wpływ wieku i płci. Związek ten przestał być istotny po zastosowaniu korekty Bonferroniego.
- 3) Analiza materiału własnego wykazała istotny związek polimorfizmu rs1050450 genu *GPx-1* z ryzykiem zachorowania na AD w modelu dominującym regresji logistycznej uwzględniającej wpływ wieku i płci. Związek ten przestał być istotny po zastosowaniu korekty Bonferroniego.
- 4) Polimorfizm rs4998557 genu *SOD*, polimorfizmy rs2855116, rs5746136 i rs4880 genu *SOD2* i polimorfizmy rs3448, rs1800668 genu *GPx-1* nie są czynnikami ryzyka AD.
- 5) U osób chorych na AD stwierdzono znacznie częstsze występowanie genotypu z allelem $\epsilon 4$ w porównaniu do osób z grupy kontrolnej, co jest zgodne z licznymi doniesieniami dokumentującymi, że allel $\epsilon 4$ jest czynnikiem ryzyka zachorowania na AD.

7. Streszczenia

7.1 Streszczenie w języku polskim

Wstęp: Choroba Alzheimera (AD) jest chorobą zwyrodnieniową ośrodkowego układu nerwowego, w której głównymi objawami są zaburzenia funkcji poznawczych prowadzące do stopniowej utraty samodzielności. AD stanowi najczęstszą przyczynę otępienia w społeczeństwach zachodnich. Etiologia tej choroby jest złożona i do tej pory zidentyfikowano kilka środowiskowych (np. starszy wiek) i genetycznych (np. nosicielstwo allelu $\epsilon 4$ genu *APOE*) czynników ryzyka tej choroby. W etiopatogenezie AD, która jest również złożona i nie w pełni poznana, bierze się pod uwagę hipotezę kaskady amyloidowej, dysfunkcji cholinergiczej, dysfunkcji synaps, a także zaburzenia homeostazy cholesterolu, jonów wapnia, funkcji mitochondriów i siateczki endoplazmatycznej oraz procesy zapalne i stres oksydacyjny.

Stres oksydacyjny jest to stan nierównowagi pomiędzy nasileniem reakcji prowadzących do generacji reaktywnych form tlenu (ROS) a reakcjami związanymi z ich usuwaniem. Stres oksydacyjny spowodowany przez reaktywne formy tlenu jest powiązany z procesem starzenia się i z licznymi chorobami związanymi z wiekiem, takimi jak AD. System antyoksydacyjny (ADS) człowieka tworzą endo- i egzogenne substancje, które hamują tworzenie się wolnych rodników lub powodują ich przemianę w nieaktywne pochodne. Najważniejsze z nich to: dysmutazy nadtlenkowe (SOD), katalaza i peroksydaza glutationu-1 (GPx-1). Obecnie uważa się, że stres oksydacyjny odgrywa znamienne rolę w etiopatogenezie AD, a powstawanie patologicznych złogów A β może być zarówno jego przyczyną jak i konsekwencją. Zarówno w badaniach *post mortem* na mózgach chorych na AD, jak i w płynie mózgowo-rdzeniowym we krwi i w moczu stwierdzono obecność markerów stresu oksydacyjnego, czyli produktów powstających w wyniku działania wolnych rodników na obecne w organizmie cząsteczki lipidów, białek, DNA i RNA. Większość badań enzymów ADS przeprowadzonych do tej pory skupiała się na oznaczaniu aktywności enzymów antyoksydacyjnych u chorych na AD i u osób z grup kontrolnych. W literaturze znaleźć można natomiast niewiele badań ukierunkowanych na ocenę znaczenia polimorfizmów

genów ADS dla ryzyka AD. Dotychczas opublikowano dwa badania dotyczące znaczenia jednego polimorfizmu genu katalazy (wyniki negatywne), jedno badanie oceniające wpływ czterech polimorfizmów w genie *SOD2* (wynik pozytywny) i jedno badanie oceniające wpływ polimorfizmu rs1050450 genu *GPx-1* dla ryzyka rozwoju AD (wynik negatywny).

Cele badania: Sprawdzenie czy polimorfizmy znacznikowe wybranych enzymów endogennego systemu antyoksydacyjnego, tzn. dyzmutazy nadtlenkowej zależnej od jonów miedzi i cynku (CuZnSOD, SOD1: rs1041740, rs4998557, rs2070424), dyzmutazy nadtlenkowej zależnej od jonów manganu (MnSOD, SOD2: rs2855116, rs5746136, rs4880) i peroksydazy glutationu-1 (GPx-1: rs3448, rs1050450, rs1800668) związane są z ryzykiem AD.

Materiał i metody: Do badania zakwalifikowano 400 chorych z rozpoznaniem klinicznie prawdopodobnej AD postawionym według kryteriów DSM-IV i NINCDS-ADRDA i 402 osoby zdrowe stanowiące z grupę kontrolną. W badaniach genetycznych przeprowadzono analizę dziewięciu polimorfizmów trzech enzymów układu antyoksydacyjnego wykorzystując metodę reakcji łańcuchowej polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym. Związek polimorfizmów genów enzymów systemu antyoksydacyjnego z ryzykiem zachorowania na AD badano w trzech modelach: bez uwzględnienia wpływu czynników ryzyka, z uwzględnieniem jedynie wieku i płci, a następnie po uwzględnieniu dodatkowo wpływu polimorfizmu genu *APOE*.

Wyniki: W prezentowanym badaniu stwierdzono, że 3 spośród 9 analizowanych polimorfizmów genów *SOD1*, *SOD2* i *GPx-1* mają związek z ryzykiem zachorowania na AD, jednak ten związek po uwzględnieniu korekty Bonferroniego utrzymał się tylko w jednym przypadku. Wykazano, że polimorfizm rs2070424 genu *SOD1* jest czynnikiem ryzyka AD w modelu addytywnym i recesywnym regresji logistycznej, uwzględniającej wpływ wieku, płci i polimorfizmu *APOE*; związek ten pozostaje istotny po zastosowaniu korekty Bonferroniego. Natomiast w przypadku polimorfizmu rs4998557 genu *SOD1* i rs1050450 genu *GPx-1* związek ich z ryzykiem zachorowania

na AD przestawał być istotny po zastosowaniu tej korekty. Wykazano również, że pozostałe badane w prezentowanej pracy polimorfizmy nie są czynnikami ryzyka AD.

Wnioski: Polimorfizm rs2070424 genu *SOD1* jest czynnikiem ryzyka zachorowania na AD w populacji polskiej. Ponadto potwierdzono znacznie częstsze występowanie genotypów z allelem $\epsilon 4$ genu *APOE* u osób chorych na AD w porównaniu do osób z grupy kontrolnej.

7.2 Streszczenie w języku angielskim

Introduction: Alzheimer's disease (AD) is a degenerative disease of the central nervous system and its main symptoms are disorders of cognitive functions that gradually lead to loss of independence. AD is one of the most common reasons of dementia in Western societies. The etiology of the disease is complex and only some environmental (e.g. older age) or genetic (e.g. possession of $\epsilon 4$ allele of *APOE* gene) risk factors that have influence on its development have been identified. The etiopathogenesis of AD is also very complex and not fully known. The following hypotheses are considered: amyloid cascade hypothesis, cholinergic or synaptic dysfunctions, dysfunction of homeostasis of cholesterol, calcium ions, mitochondria or endoplasmatic reticulum or inflammatory processes and oxidative stress.

Oxidative stress is an imbalance between the intensity of reactions leading to generation of reactive oxygen species (ROS) and the reactions related with their removal. Oxidative stress that is caused by reactive oxygen species is related to the aging processes and numerous age-related diseases, such as AD. Antioxidant defense system (ADS) of human consists of endo- and egzogenic substances that hamper the creation of free radicals or trigger their transformation into inactive derivatives. The most important ones are: superoxide dismutases (SOD), catalase and glutathione peroxidase 1 (GPx-1). Currently it is said that oxidative stress plays an important role in AD etiopathogenesis, and the creation of pathologic A β depositions may be its cause or effect. The post

mortem examinations of brains of people with AD and the cerebrospinal fluid, blood and urine show the presence of oxidative stress markers, which are products of lipid, protein, DNA and RNA oxidation.

Most studies on the ADS enzymes conducted so far was focused on evaluating the activity of antioxidant enzymes in patients with A and controls. There are few studies that were aimed at evaluating the importance of ADS gene polymorphisms for the risk of AD. So far there have been two studies evaluating the significance of one polymorphism of the catalase gene (negative results), one study evaluating the significance of four polymorphisms in the *SOD2* gene (positive results), and one study evaluating the significance of the polymorphism rs1050450 of the *GPx-1* gene for the risk of AD (negative results).

The aim of the study: to check if the tag polymorphisms of the chosen enzymes of the endogenic antioxydant system, i.e. superoxide dismutase dependent on copper and zinc ionos (CuZnSOD, SOD1: rs1041740, rs4998557, rs2070424), superoxide dismutase dependent on manganese ionos (MnSOD, SOD2: rs2855116, rs5746136, rs4880), and glutathione peroxidase 1 (GPx-1: rs3448, rs1050450, rs1800668) are related to AD risk.

Material and methodology: 400 patients with clinical diagnosis of probable AD, under DSM-IV i NINCDS-ADRDA criteria, and 402 healthy people who constituted the control group were selected for the study. The genetic study comprised the analysis of nine polymorphisms of three enzymes of the antioxidant system with the use of DNA quantitative real time polymerase chain reaction. The relation of the gene polymorphisms of antioxidant system enzymes with the risk of AD was analyzed with the use of three models: without taking into consideration the influence of risk factors, with only age and gender taken into account and, later, with the inclusion of the *APOE* gene polymorphism.

Results: the presented study shows that 3 out of 9 analyzed polymorphisms of the *SOD1*, *SOD2* and *GPx-1* genes are related to the risk of AD, but the relation persisted only in one case after the application of Bonferroni correction. It was shown that

rs2070424 of the *SOD1* gene is a risk factor for AD in an additive and recessive logistic regression models that include the influence of age, gender and the *APOE* gene polymorphism; this relation remains significant after the application of the Bonferroni correction. The rs4998557 polymorphism of the *SOD1* gene and rs1050450 polymorphism of the *GPx-1* gene remained unrelated to the risk of AD after the Bonferroni correction. It was also shown that the remaining polymorphisms analyzed in this study are not risk factors for AD.

Conclusions: Polymorphism rs2070424 of the *SOD1* gene is a risk factor for AD in Polish population. Moreover, it was shown that the genotypes with the $\epsilon 4$ allele of the *APOE* gene is more common in cases diagnosed with AD as compared to controls.

8. Piśmiennictwo:

1. Abe T, Tohgi H, Isobe C, Murata T, Sato C. Remarkable increase in the concentration of 8-hydroxyguanosine in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Res.* 2002 Nov 1;70(3):447-50.
2. Abe M, Xie W, Regan MM, King IB, Stampfer MJ, Kantoff PW, Oh WK, Chan JM. Single-nucleotide polymorphisms within the antioxidant defence system and associations with aggressive prostate cancer. *BJU Int.* 2011 Jan;107(1):126-34.
3. Abe M, Sonobe N, Fukuhara R, Mori Y, Ochi S, Matsumoto T, Mori T, Tanimukai S, Ueno SI. Phenotypical difference of Amyloid Precursor Protein (APP) V717L mutation in Japanese family. *BMC Neurol.* 2012 Jun 15;12(1):38. [Epub ahead of print]
4. Agostinho P, Oliveira CR. Involvement of calcineurin in the neurotoxic effects induced by amyloid-beta and prion peptides. *Eur J Neurosci.* 2003 Mar; 17(6):1189-96.
5. Akomolafe A., Beiser A., Meigs JB., Au R, Green RC, Farrer LA, Wolf PA, Seshadri S. Diabetes mellitus and risk of developing Alzheimer disease: results from the Framingham Study. *Arch Neurol.* 2006;63:1551–1555.
6. Aksenov MY, Tucker HM, Nair P, Aksenova MV, Butterfield DA, Estus S, Markesbery WR. The expression of key oxidative stress-handling genes in different brain regions in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci.* 1998;11:151-64.
7. Albarracin SL, Stab B, Casas Z, Sutachan JJ, Samudio I, Gonzalez J, Gonzalo L, Capani F, Morales L, Barreto GE. Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease. *Nutr Neurosci.* 2012 Jan;15(1):1-9.
8. Almeida S, Sarmiento- Ribeiro AB, Januario C, Rego AC, Oliveira CR. Evidence of apoptosis and mitochondrial abnormalities in peripheral blood cells of Huntington's disease patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 374: 599- 603.
9. Aly MS, Khaled HM. Detection of C-erb B2 gene amplification in bilharzial associated bladder cancer using fluorescence in situ hybridization. *Urol Oncol.* 2004 Nov-Dec;22(6):448-52.
10. Alzheimer's Association Report, 2011 Alzheimer's Disease Facts and Figures; http://www.alz.org/downloads/Facts_Figures_2011.pdf
11. Andersen JK Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature Medicine* 2004; vol. 10, pp. S18-S25.
12. Andersen PM, Borasio GD, Dengler R, Hardiman O, Kollwe K, Leigh PN, Pradat PF, Silani V, Tomik B; EALSC Working Group. Good practice in the management of amyotrophic lateral sclerosis: clinical guidelines. An evidence-based review with good practice points. EALSC Working Group. *Amyotroph Lateral Scler.* 2007;8(4):195-213.

13. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)*. 2005 Feb;70(2):200-14. Review.
14. Annunziato L, Amoroso S, Pannaccione A, Cataldi M, Pignataro G, D'Alessio A, Sirabella R, Secondo A, Sibaud L, Di Renzo GF. Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions. *Toxicol Lett* 2003; 139:125-133.
15. Ansari MA, Scheff SW. Oxidative Stress in the Progression of Alzheimer Disease in the Frontal Cortex. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010; 69,2:155-67.
16. Anstey KJ, von Sanden C, Salim A, O'Kearney R. Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. *Am J Epidemiol*. 2007; 166:367-378.
17. Arias C, Montiel T, Quiroz-Báez R, Massieu L. beta-Amyloid neurotoxicity is exacerbated during glycolysis inhibition and mitochondrial impairment in the rat hippocampus in vivo and in isolated nerve terminals: implications for Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 2002 Jul;176(1):163-74.
18. Arsova-Sarafinavska Z, Matevska N, Eken A, Petrovski D, Banev S, Dzikova S, Georgiev V, Sikole A, Erdem O, Sayal A, Aydin A, Dimovski AJ. Glutathione peroxidase 1 (GPX1) genetic polymorphism, erythrocyte GPX activity, and prostate cancer risk. *Int Urol Nephrol*. 2009;41(1):63-70. Epub 2008 Jun 19.
19. Arvanitakis Z., Wilson RS., Bienias JL., Evans DA., Bennett DA. Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Arch Neurol*. 2004;61:661-666.
20. Augustyniak A, Skrzydlewska E. Antioxidative abilities during aging. *Postępy Hig Med. Dośw* 2004;58:194-01.
21. Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, Quirion R. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog Neurobiol*. 2002 Oct;68(3):209-45.
22. Avramopoulos D. Genetics of Alzheimer's disease: recent advances. *Genome Med*. 2009; 1: 34.
23. Babcock D. F., Hille B., Mitochondrial oversight of cellular Ca²⁺ signaling. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8 : 398-404.
24. Bachman DL, Wolf PA, Linn RT, Knoefel JE, Cobb JL, Belanger AJ, White LR, D'Agostino RB. Incidence of dementia and probable Alzheimer's disease in a general population: the Framingham Study. *Neurology*, 1993; 43: 515-519.
25. Bag A, Bag N. Target sequence polymorphism of human manganese superoxide dismutase gene and its association with cancer risk: a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008 Dec;17(12):3298-305.

26. Bamberger ME, Landreth GE. Inflammation, apoptosis, and Alzheimer's disease. *Neuroscientist*. 2002 Jun; 8(3):276-83.
27. Bandopadhyay U, Dipak D, Banerjee RK, Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis , *Curr. Sci.* 77, 1999; 658-666.
28. Banerjee R, Starkov AA, Beal MF, Thomas B. Mitochondrial dysfunction in the limelight of Parkinson's disease pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792: 651-663.
29. Barja G. Free radicals and aging. *Trends Neurosci*. 2004 Oct;27(10):595-600. Review.
30. Barkefors I, Fuchs PF, Heldin J, Bergström T, Forsberg-Nilsson K, Kreuger J. Exocyst complex component 3-like 2 (EXOC3L2) associates with the exocyst complex and mediates directional migration of endothelial cells. *Biol Chem*. 2011 Jul 8;286(27):24189-99. Epub 2011 May 12.
31. Barrett JC, Cardon LR. Evaluating coverage of genome-wide association studies. *Nat Genet* 2006; 38: 659–662.
32. Bartosz G. *Druga twarz tlenu*. PWN, Warszawa 2003.
33. Bastaki M, Huen K, Manzanillo P, Chande N, Chen C, Balmes JR, Tager IB, Holland N. Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans. *Pharmacogenet Genomics*. 2006 Apr;16(4):279-86.
34. Behl C, Davis J, Cole GM, Schubert D. Vitamin E protects nerve cells from amyloid beta protein toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992 Jul 31;186(2):944-50.
35. Bell RD, Sagare AP, Friedman AE, Bedi GS, Holtzman DM, Deane R, Zlokovic BV. Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2007;27, 909–918.
36. Benzi G, Moretti A. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol Aging*. 1995 Jul-Aug;16(4):661-74.
37. Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE. 2007. Systematic metaanalyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet* 39: 17–23.
38. Bertram L, Tanzi RE. Genome-wide association studies in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 2009; 18: R137–145.
39. Beta L, Orsina N, Celeste S, Rapuzzi S, Pifferi S, Scarlato G, Mariani C. Idebenone induces oxygen consumption rate modifications in aged rat brain mitochondria. *Arch Gerontol Geriatr*. 1997 Jan-Feb;24(1):55-66.
40. Bhatti P, Stewart PA, Hutchinson A, Rothman N, Linet MS, Inskip PD, Rajaraman P. Lead exposure, polymorphisms in genes related to oxidative stress, and risk of adult brain tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Jun;18(6):1841-8.

41. Biessels GJ., Staekenborg S., Brunner E., Brayne C., Scheltens P. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol.* 2006;5:64–74.
42. Björkhem I, Cedazo-Minguez A, Leoni V, Meaney S. Oxysterols and neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med.* 2009 Jun;30(3):171-9. Epub 2009 Feb 25. Review.
43. Blennow, de Leon, Zetterberg, 2006. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2006 Jul 29;368(9533):387-403.
44. Boland B, Campbell V. beta-Amyloid (1-40)-induced apoptosis of cultured cortical neurones involves calpain-mediated cleavage of poly-ADP-ribose polymerase. *Neurobiol Aging.* 2003 Jan-Feb;24(1):179-86.
45. Bourdel-Marchasson I, Delmas-Beauvieux MC, Peuchant E, Richard-Harston S, Decamps A, Reignier B, Emeriau JP, Rainfray M. Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. *Age Ageing.* 2001 May;30(3):235-41.
46. Boya P, Cohen I, Zamzami N, Vieira HL, Kroemer G. Endoplasmic reticulum stress-induced cell death requires mitochondrial membrane permeabilization. *Cell Death Differ.* 2002 Apr;9(4):465-7.
47. Buchman AS, Wilson RS, Bienias JL, Shah RC, Evans DA, Bennett DA. Change in body mass index and risk of incident Alzheimer disease. *Neurology.* 2005;65:892-897.
48. Burns MP, Noble WJ, Olm V, Gaynor K, Casey E, LaFrancois J, Wang L, Duff K. Co-localization of cholesterol, apolipoprotein E and fibrillar A β in amyloid plaques. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003 Jan 31;110(1):119-25.
49. Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol Med.* 2001 Dec;7(12):548-54.
50. Calero, M. Rostagno A, Matsubara E, Zlokovic B, Frangione B, Ghiso J. Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer's disease. *Microsc. Res. Tech.* 2000; 50, 305–315.
51. Campion, D., Flaman, J.-M., Brice, A., Hannequin, D., Dubois, B., Martin, C., Moreau, V., Charbonnier, F., Didierjean, O., Tardieu, S., Penet, C., Puel, M., Pasquier, F., Bellis, G., Calenda, A., Heilig, R., Martinez, M., Mallet, J., Bellis, M., Clerget-Darpoux, F., Agid, Y. and Frebourg, T. Mutations of the Presenilin-1 gene in families with early-onset Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 1995; 4, 2373–2377.
52. Capurso C, Solfrizzi V, D'Introno A, Colacicco AM, Capurso SA, Bifaro L, Menga R, Santamato A, Seripa D, Pilotto A, Capurso A, Panza F. Short arm of chromosome 11 and sporadic Alzheimer's disease: catalase and cathepsin D gene polymorphisms. *Neurosci Lett.* 2008 Feb 27;432(3):237-42. Epub 2007 Dec 23.

53. Cardoso BR, Ong TP, Jacob-Filho W, Jaluul O, Freitas MI, Cominetti C, Cozzolino SM. Glutathione Peroxidase 1 Pro198Leu Polymorphism in Brazilian Alzheimer's Disease Patients: Relations to the Enzyme Activity and to Selenium Status. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2012 Jun 7;5(2):72-80. [Epub ahead of print]
54. Casado A, Encarnación López-Fernández M, Concepción Casado M, de La Torre R. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias. *Neurochem Res*. 2008 Mar;33(3):450-8. Epub 2007 Aug 25.
55. Ceballos-Picot I, Merad-Boudia M, Nicole A, Thevenin M, Hellier G, Legrain S, Berr C. Peripheral antioxidant enzyme activities and selenium in elderly subjects and in dementia of Alzheimer's type—place of the extracellular glutathione peroxidase. *Free Radic Biol Med*. 1996;20:579-87.
56. Cebrian A, Pharoah PD, Ahmed S, Smith PL, Luccarini C, Luben R, Redman K, Munday H, Easton DF, Dunning AM, Ponder BA. Tagging single-nucleotide polymorphisms in antioxidant defense enzymes and susceptibility to breast cancer. *Cancer Res*. 2006 Jan 15;66(2):1225-33.
57. Cecarini V, Ding Q, Keller JN. Oxidative inactivation of the proteasome in Alzheimer's disease. *Free Radic Res*. 2007 Jun;41(6):673-80.
58. Chan SL, Mayne M, Holden CP, Geiger JD, Mattson MP. Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons. *J Biol Chem*. 2000 Jun 16; 275(24):18195-200.
59. Chan SL, Furukawa K, Mattson MP. Presenilins and APP in neuritic and synaptic plasticity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*. 2002;2(2):167-96
60. Chan SL, Fu W, Zhang P, Cheng A, Lee J, Kokame K, Mattson MP. Herp stabilizes neuronal Ca²⁺ homeostasis and mitochondrial function during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*. 2004 Jul 2; 279(27):28733-43.
61. Chauhan V., Chauhan A., Oxidative stress in Alzheimer's disease *Pathophysiology* 13; 195-208, 2006.
62. Chávez-Gutiérrez L, Bammens L, Benilova I, Vandersteen A, Benurwar M, Borgers M, Lismont S, Zhou L, Van Cleynenbreugel S, Esselmann H, Wiltfang J, Serneels L, Karran E, Gijzen H, Schymkowitz J, Rousseau F, Broersen K, De Strooper B. The mechanism of γ -Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *EMBO J*. 2012 Apr 13. doi: 10.1038/emboj.2012.79. [Epub ahead of print]
63. Chen J, Cao Q, Qin C, Shao P, Wu Y, Wang M, Zhang Z, Yin C. GPx-1 polymorphism (rs1050450) contributes to tumor susceptibility: evidence from meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011 Oct;137(10):1553-61. Epub 2011 Aug 13
64. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mocecco P. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Rad Biol Med* 2005;39:841-852.

65. Choi JY, Neuhaus ML, Barnett MJ, Hong CC, Kristal AR, Thornquist MD, King IB, Goodman GE, Ambrosone CB. Iron intake, oxidative stress-related genes (MnSOD and MPO) and prostate cancer risk in CARET cohort. *Carcinogenesis*. 2008 May;29(5):964-70. Epub 2008 Feb 22.
66. Ciobica A, Padurariu M, Bild W, Stefanescu C. Cardiovascular risk factors as potential markers for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Psychiatr Danub*. 2011 Dec;23(4):340-6.
67. Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature*. 1992 Dec 17;360(6405):672-4.
68. Cooper ML, Adami HO, Grönberg H, Wiklund F, Green FR, Rayman MP. Interaction between single nucleotide polymorphisms in selenoprotein P and mitochondrial superoxide dismutase determines prostate cancer risk. *Cancer Res*. 2008 Dec 15;68(24):10171-7.
69. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993; 261: 921–923.
70. Corrada MM, Brookmeyer R, Paganini-Hill A, Berlau D, Kawas CH. Dementia incidence continues to increase with age in the oldest old: the 90+ study. *Ann Neurol*. 2010 Jan;67(1):114-21.
71. Cox DG, Tamimi RM, Hunter DJ. Gene x Gene interaction between MnSOD and GPX-1 and breast cancer risk: a nested case-control study. *BMC Cancer*. 2006 Aug 31;6:217.
72. Cramer PE, Cirrito JR, Wesson DW, Lee CY, Karlo JC, Zinn AE, Casali BT, Restivo JL, Goebel WD, James MJ, Brunden KR, Wilson DA, Landreth GE. ApoE-directed therapeutics rapidly clear β -amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science*. 2012 Mar 23;335(6075):1503-6. Epub 2012 Feb 9.
73. Cruts M, van Duijn CM, Backhovens H, Van den Broeck M, Wehnert A, Serneels S, Sherrington R, Hutton M, Hardy J, St George-Hyslop PH, Hofman A, Van Broeckhoven C. Estimation of the genetic contribution of presenilin-1 and -2 mutations in a population-based study of presenile Alzheimer disease. *Hum Mol Genet*. 1998 Jan;7(1):43-51.
74. Culotta V, Yang M, O'Halloran TV. Activation of superoxide dismutases: Putting the metal to the pedal. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006; 1763, 747-758.
75. Cutler, R.G., Mattson, M.P., The adversities of aging. *Ageing Res. Rev.* 2006; 5, 221–238.

76. Czarna M, Jarmuszkiewicz W. Rola mitochondriów w wytwarzaniu i usuwaniu reaktywnych form tlenu; związek z przesyłaniem sygnałów i programowaną śmiercią komórki. *Postępy Biochemii*. 2006; 52, 2, 145-155.
77. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*. 2006 Apr;52(4):601-23. Epub 2006 Feb 16.
78. De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K, Van Leuven F. Deficiency of presenilin 1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 1998; 391: 387-390.
79. De Strooper B, Iwatsubo T, Wolfe MS. Presenilins and γ -Secretase: Structure, Function, and Role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Jan;2(1):a006304.
80. De Vries H, Witte M, Hondius D, Rozemuller AJ, Drukarch B., Hoozemans J. et al., Nrf2-induced antioxidant protection: a promising target to counteract ROS-mediated damage in neurodegenerative disease? *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 1375-1383.
81. Dumont M, Wille E, Stack C, Calingasan NY, Beal MF, Lin MT. Reduction of oxidative stress, amyloid deposition, and memory deficit by manganese superoxide dismutase overexpression in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *ASEB J*. 2009 Aug;23(8):2459-66. Epub 2009 Apr 3.
82. Dupuis L, Oudart H, René F, Gonzalez de Aguilar JL, Loeffler JP. Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 27;101(30):11159-64. Epub 2004 Jul 19.
83. Eckert A, Schindowski K, Leutner S, Luckhaus C, Touchet N, Czech C, Müller WE. Alzheimer's disease-like alterations in peripheral cells from presenilin-1 transgenic mice. *Neurobiol Dis*. 2001 Apr;8(2):331-42.
84. Erickson RP, Larson-Thomé K, Weberg L, Szybinska A, Mossakowska M, Styczynska M, Barcikowska M, Kuznicki J. Variation in NPC1, the gene encoding Niemann-Pick C1, a protein involved in intracellular cholesterol transport, is associated with Alzheimer disease and/or aging in the Polish population. *Neurosci Lett*. 2008 Dec 12;447(2-3):153-7.
85. Esler W.P., Wolfe M.S. A portrait of Alzheimer secretases –new features and familial faces. *Science* 2002; 293: 1449-1454.
86. Esteves AR, Domingues AF, Ferreira IL, Januario C, Swerdlow RH, Oliveira CR, Cardoso SM. Mitochondrial function in Parkinson's disease cybrids containing an nt2 neuron-like nuclear background. *Mitochondrion* 2008; 8: 219-228.
87. Facheris M, Beretta S, Ferrarese C. Peripheral markers of oxidative stress and excitotoxicity in neurodegenerative disorders: tools for diagnosis and therapy? *J Alzheimers Dis*. 2004 Apr;6(2):177-84.

88. Famulari AL, Marschoff ER, Llesuy SF, Kohan S, Serra JA, Dominguez RO, Repetto M, Reides C, Sacerdote de Lustig E. The antioxidant enzymatic blood profile in Alzheimer's and vascular diseases. Their association and a possible assay to differentiate demented subjects and controls. *J Neurol Sci.* 1996;141:69-78.
89. Faraci FM, Didion SP. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2004; 24: 1367–1373.
90. Farawela H, Khorshied M, Shaheen I, Gouda H, Nasef A, Abulata N, Mahmoud HA, Zawam HM, Mousa SM. The association between hepatitis C virus infection, genetic polymorphisms of oxidative stress genes and B-cell non-Hodgkin's lymphoma risk in Egypt. *Infect Genet Evol.* 2012 Aug;12(6):1189-94. Epub 2012 Apr 12.
91. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A metaanalysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 1997; 278:1349–1356.
92. Fernandes MA, Proenca MT, Nogueira AJ, Grazina MM, Oliveira LM, Fernandes AI, Santiago B, Santana I, Oliveira CR. Influence of apolipoprotein E genotype on blood redox status of Alzheimer's disease patients. *Int J Mol Med.* 1999;4:179-86.
93. Fiala ES, Conaway CC, Mathis JE. Oxidative DNA and RNA damage in the livers of Sprague-Dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropane. *Cancer Res.* 1989 Oct 15;49(20):5518-22.
94. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000 Nov 9;408(6809):239-47. Review.
95. Flekac M, Skrha J, Hilgertova J, Lacinova Z, Jarolimkova M. Gene polymorphisms of superoxide dismutases and catalase in diabetes mellitus. *BMC Med Genet.* 2008 Apr 21;9:30.
96. Floyd RA, Hensley K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging.* 2002 Sep-Oct;23(5):795-807. Review
97. Fratiglioni L, Wang HX. Smoking and Parkinson's and Alzheimer's disease: review of the epidemiological studies. *Behav Brain Res.* 2000;113:117-120.
98. Fratiglioni L., Wang HX., Ericsson K., Maytan M., Winblad B. Influence of social network on occurrence of dementia: a community-based longitudinal study. *Lancet.* 2000;355:1315–1319.
99. Gabryelewicz T. The prevalence of dementia in the population of the Warsaw district Mokotow from 65 to 84 years of age. *Psychiatr Pol* 1999; 33:353-66.
100. Gabuzda D, Busciglio J, Chen LB, Matsudaira P, Yankner BA. Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative. *J Biol Chem.* 1994 May 6;269(18):13623-8.

101. Gacia M, Safranow K, Styczyńska M, Jakubowska K, Peplowska B, Chodakowska-Zebrowska M, Przekop I, Słowik A, Golańska E, Hułas-Bigoszewska K, Chlubek D, Religa D, Zekanowski C, Barcikowska M. Prion protein gene M129 allele is a risk factor for Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 2006 Nov;113(11):1747-51. Epub 2006 Aug 8.
102. Gacia M, Safranow K, Gabryelewicz T, Styczyńska M, Peplowska B, Dzieziejko V, Jakubowska K, Chlubek D, Zekanowski C, Barcikowska M. Two polymorphisms of presenilin-2 gene (PSEN2) 5' regulatory region are not associated with Alzheimer's disease (AD) in the Polish population. *J Neural Transm.* 2008;115(1):85-90. Epub 2007 Dec 18.
103. Gałęcka E, Jacewicz R, Mrowicka M, Florkowski A, Gałęcki P. Enzymy antyoksydacyjne – budowa, właściwości, funkcje. *Pol Merk Lek* 2008; XXV, 147:266-268.
104. Gatta L, Cardinale A, Wannenes F, Consoli C, Armani A, Molinari F, Mammi C, Stocchi F, Torti M, Rosano GM, Fini M. Peripheral blood mononuclear cells from mild cognitive impairment patients show deregulation of Bax and Sod1 mRNAs. *Neurosci Lett.* 2009 Mar 27;453(1):36-40. Epub 2009 Feb 7.
105. Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal.* 2007 Sep;19(9):1807-19. Epub 2007 May 1. Review.
106. Gentleman SM, Nash MJ, Sweeting CJ, Graham DI, and Roberts G W, β -Amyloid precursor protein (β APP) as a marker for axonal injury after head injury. *Neuroscience Letters* 1993, vol. 160, no. 2, pp. 139–144.
107. Gervais FG, Xu D, Robertson GS, Vaillancourt JP, Zhu Y, Huang J, LeBlanc A, Smith D, Rigby M, Shearman MS, Clarke EE, Zheng H, Van Der Ploeg LH, Ruffolo SC, Thornberry NA, Xanthoudakis S, Zamboni RJ, Roy S, Nicholson DW. Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell.* 1999 Apr 30;97(3):395-406.
108. Glenner G. G. and Wong C. W. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 122, no. 3, pp. 1131–1135, 1984.
109. Goate A., Chartier-Harlin M. C., Mullan M. Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 1991, vol. 349, no. 6311, pp. 704–706.
110. Golan MP, Melquist S, Safranow K, Styczyńska M, Słowik A, Kobryś M, Zekanowski C, Barcikowska M. Analysis of UBQLN1 variants in a Polish Alzheimer's disease patient: control series. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2008;25(4):366-71.

111. Golanska E, Hulas-Bigoszewska K, Rutkiewicz E, Styczynska M, Peplonska B, Barcikowska M, Bratosiewicz-Wasik J, Liberski PP. Polymorphisms within the prion (PrP) and prion-like protein (Doppel) genes in AD. *Neurology*. 2004 Jan 27;62(2):313-5.
112. Golanska E, Hulas-Bigoszewska K, Wojcik I, Rieske P, Styczynska M, Peplonska B, Pfeffer A, Luczywek E, Wasiak B, Gabryelewicz T, Religa D, Chodakowska-Zebrowska M, Barcikowska M, Sobow T, Liberski PP. CYP46: a risk factor for Alzheimer's disease or a coincidence? *Neurosci Lett*. 2005 Jul 22-29;383(1-2):105-8.
113. Golanska E, Sieruta M, Gresner SM, Hulas-Bigoszewska K, Corder EH, Styczynska M, Peplonska B, Barcikowska M, Liberski PP. Analysis of APBB2 gene polymorphisms in sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2008 Dec 12;447(2-3):164-6.
114. Goulas A, Fidani L, Kotsis A, Mirtsou V, Petersen RC, Tangalos E, Hardy J. An association study of a functional catalase gene polymorphism, -262C-->T, and patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2002;330:210-213.
115. Grivennikova VG, Vinogradov AD. Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochim Biophys Acta*. 2006 May-Jun;1757(5-6):553-61. Epub 2006 Apr 17. Review.
116. Gsell W, Conrad R, Hicketier M, Sofic E, Frölich L, Wichart I, Jellinger K, Moll G, Ransmayr G, Beckmann H. Decreased catalase activity but unchanged superoxide dismutase activity in brains of patients with dementia of Alzheimer type. *J Neurochem*. 1995;64:1216-23.
117. Guo Z, Fratiglioni L, Winblad B, Viitanen M. Blood pressure and performance on the mini-mental state examination in the very old: cross-sectional and longitudinal data from the Kungsholmen Project. *Am J Epidemiol* 1997; 145: 1106–13.
118. Guo ZM, Van Remmen H, Yang H, Chen X, Mele J, Vijg J, Epstein CJ, Ho YS, Richardson A. Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxidized LDL-induced apoptosis in mouse aortic cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*,2001; 21: 1131–1138.
119. Gustaw-Rothenberg K, Kowalczyk K, Stryjecka-Zimmer M. Lipids' peroxidation markers in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Geriatr Gerontol Int*. 2010 Apr;10(2):161-6.
120. Haag MD., Hofman A., Koudstaal PJ., Breteler MM., Stricker BH. Duration of antihypertensive drug use and risk of dementia. A prospective cohort study. *Neurology*. 2009;72:1727–1734.
121. Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S. Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 May;2(5):a006270.
122. Hakenewerth AM, Millikan RC, Rusyn I, Herring AH, North KE, Barnholtz-Sloan JS, Funkhouser WF, Weissler MC, Olshan AF. Joint effects of alcohol consumption and

- polymorphisms in alcohol and oxidative stress metabolism genes on risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011 Nov;20(11):2438-49. Epub 2011 Sep 22.
123. Hamanishi T, Furuta H, Kato H, Doi A, Tamai M, Shimomura H, Sakagashira S, Nishi M, Sasaki H, Sanke T, Nanjo K. Functional variants in the glutathione peroxidase-1 (GPx-1) gene are associated with increased intima-media thickness of carotid arteries and risk of macrovascular diseases in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 2004 Sep;53(9):2455-60.
 124. Hansson CA, Frykman S, Farmery MR, Tjernberg LO, Nilsberth C, Pursglove SE, Ito A, Winblad B, Cowburn RF, Thyberg J, Ankarcrona M. Nicastrin, presenilin, APH-1, and PEN-2 form active gamma-secretase complexes in mitochondria. *J Biol Chem.* 2004 Dec 3; 279(49):51654-60.
 125. Hardingham GE. Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochem Soc Trans* 2009; 37:1147-1160.
 126. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 1992 Apr 10; 256(5054):184-5.
 127. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology* 1956; vol.11, no. 3, pp. 298-300.
 128. Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvinina V, Dowzell K, Williams A, Jones N, Thomas C, Stretton A, Morgan AR, Lovestone S, Powell J, Proitsi P, Lupton MK, Brayne C, Rubinsztein DC, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Morgan K, Brown KS, Passmore PA, Craig D, McGuinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith AD, Love S, Kehoe PG, Hardy J, Mead S, Fox N, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, Schürmann B, van den Bussche H, Heuser I, Kornhuber J, Wiltfang J, Dichgans M, Frölich L, Hampel H, Hüll M, Rujescu D, Goate AM, Kauwe JS, Cruchaga C, Nowotny P, Morris JC, Mayo K, Sleegers K, Bettens K, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Livingston G, Bass NJ, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw CE, Tsolaki M, Singleton AB, Guerreiro R, Mühleisen TW, Nöthen MM, Moebus S, Jöckel KH, Klopp N, Wichmann HE, Carrasquillo MM, Pankratz VS, Younkin SG, Holmans PA, O'Donovan M, Owen MJ, Williams J. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2009 Oct;41(10):1088-93. Epub 2009 Sep 6.
 129. Hashimoto Y, Kaneko Y, Tsukamoto E, Frankowski H, Kouyama K, Kita Y, Niikura T, Aiso S, Bredesen DE, Matsuoka M, Nishimoto I. Molecular characterization of neurohybrid cell death induced by Alzheimer's amyloid-beta peptides via p75NTR/PLAIDD. *J Neurochem.* 2004 Aug;90(3):549-58.
 130. He C, Qureshi AA, Han J. Polymorphisms in genes involved in oxidative stress and their interactions with lifestyle factors on skin cancer risk. *J Dermatol Sci.* 2010 Oct;60(1):54-6. Epub 2010 Jul 15.

131. Hendriks L, van Duijn CM, Cras P, Cruts M, Van Hul W, van Harskamp F, Warren A, McInnis MG, Antonarakis SE, Martin JJ, Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nat. Genet.* 1992; 1, 218–221.
132. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-776.
133. Hensley K, Maitt ML, Yu Z, Sang H, Markesbery WR, Floyd RA. Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation. *J Neurosci.* 1998 Oct 15;18(20):8126-32.
134. Hoffman LB, Schmeidler J, Lesser GT, Beeri MS, Purohit DP, Grossman HT, Haroutunian V. Less Alzheimer disease neuropathology in medicated hypertensive than nonhypertensive persons. *Neurology.* 2009;72:1720-1726.
135. Hollingworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert JC, Carrasquillo MM, Abraham R, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, Dowzell K, Jones N, Stretton A, Thomas C, Richards A, Ivanov D, Widdowson C, Chapman J, Lovestone S, Powell J, Proitsi P, Lupton MK, Brayne C, Rubinsztein DC, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Brown KS, Passmore PA, Craig D, McGuinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith AD, Beaumont H, Warden D, Wilcock G, Love S, Kehoe PG, Hooper NM, Vardy ER, Hardy J, Mead S, Fox NC, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, Rütther E, Schürmann B, Heun R, Kölsch H, van den Bussche H, Heuser I, Kornhuber J, Wiltfang J, Dichgans M, Frölich L, Hampel H, Gallacher J, Hüll M, Rujescu D, Giegling I, Goate AM, Kauwe JS, Cruchaga C, Nowotny P, Morris JC, Mayo K, Sleegers K, Bettens K, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Livingston G, Bass NJ, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw CE, Tsolaki M, Singleton AB, Guerreiro R, Mühleisen TW, Nöthen MM, Moebus S, Jöckel KH, Klopp N, Wichmann HE, Pankratz VS, Sando SB, Aasly JO, Barcikowska M, Wszolek ZK, Dickson DW, Graff-Radford NR, Petersen RC; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, van Duijn CM, Breteler MM, Ikram MA, DeStefano AL, Fitzpatrick AL, Lopez O, Launer LJ, Seshadri S; CHARGE consortium, Berr C, Champion D, Epelbaum J, Dartigues JF, Tzourio C, Alperovitch A, Lathrop M; EADII consortium, Feulner TM, Friedrich P, Riehle C, Krawczak M, Schreiber S, Mayhaus M, Nicolhaus S, Wagenpfeil S, Steinberg S, Stefansson H, Stefansson K, Snaedal J, Björnsson S, Jonsson PV, Chouraki V, Genier-Boley B, Hiltunen M, Soininen H, Combarros O, Zelenika D, Delepine M, Bullido MJ, Pasquier F, Mateo I, Frank-Garcia A, Porcellini E, Hanon O, Coto E, Alvarez V, Bosco P, Siciliano G, Mancuso M, Panza F, Solfrizzi V, Nacmias B, Sorbi S, Bossù P, Piccardi P, Arosio B, Annoni G, Seripa D, Pilotto A, Scarpini E, Galimberti D, Brice A, Hannequin D, Licastro F, Jones L, Holmans PA, Jonsson T, Riemenschneider M, Morgan K, Younkin SG, Owen MJ, O'Donovan M, Amouyel P, Williams J. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2011 May;43(5):429-35. Epub 2011 Apr 3.

136. Hollingworth P, Harold D, Jones L, Owen MJ, Williams J. Alzheimer's disease genetics: current knowledge and future challenges. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2011 Aug;26(8):793-802.
137. Holtzman DM, Herz J, Bu G. Apolipoprotein e and apolipoprotein e receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Mar;2(3):a006312.
138. Honig LS., Tang MX., Albert S., Costa R, Luchsinger J, Manly J, Stern Y, Mayeux R. Stroke and the risk of Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2003;60:1707–1712.
139. Hu X, Pickering E, Liu YC, Hall S, Fournier H, Katz E, Dechairo B, John S, Van Eerdewegh P, Soares H; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Meta-analysis for genome-wide association study identifies multiple variants at the BIN1 locus associated with late-onset Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2011 Feb 24;6(2):e16616.
140. Huang TT, Carlson EJ, Kozy HM, Mantha S, Goodman SI, Ursell PC, Epstein CJ. Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001; 31: 1101–1100.
141. Huang W, Qiu C, Winblad B, Fratiglioni L. Alcohol consumption and incidence of dementia in a community sample aged 75 years and older. *J Clin Epidemiol*. 2002; 55:959-964.
142. Hubackova M, Vaclavikova R, Ehrlichova M, Mrhalova M, Kodet R, Kubackova K, Vrána D, Gut I, Soucek P. Association of superoxide dismutases and NAD(P)H quinone oxidoreductases with prognosis of patients with breast carcinomas. *Int J Cancer*. 2012 Jan 15;130(2):338-48. doi: 10.1002/ijc.26006. Epub 2011 Apr 20.
143. Ichimura Y, Habuchi T, Tsuchiya N, Wang L, Oyama C, Sato K, Nishiyama H, Ogawa O, Kato T. Increased risk of bladder cancer associated with a glutathione peroxidase 1 codon 198 variant. *J Urol*. 2004 Aug;172(2):728-32.
144. Ikram MK, Sim X, Jensen RA, Cotch MF, Hewitt AW, Ikram MA, Wang JJ, Klein R, Klein BE, Breteler MM, Cheung N, Liew G, Mitchell P, Uitterlinden AG, Rivadeneira F, Hofman A, de Jong PT, van Duijn CM, Kao L, Cheng CY, Smith AV, Glazer NL, Lumley T, McKnight B, Psaty BM, Jonasson F, Eiriksdottir G, Aspelund T; Global BPgen Consortium, Harris TB, Launer LJ, Taylor KD, Li X, Iyengar SK, Xi Q, Sivakumaran TA, Mackey DA, Macgregor S, Martin NG, Young TL, Bis JC, Wiggins KL, Heckbert SR, Hammond CJ, Andrew T, Fahy S, Attia J, Holliday EG, Scott RJ, Islam FM, Rotter JI, McAuley AK, Boerwinkle E, Tai ES, Gudnason V, Siscovick DS, Vingerling JR, Wong TY. Four novel Loci (19q13, 6q24, 12q24, and 5q14) influence the microcirculation in vivo. *PLoS Genet*. 2010 Oct 28;6(10):e1001184. Erratum in: *PLoS Genet*. 2010;6(11)
145. Irie F., Fitzpatrick AL., Lopez OL., Kuller LH, Peila R, Newman AB, Launer LJ. Enhanced risk for Alzheimer disease in persons with type 2 diabetes and APOE e4: the Cardiovascular Health Study Cognition Study. *Arch Neurol*. 2008;65:89–93.

146. Janicki SC, Schupf N. Hormonal influences on cognition and risk for Alzheimer's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2010 Sep;10(5):359-66.
147. Jarvik L, Greenson H. About a peculiar disease of the cerebral cortex. By Alois Alzheimer, 1907 (Translated by L. Jarvik and H. Greenson), *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, vol. 1, no. 1, pp. 3–8, 1987.
148. Jellinger K.A, General aspects of neurodegeneration. *J Neural Transm Suppl* 2003: 65; 101-144.
149. Jiang Q, Lee CY, Mandrekar S, Wilkinson B, Cramer P, Zelcer N, Mann K, Lamb B, Willson TM, Collins JL. ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta. *Neuron* 2008; 58, 681–693.
150. Jick H., Zornberg GL., Jick SS., Seshadri S., Drachman DA. Statins and the risk of dementia. *Lancet.* 2000;356:1627–1631.
151. Jin F, Xiong WJ, Jing JC, Feng Z, Qu LS, Shen XZ. Evaluation of the association studies of single nucleotide polymorphisms and hepatocellular carcinoma: a systematic review. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011 Jul;137(7):1095-104. Epub 2011 Jan 15. Review.
152. Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutase and their impact upon human health. *Mol. Aspect. Med.*, 2005; 26, 340-352.
153. Johnson DK, Wilkins CH, Morris JC. Accelerated weight loss may precede diagnosis in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2006; 63:1312-1317.
154. Jones DA, Prior SL, Tang TS, Bain SC, Hurel SJ, Humphries SE, Stephens JW. Association between the rs4880 superoxide dismutase 2 (C>T) gene variant and coronary heart disease in diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010 Nov;90(2):196-201. Epub 2010 Aug 21.
155. Kang D, Lee KM, Park SK, Berndt SI, Peters U, Reding D, Chatterjee N, Welch R, Chanock S, Huang WY, Hayes RB. Functional variant of manganese superoxide dismutase (SOD2 V16A) polymorphism is associated with prostate cancer risk in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Aug;16(8):1581-6. Epub 2007 Jul 23.
156. Karp A., Kåreholt I., Qiu C., Bellander T., Winblad B., Fratiglioni L. Relation of education and occupation-based socioeconomic status to incident Alzheimer's disease. *Am J Epidemiol.* 2004;159:175–183.
157. Kato K, Oguri M, Kato N, Hibino T, Yajima K, Yoshida T, Metoki N, Yoshida H, Satoh K, Watanabe S, Yokoi K, Murohara T, Yamada Y. Assessment of genetic risk factors for thoracic aortic aneurysm in hypertensive patients. *Am J Hypertens.* 2008 Sep;21(9):1023-7. Epub 2008 Jul 3.
158. Kawas C, Resnick S, Morrison A, Brookmeyer R, Corrada M, Zonderman A, Bacal C, Lingle DD, Metter E. A prospective study of estrogen replacement therapy and the

- risk of developing Alzheimer's disease: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neurology*. 1997 Jun; 48(6):1517-21.
159. Kelly BL, Vassar R, Ferreira A. Beta-amyloid-induced dynamin 1 depletion in hippocampal neurons. A potential mechanism for early cognitive decline in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 2005; 280: 31746–31753.
 160. Khachaturian AS., Zandi PP., Lyketsos CG., Hayden KM, Skoog I, Norton MC, Tschanz JT, Mayer LS, Welsh-Bohmer KA, Breitner JC. Antihypertensive medication use and incident Alzheimer disease: the Cache County Study. *Arch Neurol*. 2006;63:686–692.
 161. Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* 2009; 63: 287–303.
 162. Kiss C, Li J, Szeles A, Gizatullin RZ, Kashuba VI, Lushnikova T, Protopopov AI, Kelve M, Kiss H, Kholodnyuk ID, Imreh S, Klein G, Zabarovskiy ER. Assignment of the ARHA and GPX1 genes to human chromosome bands 3p21.3 by in situ hybridization and with somatic cell hybrids. *Cytogenet Cell Genet*. 1997;79(3-4):228-30.
 163. Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hänninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ*. 2001; 322:1447-1451.
 164. Kivipelto M, Ngandu T, Fratiglioni L, Viitanen M, Kåreholt I, Winblad B, Helkala EL, Tuomilehto J, Soininen H, Nissinen A. Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2005;62:1556-1560.
 165. Klimkowicz-Mrowiec A, Marona M, Wołkow P, Maruszak A, Styczyńska M, Barcikowska M, Zekanowski C, Szczudlik A, Slowik A. Interleukin-1 gene -511 CT polymorphism and the risk of Alzheimer's disease in a Polish population. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2009;28(5):461-4. Epub 2009 Nov 20.
 166. Klimkowicz-Mrowiec A, Wołkow P, Spisak K, Maruszak A, Styczyńska M, Barcikowska M, Szczudlik A, Słowik A. Interleukin-6 gene (-174 C/G) and apolipoprotein E gene polymorphisms and the risk of Alzheimer disease in a Polish population. *Neurol Neurochir Pol*. 2010 Nov-Dec;44(6):537-41.
 167. Klimkowicz-Mrowiec A, Marona M, Wolkow P, Witkowski A, Maruszak A, Styczyńska M, Barcikowska M, Szczudlik A, Slowik A. Paraoxonase gene polymorphism and the risk for Alzheimer's disease in the polish population. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2011;31(6):417-23. Epub 2011 Jul 13.
 168. Kowalska A, Florczak J, Pruchnik-Wolińska D, Kraszewski A, Wender M. Apolipoprotein E genotypes in sporadic early and late-onset Alzheimer's disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 1998; 46(3):177-81.

169. Kowalska A, Pruchnik-Wolińska D, Florczak J, Szczech J, Kozubski W, Rossa G, Wender M. Presenilin 1 mutations in Polish families with early-onset Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol.* 2004;42(1):9-14.
170. Kowalska A. The beta-amyloid cascade hypothesis: a sequence of events leading to neurodegeneration in Alzheimer's disease *Neurol Neurochir Pol.* 2004 Sep-Oct; 38(5):405-11.
171. Kowalska A. Genetics of dementias, Part 4: a spectrum of mutations responsible for the familial autosomal dominant form of Alzheimer's disease. *Postepy Hig Med Dosw.*2009; 63:583-91. Polish.
172. Kucukgergin C, Sanli O, Amasyalı AS, Tefik T, Seckin S. Genetic variants of MnSOD and GPX1 and susceptibility to bladder cancer in a Turkish population. *Med Oncol.* 2011 Sep 9. [Epub ahead of print]
173. Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, Lambert MP, Velasco PT, Bigio EH, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci.* 2004 Nov 10;24(45):10191-200.
174. Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, Zelenika D, Bullido MJ, Tavernier B, Letenneur L, Bettens K, Berr C, Pasquier F, Fiévet N, Barberger-Gateau P, Engelborghs S, De Deyn P, Mateo I, Franck A, Helisalmi S, Porcellini E, Hanon O; European Alzheimer's Disease Initiative Investigators, de Pancorbo MM, Lendon C, Dufouil C, Jaillard C, Leveillard T, Alvarez V, Bosco P, Mancuso M, Panza F, Nacmias B, Bossù P, Piccardi P, Annoni G, Seripa D, Galimberti D, Hannequin D, Licastro F, Soininen H, Ritchie K, Blanché H, Dartigues JF, Tzourio C, Gut I, Van Broeckhoven C, Alperovitch A, Lathrop M, Amouyel P. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2009 Oct;41(10):1094-9. Epub 2009 Sep 6.
175. Lan Q, Zheng T, Shen M, Zhang Y, Wang SS, Zahm SH, Holford TR, Leaderer B, Boyle P, Chanock S. Genetic polymorphisms in the oxidative stress pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Hum Genet.* 2007 Apr;121(2):161-8. Epub 2006 Dec 6.
176. Landi S, Gemignani F, Neri M, Barale R, Bonassi S, Bottari F, Canessa PA, Canzian F, Ceppi M, Filiberti R, Ivaldi GP, Mencoboni M, Scaruffi P, Tonini GP, Mutti L, Puntoni R. Polymorphisms of glutathione-S-transferase M1 and manganese superoxide dismutase are associated with the risk of malignant pleural mesothelioma. *Int J Cancer.* 2007 Jun 15;120(12):2739-43.
177. Larner AJ, Doran M. Clinical phenotypic heterogeneity of Alzheimer's disease associated with mutations of the presenilin-1 gene. *J Neurol.* 2006 Feb;253(2):139-58. Epub 2005 Nov 4. Review.

178. Larson EB., Wang L., Bowen JD., McCormick WC, Teri L, Crane P, Kukull W. Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. *Ann Intern Med.* 2006;144:73–81.
179. Launer LJ, Ross GW, Petrovitch H, Masaki K, Foley D, White LR, Havlik RJ. Midlife blood pressure and dementia: the Honolulu-Asia aging study. *Neurobiol Aging.* 2000; 21:49-55.
180. LeDoux SP, Druzhyna NM, Hollensworth SB, Harrison JF, Wilson GL. Mitochondrial DNA repair: a critical player in the response of cells of the CNS to genotoxic insults. *Neuroscience.* 2007 Apr 14;145(4):1249-59. Epub 2006 Nov 13.
181. Lee HP, Pancholi N, Esposito L, Previll LA, Wang X, Zhu X, Smith MA, Lee HG. Early induction of oxidative stress in mouse model of Alzheimer disease with reduced mitochondrial superoxide dismutase activity. *PLoS One.* 2012;7(1):e28033. Epub 2012 Jan 19.
182. Leoni V, Caccia C. Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases. *Chem Phys Lipids.* 2011 Sep;164(6):515-24. Epub 2011 Apr 16. Review.
183. Levy-Lahad E., Wasco W., Poorkaj P. Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 1995, vol. 269, no. 5226, pp. 973–977.
184. Lewiński A, Sewerynek E. Zmiany wolnych rodników. *Przew Lek* 2000;9:99-104.
185. Li R, Yang L, Lindholm K, Konishi Y, Yue X, Hampel H, Zhang D, Shen Y. Tumor necrosis factor death receptor signaling cascade is required for amyloid-beta protein-induced neuron death. *J Neurosci.* 2004 Feb 18; 24(7):1760-71.
186. Lightfoot TJ, Skibola CF, Smith AG, Forrest MS, Adamson PJ, Morgan GJ, Bracci PM, Roman E, Smith MT, Holly EA. Polymorphisms in the oxidative stress genes, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica.* 2006 Sep;91(9):1222-7.
187. Lin MT, Beal F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006;443:787-795.
188. Ling IF, Bhongsatiern J, Simpson JF, Fardo DW, Estus S. Genetics of clusterin isoform expression and Alzheimer's disease risk. *PLoS One.* 2012;7(4):e33923. Epub 2012 Apr 10.
189. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem.* 2002 Mar;80(5):780-7.
190. Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem.* 2004 Nov 19;279(47):49064-73. Epub 2004 Aug 17.

191. Liu YM, Li XD, Guo X, Liu B, Lin AH, Rao SQ. Association between polymorphisms in SOD1 and noise-induced hearing loss in Chinese workers. *Acta Otolaryngol.* 2010 Apr;130(4):477-86.
192. Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet.* 2003;33(2):177-82.
193. Lovell MA, Ehmann WD, Mattson MP, Markesbery WR. Elevated 4-hydroxynonenal in ventricular fluid in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1997 Sep-Oct;18(5):457-61.
194. Lyras L, Cairns LJ, Jenner A, Jenner P, Halliwell B. An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1997;68:2061-2069.
195. Ma X, Chen C, Xiong H, Fan J, Li Y, Lin H, Xu R, Huang G, Xu B. No association between SOD2 Val16Ala polymorphism and breast cancer susceptibility: a meta-analysis based on 9,710 cases and 11,041 controls. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Jul;122(2):509-14. Epub 2010 Jan 6. Review.
196. Mancuso M, Coppede F, Migliore L, Siciliano G, Murri L. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. *J Alzheimers Dis.* 2006 Sep;10(1):59-73. Review.
197. Mangialasche F, Polidori MC, Monastero R, Ercolani S, Camarda C, Cecchetti R, Mecocci P. Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Ageing Res Rev.* 2009 Oct;8(4):285-305. Epub 2009 Apr 17. Review.
198. Mansego ML, Solar Gde M, Alonso MP, Martínez F, Sáez GT, Escudero JC, Redón J, Chaves FJ. Polymorphisms of antioxidant enzymes, blood pressure and risk of hypertension. *J Hypertens.* 2011 Mar;29(3):492-500.
199. Marcus DL, Thomas C, Rodriguez C, Simberkoff K, Tsai JS, Strafaci JA, Freedman ML. Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 1998;150:40-4.
200. Marcus DL, Strafaci JA, Freedman ML. Differential neuronal expression of manganese superoxide dismutase in Alzheimer's disease. *Med Sci Monit.* 2006 Jan;12(1):BR8-14. Epub 2005 Dec 19.
201. Martin BK, Szekely C, Brandt J, Piantadosi S, Breitner JC, Craft S, Evans D, Green R, Mullan M. Cognitive function over time in the Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial (ADAPT): results of a randomized, controlled trial of naproxen and celecoxib. *Arch Neurol.* 2008; 65:896-905.
202. Martín-Aragón S, Bermejo-Bescós P, Benedí J, Felici E, Gil P, Ribera JM, Villar AM. Metalloproteinase's activity and oxidative stress in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 2009 Feb;34(2):373-8. Epub 2008 Jul 10.

203. Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 63-7.
204. Maruszak A, Safranow K, Gustaw K, Kijanowska-Haładyna B, Jakubowska K, Olszewska M, Styczyńska M, Berdyński M, Tysarowski A, Chlubek D, Siedlecki J, Barcikowska M, Zekanowski C. PIN1 gene variants in Alzheimer's disease. *BMC Med Genet*. 2009 Nov 12;10:115.
205. Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000 Nov; 1(2):120-9.
206. Mattson MP, Chan SL. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium*. 2003 Oct-Nov; 34(4-5):385-97.
207. Mavaddat N, Dunning AM, Ponder BA, Easton DF, Pharoah PD. Common genetic variation in candidate genes and susceptibility to subtypes of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Jan;18(1):255-9.
208. McCord J M i Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem*. 1969; 244:6049-55.
209. McCord JM, Edeas MA. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomed Pharmacother*. 2005 May;59(4):139-42. Epub 2005 Mar 22.
210. McIntosh LJ, Trush MA, Troncoso JC. Increased susceptibility of Alzheimer's disease temporal cortex to oxygen free radical-mediated processes. *Free Radic Biol Med*. 1997;23:183-190.
211. Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1994;36:747-751.
212. Mehler MF, Mattick JS. Non-coding RNAs in the nervous system. *J Physiol*. 2006 Sep 1;575(Pt 2):333-41. Epub 2006 Jun 29.
213. Méplan C, Hughes DJ, Pardini B, Naccarati A, Soucek P, Vodickova L, Hlavatá I, Vrána D, Vodicka P, Hesketh JE. Genetic variants in selenoprotein genes increase risk of colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2010 Jun;31(6):1074-9. Epub 2010 Apr 8.
214. Mielke MM, Zandi PP, Sjögren M, Gustafson D, Ostling S, Steen B, Skoog I. High total cholesterol levels in late life associated with a reduced risk of dementia. *Neurology*. 2005 May 24;64(10):1689-95.
215. Minc E, de Coppet P, Masson P, Thiery L, Dutertre S, Amor-Guélet M, Jaulin C. The human copper-zinc superoxide dismutase gene (SOD1) proximal promoter is regulated by Sp1, Egr-1, and WT1 via non-canonical binding sites. *J Biol Chem*. 1999 Jan 1;274(1):503-9.
216. Morris MC, Scherr PA, Hebert LE, Glynn RJ, Bennett DA, Evans DA. Association of incident Alzheimer disease and blood pressure measured from 13 years before to 2 years after diagnosis in a large community study. *Arch Neurol*. 2001; 58:1640-1646.

217. Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci.* 2000 Jun 1; 20(11):4050-8.
218. Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet.* 1992 Aug;1(5):345-7.
219. Mullen SA, Crompton DE, Carney PW, Helbig I, Berkovic SF. A neurologist's guide to genome-wide association studies. *Neurology.* 2009;72(6):558-65.
220. Murakami K, Shimizu T, Irie K. Formation of the 42-mer Amyloid β Radical and the Therapeutic Role of Superoxide Dismutase in Alzheimer's Disease. *J Amino Acids.* 2011;2011:654207. Epub 2011 Jan 16.
221. Murakami K, Murata N, Noda Y, Tahara S, Kaneko T, Kinoshita N, Hatsuta H, Murayama S, Barnham KJ, Irie K, Shirasawa T, Shimizu T. SOD1 (copper/zinc superoxide dismutase) deficiency drives amyloid β protein oligomerization and memory loss in mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 2011 Dec 30;286(52):44557-68. Epub 2011 Nov 9.
222. Nagai M, Hoshida S, Kario K. Hypertension and dementia. *Am J Hypertens.* 2010 Feb;23(2):116-24. Epub 2009 Nov 19.
223. Nahon P, Sutton A, Rufat P, Ziolkowski M, Akouche H, Laguillier C, Charnaux N, Ganne-Carrié N, Grando-Lemaire V, N'Kontchou G, Trinchet JC, Gattegno L, Pessayre D, Beaugrand M. Myeloperoxidase and superoxide dismutase 2 polymorphisms comodule the risk of hepatocellular carcinoma and death in alcoholic cirrhosis. *Hepatology.* 2009 Nov;50(5):1484-93.
224. Naj AC, Beecham GW, Martin ER, Gallins PJ, Powell EH, Konidari I, Whitehead PL, Cai G, Haroutunian V, Scott WK, Vance JM, Slifer MA, Gwirtsman HE, Gilbert JR, Haines JL, Buxbaum JD, Pericak-Vance MA. Dementia revealed: novel chromosome 6 locus for late-onset Alzheimer disease provides genetic evidence for folate-pathway abnormalities. *PLoS Genet.* 2010 Sep 23;6(9). pii: e1001130.
225. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature.* 2000 Jan 6; 403(6765):98-103.
226. Nelson TJ, Alkon DL. Oxidation of cholesterol by amyloid precursor protein and beta-amyloid peptide. *J Biol Chem.* 2005 Feb 25; 280(8):7377-87. Epub 2004 Dec 8.
227. Nelson PT, Wang WX, Rajeev BW. MicroRNAs (miRNAs) in neurodegenerative diseases. *Brain Pathol.* 2008 Jan;18(1):130-8.
228. Nemoto M, Nishimura R, Sasaki T, Hiki Y, Miyashita Y, Nishioka M, Fujimoto K, Sakuma T, Ohashi T, Fukuda K, Eto Y, Tajima N. Genetic association of glutathione

- peroxidase-1 with coronary artery calcification in type 2 diabetes: a case control study with multi-slice computed tomography. *Cardiovasc Diabetol.* 2007 Sep 7;6:23.
229. Newell K. L., Hyman B. T., Growdon J. H., and Hedley-Whyte E. T. Application of the National Institute on Aging (NIA)-Reagan Institute criteria for the neuropathological diagnosis of Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 58, no. 11, pp. 1147–1155, 1999.
 230. Nickerson DA, Taylor SL, Fullerton SM, Weiss KM, Clark AG, Stengard JH, Salomaa V, Boerwinkle E, Sing CF. Sequence diversity and large-scale typing of SNPs in the human apolipoprotein E gene. *Genome Res.* 2000; 10, 1532–1545.
 231. Nicholls DG. Mitochondrial function and dysfunction in the cell: its relevance to aging and aging-related disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 1372-1381.
 232. Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condron MM, Axelman K, Forsell C, Stenh C, Luthman J, Teplow DB, Younkin SG, Näslund J, Lannfelt L. The ‘Arctic’ APP mutation (E693G) causes Alzheimer’s disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat. Neurosci.* 2001;4, 887–893.
 233. Nordberg, A. Human nicotinic receptors—their role in aging and dementia. *Neurochem. Int.* 1994; 25, 93–97.
 234. Nordberg A, Lundqvist H, Hartvig P, Lilja A, Langstrom B. Kinetic analysis of regional (S)(-) 11C-nicotine binding in normal and Alzheimer brains—in vivo assessment using positron emission tomography. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 1995; 9, 21–27.
 235. Novarino G, Fabrizi C, Tonini R, Denti MA, Malchiodi-Albedi F, Lauro GM, Sacchetti B, Paradisi S, Ferroni A, Curmi PM, Breit SN, Mazzanti M. Involvement of the intracellular ion channel CLIC1 in microglia-mediated beta-amyloid-induced neurotoxicity. *J Neurosci.* 2004 Jun 9; 24(23):5322-30.
 236. Nunomura A, Perry G, Pappolla MA, Wade R, Hirai K, Chiba S, Smith MA. RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 1999 Mar 15;19(6):1959-64.
 237. Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001 Aug;60(8):759-67.
 238. Nunomura A, Hofer T, Moreira PI, Castellani RJ, Smith MA, Perry G. RNA oxidation in Alzheimer disease and related neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol.* 2009 Jul;118(1):151-66. Epub 2009 Mar 7.
 239. Oguri M, Kato K, Hibino T, Yokoi K, Segawa T, Matsuo H, Watanabe S, Nozawa Y, Murohara T, Yamada Y. Genetic risk for restenosis after coronary stenting. *Atherosclerosis.* 2007 Oct;194(2):e172-8. Epub 2007 Feb 1.

240. Oestergaard MZ, Tyrer J, Cebrian A, Shah M, Dunning AM, Ponder BA, Easton DF, Pharoah PD. Interactions between genes involved in the antioxidant defence system and breast cancer risk. *Br J Cancer*. 2006 Aug 21;95(4):525-31. Epub 2006 Jul 25.
241. Ott A, Slooter AJ, Hofman A, van Harskamp F, Wittteman JC, Van Broeckhoven C, van Duijn CM, Breteler MM. Smoking and risk of dementia and Alzheimer's disease in a population-based cohort study: the Rotterdam Study. *Lancet*. 1998; 351:1840-1843.
242. Padurariu M., Ciobica A., Hritcu L., Stoica B., Bild W., Stefanescu C. Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuroscience Letter* 2010;469:6-10.
243. Parton MJ, Broom W, Andersen PM, Al-Chalabi A, Nigel Leigh P, Powell JF, Shaw CE; D90A SOD1 ALS Consortium. D90A-SOD1 mediated amyotrophic lateral sclerosis: a single founder for all cases with evidence for a Cis-acting disease modifier in the recessive haplotype. *Hum Mutat*. 2002 Dec;20(6):473.
244. Paschen W. Endoplasmic reticulum: a primary target in various acute disorders and degenerative diseases of the brain. *Cell Calcium*. 2003 Oct-Nov;34(4-5):365-83.
245. Pe'er I, de Bakker PI, Maller J, Yelensky R, Altshuler D, Daly MJ. Evaluating and improving power in wholegenome association studies using fixed marker sets. *Nat Genet* 2006;38: 663–667.
246. Peila R., White LR., Masaki K., Petrovitch H., Launer LJ. Reducing the risk of dementia: efficacy of long-term treatment of hypertension. *Stroke*. 2006;37:1165–1170.
247. Pepłońska B, Zekanowski C, Religa D, Czyzewski K, Styczyńska M, Pfeffer A, Gabryelewicz T, Gołebiowski M, Luczywek E, Wasiak B, Barczak A, Chodakowska M, Barcikowska M, Kuźnicki J. Strong association between Saitohin gene polymorphism and tau haplotype in the Polish population. *Neurosci Lett*. 2003 Sep 18;348(3):163-6.
248. Pera J, Slowik A, Dziedzic T, Pulyk R, Wloch D, Szczudlik A. Glutathione peroxidase 1 C593T polymorphism is associated with lobar intracerebral hemorrhage. *Cerebrovasc Dis*. 2008;25(5):445-9. Epub 2008 Apr 16
249. Perry G, Nunomura A, Lucassen P, Lassmann H, Smith MA. Apoptosis and Alzheimer's disease. *Science*. 1998 Nov 13;282(5392):1268-9.
250. Peters U, Chatterjee N, Hayes RB, Schoen RE, Wang Y, Chanock SJ, Foster CB. Variation in the selenoenzyme genes and risk of advanced distal colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008 May;17(5):1144-54.
251. Petri S, Kiaei M, Damiano M, Hiller A, Wille E, Manfredi G, Calingasan NY, Szeto HH, Beal MF. Cell-permeable peptide antioxidants as novel therapeutic approach in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 2006; 98: 1141- 1148.

252. Poirier J. Apolipoprotein E represents a potent gene-based therapeutic target for the treatment of sporadic Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2008; 4: S91–97.
253. Prince M, Jackson J. 2009 World Alzheimer Report 2009. Alzheimer's Disease International
254. Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM. Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci.* 2003 Apr; 6(4):345-51.
255. Qiu C, von Strauss E, Fastbom J, Winblad B, Fratiglioni L. Low blood pressure and risk of dementia in the Kungsholmen project: a 6-year follow-up study. *Arch Neurol.* 2003 Feb;60(2):223-8.
256. Qiu C., Winblad B., Fratiglioni L. The age-dependent relation of blood pressure to cognitive function and dementia. *Lancet Neurol.* 2005;4:487–499.
257. Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci.* 2009;11(2):111-28.
258. Raaschou-Nielsen O, Sørensen M, Hansen RD, Frederiksen K, Tjønneland A, Overvad K, Vogel U. GPX1 Pro198Leu polymorphism, interactions with smoking and alcohol consumption, and risk for lung cancer. *Cancer Lett.* 2007 Mar 18;247(2):293-300. Epub 2006 Jun 23.
259. Raina AK, Hochman A, Zhu X, Rottkamp CA, Nunomura A, Siedlak SL, Boux H, Castellani RJ, Perry G, Smith MA. Abortive apoptosis in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2001 Apr;101(4):305-10.
260. Rajaraman P, Hutchinson A, Rothman N, Black PM, Fine HA, Loeffler JS, Selker RG, Shapiro WR, Linet MS, Inskip PD. Oxidative response gene polymorphisms and risk of adult brain tumors. *Neuro Oncol.* 2008 Oct;10(5):709-15. Epub 2008 Aug 5.
261. Ramassamy C, Averill D, Beffert U, Bastianetto S, Theroux L, Lussier-Cacan S, Cohn JS, Christen Y, Davignon J, Quirion R, Poirier J. Oxidative damage and protection by antioxidants in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype. *Free Rad Biol Med.* 1999;27:544-553.
262. Ramassamy C, Averill D, Beffert U, Theroux L, Lussier-Cacan S, Cohn JS, Christen Y, Schoofs A, Davignon J, Poirier J. Oxidative insults are associated with apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis.* 2000 Feb;7(1):23-37.
263. Ratnasinghe D, Tangrea JA, Andersen MR, Barrett MJ, Virtamo J, Taylor PR, Albanes D. Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. *Cancer Res.* 2000 Nov 15;60(22):6381-3.
264. Ratovitski T, Corson LB, Strain J, Wong P, Cleveland DW, Culotta VC, Borchelt DR. Variation in the biochemical/biophysical properties of mutant superoxide dismutase 1

- enzymes and the rate of disease progression in familial amyotrophic lateral sclerosis kindreds. *Hum Mol Genet.* 1999 Aug;8(8):1451-60.
265. Ravn-Haren G, Olsen A, Tjønneland A, Dragsted LO, Nexø BA, Wallin H, Overvad K, Raaschou-Nielsen O, Vogel U. Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis.* 2006 Apr;27(4):820-5. Epub 2005 Nov 14.
266. Rea TD., Breitner JC., Psaty BM., Fitzpatrick AL, Lopez OL, Newman AB, Hazzard WR, Zandi PP, Burke GL, Lyketsos CG, Bernick C, Kuller LH. Statin use and the risk of incident dementia: the Cardiovascular Health Study. *Arch Neurol.* 2005;62:1047–1051.
267. Refolo LM, Pappolla MA, LaFrancois J, Malester B, Schmidt SD, Thomas-Bryant T, Tint GS, Wang R, Mercken M, Petanceska SS, Duff KE. A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 2001 Oct;8(5):890-9.
268. Regland B. and Gottfries CG, The role of amyloid β -protein in Alzheimer's disease. *The Lancet* 1992, vol. 340, no. 8817, pp. 467–469.
269. Reiman EM, Webster JA, Myers AJ, Hardy J, Dunckley T, Zismann VL, Joshipura KD, Pearson JV, Hu-Lince D, Huentelman MJ, Craig DW, Coon KD, Liang WS, Herbert RH, Beach T, Rohrer KC, Zhao AS, Leung D, Bryden L, Marlowe L, Kaleem M, Mastroeni D, Grover A, Heward CB, Ravid R, Rogers J, Hutton ML, Melquist S, Petersen RC, Alexander GE, Caselli RJ, Kukull W, Papassotiropoulos A, Stephan DA. GAB2 alleles modify Alzheimer's risk in APOE epsilon4 carriers. *Neuron.* 2007 Jun 7;54(5):713-20.
270. Reiss AB, Siller KA, Rahman MM, Chan ES, Ghiso J, de Leon MJ. Cholesterol in neurologic disorders of the elderly: stroke and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2004 Sep;25(8):977-89.
271. Reitz C. Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: a critical review. *Int J Alzheimers Dis.* 2012; 2012:369808. Epub 2012 Mar 17.
272. Religa D, Styczynska M, Peplonska B, Gabryelewicz T, Pfeffer A, Chodakowska M, Luczywek E, Wasiak B, Stepień K, Golebiowski M, Winblad B, Barcikowska M. Homocysteine, apolipoproteine E and methylenetetrahydrofolate reductase in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2003; 16(2):64-70.
273. Repetto MG, Reides CG, Evelson P, Kohan S, de Lustig ES, Llesuy SF. Peripheral markers of oxidative stress in probable Alzheimer patients. *Eur J Clin Invest.* 1999 Jul;29(7):643-9.
274. Rinaldi P, Polidori MC, Metastasio A, Mariani E, Mattioli P, Cherubini A, Catani M, Cecchetti R, Senin U, Mecocci P. Plasma antioxidants are similarly depleted in mild

- cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2003 Nov;24(7):915-9.
275. Ritchie K. *Epidemiology of the Dementias and Alzheimer's Disease*, w: *Evidencebased Dementia Practice*, wyd: Qizilbach N. Schneider L.S, Chui H., Tariot P., Brodaty H., Kaye J., & Erkinjuntti T, 2002 by Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing Company, 238-259.
 276. Rizzuto R., Bernardi P., Pozzan T. Mitochondria as all-round players of the calcium game. *J Physiol* 2000; 529: 37-47.
 277. Roberts GW, Gentleman SM, Lynch A, Murray L, Landon M, and Graham DI, β Amyloid protein deposition in the brain after severe head injury: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 1994, vol. 57, no. 4, pp. 419–425.
 278. Roberts LJ, Montine TJ, Markesbery WR, Tapper AR, Hardy P, Chemtob S, Dettbarn WD, Morrow JD. Formation of isoprostane-like compounds (neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. *J Biol Chem* 1998;273:13605-13612.
 279. Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F(2) isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Rad Biol Med*. 2000;28:505-513
 280. Roberts KE, Fallon MB, Krowka MJ, Brown RS, Trotter JF, Peter I, Tighiouart H, Knowles JA, Rabinowitz D, Benza RL, Badesch DB, Taichman DB, Horn EM, Zacks S, Kaplowitz N, Kawut SM; Pulmonary Vascular Complications of Liver Disease Study Group. Genetic risk factors for portopulmonary hypertension in patients with advanced liver disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 May 1;179(9):835-42. Epub 2009 Feb 12.
 281. Rockwood K., Kirkland S., Hogan DB., MacKnight C, Merry H, Verreault R, Wolfson C, McDowell I. Use of lipid-lowering agents, indication bias, and the risk of dementia in community-dwelling elderly people. *Arch Neurol*. 2002;59:223–227.
 282. Rondeau V, Jacqmin-Gadda H, Commenges D, Helmer C, Dartigues JF. Aluminum and silica in drinking water and the risk of Alzheimer's disease or cognitive decline: findings from 15-year follow-up of the PAQUID cohort. *Am J Epidemiol*. 2009; 169:489-496.
 283. Rosenberger A, Illig T, Korb K, Klopp N, Zietemann V, Wölke G, Meese E, Sybrecht G, Kronenberg F, Cebulla M, Degen M, Drings P, Gröschel A, Konietzko N, Kreymborg KG, Häussinger K, Höffken G, Jilge B, Ko YD, Morr H, Schmidt C, Schmidt EW, Täuscher D, Bickeböller H, Wichmann HE. Do genetic factors protect for early onset lung cancer? A case control study before the age of 50 years. *BMC Cancer*. 2008 Feb 25;8:60.
 284. Rovio S., Kåreholt I., Helkala EL., Viitanen M, Winblad B, Tuomilehto J, Soininen H, Nissinen A, Kivipelto M. Leisure-time physical activity at midlife and the risk of dementia and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2005;4:705–711.

285. Ruitenbergh A, van Swieten JC, Witteman JC, Mehta KM, van Duijn CM, Hofman A, Breteler MM. Alcohol consumption and risk of dementia: the Rotterdam Study. *Lancet*. 2002; 359:281-286.
286. Sagara Y, Dargusch R, Klier FG, Schubert D, Behl C. Increased antioxidant enzyme activity in amyloid beta protein-resistant cells. *J Neurosci*. 1996 Jan 15;16(2):497-505.
287. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 1993; 43: 1467–1472.
288. Scapagnini G, Vasto S, Abraham NG, Caruso C, Zella D, Fabio G. Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol*. 2011 Oct;44(2):192-201. Epub 2011 Apr 19.
289. Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD. Increased amyloid betapeptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9649–9653.
290. Schmidt R, Schmidt H, Curb JD, Masaki K, White LR, Launer LJ. Early inflammation and dementia: a 25-year follow-up of the Honolulu-Asia Aging Study. *Ann Neurol*. 2002; 52:168-174.
291. Schuessel K, Schäfer S, Bayer TA, Czech C, Pradier L, Müller-Spahn F, Müller WE, Eckert A. Impaired Cu/Zn-SOD activity contributes to increased oxidative damage in APP transgenic mice. *Neurobiol Dis*. 2005 Feb;18(1):89-99.
292. Selkoe D.J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 1991; 6: 487-498.
293. Seripa D, Panza F, Franceschi M, D'Onofrio G, Solfrizzi V, Dallapiccola B, Pilotto A. Non-apolipoprotein E and apolipoprotein E genetics of sporadic Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*. 2009 Jul;8(3):214-36.
294. Seshadri S, Fitzpatrick AL, Ikram MA, DeStefano AL, Gudnason V, Boada M, Bis JC, Smith AV, Carassquillo MM, Lambert JC, Harold D, Schrijvers EM, Ramirez-Lorca R, Debette S, Longstreth WT Jr, Janssens AC, Pankratz VS, Dartigues JF, Hollingworth P, Aspelund T, Hernandez I, Beiser A, Kuller LH, Koudstaal PJ, Dickson DW, Tzourio C, Abraham R, Antunez C, Du Y, Rotter JJ, Aulchenko YS, Harris TB, Petersen RC, Berr C, Owen MJ, Lopez-Arrieta J, Varadarajan BN, Becker JT, Rivadeneira F, Nalls MA, Graff-Radford NR, Campion D, Auerbach S, Rice K, Hofman A, Jonsson PV, Schmidt H, Lathrop M, Mosley TH, Au R, Psaty BM, Uitterlinden AG, Farrer LA, Lumley T, Ruiz A, Williams J, Amouyel P, Younkin SG, Wolf PA, Launer LJ, Lopez OL, van Duijn CM, Breteler MM; CHARGE Consortium; GERAD1 Consortium; EADI1 Consortium. Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA*. 2010 May 12;303(18):1832-40.

295. Shan X, Tashiro H, Lin CL. The identification and characterization of oxidized RNAs in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2003 Jun 15;23(12):4913-21.
296. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HA, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 1995, vol. 375, no. 6534, pp. 754–760.
297. Shimohama S. Apoptosis in Alzheimer's disease--an update. *Apoptosis.* 2000 Feb;5(1):9-16.
298. Siuda J, Gorzkowska A, Patalong-Ogiewa M, Krzystanek E, Czech E, Wiechuła B, Garczorz W, Danch A, Jasińska-Myga B, Opala G. From mild cognitive impairment to Alzheimer's disease - influence of homocysteine, vitamin B12 and folate on cognition over time: results from one-year follow-up. *Neurol Neurochir Pol.* 2009 Jul-Aug;43(4):321-9.
299. Skólmowska M, Kmiec M. Enzymosomy antyoksydacyjne – właściwości i zastosowanie Antioxidant enzymosomes – properties and application. *Postepy Hig Med Dosw (online)*, 2011; 65: 640-644.
300. Skulachev VP. Biochemical mechanisms of evolution and the role of oxygen. *Biochemistry (Mosc).* 1998 Nov;63(11):1335-43.
301. Soerensen M, Christensen K, Stevnsner T, Christiansen L. The Mn-superoxide dismutase single nucleotide polymorphism rs4880 and the glutathione peroxidase 1 single nucleotide polymorphism rs1050450 are associated with aging and longevity in the oldest old. *Mech Ageing Dev.* 2009 May;130(5):308-14. Epub 2009 Feb 5.
302. Solomon A, Kåreholt I, Ngandu T, Winblad B, Nissinen A, Tuomilehto J, Soininen H, Kivipelto M. Serum cholesterol changes after midlife and late-life cognition: twenty-one-year follow-up study. *Neurology.* 2007 Mar 6;68(10):751-6.
303. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids.* 2003 Dec;25(3-4):207-18. Epub 2003 Jul 29.
304. Steinbrecher A, Méplan C, Hesketh J, Schomburg L, Endermann T, Jansen E, Akesson B, Rohrmann S, Linseisen J. Effects of selenium status and polymorphisms in selenoprotein genes on prostate cancer risk in a prospective study of European men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 Nov;19(11):2958-68. Epub 2010 Sep 17.
305. Stewart WF, Kawas C, Corrada M, Metter EJ. Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. *Neurology.* 1997 Mar;48(3):626-32.
306. Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD. Binding of human

- apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8098– 8102.
307. Styczyńska M, Wasiak B, Łuczywek E, Pfeffer A, Barcikowska M. Alpha2-macroglobulin gene polymorphism in patients with Alzheimer's disease. *Neurol Neurochir Pol.* 2001 Nov-Dec;35(6):1013-20.
 308. Styczynska M, Religa D, Pfeffer A, Luczywek E, Wasiak B, Styczynski G, Peplonska B, Gabryelewicz T, Golebiowski M, Kobrys M, Barcikowska M. Simultaneous analysis of five genetic risk factors in Polish patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2003 Jun 26; 344(2):99-102.
 309. Subasinghe S, Unabia S, Barrow CJ, Mok SS, Aguilar MI, Small DH. Cholesterol is necessary both for the toxic effect of Abeta peptides on vascular smooth muscle cells and for Abeta binding to vascular smooth muscle cell membranes. *J Neurochem.* 2003 Feb; 84(3):471-9.
 310. Sultana R, Piroddi M, Galli F, Butterfield DA. Protein levels and activity of some antioxidant enzymes in hippocampus of subjects with amnesic mild cognitive impairment. *Neurochem Res.* 2008 Dec;33(12):2540-6. Epub 2008 Mar 6.
 311. Swerdlow RH, Khan SM. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis; an update. *Exp Neurol* 2009; 218: 308-315.
 312. Szekely CA, Thorne JE, Zandi PP, Ek M, Messias E, Breitner JC, Goodman SN. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of Alzheimer's disease: a systematic review. *Neuroepidemiology.* 2004; 23(4):159-169.
 313. Talarowska M, Florkowski A, Zboralski K, Gałeczki P. Skala MOCA oraz MMSE w diagnozie łagodnych zaburzeń funkcji poznawczych - MOCA and MMSE In the diagnosis of mild cognitive impairment. *Psychiatria i Psychoterapia* 2011, Tom 7, Nr 1: s. 13-20.
 314. Tan ZS, Beiser AS, Vasari RS, Roubenoff R, Dinarello CA, Harris TB, Benjamin EJ, Au R, Kiel DP, Wolf PA, Seshadri S. Inflammatory markers and the risk of Alzheimer disease: the Framingham Study. *Neurology.* 2007; 68:1902-1908.
 315. Tang NP, Wang LS, Yang L, Gu HJ, Sun QM, Cong RH, Zhou B, Zhu HJ, Wang B. Genetic variant in glutathione peroxidase 1 gene is associated with an increased risk of coronary artery disease in a Chinese population. *Clin Chim Acta.* 2008 Sep;395(1-2):89-93. Epub 2008 May 25.
 316. Tang H, Dong X, Day RS, Hassan MM, Li D. Antioxidant genes, diabetes and dietary antioxidants in association with risk of pancreatic cancer. *Carcinogenesis.* 2010 Apr;31(4):607-13. Epub 2010 Jan 22.
 317. Teaktong T, Graham AJ, Court JA, Perry RH, Jaros E, Johnson M, Hall R, Perry EK. Nicotinic acetylcholine receptor immunohistochemistry in Alzheimer's disease and

- dementia with Lewy bodies: differential neuronal and astroglial pathology. *J. Neurol. Sci.* 2004;225, 39–49.
318. Thomas RS, Lelos MJ, Good MA, Kidd EJ. Clathrin-mediated endocytic proteins are upregulated in the cortex of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease-like amyloid pathology. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Dec 2;415(4):656-61. Epub 2011 Nov 3.
 319. Tian C, Fang S, Du X, Jia C. Association of the C47T polymorphism in SOD2 with diabetes mellitus and diabetic microvascular complications: a meta-analysis. *Diabetologia.* 2011 Apr;54(4):803-11. Epub 2010 Dec 22.
 320. Tian C, Liu T, Fang S, Du X, Jia C. Association of C47T polymorphism in SOD2 gene with coronary artery disease: a case-control study and a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2012 May;39(5):5269-76. Epub 2011 Dec 15.
 321. Torres LL, Quaglio NB, de Souza GT, Garcia RT, Dati LM, Moreira WL, Loureiro AP, de Souza-Talarico JN, Smid J, Porto CS, Bottino CM, Nitrini R, Barros SB, Camarini R, Marcourakis T. Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2011;26(1):59-68.
 322. Troy CM, Rabacchi SA, Xu Z, Maroney AC, Connors TJ, Shelanski ML, Greene LA. beta-Amyloid-induced neuronal apoptosis requires c-Jun N-terminal kinase activation. *J Neurochem.* 2001 Apr;77(1):157-64.
 323. Tuppo EE, Arias HR. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Feb;37(2):289-305.
 324. Turner BJ, Li QX, Laughton KM, Masters CL, Lopes EC, Atkin JD, Cheema SS. Brain beta-amyloid accumulation in transgenic mice expressing mutant superoxide dismutase 1. *Neurochem Res.* 2004 Dec;29(12):2281-6.
 325. Udler M, Maia AT, Cebrian A, Brown C, Greenberg D, Shah M, Caldas C, Dunning A, Easton D, Ponder B, Pharoah P. Common germline genetic variation in antioxidant defense genes and survival after diagnosis of breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007 Jul 20;25(21):3015-23.
 326. Vaishnavi SN, Vlassenko AG, Rundle MM, Snyder AZ, Mintun MA, Raichle ME. Regional aerobic glycolysis in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Oct 12;107(41):17757-62. Epub 2010 Sep 13.
 327. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84. Epub 2006 Aug 4. Review.
 328. Van Broeckhoven C. Presenilins and Alzheimer disease. *Nat Genet.* 1995 Nov;11(3):230-2.
 329. Vaya J, Schipper HM. Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease. *J Neurochem.* 2007 Sep;102(6):1727-37. Epub 2007 Jun 15. Review.

330. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet.* 2005;39:359-407.
331. Walsh DM, Selkoe DJ. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron.* 2004 Sep 30;44(1):181-93.
332. Wang T, Liu B, Qin L, Wilson B, Hong JS. Protective effect of the SOD/catalase mimetic MnTMPyP on inflammation-mediated dopaminergic neurodegeneration in mesencephalic neuronal-glia cultures. *J. Neuroimmunol.*, 2004; 147: 68–72.
333. Wang J, Xiong S, Xie C, Markesbery WR, Lovell MA. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2005 May;93(4):953-62.
334. Wang SS, Davis S, Cerhan JR, Hartge P, Severson RK, Cozen W, Lan Q, Welch R, Chanock SJ, Rothman N. Polymorphisms in oxidative stress genes and risk for non-Hodgkin lymphoma. *Carcinogenesis.* 2006 Sep;27(9):1828-34. Epub 2006 Mar 16.
335. Wang J, Markesbery WR, Lovell MA. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in mild cognitive impairment. *J Neurochem.* 2006 Feb;96(3):825-32. Epub 2006 Jan 9.
336. Warpman U, Nordberg A. Epibatidine and ABT 418 reveal selective losses of alpha 4 beta 2 nicotinic receptors in Alzheimer brains. *Neuroreport.* 1995;6, 2419–2423.
337. Wheatley-Price P, Asomaning K, Reid A, Zhai R, Su L, Zhou W, Zhu A, Ryan DP, Christiani DC, Liu G. Myeloperoxidase and superoxide dismutase polymorphisms are associated with an increased risk of developing pancreatic adenocarcinoma. *Cancer.* 2008 Mar 1;112(5):1037-42.
338. Wiener HW, Perry RT, Chen Z, Harrell LE, Go RC. A polymorphism in SOD2 is associated with development of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav.* 2007 Nov;6(8):770-5. Epub 2007 Mar 21.
339. Wigge P, McMahon HT. The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. *Trends Neurosci* 1998; 21: 339–344.
340. Wijsman EM, Daw EW, Yu X, Steinbart EJ, Nochlin D, Bird TD, Schellenberg GD. APOE and other loci affect age-at-onset in Alzheimer's disease families with PS2 mutation. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2005 Jan 5;132B(1):14-20.
341. Wijsman EM, Pankratz ND, Choi Y, Rothstein JH, Faber KM, Cheng R, Lee JH, Bird TD, Bennett DA, Diaz-Arrastia R, Goate AM, Farlow M, Ghetti B, Sweet RA, Foud TM, Mayeux R; NIA-LOAD/NCRAD Family Study Group. Genome-wide association of familial late-onset Alzheimer's disease replicates BIN1 and CLU and nominates CUGBP2 in interaction with APOE. *PLoS Genet.* 2011 Feb;7(2):e1001308. Epub 2011 Feb 17.

342. Wong P, Waggoner D, Subramaniam J, Tessarollo L, Bartnikas TB, Culotta VC, Price DL, Rothstein J, Gitlin JD. Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000; 97, 28-86.
343. Woźniak M, Czyż M, Mimetyki dysmutazy ponadtlenkowej – potencjalne zastosowania kliniczne -Superoxide dismutase mimetics: Possible clinical Applications *Postępy Hig Med Dosw.* (online), 2008; 62: 613-624.
344. Wójcicka G, Bełtowski J. Stres oksydacyjny w zapaleniu kłębusz-ków nerkowych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2001; 55: 855–869.
345. Xiao J, Perry G, Troncoso J, Monteiro MJ. alpha-calcium-calmodulin-dependent kinase II is associated with paired helical filaments of Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996 Sep;55(9):954-63.
346. Xie Q, Ratnasinghe LD, Hong H, Perkins R, Tang ZZ, Hu N, Taylor PR, Tong W. Decision forest analysis of 61 single nucleotide polymorphisms in a case-control study of esophageal cancer; a novel method. *BMC Bioinformatics.* 2005 Jul 15;6 Suppl 2:S4.
347. Xu WL., Qiu CX., Winblad B., Fratiglioni L. The effect of borderline diabetes mellitus on the risk of dementia and Alzheimer disease. *Diabetes.* 2007;56:211–216.
348. Yasar S, Corrada M, Brookmeyer R, Kawas C. Calcium channel blockers and risk of AD: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neurobiol Aging.* 2005 Feb;26(2):157-63.
349. Yates SL, Burgess LH, Kocsis-Angle J, Antal JM, Dority MD, Embury PB, Piotrkowski AM, Brunden KR. Amyloid beta and amylin fibrils induce increases in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia. *J Neurochem.* 2000 Mar;74(3):1017-25.
350. Yi JF, Li YM, Liu T, He WT, Li X, Zhou WC, Kang SL, Zeng XT, Zhang JQ. Mn-SOD and CuZn-SOD polymorphisms and interactions with risk factors in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2010 Oct 7;16(37):4738-46.
351. Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):802-9. Review.
352. Zafrilla P, Mulero J, Xandri JM, Santo E, Caravaca G, Morillas JM. Oxidative stress in Alzheimer patients in different stages of the disease. *Curr Med. Chem* 2006;13:1075-83.
353. Zandi PP, Carlson MC, Plassman BL, Welsh-Bohmer KA, Mayer LS, Steffens DC, Breitner JC; Cache County Memory Study Investigators. Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women: the Cache County Study. *JAMA.* 2002 Nov 6;288(17):2123-9.

354. Zandi PP., Sparks DL., Khachaturian AS., Tschanz J, Norton M, Steinberg M, Welsh-Bohmer KA, Breitner JC; Cache County Study investigators. Do statins reduce risk of incident dementia and Alzheimer disease? The Cache County Study. *Arch Gen Psychiatry*. 2005;62:217–224.
355. Zarkovic K. 4-hydroxynonenal and neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med*. 2003;24:293-303.
356. Zejnilovic J, Akev N, Yilmaz H, Isbir T. Association between manganese superoxide dismutase polymorphism and risk of lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 2009 Feb;189(1):1-4.
357. Zhang J, Zhang X, Dhakal IB, Gross MD, Kadlubar FF, Anderson KE. Sequence variants in antioxidant defense and DNA repair genes, dietary antioxidants, and pancreatic cancer risk. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2011 Aug 30;2(3):236-44. Epub 2011 Jun 5.
358. Zhu X, Raina AK, Perry G, Smith MA Apoptosis in Alzheimer disease: a mathematical improbability.. *Curr Alzheimer Res*. 2006 Sep;3(4):393-6. Review.
359. Zienolddiny S, Campa D, Lind H, Ryberg D, Skaug V, Stangeland LB, Canzian F, Haugen A. A comprehensive analysis of phase I and phase II metabolism gene polymorphisms and risk of non-small cell lung cancer in smokers. *Carcinogenesis*. 2008 Jun;29(6):1164-9. Epub 2008 Feb 6.
360. Żekanowski C, Styczyńska M, Pepłońska B, Gabryelewicz T, Religa D, Ilkowski J, Kijanowska-Haładyna B, Kotapka-Minc S, Mikkelsen S, Pfeffer A, Barczak A, Łuczywek E, Wasiak B, Chodakowska-Zebrowska M, Gustaw K, Łaczkowski J, Sobów T, Kuźnicki J, Barcikowska M. Mutations in presenilin 1, presenilin 2 and amyloid precursor protein genes in patients with early-onset Alzheimer's disease in Poland. *Exp Neurol*. 2003 Dec;184(2):991-6.
361. Żekanowski C, Pepłońska B, Styczyńska M, Religa D, Pfeffer A, Czyzewski K, Gabryelewicz T, Szybińska A, Kijanowska-Haładyna B, Kotapka-Minc S, Łuczywek E, Barczak A, Wasiak B, Chodakowska-Zebrowska M, Przekop I, Kuźnicki J, Barcikowska M. The E318G substitution in PSEN1 gene is not connected with Alzheimer's disease in a large Polish cohort. *Neurosci Lett*. 2004 Mar 11;357(3):167-70.
362. Żekanowski C, Religa D, Safranow K, Maruszak A, Dziedziejko V, Styczyńska M, Gacia M, Golan M, Pepłońska B, Chlubek D, Kuźnicki J, Barcikowska M. The -22c/t polymorphism in presenilin 1 gene is not connected with late-onset and early-onset familial Alzheimer's disease in Poland. *J Neural Transm*. 2005 Jun;112(6):839-45. Epub 2004 Oct 12.

- Tabela 1.** Rozkład płci w grupie chorych na AD i w grupie kontrolnej.
- Tabela 2.** Liczba próbek, w których nie udało się określić genotypu.
- Tabela 3.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs4998557 genu *SOD1* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej.
- Tabela 4.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs1041740 genu *SOD1* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej.
- Tabela 5.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs2070424 genu *SOD1* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej.
- Tabela 6.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs2855116 genu *SOD2* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej.
- Tabela 7.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs5746136 genu *SOD2* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej.
- Tabela 8.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs4880 genu *SOD2* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej.
- Tabela 9.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs3448 genu *GPx-1* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej.
- Tabela 10.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs1050450 genu *GPx-1* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej.
- Tabela 11.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs1800668 genu *GPx-1* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej.
- Tabela 12.** Rozkład genotypów polimorfizmu genu *APOE* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej.
- Tabela 13.** Rozkład alleli polimorfizmu genu *APOE* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej.
- Tabela 14.** Analiza regresji logistycznej w modelu recesywnym uwzględniająca wpływ wieku, płci, allelu ε4 genu *APOE* i polimorfizmu rs2070424 genu *SOD1*.
- Tabela 15.** Analiza regresji logistycznej w modelu addytywnym uwzględniająca wpływ wieku, płci, allelu ε4 genu *APOE* i polimorfizmu rs2070424 genu *SOD1*