

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Monika Marona

Wpływ wybranych polimorfizmów genów paraoksonaz na ryzyko sporadycznej postaci choroby Alzheimera oraz na skuteczność terapii choroby Alzheimera za pomocą inhibitorów acetylocholinesterazy.

Praca doktorska

Promotor: dr hab. med. Agnieszka Słowik

Pracę wykonano w Zakładzie Genetyki i Klinice Neurologii
Katedry Neurologii UJ CM

Kierownik Katedry Neurologii: Prof. dr hab. med. Andrzej Szczudlik

Kraków, 2010 rok

SPIIS TREŚCI

I. WPROWADZENIE.....	6
I.1. CHOROBA ALZHEIMERA.....	6
I.1.1. Wstęp.....	6
I.1.2. Epidemiologia Choroby Alzheimer.....	6
I.1.3. Uwarunkowania Choroby Alzheimer.....	7
I.1.3.1. Środowiskowe uwarunkowania Choroby Alzheimer.....	7
I.1.3.2. Genetyczne uwarunkowania Choroby Alzheimer.....	21
I.1.3.2.1. Genetyczne uwarunkowania Choroby Alzheimer o wczesnym początku.....	23
I.1.3.2.2. Genetyczne uwarunkowania Choroby Alzheimer późnym początku.....	
I.1.4. Patomorfologia i etiopatogeneza choroby Alzheimer.....	32
I.1.4.1 Obraz patomorfologiczny choroby Alzheimer.....	32
I.1.4.2 Etiopatogeneza choroby Alzheimer.....	38
I.1.4.2.1. Hipoteza kaskady amyloidowej.....	38
I.1.4.2.2. Inne procesy w etiopatogenezie choroby Alzheimer.....	43
I.1.4.2.2.1. Hipoteza dysfunkcji cholinergicznej.....	43
I.1.4.2.2.2. Dysfunkcja synaps.....	44
I.1.4.2.2.3. Stres oksydacyjny i zaburzenia homeostazy jonów metali.....	45
I.1.4.2.2.4. Zaburzenia homeostazy cholesterolu.....	46
I.1.4.2.2.5. Zaburzenia homeostazy jonów wapnia.....	46
I.1.4.2.2.6. Zaburzenia funkcji mitochondriów i siateczki endoplazmatycznej.....	48
I.1.4.2.2.7. Rola apoptozy.....	49
I.1.4.2.2.8. Rola procesów zapalnych.....	50

I.1.5. Leczenie i profilaktyka choroby Alzheimera.....	52
I.1.5.1. Leki modulujące neurotransmisję.....	52
I.1.5.1.1. Leki modulujące neurotransmisję w układzie cholinergicznym.....	52
I.1.5.1.2. Leki modulujące neurotransmisję w układzie glutaminergicznym.....	54
I.1.5.2. Inne koncepcje terapeutyczne.....	56
I.1.5.2.1. Terapia antyoksydacyjna.....	56
I.1.5.2.2. Leki wpływające na procesy zapalne.....	58
I.1.5.2.3. Hormonoterapia zastępcza.....	58
I.1.5.2.4. Terapie wpływające na biologię amyloidu- β	59
I.1.5.2.1. Inhibitory γ - i β -sekretyazy.....	59
I.1.5.2.2. Leki wpływające na eliminację amyloidu- β	60
I.1.5.2.3. Leki stabilizujące mikrotubule i inhibitory kinaz.....	65
I.2. PARAOKSONAZY.....	68
I.2.1. Ogólna charakterystyka.....	68
I.2.1. Paraoksonaza 1 (PON1).....	68
I.2.2. Paraoksonaza 2 (PON2).....	71
I.2.3. Paraoksonaza 3 (PON3).....	73
I.2.2. Paraoksonazy a ryzyko choroby Alzheimera.....	73
I.2.3. Paraoksonazy a patomechanizm choroby Alzheimera.....	74
I.2.4. Paraoksonazy a reakcja na leczenie inhibitorami acetylocholinesterazy chorych na chorobę Alzheimera.....	75
II. CEL NAUKOWY PROJEKTU I ZADANIA BADAWCZE.....	76
II.1. CEL NAUKOWY.....	76
II.2. ZADANIA BADAWCZE.....	76

III. MATERIAŁ.....	77
III.1 GRUPA BADANA.....	77
III.2 GRUPA KONTROLNA.....	77
III.3 MATERIAŁ BIOLOGICZNY.....	77
IV. METODY.....	78
IV.1. METODYKA PROCEDUR DIAGNOSTYCZNYCH RZEPROWADZONYCH U CHORYCH KWALIFIKOWANYCH DO BADANIA.....	78
IV.1.1. Kryteria włączenia do badania.....	78
IV.1.2. Kryteria wykluczenia.....	78
IV.2. ETAPY BADANIA.....	79
IV.3. METODYKA BADAŃ LABORATORYJNYCH.....	80
IV.3.1. Izolowanie DNA.....	80
IV.3.2. Oznaczenie polimorfizmów genów.....	80
IV.3.2.1. Polimorfizm Q192R genu <i>PON1</i>	86
IV.3.2.2. Polimorfizm L55M genu <i>PON1</i>	81
IV.3.2.3. Polimorfizm C311S genu <i>PON2</i>	82
IV.3.2.4. Polimorfizm –161C/T genu <i>PON1</i>	82
IV.3.2.5. Polimorfizm genu <i>APOE</i>	83
IV.4. STATYSTYCZNE OPRACOWANIE WYNIKÓW.....	84
V. WYNIKI.....	85
V.1. CHARAKTERYSTYKA BADANYCH GRUP.....	85
V.2. BADANIA GENETYCZNE.....	86
V.2.1. Związek badanych polimorfizmów z ryzykiem zachorowania na chorobę Alzheimera.....	86
V.2.1.1. Polimorfizm Q192R genu <i>PON1</i> a ryzyko choroby Alzheimera.....	86
V.2.1.2. Polimorfizm L55M genu <i>PON1</i> a ryzyko choroby Alzheimera.....	88

V.2.1.3. Polimorfizm –161C/T genu <i>PON1</i> a ryzyko choroby Alzheimera....	90
V.2.1.4. Polimorfizm C311S genu <i>PON2</i> a ryzyko choroby Alzheimera.....	92
V.2.1.5. Analiza haplotypów.....	94
V.2.1.6. Polimorfizm genu <i>APOE</i> a ryzyko choroby Alzheimera.....	97
V.2.1.7. Testowanie interakcji między badanymi polimorfizmami.....	100
V.2.2. Związek badanych polimorfizmów z odpowiedzią na leczenie inhibitorami acetylocholinesterazy.....	102
V.2.3. Metaanalizy.....	107
VI. DYSKUSJA.....	110
VI.1. Związek badanych polimorfizmów z ryzykiem zachorowania na chorobę Alzheimera.....	110
VI.2. Związek badanych polimorfizmów z odpowiedzią na leczenie inhibitorami acetylocholinesterazy.....	118
VI.3. Podsumowanie.....	125
VII. WNIOSKI.....	126
VIII. STRESZCZENIE.....	128
IX. SUMMARY.....	130
X. ZAŁĄCZNIKI.....	133
XI. PIŚMIENNICTWO.....	140

I. WPROWADZENIE

I.1. CHOROBA ALZHEIMERA

I.1.1. Wstęp

Choroba Alzheimerera (*ang. Alzheimer Disease – AD*) jest chorobą pierwotnie zwyrodnieniową ośrodkowego układu nerwowego, charakteryzującą się postępującym deficytem pamięci i innych funkcji poznawczych, np. zdolności uczenia się, myślenia, oceny sytuacji, często z towarzyszącymi zaburzeniami zachowania, co prowadzi do pogarszania się umiejętności komunikacyjnych oraz znacznego obniżenia się zdolności radzenia sobie z czynnościami życia codziennego w porównaniu do stanu sprzed choroby. W badaniu neuropatologicznym mózgu najbardziej charakterystycznymi zmianami dla tej choroby są: blaszki amyloidowe oraz zwyrodnienie włóknkowe [Blennow, de Leon, Zetterberg, 2006].

I.1.2. Epidemiologia choroby Alzheimerera

AD jest najczęstszą przyczyną otępienia w społeczeństwach zachodnich i drugą, co do częstości w krajach Dalekiego Wschodu. Szacuje się, że w krajach zachodnich AD dotyka od 1 do 5% osób w wieku 60-64 lata, od 3 do 12% osób w wieku 70-80 lat i od 25 do 35% osób powyżej 85. roku życia [Evans i wsp., 1989]. Zachorowalność na AD podwaja się co 5 lat u osób pomiędzy 65. a 85. rokiem życia [Ritchie K. i wsp., 2002]. Zasada ta już nie obowiązuje u osób powyżej 85. roku życia.

Dane epidemiologiczne opublikowane w 1999 roku szacują, że w Polsce na AD choruje około 200 tysięcy osób [Winblad B., 1999]. W populacji polskiej AD, zwłaszcza w młodszych grupach wiekowych i u mężczyzn, jest drugą, co do częstości (po otępieniu naczyniopochodnym) przyczyną otępienia [Gabryelewicz i wsp., 1999].

Najnowsze dane donoszą, że wśród mieszkańców USA około 5.3 miliona osób choruje na AD [Alzheimer's Association Report, 2010 Alzheimer's Disease Facts and Figures; http://www.alz.org/documents_custom/report_alzfactsfigures2010].

Szacuje się, że w tej grupie około 5.1 miliona to osoby powyżej 65 roku życia [Hebert i wsp., 2003], a około 200 000 osoby w wieku poniżej 65 roku życia [Alzheimer's Association. Early-Onset Dementia: A National Challenge, www.alz.org]. Na podstawie innych danych, opartych na wyliczeniach grupy badawczej ADAMS (*ang. The Aging*,

Demographics and Memory Study) 14% mieszkańców USA w wieku powyżej 71 roku życia choruje na AD. W tej grupie wiekowej wśród kobiet choruje 16%, a wśród mężczyzn 11% [Plassman i wsp., 2007].

Jeszcze bardziej niepokojące są szacunki, według których w 2050r. chorować będzie od 11.3 do 16 milionów osób, co oznacza potrojenie obecnej liczby chorych [Hebert LE i wsp., 2003].

Ostatnie raporty donoszą, że w Stanach Zjednoczonych roczne koszty opieki nad chorymi na AD i inne otępienia wynoszą 148 bilionów \$ oraz, że w społeczeństwie amerykańskim AD potraja koszty opieki nad osobami powyżej 65 roku życia [Alzheimer's Association, 2009].

Jednocześnie wiadomo, że AD znamienne skraca przewidywany czas przeżycia oraz jest jedną z głównych przyczyn niesprawności i potrzeby korzystania z pomocy innych osób, co znacznie pogarsza jakość życia zarówno chorych jak i opiekunów.

I.1.3. Uwarunkowania choroby Alzheimera

I.1.3.1. Środowiskowe uwarunkowania choroby Alzheimera

AD jest chorobą o heterogennej etiologii i złożonej, wieloczynnikowej patogenezie. W rozwoju AD bierze się pod uwagę wpływ czynników środowiskowych i uwarunkowań genetycznych.

Najważniejsze środowiskowe czynniki ryzyka AD to: starszy wiek, czynniki psychosocjalne, w tym niski poziom wykształcenia, wykonywanie mało skomplikowanych zadań w pracy zawodowej czy ograniczone kontakty społeczne w starszym wieku, a także naczyniowe czynniki ryzyka oraz tzw. inne czynniki ryzyka, tzn. zapalne, toksyczne, niestosowanie hormonoterapii zastępczej, przebyty uraz głowy.

Wiek jest najsilniejszym czynnikiem ryzyka AD, co dowodzi, że procesy biologiczne związane z wiekiem mogą mieć znaczenie w patogenezie tej choroby [Bachman i wsp., 1993].

Wielokrotnie dokumentowano, że niski poziom wykształcenia, niski status ekonomiczny czy też mała aktywność socjalna zwiększają ryzyko zachorowania na AD. Na przykład,

w badaniu prowadzonym przez Karp i wsp. przez trzy lata monitorowano 931 osób w wieku, co najmniej 75 lat, u których w chwili włączenia do badania nie stwierdzono otępienia. W grupie tej po zakończeniu obserwacji otępienie rozpoznano u 101 osób, w tym u 76 badanych postawiono rozpoznanie AD. W analizie jednoczynnikowej stwierdzono, że niski poziom wykształcenia i niski status socjoekonomiczny zwiększają ryzyko zachorowania na AD (odpowiednio ryzyko względne równe jest 3.4 i 1.6). Jednak łączna analiza obu tych parametrów (wykształcenie i status ekonomiczny) wykazała, że tylko niski poziom edukacji stanowił niezależny czynnik ryzyka AD [Karp i wsp., 2004].

Uważa się też, że ograniczone kontakty społeczne również predysponują do rozwoju AD. Wnioski takie wyciągnięto m.in. na podstawie badania, w którym obserwowano przez 3 lata 1203 osoby bez otępienia. Po tym okresie, otępienie rozpoznano u 176 pacjentów. Na podstawie danych, m.in. takich jak: czy badana osoba mieszka samotnie czy nie, czy jest zamężna czy nie, czy pozostaje w bliskich relacjach z innymi osobami czy nie, stwierdzono, że ubogie życie społeczne zwiększa ryzyko rozwoju otępienia o 60% [Fratiglioni i wsp., 2000].

W innym badaniu analizowano wpływ aktywności fizycznej na ryzyko rozwoju AD. Obserwowano 1740 osób w wieku powyżej 65 lat przez 6 lat. Po tym czasie u 158 osób rozpoznano otępienie, w tym AD u 107 osób. Stwierdzono, że regularnie wykonywane ćwiczenia fizyczne są czynnikiem, który opóźnia rozwój otępienia i AD. Częstość występowania otępienia w grupie pacjentów, którzy wykonywali ćwiczenia fizyczne przynajmniej 3 razy w tygodniu wynosiła 13 na 1000 osobolat, w porównaniu z 19,7 na 1000 osobolat w grupie osób wykonujących ćwiczenia fizyczne rzadziej niż 3 razy w tygodniu. Podobne wyniki uzyskano w analizie grupy ograniczonej do osób z rozpoznaniem AD, szczególnie nosicieli allelu $\epsilon 4$ genu *APOE* [Larson i wsp., 2006; Rovio i wsp., 2005].

Poza wyższym poziomem edukacji również podejmowanie różnych aktywności stymulujących intelektualnie i socjalnie wydaje się być czynnikiem chroniącym przed rozwojem otępienia i AD. W jednym z badań przez 21 lat obserwowano pod tym kątem 1449 osób w wieku od 65 do 79 lat. Stwierdzono, że osoby aktywne, tzn. takie, które przynajmniej dwa razy w tygodniu w czasie wolnym brały udział w grupowych zajęciach sportowych charakteryzowały się znacząco niższym ryzykiem zachorowania na otępienie i AD

w porównaniu z osobami prowadzącymi spoczynkowy tryb życia. Stwierdzono też, że związek ten był szczególnie wyraźny u nosicieli allelu $\epsilon 4$ genu *APOE* [Rovio i wsp., 2005].

Liczne badania popierają tezę, że naczyniowe czynniki ryzyka, w tym: palenie papierosów, otyłość, hipercholesterolemia, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, przebyty „niemy” zawał mózgu czy zmiany w istocie białej mózgu o typie leukoarajozji, są związane ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na otępienie i AD.

Znaczenie palenia papierosów jako czynnika ryzyka otępienia w pierwszych opublikowanych badaniach budziło pewne kontrowersje. Według tych badań obserwowano znamienne niższy odsetek chorych na AD wśród osób palących papierosy. Na tej podstawie wysunięto tezę o ochronnym działaniu nikotyny [Fratiglioni i wsp., 2000]. Wydaje się jednak, że było to spowodowane obecnością mniejszej liczby palaczy wśród badanych chorych na AD (krótszy czas przeżycia osób palących papierosy) i w kolejnych badaniach wykazano już znamienne wyższe ryzyko zachorowania na AD u palaczy.

W 1998r. w czasopiśmie *Lancet* opublikowano wyniki dużego populacyjnego badania, *the Rotterdam Study*, do którego włączono 6870 osób powyżej 55 roku życia bez otępienia w chwili włączenia do badania, których pod względem wywiadu nikotynowego podzielono na trzy grupy: nigdy nie palących, palących kiedykolwiek w przeszłości i palących aktualnie. Po ponad 2 latach obserwacji stwierdzono otępienie u 146 osób, w tym AD rozpoznano u 105 osób. Wykazano, że w porównaniu z osobami nigdy nie palącymi palacze papierosów są znacznie bardziej obciążeni ryzykiem zachorowania na otępienie (OR=2.2, 95%CI:1.3 – 3.6) i AD (OR=2.3, 95%CI:1.3 – 4.1). Ta zależność jest szczególnie silnie wyrażona u osób nie będących nosicielami allelu $\epsilon 4$ genu *APOE*, a nie ma znaczenia dla osób będących nosicielami tego allelu [Ott i wsp., 1998].

W metaanalizie opartej na 19 badaniach, które łącznie objęły 26 374 uczestników, których obserwowano przez 2 do 30 lat stwierdzono, że w porównaniu z osobami, które paliły w przeszłości, aktualni palacze wykazują znamienne większe ryzyko zachorowania na AD oraz większy postęp narastania zaburzeń funkcji poznawczych w skali roku [Anstey i wsp., 2007].

Zwiększone ryzyko zachorowania na AD u osób z obciążającym wywiadem w kierunku palenia papierosów potwierdzono również w kilku innych badaniach [Merchant i wsp., 1999;

Aggarwal i wsp., 2006; Peters i wsp. 2008; Wang i wsp.,1999; Hill i wsp.,2003; Tyas i wsp., 2003].

W prospektywnym badaniu prowadzonym przez Antilla i wsp. badano związek między spożywaniem alkoholu a ryzykiem otępienia. Spośród 1464 badanych w wieku 65 do 79 lat, po okresie obserwacji trwającym 23 lata, badaniu kontrolnemu poddano 1018 osób. Stwierdzono, że nadużywanie alkoholu w średnim wieku, jest czynnikiem, który dwukrotnie podnosi ryzyko zachorowania na otępienie i AD, szczególnie u nosicieli allelu $\epsilon 4$ genu *APOE* [Anttila i wsp., 2004]. W przeciwieństwie do nadużywania alkoholu, spożywanie niewielkich jego ilości wydaje się być czynnikiem chroniącym przed otępieniem. W jednym z badań przeprowadzonym na 402 osobach, które obserwowano przez 6 lat stwierdzono, że niewielkie lub umiarkowane spożywanie alkoholu było znamienne związane ze zmniejszeniem ryzyka zachorowania na otępienie (OR=0.5; 95%CI:0.3-0.7) [Huang i wsp., 2002].

Podobne wnioski wyciągnięto na podstawie wcześniej przytaczanego badania, *the Rotterdam Study*, w którym stwierdzono, że niewielkie i umiarkowane spożycie alkoholu (1-3 drinków na dzień) było związane ze znamienym zmniejszeniem ryzyka zachorowania na jakiegokolwiek otępienie (HR=0.58; 95%CI:0.38-0.90) [Ruitenberg i wsp., 2002].

Kolejnym naczyniowy czynnik ryzyka, który poddano analizie w kontekście ryzyka zachorowania na AD była otyłość. W badaniu Kivipelto i wsp., w którym uczestniczyło 1449 osób, w wieku 65 do 79 lat obserwowanych przez 21 lat stwierdzono, że otyłość (BMI $>30 \text{ kg/m}^2$) w średnim wieku jest związana z ponad dwukrotnym ryzykiem zachorowania na otępienie, w tym na AD (OR=2.4; 95%CI: 1.2-5.1). Jednocześnie wykazano, że występowanie innych naczyniowych czynników ryzyka, tzn. nadciśnienia tętniczego i hipercholesterolemii dodatkowo jeszcze potraja to ryzyko (OR=6,2) [Kivipelto i wsp.,2005].

Jednocześnie kilka badań prowadzonych wśród starszych osób przekonuje, że stopniowe zmniejszanie się wagi ciała często jest jednym z objawów towarzyszących początkowemu stadium otępienia. W badaniu prowadzonym przez Buchmana i wsp. przez 5.5 roku obserwowano 918 starszych osób. Po tym czasie u 151 osób rozpoznano AD. W modelu logistycznym biorącym pod uwagę również wiek, płeć i wykształcenie stwierdzono, że obniżenie BMI o 1 jednostkę w stosunku do wartości wyjściowej wiązało się z 5% zwiększeniem ryzyka zachorowania na AD. Ponadto, jednocześnie zmniejszenie BMI o jedną jednostkę w skali roku związane było z 35% zwiększeniem ryzyka zachorowania na AD w porównaniu z osobami, u których takiego spadku wartości BMI nie stwierdzano

[Buchman i wsp., 2005]. W innym badaniu, w którym przez 6 lat obserwowano 449 osób, w wieku 65 do 95 lat, stwierdzono, że u 125 osób, u których po tym czasie zdiagnozowano AD, w roku poprzedzającym postawienie rozpoznania, utrata masy ciała była dwa razy większa niż u osób bez rozpoznanego AD [Johnson i wsp., 2006].

Znaczenie wartości ciśnienia tętniczego dla ryzyka rozwoju otępienia było badane wielokrotnie w dużych kohortowych badaniach epidemiologicznych. Analizowano znaczenie podwyższonych wartości ciśnienia tętniczego, skurczowego i rozkurczowego, rejestrowanych u osób w średnim wieku i starszych oraz znaczenie stosowania leków przeciwnadciśnieniowych.

Do badania prowadzonego przez Launer i wsp. włączono 3703 Amerykanów japońskiego pochodzenia w wieku 45-68 lat, którzy brali udział w *the Honolulu Heart Program* w latach 1965 do 1971 i zostali ponownie zbadani w 1991r. pod kątem występowania otępienia.

Odnotowywano wartości ciśnienia tętniczego krwi skurczowego i rozkurczowego oraz przyjmowanie lub nie leków przeciwnadciśnieniowych. Stwierdzono, że osoby, które miały podwyższone wartości ciśnienia tętniczego krwi, zarówno skurczowego jak i rozkurczowego, i nigdy nie były leczone lekami przeciwnadciśnieniowymi miały znamienne wyższe ryzyko otępienia. Wzrost wartości ciśnienia tętniczego korelował ze wzrostem ryzyka otępienia. Dla wartości ciśnienia rozkurczowego od 90 do 94 mmHg ryzyko względne wynosiło 3,8 i dla wartości równej 95 mmHg ryzyko względne wynosiło 4,3 w porównaniu z osobami, u których wartość ciśnienia rozkurczowego mieściła się w granicach 80 do 89mmHg. Podobnie, dla ciśnienia skurczowego stwierdzono znamienne zwiększenie ryzyka zachorowania na otępienie u osób z wartościami ciśnienia równymi 160mmHg i wyżej (OR=4.8; 95%CI:2.0–11.0) w porównaniu z osobami z prawidłowymi wartościami ciśnienia skurczowego (110-139 mmHg). Nie stwierdzono związku wartości ciśnienia tętniczego krwi z ryzykiem otępienia u osób leczonych lekami przeciw nadciśnieniowymi [Launer i wsp., 2000].

Osoby do badania Kivipelto i wsp. rekrutowane były spośród mieszkańców Finlandii, którzy uczestniczyli w dużym badaniu oceniającym czynniki ryzyka chorób sercowo-naczyniowych (*The North Karelia Project*). U tych osób na przestrzeni 20 lat w 5-letnich odstępach oceniano wartości ciśnienia tętniczego krwi i poziomu cholesterolu we krwi. Spośród 2293 osób włączonych do badania, w 1998 roku ponownej ocenie poddano 1449 osób (w wieku 65 do 79 lat). Średni czas obserwacji wynosił 21 lat. Stwierdzono, że ciśnienie skurczowe powyżej

160 mmHg znamienne zwiększa ryzyko zachorowania na AD w starszym wieku (OR=2.3), podobnie jak poziom cholesterolu we krwi powyżej 6.5 mmol/l (OR=2.1). Wykazano również, że osoby obciążone jednocześnie oboma tymi czynnikami ryzyka w średnim wieku znacznie częściej chorują na AD w porównaniu z osobami z nadciśnieniem lub hipercholesterolemią występującymi niezależnie. W przeciwieństwie do badania Launer i wsp. [Launer i wsp., 2000] nie stwierdzono związku między ciśnieniem rozkurczowym a ryzykiem zachorowania na AD [Kivipelto i wsp., 2001].

W jednym z dużych populacyjnych badań prowadzono kilkakrotnie pomiar ciśnienia tętniczego krwi u 634 osób powyżej 65 roku życia. Po 13 latach trwania badania rozpoznanie AD postawiono u 99 osób. Nie stwierdzono związku między ryzykiem zachorowania na AD a wysokimi wartościami skurczowego ciśnienia tętniczego mierzonego na początku obserwacji (OR=1.03 na 10mm Hg; 95%CI:0.80-1.32), wykazano, że wysokie wartości ciśnienia tętniczego stwierdzone 4 lata przed postawieniem diagnozy zmniejszają ryzyko zachorowania na AD (OR=0.82 na 10 mm Hg; 95%CI:0.72-0.95), a wartości ciśnienia tętniczego krwi mierzone 2 lata przed rozpoznaniem nie mają wpływu na ryzyko wystąpienia choroby [Morris i wsp., 2001].

W innym badaniu stwierdzono, że niskie wartości ciśnienia tętniczego krwi u osób w wieku 75 do 101 lat zwiększają ryzyko zaburzeń funkcji poznawczych. W badaniu tym objęto obserwacją 1736 osób przez okres średnio 40,5 miesiąca. Stwierdzono, że osoby nie leczone lekami przeciwnadciśnieniowymi, które mają wartości ciśnienia skurczowego poniżej 130 mmHg charakteryzuje znacznie wyższe ryzyko wystąpienia zaburzeń funkcji poznawczych (MMSE<24) w porównaniu z osobami, u których wartość ciśnienia skurczowego wynosiła 130-159 mmHg [Guo i wsp., 1997].

Przytoczone powyżej dane wskazują, że wysokie wartości ciśnienia tętniczego, przede wszystkim skurczowego, stwierdzane w średnim wieku zwiększają ryzyko otępienia w wieloletniej perspektywie, z kolei u osób w starszym wieku taki efekt dają zbyt niskie wartości skurczowego ciśnienia tętniczego krwi.

Badania analizujące związek między stosowaniem leków przeciwnadciśnieniowych a ryzykiem zachorowania na AD również dostarczają sprzecznych informacji.

Do jednego z badań włączono 1092 osoby w wieku powyżej 60 lat i poddano 19-letniej obserwacji pod kątem stosowania blokerów kanałów wapniowych i ich korelacji z ryzykiem

zachorowania na AD. Wbrew przyjętemu założeniu o ochronnym (neuroprotektoryjnym) działaniu leków z tej grupy na rozwój otępienia, w powyższym badaniu nie stwierdzono, aby u osób stosujących te leki ryzyko zachorowania na AD było mniejsze [Yasar i wsp., 2005].

Natomiast w badaniu *the Cache County Study* oceniano wpływ stosowania jakichkolwiek leków przeciwnadciśnieniowych (inhibitory konwertazy angiotensyny, beta-blokery, blokery kanałów wapniowych lub diuretyki) na ryzyko AD. W badaniu uczestniczyło 3308 osób w wieku powyżej 65 lat, spośród których po 3 latach obserwacji AD rozpoznano u 104 badanych. Wykazano, że stosowanie jakichkolwiek leków przeciwnadciśnieniowych w chwili włączenia do badania zmniejsza istotnie ryzyko zachorowania na AD (HR=0.64; 95%CI:0.41-0.98). Wykazano, że szczególnie korzystne działanie mają diuretyki oszczędzające potas (HR=0.26; 95%CI:0.08-0.64) [Khachaturian i wsp., 2006].

Wielokrotnie udokumentowano, że istotne ochronne działanie na rozwój AD ma czas leczenia lekami przeciwnadciśnieniowymi; im dłuższy czas leczenia, tym mniejsze ryzyko zachorowania. W jednym z badań, które to udokumentowały uczestniczyło około 1300 osób ze stwierdzonym nadciśnieniem tętniczym krwi, w wieku średnio 76,7 lat, u których w chwili włączenia do badania nie stwierdzano otępienia. Wykazano, że każdy rok stosowania leków przeciwnadciśnieniowych istotnie zmniejszał ryzyko zachorowania (HR=0.94; 95%CI:0.89-0.99). Ryzyko otępienia u osób leczonych powyżej 12 lat było znamienne niższe w porównaniu z nigdy nie leczonymi (HR=0.40; 95%CI:0.22-0.75). Podobną zależność zaobserwowano dla ryzyka AD (HR=0.35; 95%CI:0.16-0.78) [Peila i wsp., 2006].

W badaniu prowadzonym przez Haag i wsp. wykazano, że leczenie to jest najskuteczniejsze w grupie „młodszych” starszych osób (w wieku poniżej 75 lat). Do badania tego włączono 6249 osób w wieku średnio 68 lat i stwierdzono, że stosowanie leków przeciwnadciśnieniowych wiąże się ze znamennym zmniejszeniem ryzyka zachorowania na otępienie (HR na rok stosowania leków=0.95; 95%CI:0.91-0.99). Ponadto wykazano, że rocznie ryzyko to zmniejsza się o 8% u osób poniżej 75 roku życia, a u pozostałych badanych (≥ 75 roku życia) tylko o 4% [Haag i wsp., 2009].

Uważa się, że ochronne działanie leków obniżających ciśnienie tętnicze krwi polega na hamowaniu rozwoju miażdżycy, zmniejszeniu liczby zmian naczyniopochodnych w mózgu i poprawie przepływu mózgowego [Qiu i wsp., 2005]. W najnowszych publikacjach donoszono również o występowaniu mniej nasilonych zmian neuropatologicznych, typowych dla AD, w mózgu osób leczonych lekami przeciwnadciśnieniowymi w porównaniu z grupą osób, u których takiego leczenia nie stosowano [Hoffman i wsp., 2009].

Hipercholesterolemia jest stwierdzonym czynnikiem ryzyka otępienia, jeżeli występuje w średnim wieku, natomiast znaczenie poziomu cholesterolu we krwi w starszym wieku w kontekście występowania otępienia nie jest jednoznaczne. W badaniu Solomona i wsp. w 21-letniej obserwacji udział brało 1449 osób w wieku 65 do 79 lat. Stwierdzono, że związek między poziomem cholesterolu całkowitego we krwi i ryzykiem zachorowania na otępienie jest dwójaki. Z jednej strony podniesiony poziom cholesterolu we krwi stwierdzany w średnim wieku (średnio 50,4 lat) zwiększa ryzyko zachorowania na otępienie i AD, z drugiej zaś strony samoistne obniżanie się poziomu cholesterolu całkowitego we krwi u starszych osób (średnio 71,3 lat) może informować o rozwijającej się chorobie, może być wręcz markerem dla AD i otępienia [Solomon i wsp., 2007].

Również dane dotyczące stosowania leków hipolipemizujących (w tym statyn) i ich związku z występowaniem AD dostarczają sprzecznych informacji. Niektóre z prac donoszą, że u osób stosujących statyny ryzyko zachorowania na AD jest znamienne mniejsze w porównaniu z osobami bez takiego leczenia. Na przykład w badaniu Rockwooda i wsp., do którego włączono 2305 osób powyżej 65 roku życia, otępienie rozpoznano u 492 osób (w tym AD u 326 osób), stwierdzono taki korzystny wpływ statyn. Stosowanie statyn i innych leków hipolipemizujących znamienne redukowało ryzyko zachorowania na AD u osób poniżej 80 roku życia ($OR=0.26$; $95\%CI:0.08-0.88$). Równie korzystnego efektu nie stwierdzono u osób starszych niż 80 lat [Rockwood i wsp., 2002]. Także w pracy Jicka i wsp. stwierdzono, że stosowanie statyn u osób w wieku co najmniej 50 lat zmniejsza ryzyko zachorowania na otępienie ($RR=0.29$; $95\%CI:0.13-0.63$) [Jick i wsp., 2000].

Wyniki innych badań, przeciwnie, informują, że stosowanie statyn nie ma działania ochronnego lub ma tylko minimalny wpływ na rozwój AD. W badaniu *The Cardiovascular Health Study* brało udział 2798 osób powyżej 65 roku życia. Stwierdzono, że w porównaniu z osobami nigdy nie leczonymi statynami osoby z takim leczeniem nie były mniej narażone na zachorowanie na jakiegokolwiek otępienie ($HR=1.08$; $95\%CI:0.77-1.52$) lub AD ($HR=1.21$; $95\%CI:0.76-1.91$) czy też mieszaną postać otępienia, tzn. otępienie naczyniopochodne i AD ($HR=0.87$; $95\%CI:0.44-1.72$) ani też na „czyste” otępienie naczyniopochodne ($HR=1.36$; $95\%CI:0.61-3.06$) [Rea i wsp., 2005].

W innym prospektywnym badaniu brało udział 5092 osoby powyżej 65 roku życia, u których dwukrotnie (w latach 1995-1997 i 1998-2000) oceniano związek występowania otępienia ze stosowaniem statyn i innych leków hipolipemizujących. Podczas wstępnego badania otępienie rozpoznano u 355 osób, w tym AD u 200 osób. Wykazano, że stosowanie statyn było

odwrotnie skorelowane z ryzykiem zachorowania na AD (OR=0.44; 95%CI:0.17-0.94). Po 3 latach obserwacji otępienie rozpoznano u 185 kolejnych osób, w tym AD u 104 osób. Również w tej grupie badanych stosowanie statyn zarówno w chwili włączenia do badania, jak i w kontrolnym badaniu nie chroniło przed zachorowaniem na otępienie i AD [Zandi i wsp., 2005]. Eksperymentalne prace dowodzą, że ochronny wpływ statyn na otępienie może wynikać z ich działania zmniejszającego produkcję β -amyloidu *in vitro* i *in vivo* [Fonseca i wsp., 2009] oraz ochronnego działania na śródbłonek poprzez działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne i przeciwplatetkowe [Dobarro i wsp., 2009].

Cukrzyca jako czynnik ryzyka nie tylko otępienia naczyniopochodnego, ale też otępienia o podłożu zwyrodnieniowym była raportowana w kilku badaniach.

Na przykład, w badaniu Arvanitakisa i wsp. brało udział 824 osoby w wieku powyżej 55 lat. Cukrzyce stwierdzono u 127 osób. Po 5 latach obserwacji AD rozpoznano u 151 osób. Stwierdzono, że osoby z cukrzycą miały o 65% większe ryzyko zachorowania na AD niż osoby bez cukrzycy (HR=1.65; 95%CI:1.10-2.47) [Arvanitakis i wsp., 2004].

W badaniu *the Framingham Study* brało udział 2210 osób, średnio w wieku 70 lat. Oceniano ryzyko zachorowania na AD związane z występowaniem cukrzycy podczas rekrutacji do badania w obrębie całej badanej grupy oraz w obrębie podgrup określonych poprzez genotyp *APOE* i poziom homocysteiny w surowicy. W chwili włączenia do badania cukrzycę rozpoznano u 202 osób. Po okresie obserwacji, trwającej 12.7 lat, AD rozpoznano u 17 osób z cukrzycą (8.4%) oraz u 220 bez cukrzycy (11.0%) (RR=1.15; 95%CI:0.65-2.05). Ryzyko względne rozwoju AD u chorych z cukrzycą w porównaniu z osobami bez cukrzycy było większe u osób bez allelu $\epsilon 4$ genu *APOE* i podniesionego poziomu homocysteiny w surowicy (RR=2.98; 95%CI:1.06-8.39). Na podstawie tych danych stwierdzono, że cukrzyca nie podnosi ryzyka zachorowania na AD w całej badanej grupie, ale może zwiększać to ryzyko przy braku innych obciążających czynników (allel $\epsilon 4$ genu *APOE*, hiperhomocysteinemia) [Akomolafe i wsp., 2006].

W badaniu *The Cardiovascular Health Study Cognition Study* oceniano wpływ współwystępowania cukrzycy typu II i allelu $\epsilon 4$ genu *APOE* na ryzyko AD, ryzyko mieszanej postaci otępienia oraz otępienia naczyniopochodnego. W badaniu brało udział 2547 osób, w wieku 74.7 lat. Badani byli obserwowani średnio przez 5.4 lat, po tym czasie otępienie stwierdzono u 411 osób, w tym AD u 207 osób, u 132 otępienie mieszane i u 58 otępienie naczyniopochodne. Stwierdzono, że w porównaniu z osobami bez cukrzycy typu II i allelu

ε4 genu *APOE*, osoby obciążone tymi oboma czynnikami ryzyka mają znamienne większe ryzyko zachorowania na AD (HR=4.58; 95%CI:2.18-9.65) i otępienie mieszane (HR=3.89; 95%CI:1.46-10.40) [Irie i wsp., 2008].

W badaniu Xu i wsp. potwierdzono, że zaburzenia metabolizmu glukozy już na wcześniejszym etapie (stan przedcukrzycowy) są czynnikiem zwiększającym ryzyko zachorowania na AD. Do badania włączono 1173 osoby bez otępienia i cukrzycy w wieku powyżej 75 lat. U osób tych w chwili włączenia do badania oceniano poziom glikemii na czczo pod kątem występowania stanu przedcukrzycowego (glikemia równa 7.8-11.0 mmol/l). Podczas 9-letniej obserwacji uczestnicy byli trzykrotnie poddani badaniu funkcji poznawczych. Stan przedcukrzycowy stwierdzono u 47 osób, otępienie rozpoznano u 397 osób, w tym AD u 307 osób. Osoby z rozpoznanym stanem przedcukrzycowym znamienne częściej chorowały na otępienie (HR=1.67; 95%CI:1.04–2.67) i AD (HR=1.77; 95%CI:1.06–2.97). Zwiększone ryzyko zachorowania na AD u osób ze stanem przedcukrzycowym stwierdzono tylko u badanych bez allelu ε4 genu *APOE*. Jednocześnie wykazano, że stan przedcukrzycowy jako ryzyko AD jest szczególnie silnie wyrażony u osób ze współwystępującym nadciśnieniem skurczowym krwi [Xu i wsp., 2007].

Również zespół metaboliczny, na który składają się otyłość brzuszna, hipertriglicerydemia, obniżony poziom HDL (ang. *High Density Lipoproteins*), nadciśnienie tętnicze, nieprawidłowa glikemia na czczo jest związany z większym ryzykiem zachorowania na AD. W badaniu Vanhanena i wsp. brało udział 959 osób bez otępienia, w wieku 69 do 78 lat. Dane dotyczące sercowo-naczyniowych czynników ryzyka rejestrowane były w chwili włączenia do badania i po 3.5 letniej obserwacji, kiedy to przeprowadzono również badanie mające na celu ocenę występowania zaburzeń funkcji poznawczych. Zespół metaboliczny stwierdzono u 418 osób (43.6%), AD u 45 osób (4.7%). AD było częściej rozpoznawane u chorych z zespołem metabolicznym w porównaniu z osobami bez tych zaburzeń (7.2 vs 2.8%; $p<0.001$) [Vanhanen i wsp., 2006].

W innej pracy donoszono, że nie sam zespół metaboliczny jest czynnikiem sprzyjającym rozwojowi AD, a jedynie cukrzyca i hiperinsulinemia. W badaniu tym brało udział 1833 osoby bez rozpoznanego otępienia, w wieku powyżej 65 lat. Po okresie obserwacji równym 4.4 lat otępienie rozpoznano u 236 osób. Nie stwierdzono, aby zespół metaboliczny zwiększał ryzyko zachorowania na otępienie, natomiast wykazano, że niezależnie od innych komponentów zespołu metabolicznego, cukrzyca i hiperinsulinemia zwiększają ryzyko

zachorowania na AD (odpowiednio: HR=1.4; 95%CI:1.0–2.1 i HR=1.4; 95%CI:0.9–2.7) [Muller i wsp., 2007].

Wielokrotnie dokumentowano, że choroby naczyń serca, mózgu i naczyń obwodowych podnoszą ryzyko zachorowania na AD.

W badaniu Vermeera i wsp. badano związek między „niemymi” zawałami mózgu stwierdzanymi w MRI mózgu a ryzykiem zachorowania na otępienie. Spośród 1015 osób w wieku 60 do 90 lat, które następnie były monitorowane przez średnio 3.6 lat pod kątem występowania zaburzeń funkcji poznawczych, otępienie stwierdzono u 30 osób, w tym AD u 26. „Nieme” zawały mózgu stwierdzone w MRI przy włączeniu do badania ponad dwukrotnie zwiększały ryzyko zachorowania na otępienie po okresie obserwacji (HR= 2.26; 95%CI:1.09- 4.70). W badanej grupie większość chorych na otępienie miała rozpoznane AD [Vermeer i wsp., 2003].

Honig i wsp. badali związek między przebyłym udarem mózgu i innymi naczyniowymi czynnikami ryzyka a ryzykiem zachorowania na otępienie. Do badania włączono 1766 osób bez otępienia w wieku powyżej 65 lat. Po 7-letniej obserwacji otępienie stwierdzono u 212 osób, w tym AD u 181. Wykazano, że zapadalność na AD u osób z przebyłym udarem mózgu wynosiła 5.2% na osoborok w porównaniu z osobami bez udaru: 4% na osoborok. Ryzyko względne wystąpienia AD w grupie osób z udarem mózgu w wywiadzie było zwiększone 1.6 razy. Ryzyko zachorowania na AD u osób po udarze mózgu znamienne wzrastało, gdy współwystępowały inne naczyniowe czynniki ryzyka, w tym: nadciśnienie tętnicze (RR= 2.3; 95%CI:1.4-3.6), cukrzyca (RR=4.6; 95%CI:2.2-9.5) czy choroby serca (RR=2.0; 95%CI:1.2-3.2) [Honig i wsp., 2003].

Choroby serca (migotanie przedsionków, przebyty zawał serca) oraz występowanie miażdżycy naczyń obwodowych mają związek przede wszystkim z otępieniem naczyniopochodnym i typu mieszanego, jednak potwierdzono również związek tych czynników ryzyka z AD. W badaniu prowadzonym przez Qui i wsp. brało udział 1301 osób powyżej 75 roku życia, osoby te były badane trzykrotnie podczas 9-letniej obserwacji. U 440 osób stwierdzono otępienie, w tym AD u 333, w chwili włączenia do badania niewydolność serca stwierdzono u 205 osób. Wykazano, że niewydolność serca zwiększa ryzyko zachorowania na otępienie (HR=1.84; 95%CI:1.35-2.51) i AD (HR=1.80; 95%CI:1.25-2.61). W badaniu tym jednocześnie stwierdzono, że ryzyko zachorowania na AD związane z występowaniem niewydolności serca redukowane jest przez stosowanie leków

przeciwnadciśnieniowych (głównie diuretyków) (HR=1.38; 95%CI:0.99-1.94) [Qiu i wsp., 2006].

W innym badaniu, do którego włączono 6647 osób powyżej 55 roku życia oceniano występowanie miażdżycy jako czynnika ryzyka zachorowania na otępienie i jego podtypy, w tym AD. Po średnio 9 latach obserwacji otępienie stwierdzono u 678 osób, w tym AD u 476. Okazało się, że w krótkotrwałej obserwacji miażdżycy (szczególnie dotycząca tętnic domózgowych oceniana za pomocą wskaźnika intima-media) znamienne zwiększa ryzyko zachorowania na otępienie. Osoby, u których stwierdzono grubość kompleksu intima-media w piątym quintyli miały o 50% większe ryzyko zachorowania na AD w porównaniu z osobami z tym wskaźnikiem w 1 quintyli (wynik referencyjny). Wykazano osłabienie tej korelacji w dłuższej obserwacji, najprawdopodobniej na skutek większej śmiertelności u osób z miażdżycą [van Oijen i wsp., 2007].

Udokumentowanie związku stresu oksydacyjnego z patogenezą AD było podstawą badań oceniających ochronne znaczenie antyoksydantów (m.in. witaminy E i C) dla ryzyka rozwoju tej choroby. Taki korzystny wpływ potwierdzono w badaniu *The Cache County Study*, w którym brało udział 3227 osób, w wieku powyżej 65 lat, w grupie, których AD rozpoznano u 104 osób. Stwierdzono, że osoby, które stosowały witaminę E i C jednocześnie, były w mniejszym stopniu narażone na AD (OR=0.22; 95%CI:0.05-0.60). Natomiast nie stwierdzono analogicznej korelacji w wypadku stosowania tych witamin oddzielnie [Zandi i wsp., 2004].

Negatywne wyniki badań analizujących taką zależność również były raportowane [Gray i wsp., 2008]. Donoszono także o pozytywnym działaniu diety śródziemnomorskiej [Scarmeas i wsp., 2006], kwasu foliowego i witaminy B12 (działających poprzez obniżenie poziomu homocysteiny w surowicy) [Malouf i wsp., 2003], wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i diety bogatej w ryby [Huang i wsp., 2005].

Podniesiony poziom wysoce czułego białka C-reaktywnego (ang. *high sensitivity C-reactive protein*, hsCRP) stwierdzany w średnim wieku uważany jest za czynnik predysponujący do rozwoju otępienia i za czynnik, którego wzrost w surowicy znacznie wyprzedza manifestację kliniczną choroby. Takie dane pochodzą z badania *the Honolulu-Asia Aging Study*, w którym brało udział 1050 osób urodzonych pomiędzy 1900 a 1919 rokiem. Osoby te były badane podczas wstępnej rekrutacji w latach 1965-1968, a następnie podczas badania kontrolnego w latach 1968-1970 miały pobieraną krew celem oznaczenia poziomu hsCRP. W latach

1991-1993 i 1994-1996 były badane pod kątem występowania zaburzeń funkcji poznawczych. Poziom stwierdzanego hsCRP skwantyfikowano w czterech kwartylach: 1. kwartył ($<0.34\text{mg/L}$), 2. kwartył ($0.34\text{--}0.56\text{mg/L}$), 3. kwartył ($0.57\text{--}1.00\text{mg/L}$), 4. kwartył ($>1.00\text{mg/L}$). Stwierdzono, że w porównaniu z osobami, u których wartość hsCRP mieściła się w 1.kwartylu, ryzyko zachorowania na AD i na otępienie naczyniopochodne jest trzy razy większe u osób z poziomem hsCRP w trzecim kwartylu (dla otępienia $\text{OR}= 3.8$; $95\%\text{CI}:2.2\text{--}6.6$, dla AD $\text{OR}= 3.9$; $95\%\text{CI}:1.9\text{--}8.0$, dla otępienia naczyniopochodnego $\text{OR}=5.7$; $95\%\text{CI}:1.1\text{--}12.0$) [Schmidt i wsp., 2002].

Również wiele innych badań prowadzonych wśród starszych pacjentów wskazuje na związek między podniesionym poziomem wskaźników zapalnych a większym ryzykiem zachorowania na AD. W jednym z badań uczestniczyło 691 osób, w średnim wieku 79 lat, które badano pod kątem występowania zaburzeń funkcji poznawczych oraz oznaczano wskaźniki zapalne (CRP, IL-6, IL-1, IL-1RA, TNF- α). Stwierdzono, że u osób z podniesionym poziomem IL-1 i TNF- α ryzyko zachorowania na AD było wyraźnie większe (dla IL-1 $\text{HR}=2.84$; $95\%\text{CI}:1.09\text{--}7.43$; $p < 0.03$; dla TNF- α $\text{HR}=2.59$; $95\%\text{CI}:1.09\text{--}6.12$; $p < 0.031$) [Tan i wsp., 2007].

Mimo udowodnionego wpływu czynników zapalnych na rozwój AD, badania dotyczące ochronnego działania niesterydowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) dostarczają sprzecznych informacji. W metaanalizie opublikowanej w 2004 roku wzięto pod uwagę wyniki 11 badań spośród 38 (opublikowanych od 1960 r.), które dotyczyły związku AD ze stosowaniem NLPZ. Stwierdzono, że ryzyko względne zachorowania na AD u osób stosujących NLPZ wynosiło 0.51 ($95\%\text{CI}:0.40\text{--}0.66$), co dowodzi, że NLPZ zmniejszają ryzyko zachorowania na AD [Szekely i wsp., 2004].

Jednak w dużym wieloośrodkowym randomizowanym i kontrolowanym placebo badaniu *Alzheimer's Disease Anti-Inflammatory Prevention Trial (ADAPT)* nie potwierdzono protekcyjnego działania niesterydowych leków przeciwzapalnych wobec rozwoju AD, co więcej, obserwowano zwiększone ryzyko zachorowania na AD związane ze stosowaniem takiej terapii. W badaniu tym spośród zarekrutowanych 2528 osób powyżej 70 roku życia, 2117 poddano ocenie funkcji poznawczych. Badani zostali zrandomizowani do grupy stosującej celecoxib (200mg dwa razy dziennie), naproxen (220 mg dwa razy dziennie) lub placebo. Stwierdzono obniżenie punktacji w testach globalnie oceniających funkcje poznawcze u osób stosujących naproxen w porównaniu z placebo oraz niższą punktację

w MMSE zarówno dla grupy stosującej celecoxyb jak i naproxen w porównaniu z placebo [Martin i wsp., 2008].

Zauważono również wpływ warunków życia na ryzyko rozwoju AD, w tym za szczególnie obciążające uważa się zawodowe narażenie na substancje toksyczne, takie jak metale ciężkie (aluminium). W jednym z badań przez 15 lat obserwowano 1925 osób powyżej 65 roku życia. Oceniano narażenie na aluminium monitorowane w miejscu zamieszkania oraz indywidualne narażenie (mierzone poprzez codzienne spożycie aluminium w wypijanej wodzie). Stwierdzono znamienne pogorszenie funkcji poznawczych u osób spożywających większe ilości aluminium w wypijanej wodzie (≥ 0.1 mg/dzień) [Rondeau i wsp., 2009].

Istnieją również kontrowersyjne doniesienia na temat wpływu, jaki może wywierać przebyty uraz głowy na zwiększone ryzyko zachorowania na AD. W 2003r. opublikowano wynik metaanalizy 15 badań oceniających wpływ urazu głowy jako czynnika ryzyka zachorowania na AD. Stwierdzono, że przebyty uraz głowy zwiększa ryzyko zachorowania na AD tylko u mężczyzn (OR=2.29; 95%CI:1.47-2.06) [Fleminger i wsp., 2003]. Doniesienia te jednak nie mają potwierdzenia w innych długofalowych badaniach. W prospektywnym badaniu *the Rotterdam Study* brało udział 6645 osób w wieku powyżej 55 lat, bez stwierdzanego otępienia w chwili włączenia do badania. Dane na temat przebytego urazu głowy (uraz z utratą świadomości, czas trwania utraty przytomności, jak długi czas upłynął od urazu głowy, ilość urazów głowy) czerpano z ankiet przeprowadzonych w chwili włączenia do badania. Po czasie obserwacji trwającym ponad 2 lata u 129 osób stwierdzono otępienie, w tym AD u 91 osób. Nie stwierdzono, aby przebyty uraz głowy zwiększał ryzyko otępienia (RR=1.0; 95%CI:0.5-2.0) lub AD (RR=0.8; 95%CI:0.4-1.9). Również obecność allelu $\epsilon 4$ genu *APOE* nie wpływała na wynik przeprowadzonej analizy [Mehta i wsp., 1999].

Większość badań wskazuje, że stosowanie hormonalnej terapii zastępczej (HTZ) podczas menopauzy wiąże się z mniejszym ryzykiem zachorowania na AD. Kawas i wsp. po 16-letniej obserwacji 500 kobiet stwierdzili, że stosowanie HTZ skutkuje 54% redukcją ryzyka zachorowania na AD [Kawas i wsp., 1997]. W innym badaniu, gdzie podczas 6 lat obserwowano grupę prawie 1900 kobiet, potwierdzono ochronny wpływ uprzednio stosowanej HTZ, ale nie wtedy, gdy czas leczenia był dłuższy niż 10 lat [Zandi i wsp., 2002]. Mechanizm działania HTZ nie jest do końca jasny. Możliwe, że ma on związek z „ochronnym” wpływem edukacji (HTZ stosują kobiety o wyższym poziomie wykształcenia). Nie można też wykluczyć wpływu estrogenów na metabolizm A β

(amyloid- β) oraz ich działania stymulującego układ cholinergiczny, poprawiającego mikrokrążenie i metabolizm glukozy.

I.1.3.2. Genetyczne uwarunkowania choroby Alzheimera

Choroba Alzheimera również pod względem uwarunkowań genetycznych jest heterogenną i złożoną jednostką chorobową, a typ dziedziczenia zależy od postaci choroby (Tabela 1). Biorąc pod uwagę wiek zachorowania wyróżnia się postać wczesną (wiek zachorowania ≤ 60 . roku życia, ang. *early onset AD*, EOAD) i postać późną (wiek zachorowania > 60 . roku życia, ang. *late onset AD*, LOAD) [Tanzi i wsp., 1999].

Inny podział wyróżnia postać rodzinną (z co najmniej dwiema osobami chorymi w rodzinie, ang. *familial AD*, FAD) i postać sporadyczną (bez uwarunkowań rodzinnych, ang. *sporadic AD*, SAD) [Kowalska i wsp., 2004]. Chcąc usystematyzować wiedzę na temat dziedziczenia AD badacze stworzyli dychotomiczny model, który zakłada inny sposób dziedziczenia u chorych z EOAD zwykle występującej rodzinnie i inny u chorych LOAD, najczęściej występującej sporadycznie [Bertram i wsp., 2009].

Model ten opiera się o zasadę, że odmiany choroby cechujące się wcześniejszym zachorowaniem i rzadszym występowaniem są spowodowane przez rzadkie mutacje, zwykle ze 100% penetracją, natomiast odmiany choroby o późniejszym początku, częściej występujące, których zapadalność wzrasta z wiekiem, są uwarunkowane wieloczynnikowo, zarówno poprzez czynniki (warianty) genetyczne jak i czynniki środowiskowe [Tanzi i wsp., 1999]. Jest to model przydatny do zdefiniowania sposobu dziedziczenia nie tylko AD, ale też innych częstych w populacji chorób związanych z wiekiem, jak choroby sercowo-naczyniowe, nowotwory czy cukrzyca.

Na podstawie dotychczasowych badań wykazano, że chorzy na AD z postacią choroby rodzinną o wczesnym początku, dziedziczącą się autosomalnie dominująco stanowią około 5 do 10% wszystkich chorych na AD. Natomiast około 90 do 95 % chorych na AD to chorzy z postacią o późnym początku, najczęściej występującą sporadycznie podlegającą dziedziczeniu wieloczynnikowemu [Kowalska, 2009].

Tabela 1. Defekty genetyczne determinujące chorobę Alzheimera: postać rodzinną (FAD) o wczesnym początku (EOAD) i późnym początku (LOAD) oraz postać sporadyczną (SAD).
Na podstawie: Kowalska A. [Genetics of dementias, Part 4: a spectrum of mutations responsible for the familial autosomal dominant form of Alzheimer's disease] Postępy Hig Med Dosw (Online).2009;63:583-91. Modyfikacja własna.

AD			
FAD/EOAD			FAD/LOAD oraz SAD
Dziedziczenie autosomalnie dominujące			Dziedziczenie wieloczynnikowe
5-10% wszystkich chorych			90-95% wszystkich chorych
PSEN1	APP	PSEN2	APOE
14q24.3	21q21.2	1q31-42	19q13.2
mutacje	mutacje	mutacje	polimorfizm DNA
18-50%	<5%	<5%	~ 50%
Liczba wykrytych mutacji			
166	29	13	
Wiek na początku choroby (r.ż.)			
28-62	45-66	40-85	

I.1.3.2.1. Genetyczne uwarunkowania choroby Alzheimera o wczesnym początku

Wykryto dotychczas 3 geny, których mutacje odpowiedzialne są za postać rodzinną AD dziedziczną autosomalnie dominująco: gen białka prekursora amyloidu (ang. *amyloid precursor protein*, *APP*), gen preseniliny 1 (ang. *Presenilin-1*, *PSEN1*) oraz gen preseniliny 2 (ang. *Presenilin-2*, *PSEN2*). Mutacje w tych genach są odpowiedzialne za około 50% wszystkich przypadków rodzinnych AD o wczesnym początku i autosomalnie dominującym typie dziedziczenia [Kowalska i wsp., 2009]. Wszystkie te mutacje cechuje pełna (100%) penetracja. Oznacza to, że ryzyko wystąpienia AD u nosiciela danej mutacji jest 100%, a prawdopodobieństwo wystąpienia choroby u potomstwa lub rodzeństwa chorego wynosi 50% [Ciarleglio i wsp., 2003].

W około 5% przypadków FAD o wczesnym początku mutacje odpowiedzialne za rozwój choroby dotyczą genu *APP* [Van Broeckhoven, 1995]. Gen ten zlokalizowany jest na chromosomie 21 (21q21.1) [Goate i wsp., 1991].

Według Campiona i wsp. od 30 do 50% chorych z FAD jest nosicielami mutacji w genie *PSEN1* [Campion i wsp., 1995] zlokalizowanym na chromosomie 14 (14q24.3) [Sherrington i wsp., 1995]. Niewielki odsetek chorych na FAD o wczesnym początku jest nosicielem mutacji w genie *PSEN2* (od 1 do około 5% według różnych badaczy) [Cruts i wsp., 1998; Kowalska, 2009]. Gen ten jest zlokalizowany na chromosomie 1 (1q42.1) [Levy-Lahad i wsp., 1995].

APP jest glikoproteiną błonową typu I. Jest syntetyzowana we wszystkich tkankach (gen *APP* należy do tzw. podstawowego metabolizmu komórkowego: *house keeping gene*) [Kowalska, 2003].

Preseniliny są białkami transbłonowymi zbudowanymi z 7 do 9 odcinków przenikających błonę komórki nerwowej, gdzie pełnią rolę receptorów błonowych lub kanałów wapniowych. Najsilniejszą ekspresję presenilin stwierdzono w komórkach hipokampa i komórkach Purkiniego [Fraser i wsp., 2000].

Fizjologiczna rola APP, PSEN1 oraz PSEN2 w organizmie nie jest do końca poznana, ale wiadomo, że wystąpienie mutacji w obrębie ich genów prowadzi do zaburzeń endoproteolizy APP i nadprodukcji beta-amyloidu ($A\beta$) o długości 42 aminokwasów ($A\beta_{42}$), który wykazuje większe właściwości amyloidogenne niż krótsze peptydy ($A\beta_{41}$). Uruchamia to proces

oligomeryzacji i agregacji A β w postaci płytek starczych w korze mózgowej, co stanowi podstawę etiopatogenezy AD (hipoteza kaskady amoloidowej) [Hardy, 1997].

Mutacje stwierdzone w powyższych genach mają wpływ na przebieg kliniczny choroby, m.in. na wiek zachorowania oraz czas przeżycia. Stwierdzono, że u nosicieli mutacji w genie *APP* początek choroby przypada na wiek 40 do 65 lat, *PSEN1* 35 do 55, a *PSEN2* 40 do 70 lat. Najdłuższy czas przeżycia (około 9 do 10 lat) dotyczy chorych z mutacją w genie *APP*, najkrótszy nosicieli mutacji w genie *PSEN1* (5.8 do 6.8 lat) oraz średnio długi - nosicieli mutacji w genie *PSEN2* (4.4 do 10.8 lat) [Holmes, 2002]. Według innych badaczy wiek zachorowania przyjmuje nieco inne wartości (*vide* powyższa tabela), co jednak nie zmienia ogólnej tendencji pokazującej, że mutacje w genie *PSEN1* wiążą się z najwcześniejszym wiekiem zachorowania, w genie *APP* z pośrednim, a w genie *PSEN2* z najpóźniejszym. Wydaje się, że wiek zachorowania u nosicieli niektórych mutacji genu *APP* może być modyfikowany przez polimorfizm *APOE*. W rodzinie, w której stwierdzono występowanie mutacji w genie *APP*, u osób będących jednocześnie homozygotami $\epsilon 4/\epsilon 4$ genu *APOE* obserwowano wcześniejszy o kilka lat początek choroby w porównaniu z osobami o innym genotypie *APOE* [Cruts i wsp., 1998].

W 2003 roku opublikowano wyniki badania, w którym oceniano dystrybucję mutacji w genach *APP*, *PSEN1* i *PSEN2* w populacji polskiej. Przebadano 40 chorych z rozpoznaniem FAD (przynajmniej u jednego krewnego pierwszego stopnia rozpoznano AD o wczesnym początku) i u których średni wiek zachorowania wynosił 52.8 ± 8.2 lat. Występowanie mutacji w badanych genach wykryto tylko u 17% chorych. Stwierdzono siedem mutacji w badanych genach: cztery mutacje sprawcze 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].

I.1.3.2.2. Genetyczne uwarunkowania choroby Alzheimera o późnym początku

95% chorych na AD to przypadki tzw. postaci sporadycznej choroby o późnym początku [Holmes, 2002]. Od wielu lat prowadzone są intensywne poszukiwania związku różnych wariantów genetycznych genów białek zaangażowanych w patomechanizm choroby, które przez modyfikacje ich stężenia czy też aktywności mogą mieć wpływ na ryzyko zachorowania.

Mimo wieloletnich badań w tym zakresie jedynym jak dotąd pewnym genetycznym czynnikiem ryzyka AD jest nosicielstwo przynajmniej jednego allelu $\epsilon 4$ genu *APOE* [Saunders i wsp., 1993]. Gen *APOE* jest zlokalizowany na chromosomie 19 (19q13.31) [Seripa i wsp., 2009].

Polimorfizm *APOE* daje 6 różnych wariantów tego genu: 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 populacji ogólnej częstość występowania poszczególnych alleli jest różna i wynosi dla *APOE* $\epsilon 3$ około 75%, dla *APOE* $\epsilon 4$ 15% i dla *APOE* $\epsilon 2$ około 8% [Utermann i wsp., 1980].

Nosicielstwo allelu $\epsilon 4$ genu *APOE* zwiększa ryzyko choroby, ale nie daje pewności zachorowania i w tym kontekście można gen *APOE* nazwać genem ryzyka, w odróżnieniu od genów, których mutacje determinują rodzinną postać AD i które nazywane są genami sprawczymi. Szacuje się, że u młodych asymptomatycznych osób będących homozygotami *APOE* $\epsilon 4/\epsilon 4$ ryzyko zachorowania na AD wynosi około 30% [Breitner, 1996]. Inne badania donoszą, że u kobiet o genotypie *APOE* $\epsilon 4/\epsilon 4$ ryzyko AD przed 73 rokiem życia wynosi 45%, a u mężczyzn 25% [Breitner i wsp., 1999]. Ryzyko to jest mniejsze u osób będących nosicielami jednego allelu $\epsilon 4$ genu *APOE*. Jednocześnie szacuje się, że średni wiek zachorowania u tych osób wynosi około 75 lat, a u osób bez tego allelu średni wiek zachorowania to 95 lat [Bird, 2008].

Według innych danych ryzyko zachorowania na AD jest 2 do 3 razy większe u chorych z jednym allelem $\epsilon 4$ i wzrasta aż 12-krotnie u nosicieli dwóch alleli $\epsilon 4$ genu *APOE* w porównaniu z osobami bez tego allelu. [Roses, 1996]. Szereg badań wskazuje natomiast, że obecność allelu $\epsilon 2$ w genie *APOE* wiąże się z mniejszym ryzykiem zachorowania na AD [Corder i wsp., 1994; Farrer i wsp., 1997].

Produktem genu *APOE* są białka, które w zależności od kombinacji alleli w genomie determinujących fenotyp różnią się między sobą obecnością dwóch aminokwasów: argininy i cysteiny w pozycji odpowiednio 112 i 158. Wyróżnia się: izoformę *APOE* $\epsilon 2$ (cys112, cys158), *APOE* $\epsilon 3$ (cys112, arg158) oraz *APOE* $\epsilon 4$ (arg112, arg158) [Nickerson i wsp., 2000].

Białko *APOE* należy do rodziny apolipoprotein, w której wyróżnia się: grupę *APOA* (*APOA*-I, *APOA*-II i *APOA*-IV), grupę *APOB* (*APOB*48 i *APOB*-100), grupę *APOC* (*APOC*-I, *APOC*-II i *APOC*-III), *APOD*, *APOE*, *APOH* i *APOJ*. Główną rolą *APOE* w organizmie jest

jej udział w metabolizmie lipidów, przede wszystkim w transporcie i przemianach cholesterolu i trójglicerydów. Jest składnikiem chylomikronów, VLDL oraz HDL1 i pośredniczy w ich interakcjach z receptorami komórkowymi. U nosicieli allelu $\epsilon 4$ genu *APOE* stwierdzono wyższy poziom cholesterolu całkowitego i LDL w surowicy oraz większe ryzyko wystąpienia choroby wieńcowej [Wilson i wsp., 1996].

Największą ekspresję *APOE* stwierdzono w wątrobie i mózgu (głównie w astrocytach i mikrogleju, w mniejszym stopniu w neuronach) [Grehan i wsp., 2001].

W ośrodkowym układzie nerwowym fizjologiczna rola *APOE* polega na udziale w dystrybucji lipidów i rozpuszczalnych związków lipidowych pomiędzy komórkami mózgu i płynem mózgowo-rdzeniowym [Pitas i wsp., 1987].

Rola *APOE* w patomechanizmie AD polega na jej udziale w metabolizmie i dystrybucji $A\beta$. *APOE* w mózgu jest produkowane przez astrocyty i mikroglej. Następnie podlega procesowi lipidacji. W zależności od izoformy, *APOE* po połączeniu z $A\beta$ powoduje jego odkładanie się w postaci plak amyloidowych lub dystrybucję do płynu mózgowo-rdzeniowego. *APOE*, za pomocą lipoproteinowej jednostki wiążącej, może tworzyć kompleks z $A\beta$ i ułatwiać jego komórkowy wychwyt na drodze endocytozy.

APOE również może nasilać zdolności mikrogleju i astrocytów do uprzątkowania $A\beta$ [Jiang i wsp., 2008]. Uważa się też, że *APOE* może kontrolować transport $A\beta$ przez barierę krew-mózg [Bell i wsp., 2007]. Różne izoformy *APOE* w różnym stopniu uczestniczą w wyżej wymienionych procesach. *APOE* również wpływa na inne procesy w centralnym systemie nerwowym, które są potencjalnie związane z rozwojem AD: przekąźnictwo synaptyczne, neurotoksyczność, hiperfosforylacja białka tau oraz procesy zapalne w centralnym systemie nerwowym [Kim i wsp., 2009]. Wykazano również wpływ polimorfizmu *APOE* na odpowiedź na leczenie inhibitorami acetylocholinesterazy (AChEI, ang. *acetylcholinesterase inhibitor*) [Poirier i wsp., 1995; Almkvist i wsp., 2001; Choi i wsp., 2008; Bizzarro i wsp., 2005].

Polimorfizm *APOE* jest jedynym, wielokrotnie potwierdzonym genetycznym czynnikiem ryzyka SAD, ale niewystarczającym, aby w pełni tłumaczyć genetyczne uwarunkowania tej postaci choroby. Szacuje się, że około 50% predyspozycji genetycznych SAD jest nadal nieznane [Bergem, 1994].

Determinuje to dalsze stałe poszukiwania genetycznych czynników ryzyka SAD.

Poszukiwanie te umożliwiają trzy metody: analiza znaczenia wybranych genów kandydatów (ang. *candidate gene approach*), analiza sprzężeń (ang. *linkage analysis*) i przeszukiwanie całego genomu w celu wykrycia genów ryzyka (ang. *genome-wide association study*, GWAS). Pierwsza metoda polega na sprawdzeniu, czy wybrany polimorfizm genu białka zaangażowanego w patofizjologię choroby częściej występuje u chorych w porównaniu z osobami zdrowymi dobranymi pod względem płci i wieku. Metoda ta, najpowszechniej dotychczas stosowana, ma szereg słabych punktów: służy przede wszystkim do badań polimorfizmów funkcjonalnych, czyli zlokalizowanych w rejonach kodujących, które, jak się okazuje, rzadko mają wpływ na ryzyko chorób (polimorfizmy odpowiedzialne za ryzyko wielu chorób znajdują się przede wszystkim w rejonach niekodujących). Wymaga bardzo dużej liczebności grup w celu uniknięcia wyników zafałszowanych, co niestety jest trudne do uzyskania ze względu na zbyt małą liczebność dostępnych grup badanych w poszczególnych ośrodkach [Gulcher, 2005].

Druga metoda, analiza sprzężeń, jest możliwa tylko w specjalnych sytuacjach, tzn. gdy co najmniej dwie spokrewnione osoby z rodziny, co najmniej dwupokoleniowej są dotknięte chorobą. Analiza sprzężeń pozwala na wykrycie wariantów genetycznych charakterystycznych dla przypadków występujących rodzinnie. Od niedawna coraz większe zastosowanie ma badanie metodą GWAS. Metoda ta jednocześnie pozwala zbadać nawet milion wariantów genetycznych, zarówno w rejonach kodujących jak i niekodujących. W ludzkim genomie jest około 12 milionów polimorfizmów. Jak wykazały odkrycia międzynarodowego projektu HapMap (ang. *International HapMap Project*) warianty genetyczne zlokalizowane blisko siebie dziedziczą się razem, jako haplotyp. W związku z tym wystarczy zbadać tylko tzw. polimorfizmy znacznikowe, których jest około milion, charakteryzujące określony haplotyp [<http://www.hapmap.org/>]. Przeszukiwanie genomu ludzkiego umożliwiło już wykrycie genów ryzyka choroby Parkinsona [Fung, 2006] czy zawału serca [Helgadottir, 2007; McPherson, 2007; Samani, 2007].

Metodę tę zaczęto stosować również w celu identyfikacji genów związanych z SAD. Opublikowane dotychczas badania GWAS poszukujące genetycznych czynników ryzyka SAD konsekwentnie potwierdzają znacznie *APOE* dla ryzyka tej choroby [Coon i wsp., 2007; Li i wsp., 2008; Bertram i wsp., 2008], natomiast tylko pojedyncze badania GWAS donoszą o polimorfizmach innych niż polimorfizmy genu *APOE*, a które są potencjalnymi czynnikami ryzyka SAD.

W pierwszym badaniu opublikowanym w 2007 roku zbadano znaczenie 17343 polimorfizmów znacznikowych u 1808 chorych z LOAD i 2062 osób z grupy kontrolnej. Wykazano 19 genów, których warianty znamienne związane są z AD, m.in.: *GALP* na chromosomie 19q13.42, *TNKL* na chromosomie 17p13.1 i *PCK1* na chromosomie 20q13.31. Produkty wszystkich tych genów wywierają wpływ na metabolizm lub przekazywanie w szlakach związanych z AD [Grupe i wsp., 2007]. W kolejnym badaniu GWAS przeprowadzonym na wyizolowanej populacji zamieszkującej południowo-zachodnią część Niderlandów brało udział 103 pacjentów z LOAD oraz 170 ich krewnych pierwszego stopnia. Przeanalizowano 262 000 polimorfizmów znacznikowych. Potwierdzono wcześniej stwierdzony związek SAD z polimorfizmem w miejscach 1q21-25 oraz 10q22-24 oraz zasugerowano związek genów *RGS2* na chromosomie 1 i *NMNAT3* na chromosomie 3 z ryzykiem SAD oraz po raz pierwszy wykazano taki związek z polimorfizmem w locus 3q23 [Liu i wsp., 2007]. W badaniu Raimana i wsp. uczestniczyło 446 chorych z LOAD oraz 290 osób z grupy kontrolnej. W tym badaniu przeanalizowano znaczenie 312316 polimorfizmów znacznikowych i wykazano, że polimorfizm genu *GAB2* modyfikuje ryzyko AD u nosicieli allelu $\epsilon 4$ genu *APOE* (genotyp GG znamienne zwiększał ryzyko AD u nosicieli allelu $\epsilon 4$ w porównaniu z genotypem GT lub TT); natomiast ta zmienność genotypowa nie miała wpływu na ryzyko AD u osób nie będących nosicielami allelu $\epsilon 4$ [Reiman i wsp., 2007]. W 2009 roku opublikowano wyniki czterech badań GWAS. W badaniu Beechama i wsp. brało udział 492 pacjentów z LOAD oraz 498 osób z grupy kontrolnej. Przebadano 555 000 polimorfizmów znacznikowych i potwierdzono znaczenie polimorfizmu *APOE* w etiopatogenezie LOAD oraz wykazano, że polimorfizm w locus 12q13 ma związek z występowaniem LOAD [Beecham i wsp., 2009]. W innym badaniu poddano analizie 313504 wariantów u 844 chorych z LOAD i 1255 osób z grupy kontrolnej. Wykazano silny związek polimorfizmu genu *PCDH11X* na chromosomie X (Xq21.3) z występowaniem LOAD [Carrasquillo i wsp., 2009]. Do kolejnego badania włączono 2032 chorych z AD i 5328 osób z grupy kontrolnej pochodzących z Francji oraz 3978 chorych i 3297 osób z grupy kontrolnej z Belgii, Finlandii, Włoch i Hiszpanii. Poddano analizie 537029 wariantów znacznikowych. Wykazano znaczenie polimorfizmu następujących genów w etiopatogenezie AD: *CLU* (na chromosomie 8) i *CRI* (na chromosomie 1) [Lambert i wsp., 2009]. W badaniu Harolda i wsp. brało udział 3941 chorych na AD oraz 7848 osób z grupy kontrolnej. Poddano analizie 529205 wariantów genetycznych i wykazano związek polimorfizmów w genach: *PICALM* (na chromosomie 11) i *CLU* (na chromosomie 8) z ryzykiem zachorowania na AD [Harold i wsp., 2009].

Doniesienia dotyczące genów będących potencjalnymi czynnikami ryzyka SAD zostały uporządkowane i są stale uaktualniane w internetowej bazie danych: www.alzgene.org. Na podstawie sporządzonych meta-analiz oraz danych potwierdzających znaczenie poszczególnych alleli we wszystkich populacjach lub tylko populacji kaukaskiej sporządzono „top” listę genów, które wydają się najbardziej obiecujące pod względem znaczenia dla etiopatogenezy SAD (Tabela 2).

Tabela 2. „Top lista” genów mających znaczenie w etiopatogenezie SAD.

Na podstawie www.alzgene.org

CHROMOSOM	NAZWA GENU	LOCUS
1	MTHFR	1p36.3
	CHRNA2	1q21.3
	CR1	1q32
	ECE1	1p36.1
2	IL1A	2q14
	IL1B	2q14
3	TF	3q21
4	-	
5	-	
6	NEDD9	6p25.24
	PGBD1	6p22.1
	TNF	6p21.3
	LOC651924	6q24.1
7	-	
8	CLU	8p21-p12
9	IL33	9p24.1
	DAPK1	9q34.1
10	TFAM	10q21
	CH25H	10q23
	LOC439999	10q24.1
	CALHM1	10q24.33
	ENTPD7	10q23-q24
	SORCS1	10q23-q25
	hCG2039140	10q25
11	BDNF	11p14.1
	GAB2	11q13.4-q13.5
	PICALM	11q.14.2
	SORL1	11q.24.1

12	-	
13	-	
14	GWA_14q32.13	14q32.13
15	ADAM10	15q22
16	-	
17	TNK1	17p13.1
	THRA	17q11.2
	ACE	17q23
	GRN	17q21.32
18	-	
19	APOE	19q13.31
	PVRL2	19q13.2
	TOMM40	19q13
	APOC1	19q13.2
	APOC4	19q13.2
	LDLR	19p13.3
	BCAM	19q13.2
20	PRNP	20pter-p12
	CST3	20p11.2
21	-	
22	-	

Niestety, żaden z dotychczas badanych polimorfizmów nie okazał się czynnikiem ryzyka SAD we wszystkich badanych populacjach. Może to być wynikiem odmienności fenotypowej choroby w różnych populacjach, zbyt małej liczby uczestników badań czy interakcji czynnik genetyczny – czynnik środowiskowy. Zasadne, zatem są dalsze poszukiwania genetycznych czynników ryzyka w AD.

Badania nad genetycznymi czynnikami ryzyka AD prowadzone były również w polskiej populacji. Od 1998 roku opublikowano wyniki około 20 badań analizujących polimorfizmy genów potencjalnie związanych z ryzykiem AD. Większość z tych badań wykazało, że polimorfizmy genów wcześniej określone jako potencjalny czynnik ryzyka AD w innych populacjach, nie mają związku z ryzykiem zachorowania na AD w populacji polskiej, dotyczy to np.: genu alfa2-makroglobuliny [Styczyńska i wsp., 2001], genu *MTHFR* [Religa i wsp., 2003], genu sitohin (*STH*) [Pepłońska i wsp., 2003], genu *CYP46* [Golanska i wsp., 2005]. Potwierdzono natomiast związek polimorfizmu *APOE* z ryzykiem wystąpienia AD [Kowalska i wsp., 1998; Styczynska i wsp., 2003] oraz związek z ryzykiem zachorowania na AD polimorfizmów takich genów jak gen: *PRNP* i *PRND* [Golanska i wsp., 2004], *M129V* [Gacia i wsp., 2006], *UBQLN1* [Golan i wsp., 2008], *NPC1* [Erickson i wsp., 2008] oraz gen *APBB2* [Golanska i wsp., 2008].

I.1.4. Patomorfologia i etiopatogeneza choroby Alzheimera

I.1.4.1 Obraz patomorfologiczny choroby Alzheimera

W obrazie patomorfologicznym AD można wyróżnić następujące elementy: zmiany wytwórcze związane z odkładaniem patologicznych produktów, zmiany zanikowe oraz zmiany odczynowe [Duyckaerts i wsp., 2009].

Zmiany, które są konsekwencją odkładania się produktów patologicznych to: blaszki amyloidowe (ang.: *amyloid plaques*) (Rycina 1), zwyrodnienie włókienkowe neuronów typu Alzheimera (ang.: *neurofibrillary tangles, NFTs*) (Rycina 2), a także dystroficzne neuryty (ang.: *dystrophic neurites, DN*), „nitki neuropilowe” (ang.: *neuropil threads*), ciała Hirano oraz zwyrodnienie ziarnisto- włókienkowe (ang. *granulovacuolar degeneration, GVD*).

Złogi A β w CSN mogą przyjmować różną postać [Delac`re i wsp., 1991]. Klasyczna blaszka amyloidowa (ang. *neuritic plaque*) zbudowana jest z centralnego rdzenia, którego głównym składnikiem są włókna powstałe w wyniku oligomeryzacji A β oraz z wieńca zbudowanego z dystroficznych neurytów, reaktywnych astrocytów i mikrogleju, których obecność świadczy o stanie zapalnym, jaki towarzyszy odkładaniu się A β [Cras i wsp., 1991]. Oprócz A β w skład blaszki amyloidowej wchodzi kilkadziesiąt różnych białek, m.in.: acetylocholinoesteraza, APOE, antygen HLA-DR, α 1-antychymotrypsyna, α 1-antytrypsyna, proteazy, białka układu dopełniacza, tromboplastyna, kalpaina, białko adhezji komórkowej ICAM-1.

Oprócz klasycznych blaszek amyloidowych, A β może formować ziarniste złogi bez rdzenia, tzw. złogi rozproszone (ang.: *diffuse plaques*) [Wisniewski i wsp., 1998]. Są one wykrywalne jedynie metodami immunohistochemicznymi.

Bardzo rzadko spotyka się też blaszki typu waty (ang.: *cotton wool plaques*) [Crook i wsp., 1998]. Cechuje je, podobnie do złogów rozproszonych, brak wyraźnego rdzenia oraz możliwość wykrycia jedynie przy pomocy barwników eozynowych.

Zwyrodnienie włókienkowe typu Alzheimera są to wewnątrzneuronalne złogi spiralnie skręconych włókien. Te włókna określane w języku angielskim jako *paired helical filaments, PHF*, zawierają nadmiernie ufosforylowane białko tau. Tau należy do rodziny białek zasocjowanych z mikrotubulami komórkowymi (ang. *microtubule associated protein tau*,

MAP- τ). W warunkach fizjologicznych rola tego białka polega na inicjowaniu polimeryzacji mikrotubul oraz ich stabilizacji w neuronach. O właściwościach tego białka decyduje stopień jego ufosforylowania, który to proces regulowany jest przy pomocy antagonistycznie działających układów enzymatycznych: kinaz, np. kinazy syntazy glikogenowej 3 β (GSK-3 β), kinazy 5 zależnej od cykliny, kinazy białkowej aktywowanej przez mitogen (MAPK) oraz fosfataz, np. PP-1 i PP-2A [Iqbal i wsp., 2005]. W AD tau jest hiperfosforylowane, co prowadzi do upośledzenia funkcjonowania mikrotubul, uszkodzenia cytoszkieletu i zaburzeń transportu wewnątrz komórki nerwowej [Grundke-Iqbal i wsp., 1986]. *NFTs* tworzą się wewnątrzkomórkowo, później występują również pozakomórkowo jako ślad po obumarłych, zawierających *NFTs*, komórkach nerwowych (ang. *ghost tangles*) [Anderton i wsp., 1982]. W AD *NFTs* występują głównie w komórkach piramidowych regionu CA1 hipokampa, w korze entorinalnej, w warstwach III i V kory kojarzeniowej oraz w neuronach niektórych jąder kresomózgowia i pnia mózgu. Wykazano hierarchiczny wzorec narastania gęstości *NFTs* od kory entorinalnej, poprzez struktury układu limbicznego aż po korę nową [Braak i wsp., 1991]. *NFTs*, poza białkiem tau, zawierają również wiele innych białek, np. kinazę kazeiny II, proteinazę neksyny I, proteoglikany siarczanu heparyny, czynnik wzrostu fibroblastów, MAP-5 i ubikwitynę [Mirra i wsp., 2002].

Z kolei dystroficzne neuryty to heterogenna grupa wypustek neuronalnych, zawierających neurofilamenty, wyrodnijące organelle wewnątrzkomórkowe, ciała wielopęcherzykowe i wieloblaszkowe lub włókna *PHFs* [Dickson i wsp., 2001]. Dystroficzne neuryty tworzą wieniec blaszki amyloidowej, zawierają *PHFs* i barwią się za pomocą przeciwciał anti-MAP- τ [Liberski i wsp., 1995].

Nitki neuropilowe to małe pofragmentowane struktury, o krętym przebiegu zgromadzone pomiędzy ciałami komórek nerwowych. Zbudowane są z włókien *PHFs*, towarzyszą blaszkom amyloidowym i zwyrodnieniu włókienkowemu neuronów. Pojawiają się we wczesnym etapie zwyrodnienia włókienkowego [Braak i wsp., 1988].

Ciała Hirano składają się z ułożonych w “jodełkę” (ang. *herring bone configuration*) krystalicznych regularnych układów przeplatających się filamentów. Spotykane są głównie wewnątrz neuronów hipokampa jako eozynofilne „pałeczki”. Towarzyszą również innym procesom zwyrodnieniowym, np. zespołowi parkinsonizm-stwardnienie zanikowe boczne-otępienie z wysp Guam [Hirano i wsp., 1966].

Zwyrodnienie ziarnisto - włókienkowe tworzą wakuole zawierające ziarnistości, zlokalizowane w cytoplazmie komórek piramidowych hipokampa. Znaczenie i morfogeneza zwyrodnienia ziarnisto-włókienkowego są niejasne [Price i wsp., 1986].

Mniej charakterystyczne dla AD, a obecne w obrazie neuropatologicznym są zmiany związane z zanikiem. Należą do nich: zanik neuronów, zwyrodnienie synaps, zgąbczenie tkanki mózgowej oraz makroskopowo widoczny zanik mózgu.

Zanik neuronów najprawdopodobniej jest związany z toksycznym wpływem A β . Dowodem na to może być obecność śladów po obumarłych, obładowanych *NFTs* komórkach nerwowych w postaci tzw. *ghost tangles* [Cras i wsp., 1995]. Zanik ten dotyczy przede wszystkim opuszki węchowej i przedniego jądra węchowego, ciała migdałowatego, jąder podstawnych Meynerta, miejsca sinawego oraz jąder szwu [Duyckaerts i wsp., 2009].

Ultrastrukturalna oraz immunohistochemiczna ocena tkanki mózgowej chorych na AD wykazuje zanik synaps z jednoczesnym powiększeniem ich rozmiarów [DeKosky i wsp., 1990]. Wykazano, że zanik synaps również może być związany z toksycznym działaniem A β [Grutzendleri i wsp., 2007]. Znaczenie zaniku synaps w patomechanizmie AD potwierdza fakt, że nasilenie tego procesu wyraźnie koreluje z nasileniem zaburzeń funkcji poznawczych [Terry i wsp., 1991].

Widoczne w badaniach neuropatologicznych zgąbczenie tkanki mózgowej chorych na AD wynika z obecności licznych wakuol w obrębie siatki neuropilowej. Zwykle obraz ten może utrudniać różnicowanie z obrazem charakterystycznym dla choroby Creutzfeldta-Jacoba [Smith i wsp., 1987]. Taka nadmierna wakuolizacja jest częstsza u chorych, u których stwierdzono współwystępowanie AD i otępienia z ciałami Lewy'ego [Hansen i wsp., 1989].

Zanik tkanki mózgowej chorych na AD widoczny makroskopowo dotyczy głównie kory węchowej, hipokampa i ciał migdałowatych [Whitwell i wsp., 2008].

Zmiany odczynowe stwierdzane w badaniach neuropatologicznych mózgów chorych na AD to zmiany zapalne, astrocytoza oraz procesy neuroregeneracyjne.

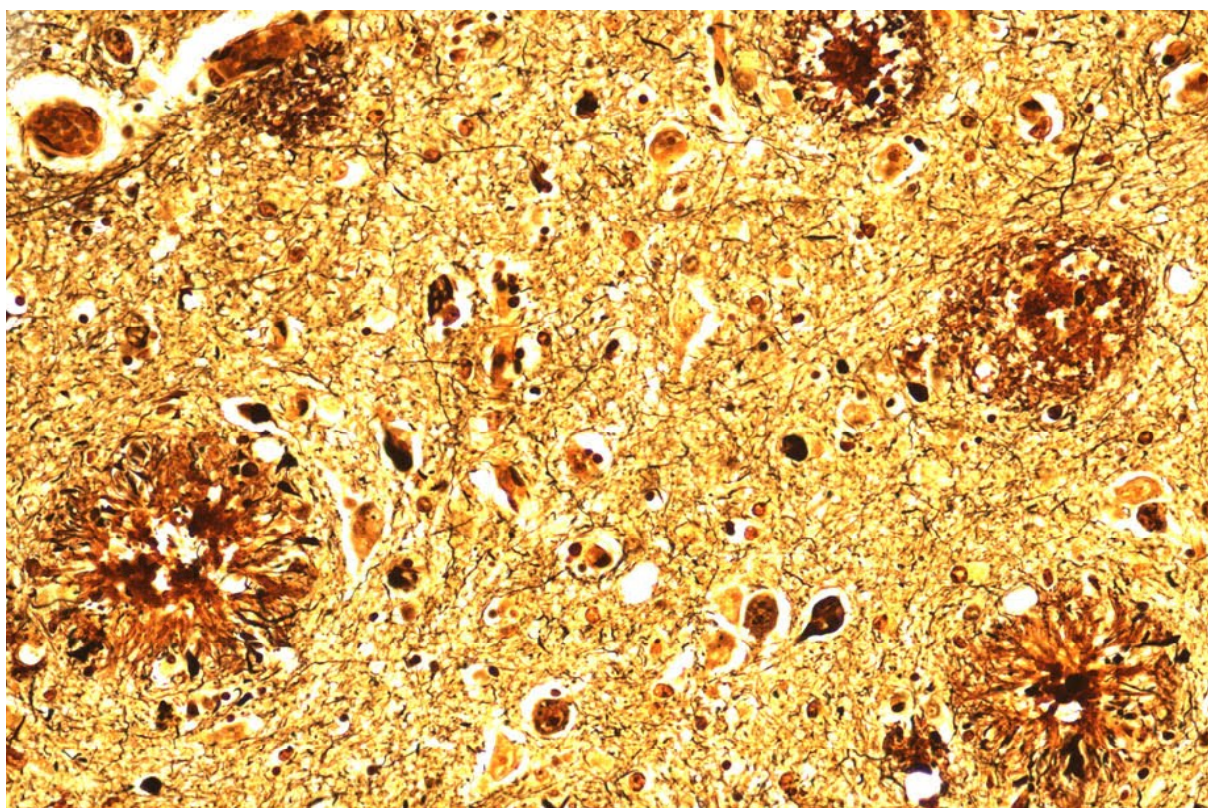
Obecność aktywowanego mikrogleju, składników kaskady dopełniacza oraz prozapalnych cytokin w plakach amyloidowych świadczy o aktywnym procesie zapalnym, jaki się tu toczy [Eikelenboom i wsp., 2008]. Przez niektórych badaczy proces ten jest interpretowany jako pozytywny, ponieważ obecność aktywnych komórek fagocytarnych zmniejsza ilość odkładanego amyloidu [Nicolle i wsp., 2006], inni z kolei uważają, że proces ten może nasilać zanik tkanki mózgowej [Fox i wsp., 2005].

Stwierdzono również zwiększoną gęstość włóknistych astrocytów w mózgach chorych na AD [Schechter i wsp., 1981]. Dotyczy to głównie kory, wzgórza, pnia mózgu, a w skrajnych przypadkach nawet mózdzku [Delacourte, 1990]. Stwierdzono korelację nasilenia tego procesu z gęstością *NFTs* oraz ilością zdeponowanego A β [Cairns i wsp., 1992].

Wykazano, że w mózgach chorych na AD przebiegają nie tylko procesy związane z degradacją tkanki mózgowej, ale także procesy regeneracyjne [Teter i wsp., 2002]. Zaobserwowano kiełkowanie zakończeń neuralitycznych oraz powstawanie kolaterali aksonów w obrębie plak amyloidowych [Arendt i wsp., 1986; Probst i wsp., 1983]. Ponadto opublikowano doniesienia na temat podniesionego poziomu markerów neurogenezy w tkankach mózgowych chorych na AD, co może świadczyć o procesie regeneracji [Jin i wsp., 2004].

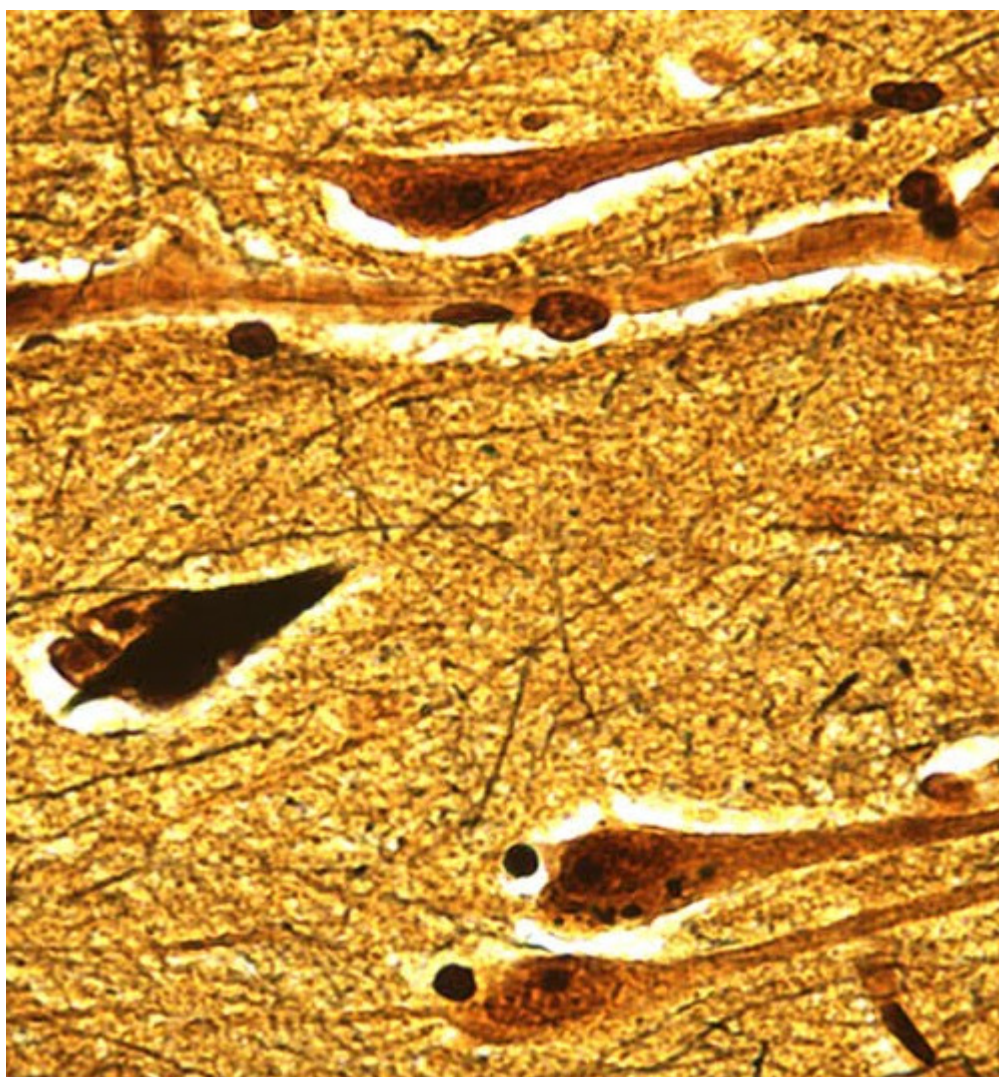
Ryc1. Plaki amyloidowe w korze mózgowej- zmiany patomorfologiczne charakterystyczne dla AD.

Rycina udostępniona przez: Dr Kaj Blennow, Clinical Neurochemistry Laboratory, Department of Neuroscience and Physiology, Sahlgren's University Hospital, SE-431 80 Möndal, Sweden. kaj.blennow@neuro.gu.se



Ryc 2. Zwyródnienie włókienkowe w korze mózgowej- zmiany patomorfologiczne charakterystyczne dla AD.

Rycina udostępniona przez: Dr Kaj Blennow, Clinical Neurochemistry Laboratory, Department of Neuroscience and Physiology, Sahlgren's University Hospital, SE-431 80 Möndal, Sweden. kaj.blennow@neuro.gu.se



I.1.4.2. Etiopatogeneza choroby Alzheimera

Etiopatogeneza choroby Alzheimera jest złożona i nie w pełni poznana. Zanik neuronów i upośledzenie ich funkcji w AD jest pochodną obecności dwu patologicznych białek w tkance mózgowej, peptydu A β oraz hiperfosforylowanego białka tau. Najlepiej proces ich powstawania tłumaczy zaproponowana na początku lat dziewięćdziesiątych hipoteza kaskady amyloidowej, która wiąże różne obserwacje z badań nad etiopatogenezą AD w jeden model [Hardy i Higgins, 1992; Selkoe, 1991].

Na podstawie dotychczasowych badań, jako wtórne do amyloidogenezy należy traktować inne patologiczne procesy przebiegające w mózgach chorych na AD, w tym podwyższony poziom stresu oksydacyjnego, przewlekły proces zapalny, zaburzenia formowania kanałów jonowych, zmiany w neurotransmisji (hipoteza cholinergiczna).

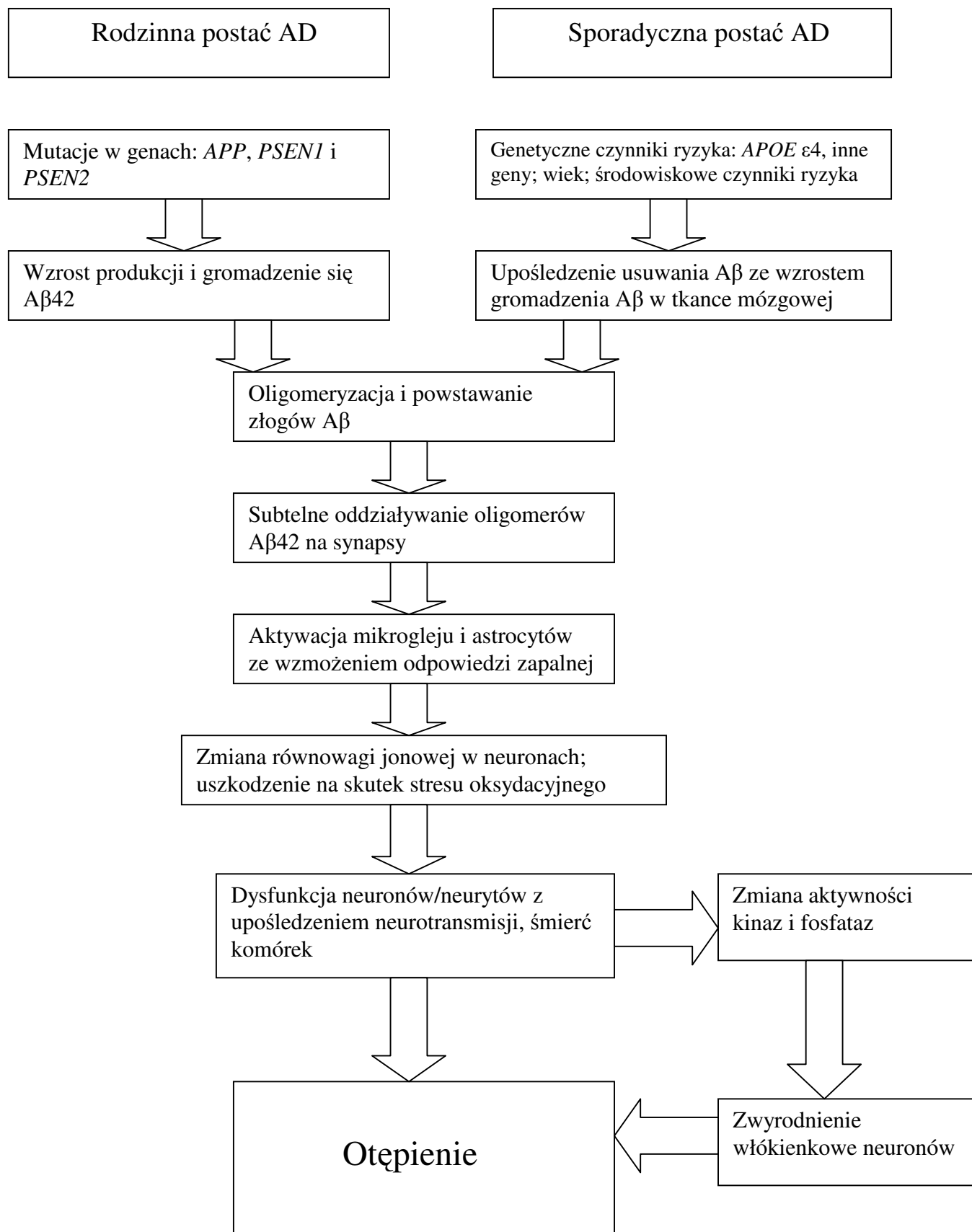
I.1.4.2.1. Hipoteza kaskady amyloidowej

Według tej teorii pierwszym etapem choroby jest odkładanie się w mózgu nierozpuszczalnych i opornych na proteolizę form A β , a pozostałe zmiany neuropatologiczne tzn. zwyrodnienie włóknienkowe neuronów, zwyrodnienie synaps oraz zanik neuronów powstają jako konsekwencja odkładania A β i mają charakter wtórny (Rycina 3). Rola A β nie budzi wątpliwości w patogenezie przypadków rodzinnych AD, gdzie stwierdzone defekty genetyczne w większości prowadzą do zmiany metabolizmu APP w kierunku powstawania bardziej „amyloidogennych” form peptydu A β . Inaczej jest w przypadkach sporadycznych AD, gdzie etiopatogeneza jest słabiej poznana i prawdopodobnie oparta na współdziałaniu wielu czynników, zarówno genetycznych (np. wariant ϵ 4 genu *APOE*) jak i niegenetycznych (np. wpływ hormonów, patologia mikrokrążenia).

β -amyloid powstaje w wyniku proteolizy β APP. APP jest białkiem syntetyzowanym we wszystkich typach tkanek. Po zsyntetyzowaniu na rybosomach cząsteczka APP podlega licznym procesom obróbki, między innymi serii specyficznych cięć przy pomocy proteaz zwanych sekretazami. W wyniku cięć prowadzonych przy udziale α - i γ -sekretyz (szlak α -sekretyzy) powstają nieamyloidogenne produkty: N-końcowy fragment sAPP α , p3 oraz C-końcowy fragment C83. Jeśli proces obróbki prowadzony jest przy pomocy β - i γ -sekretyz (szlak β -sekretyzy) to powstają: N-końcowy fragment sAPP β , C-końcowy fragment C99 oraz

cząsteczka β -amyloidu. Jeżeli APP cięte jest przez γ -sekretazę w pozycji waliny 40 to powstaje β - amyloid o długości 40 aminokwasów ($A\beta_{40}$). Natomiast w wyniku cięcia APP w pozycji alaniny 42 powstaje β - amyloid o długości 42 aminokwasów ($A\beta_{42}$). $A\beta_{42}$ jest bardziej hydrofobowy, ma większą tendencję do oligomeryzacji i agregacji, przez co, w porównaniu z $A\beta_{40}$, jest znacznie bardziej amyloidogenny i neurotoksyczny. Ostatnio zidentyfikowano dodatkowe miejsce cięcia APP, zwane ϵ [Weidemann, 2002]. Enzym wykonujący to cięcie zwany jest ϵ -sekretażą. Nie jest znana jego rola, ale poprzez analogię do proteolizy receptora Notch można sądzić, że bierze on udział w tworzeniu wewnątrzkomórkowej domeny białka APP (ang. *APP intracellular domain*). Na podstawie dotychczasowych prób określenia fizjologicznej roli APP stwierdzono, że odgrywa ono istotną rolę w rozwoju i wzroście komórki, regulacji długości neurytu, adhezji oraz w transporcie jonów cynku i miedzi [Multhaup i wsp., 1998]. Fizjologicznie procesy produkcji i eliminacji $A\beta$ z tkanki mózgowej pozostają w równowadze. Dzieje się tak dzięki mechanizmom odpowiedzialnym za jego usuwanie. $A\beta$ jest degradowany przez enzym zwany neprylizyną oraz przez enzym konwertujący endotelinę [Carson i wsp., 2002]. Nadmiar $A\beta$ usuwany jest również na drodze jego eliminacji poprzez barierę krew- mózg, który to proces jest regulowany za pomocą białek związanych z receptorami dla LDL [Tanzi i wsp., 2004].

Rycina 3. Hipoteza kaskady amyloidowej. Sekwencja wydarzeń prowadzących do neurodegeneracji w chorobie Alzheimera. Na podstawie: Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. Lancet. 2006 Jul 29;368(9533):387-403. Modyfikacja własna.



U chorych z AD dochodzi do zachwiania równowagi pomiędzy produkcją a utylizacją A β czego konsekwencją jest jego odkładania w tkance mózgowej.

W postaci rodzinnej AD za nieprawidłowy metabolizm APP odpowiedzialne może być występowanie mutacji w genach *APP* oraz w genach białek odpowiedzialnych za aktywność sekretaz.

Gen *APP* zmapowano na chromosomie 21q21.2 [Tanzii wsp., 1987]. Dotychczas opisano ponad 20 mutacji tego genu, z tego 12 warunkuje rozwój rodzinnej postaci AD o wczesnym początku choroby [Kowalska i wsp., 2003].

Wszystkie mutacje występują w eksonach 16 i 17 genu *APP* kodujących region β -amyloidu. Mutacje te występują w pobliżu miejsc rozpoznawanych przez sekretazy, co potwierdza ich znaczenie w procesie powstawania A β . W pobliżu miejsca cięcia *APP* przez β -sekretazę (Met671) wykryto mutację K/M670/671N/L [Mullan i wsp., 1992].

W pobliżu miejsca rozpoznawanego przez α -sekretazę (Lys687) występują mutacje A692G [Hendriks i wsp., 1992] i E693G [Nilsberth i wsp., 2001].

W regionie działania γ -sekretazy (Ile712 oraz Thr714) znaleziono najwięcej mutacji: V715A, V715M, I716V, I716T, V717I, V717F, V717G, V717L [Kowalska, 2004].

Prawie wszystkie poznane mutacje zaburzają proces endoproteolizy APP. Większość z nich powoduje wzrost produkcji A β , zwłaszcza amyloidogennego A β 42 [Citron i wsp., 1992]. Podwójna mutacja K/M670/671N/L wzmacnia aż 10-krotnie produkcję zarówno A β 42, jak i A β 40 [Kowalska, 2004].

Wykazano również, że wpływ na aktywność sekretaz, a co za tym idzie na wzrost produkcji A β , mają białka PSEN. PSEN są białkami błonowymi zlokalizowanymi, podobnie jak APP, w błonie komórkowej, siateczce endoplazmatycznej

i w aparacie Golgiego. W 1995 roku zidentyfikowano gen *PSEN1* na chromosomie 14q24.3 [Sherrington i wsp., 1995] oraz *PSEN2* na chromosomie 1q42.1 [Levy-Lahad i wsp., 1995].

Geny *PSEN* ulegają ekspresji głównie w neuronach, w mniejszym stopniu w innych typach tkanek (serce, nerka, trzustka). Mutacje w genach *PSEN* warunkują autosomalnie dominującą wczesną postać AD. Wykryto już około 200 mutacji w rodzinach z AD. Preseniliny biorą udział w przekazywaniu sygnałów w różnych szlakach komórkowych, m.in. Notch, WNT/ β -kateniny oraz wchodzą w skład centrum katalitycznego odpowiedzialnego za aktywność γ -sekretazy. Mutacje presenilin poprzez subtelne zmiany konformacyjne mogą zaburzać wzajemne oddziaływania białek w tym kompleksie [Esler i wsp., 2002]. Jednym

z efektów molekularnych tych zmian, podobnie jak mutacji w genie *APP*, jest wzmożona produkcja A β 42 [De Strooper i wsp., 1998].

Początkowo uważano, że neurotoksyczne są jedynie fibrylarne formy A β gromadzone w plakach, jednak ostatnie dane przekonują o znaczeniu rozpuszczalnych oligomerów A β w patomechanizmie AD. Rozpuszczalne oligomery pozostają w równowadze z formą fibrylarną i mogą pojawiać się zanim jeszcze dochodzi do powstania plak i już na takim etapie działać neurotoksycznie, sprzyjając procesom rozwoju otępienia [Klein i wsp., 2004].

Na podstawie dotychczasowych badań wydaje się, że powstawanie zwyrodnienia włóknienkowego, drugiej charakterystycznej dla AD zmiany patomorfologicznej, jest ściśle związane z toksycznym działaniem A β . Prawdopodobnie to akumulacja A β powoduje aktywację kinaz, odpowiedzialnych za nadmierne ufosforylowanie białka tau, warunkujące powstawanie *NFTs*, a nie odwrotnie.

Słuszność hipotezy kaskady amyloidowej wielokrotnie poddawano w wątpliwość, ale dotychczasowe obserwacje przekonują raczej, że to ona jest kluczowa dla patofizjologii AD.

Na przykład:

- większość mutacji w genach *APP* i *PSEN* we wczesnych rodzinnych postaciach AD powoduje jednocześnie wzrost produkcji A β ;
- zarówno w postaciach sporadycznych jak i rodzinnych AD wykazano silną korelację poziomu A β w mózgach chorych z nasileniem zaburzeń funkcji poznawczych [Näslund i wsp., 2000];
- u chorych z zespołem Downa, będących nosicielami trzech chromosomów 21 (co oznacza nosicielstwo trzech kopii genu *APP*) występuje zespół otępienny i zmiany neuropatologiczne analogiczne do stwierdzanych w AD [Wisniewski i wsp., 1985].
- w badaniach eksperymentalnych potwierdzono, że to A β indukuje powstawanie *NFTs*, natomiast występowanie jedynie *NFTs* nie wystarcza do zainicjowania procesu akumulacji A β i rozwoju procesu otępiennego [Games i wsp., 1995; Götz i wsp., 2001; Lewis i wsp., 2001].

Ciągle nieznany jest mechanizm odpowiadający za wytwarzanie A β w postaci sporadycznej LOAD. Przypuszcza się, że za ten proces odpowiedzialne mogą być zaburzenia metabolizmu cholesterolu w komórkach nerwowych. Za tą hipotezą przemawia fakt, że nosicielstwo allelu ϵ 4 genu *APOE*, główny czynnik ryzyka LOAD, wpływa na rozkład cholesterolu oraz jego metabolizm w błonach neuronów [Tun i wsp., 2002]. Ponadto przypuszcza się, że kumulacja

A β w tkance mózgowej chorych na AD zaczyna się od jego wiązania do cząsteczki glikolipidu zwanego gangliozydem GM1. Wysznuo hipotezę, że A β wiążąc się z GM1 zmienia swą konformację, co stymuluje agregację rozpuszczalnego A β w jego nierozpuszczalne złoży [Yanagisawa i wsp., 1995]. Wykazano również, że wiązanie A β z GM1 jest znacznie silniejsze w przedziałach komórkowych bogatych w cholesterol. Stwierdzono też, że A β odkłada się w tzw. tratwach lipidowych (ang. *lipid rafts*) [Sawamura i wsp., 2000]. W związku z powyższym można przypuszczać, że lipidy błon komórek nerwowych, które zawierają cholesterol i gangliozydy odgrywają znaczącą rolę w procesie agregacji A β w mózgach chorych na AD [Ehehalt i wsp., 2003; Tun i wsp., 2002].

I.1.4.2.2. Inne procesy w etiopatogenezie choroby Alzheimera

I.1.4.2.2.1. Hipoteza dysfunkcji cholinergicznej

Dysfunkcja układu cholinergicznego jest uważana za jedno z wcześniejszych zjawisk, jakie występuje w procesie rozwoju AD. O upośledzeniu czynnościowym i strukturalnym układu cholinergicznego u chorych na AD świadczą zanik i zaburzenia funkcji neuronów cholinergiczych w przodomózgowiu oraz zmniejszona aktywność acetylotransferazy (ChAT) i acetylocholinesterazy (AChE) w tkance mózgowej chorych na AD, a także zmniejszone uwalnianie acetylocholiny, zwiększony jej wychwyt oraz upośledzenie jej wiązania z receptorami nikotynowymi i muskarynowymi [Auld i wsp., 2002].

Wykazano, że spadek aktywności ChAT stwierdzany w tkance mózgowej chorych na AD koreluje z nasileniem zaburzeń funkcji poznawczych [Davies i wsp., 1976].

Acetylocholina, będąca neuromediatorem w układzie cholinergicznym, wiąże się z dwoma typami receptorów: nikotynowymi i muskarynowymi. Wykazano, że w patomechanizmie AD szczególne znaczenie ma upośledzenie aktywacji receptorów nikotynowych. Niektórzy badacze stwierdzili wręcz selektywny zanik konkretnych podtypów ($\alpha 7$ lub $\alpha 4\beta 2$) tych receptorów [Teaktong i wsp., 2004; Warpman, Nordberg, 1995; Nordberg, 1994].

Również badania przyżyciowe z wykorzystaniem metody PET wykazały zmniejszenie gęstości receptorów nikotynowych w mózgach chorych na AD [Nordberg i wsp., 1995].

Przyczyna upośledzenia funkcji układu cholinergicznego u chorych na AD nie jest jednoznacznie określona, ale wydaje się, że zmniejszenie produkcji i uwalniania oraz zwiększona degradacja acetylocholiny powodowana jest przez nadmierną kumulację A β [Auld i wwsp., 2002].

Znaczenie hipotezy cholinergiczej w patomechanizmie AD stało się punktem uchwytu dla koncepcji terapeutycznych pokładających nadzieję w inhibitorach AChE (AChEI), które poprzez hamowanie rozkładu acetylocholiny mają wpływać na zmniejszenie deficytów poznawczych [Johannsen, 2004].

Poza acetylocholimą u chorych z AD stwierdzono również obniżony poziom innych neuroprzekaźników, w tym: kwasu glutaminowego, GABA, serotoniny, neuropeptydu Y [Doraiswamy, 2002].

Inne, wtórne do amyloidogenezy, neurotoksyczne procesy współuczestniczące w etiopatogenezie AD to m.in. dysfunkcja synaps nerwowych, wzmożony poziom stresu oksydacyjnego oraz zaburzenia homeostazy jonów metali, zaburzenia homeostazy cholesterolu, zaburzenia homeostazy jonów wapnia, zaburzenia funkcji mitochondriów i siateczki endoplazmatycznej, wzmożony proces apoptozy i zwiększona odpowiedź zapalna.

I.1.4.2.2.2. Dysfunkcja synaps

Zanik synaps oraz upośledzenie ich funkcji jest procesem stwierdzanym na wczesnym etapie rozwoju AD, nawet na etapie poprzedzającym powstanie plak amyloidowych [Walsh i wsp., 2004]. Zmniejszoną gęstość synaps w tkance mózgowej chorych na AD oraz mniejszą liczbę synaps przypadających na jeden neuron stwierdzono również w badaniach pośmiertnych [Davies i wsp., 1987].

W niektórych badaniach wykazano, że patologia w obrębie synaps może lepiej korelować z nasileniem zaburzeń funkcji poznawczych niż plaki amyloidowe i zwyrodnienie włóknienkowe [Coleman i wsp., 2003]. Stwierdzono również znamienne korelacje pomiędzy poziomem A β , natężeniem zaniku synaps oraz nasileniem zaburzeń funkcji poznawczych [Lue i wsp., 1999].

Na podstawie dotychczasowych badań wydaje się, że dysfunkcja synaps jest wynikiem toksycznego działania A β . Oligomery A β wykazują szczególne powinowactwo do zakończeń synaptycznych neuronów hipokampa [Lacor i wsp., 2004].

Wpływ toksycznego działania A β na liczbę synaps wykazano również w badaniach na myszach transgenicznych. Stwierdzono, że liczba zakończeń presynaptycznych znamienne spada wraz ze wzrostem rozpuszczalnych form A β zanim ulegną one depozycji w postaci plak amyloidowych [Mucke i wsp., 2000].

Kumulacja oligomerów A β w synapsach może sprzyjać dalszym patologicznym procesom, tzn. indukcji stresu oksydacyjnego, zaburzeniom homeostazy jonów wapnia oraz upośledzeniu funkcji mitochondriów i siateczki endoplazmatycznej; w sumie wzmagając aktywację kaskady apoptozy.

I.1.4.2.2.3. Stres oksydacyjny i zaburzenia homeostazy jonów metali

Obecnie uważa się, że stres oksydacyjny odgrywa znamioną rolę w etiopatogenezie AD, a powstawanie patologicznych złogów A β może być zarówno jego przyczyną jak i konsekwencją. W dotychczasowych badaniach wykazywano obecność licznych markerów stresu oksydacyjnego powiązanych z plakami amyloidowymi i zwyrodnieniem włóknkowym w tkance mózgowej chorych na AD [Butterfield i wsp., 2001]. Znaczenie stresu oksydacyjnego w etiopatogenezie AD potwierdza również fakt, że niektórzy badacze wykazali, że antyoksydanty mogą opóźnić postęp choroby [Sano i wsp., 1997]. W jednej z eksperymentalnych prac na myszach transgenicznym wykazano, że przyczyną stresu oksydacyjnego u chorych na AD może być A β [Poon i wsp., 2004]. W innych badaniach stwierdzono, że agregacji A β towarzyszą procesy będące wskaźnikami stresu oksydacyjnego, tzn. wytwarzanie H₂O₂ [Bush i wsp., 2003], peroksydacja lipidów oraz produkcja cytotoksycznego aldehydu 4-HNE (ang. *4-hydroxy-2-nonenal-HNE*) [Mark i wsp., 1995], który wydaje się zwiększać podatność neuronów na apoptozę [Tamagno i wsp., 2003] oraz stymulować oksydacyjną modyfikację białka tau sprzyjającą jego odkładaniu w postaci *NFTs* [Mattson i wsp., 1997].

Wydaje się również, że do uszkodzenia synaps indukowanego przez A β dochodzi za pośrednictwem mechanizmu stresu oksydacyjnego [Lauderback i wsp., 2002]. Na podstawie badań na myszach transgenicznym stwierdzono, że indukowane wiekiem zmiany w procesach stresu oksydacyjnego, poprzez stymulację aktywności β -sekreazy, zwiększają produkcję i odkładanie A β w mózgu [Apelt i wsp., 2004]. Na tej podstawie można wnioskować, że nie tylko A β stymuluje procesy stresu oksydacyjnego u chorych na AD, ale i odwrotnie, stres oksydacyjny może indukować amyloidogenezę [Gabuzda i wsp., 1994].

W etiopatogenezie AD stres oksydacyjny może wpływać na rozregulowanie homeostazy jonów metali, co sprzyja uszkodzeniom tkanki mózgowej [Rogers i wsp., 2004]. Stwierdzono podniesiony poziom jonów miedzi, żelaza i cynku w tkance mózgowej zawierającej plaki amyloidowe [Lovell i wsp., 1998]. Wykazano, że jony tych metali przyspieszają odkładanie

A β , wzmagają stres oksydacyjny towarzyszący procesowi formowania plak amyloidowych [Smith i wsp., 1997] oraz powodują, że A β jest bardziej neurotoksyczny [Moreira i wsp., 2000]. Wydaje się, że akumulacja jonów żelaza, miedzi i cynku może być głównym źródłem wolnych rodników odpowiedzialnych za stres oksydacyjny w AD [Kim i wsp., 1999].

I.1.4.2.2.4. Zaburzenia homeostazy cholesterolu

Cholesterol jest w fizjologicznych warunkach znaczącym komponentem neuronów (szczególnie błon komórkowych) oraz komórek glejowych. Jego zawartość w tkance nerwowej jest regulowana poprzez pozostające w równowadze procesy produkcji i usuwania jego metabolitów poprzez barierę krew-mózg. Wykazano, że w procesie rozwoju AD zwiększony poziom cholesterolu wpływa na produkcję oraz odkładanie A β w postaci plak amyloidowych [Reiss i wsp., 2004]. Związek pomiędzy dietą bogatą w tłuszcze a wysoką zawartością A β w tkance mózgowej wykazano na modelu zwierzęcym z wykorzystaniem myszy transgenicznych [Refolo i wsp., 2001]. Stwierdzono również, że cholesterol wpływa na zdolność wiązania A β z błonami komórkowymi oraz na jego cytotoksyczność [Subasinghe i wsp., 2003]. Również odwrotnie, to A β może indukować powstawanie cytotoksycznych metabolitów cholesterolu sprzyjając oksydacji cholesterolu do 7 β -hydroxycholesterolu, który ma działanie proapoptyczne [Nelson i wsp., 2004].

Głównym czynnikiem wpływającym na homeostazę cholesterolu w centralnym systemie nerwowym jest APOE. Wykazano, że izoforma $\epsilon 4$ ma większą tendencję do wiązania z A β niż $\epsilon 3$ [Puglielli i wsp., 2003].

Wykazano również, że APOE i cholesterol współwystępują w klasycznych blaszkach amyloidowych, co potwierdza ich współoddziaływanie w procesie tworzenia tych zmian patomorfologicznych [Burns i wsp., 2003].

I.1.4.2.2.5. Zaburzenia homeostazy jonów wapnia

Wyniki licznych badań donoszą o znaczeniu homeostazy jonów wapnia w procesie uszkodzania synaps i śmierci neuronów w AD [LaFerla i wsp., 2002]. Stwierdzono, że neurony zawierające zwyrodnienie włóknkowe wykazują podniesiony poziom jonów wapnia oraz proteaz wapnio-zależnych i kinaz aktywowanych wapniem [Xiao i wsp., 1996],

a enzym wiążący jony wapnia, kalpaina, uczestniczy w procesie hiperfosforylacji białka tau w tkance mózgowej chorych na AD [Veeranna i wsp., 2004].

Na podstawie badania przeprowadzonego na limfocytach pobranych od chorych na sporadyczną i rodzinną postać AD oraz od myszy transgeniczných (linia β APP oraz linia PSEN1), w którym wykazano zaburzenia homeostazy jonów wapnia w badanych próbkach, stwierdzono, że proces ten może mieć znaczenie w patogenezie zarówno postaci rodzinnej jak i sporadycznej AD [Eckert i wsp., 2001]. Wiadomo również, że mutacje w genach *PSEN* zwiększają wrażliwość neuronów na działanie $A\beta$, na ekscytotoksyczność oraz apoptozę na drodze mechanizmów wapnionależnych. Mechanizmy te wykorzystują zaburzenia homeostazy wapniowej w siateczce endoplazmatycznej oraz aktywację enzymów związanych z gospodarką wapniową (kalpaina, kaspaza-12) [Chan i wsp., 2002], zmiany w receptorach rianodynowych [Chan i wsp., 2000] a także w działaniu białka Herp, które stabilizuje homeostazę wapniową w siateczce endoplazmatycznej [Chan i wsp., 2004].

W AD zaburzenia wewnątrzneuronalnej gospodarki jonów wapnia mogą, na drodze zmiany w proteolizie β APP, powodować wzrost syntezy $A\beta_{42}$ [Gabuzda i wsp., 1994].

Z kolei $A\beta$ powoduje zaburzenia homeostazy jonów wapnia poprzez aktywację stresu oksydacyjnego, zwiększenie peroksydacji lipidów błonowych oraz zwiększenie wytwarzania aldehydu 4-HNE, który powoduje rozregulowanie transbłonowego transportu jonów wapnia [Mattson i wsp., 2003].

W badaniach z wykorzystaniem zwierzęcego modelu AD stwierdzono, że melatonina (antyoksydant oraz zmiatacz wolnych rodników), która poprawia pamięć i zdolności uczenia się, chroni przed wewnątrzkomórkowym przeładowaniem jonami wapnia, indukowanym $A\beta$ [Feng i wsp., 2004].

Homeostaza wapniowa, aktywacja kaspaz oraz kalpainy mają również znaczenie w indukowanych $A\beta$ zaburzeniach proliferacji oraz różnicowania komórek nerwowych, które to mechanizmy biorą udział w procesach uczenia się i zapamiętywania [Haughey i wsp., 2002].

Upośledzenie funkcji synaps w AD również ma związek z zaburzeniami homeostazy wapniowej [Mattson i wsp., 2003]. Stwierdzono, że synaptosomy poddane działaniu $A\beta$ wykazują upośledzenia działania ATPazy wapniowej [Mark i wsp., 1995].

Również w modelu zwierzęcym (mutanty mysz PSEN1) wykazano, że podniesiony presynaptyczny poziom jonów wapnia modyfikuje plastyczność synaps w hipokampie [Parent i wsp., 1999].

I.1.4.2.2.6. Zaburzenia funkcji mitochondriów i siateczki endoplazmatycznej

Na podstawie dotychczasowych badań wykazano, że gospodarka energetyczna tkanki mózgowej u chorych na AD jest wyraźnie zaburzona. Badania neuroobrazowe pokazują zmniejszone wykorzystanie glukozy w tkance mózgowej chorych na AD i coraz więcej danych wskazuje, że ten obraz może poprzedzać manifestację kliniczną choroby. Wykazano również zmniejszenie aktywności układów enzymatycznych uczestniczących w procesach energetycznych, w tym oksydazy cytochromu c, dehydrogenazy pirogronianowej oraz dehydrogenazy α -ketoglutarowej [Blass i wsp., 2001]. Jednocześnie wykazano, że degeneracja mitochondriów jest wczesnym zjawiskiem w patomechanizmie AD, wręcz poprzedzającym powstanie *NFT* [Manczak i wsp., 2004].

W kilku badaniach udokumentowano, że proteolityczna obróbka β APP pozostaje w korelacji z zaburzeniami funkcji energetycznych. W badaniach na myszach transgenicznym (mutanty β APP) wykazano zmniejszenie mózgowego metabolizmu glukozy współwystępujące ze zwiększonym odkładaniem $A\beta$ w obszarach związanych z funkcjami poznawczymi [Dodart i wsp., 1999] oraz znamienne zmniejszoną tolerancję na hipoksję [Büchner i wsp., 2002]. Najnowsze badania donoszą, że dysfunkcja mitochondriów odgrywa bardzo ważną rolę w procesie rozwoju AD [Hansson i wsp., 2004]. Wykazano, że $A\beta$ może wpływać na funkcjonowanie łańcucha oddechowego, prowadząc do wzmożonej produkcji wolnych rodników i w tym mechanizmie może uszkadzać mitochondria [Arias i wsp., 2002]. Stwierdzono również, że zwrotnie zaburzenia metabolizmu energetycznego mogą indukować amyloidogeny szlak obróbki β APP, sprzyjając odkładaniu neurotoksycznych form $A\beta$ [Gabuzda i wsp., 1994].

Wiadomo, że mitochondria pod względem położenia i funkcji pozostają w ścisłym związku z siateczką endoplazmatyczną co ma odzwierciedlenie również w mechanizmie rozwoju AD. Wykazano, że czynniki, które działają szkodliwie na siateczkę endoplazmatyczną, zwiększają uwalnianie cytochromu c z mitochondriów i powodują wzrost stężenia kaspazy-3, są hamowane przez Bcl-2 (heterogenna grupa białek hamująca apoptozę), które są powiązane z układem siateczki endoplazmatycznej [Häcki i wsp., 2000].

Niektóre badania donoszą, że śmierć neuronów w rodzinnej i sporadycznej postaci AD może mieć związek z uszkodzeniem siateczki endoplazmatycznej [Boya i wsp., 2002].

Stwierdzono, że mutacje w genach *PSEN1* i *PSEN2* powodują wzrost produkcji $A\beta$ oraz jednocześnie osłabiają tzw. odpowiedź na nieprawidłowo złożone białka (UPR,

ang.: *Unfolded Protein Response*). UPR jest jednym z mechanizmów obronnych wobec czynników uszkodzających siateczkę endoplazmatyczną i osłabienie UPR powoduje gromadzenie w niej nieprawidłowo złożonych białek [Paschen i wsp., 2003].

Znaczenie siateczki endoplazmatycznej w etiopatogenezie AD wykazano również na modelu zwierzęcym. Wykazano, że myszy pozbawione kaspazy-12 (enzym, który po uwolnieniu z siateczki endoplazmatycznej kieruje komórkę na drogę apoptozy), odporne są na toksyczne działanie A β [Nakagawa i wsp., 2000].

I.1.4.2.2.7. Rola apoptozy

Liczne badania donoszą, że apoptoza może być jednym z mechanizmów śmierci neuronów u chorych na AD. Potwierdzono to w badaniach eksperymentalnych na limfocytach poddanych działaniu różnych czynników ryzyka AD, które wykazywały zwiększoną podatność na śmierć na drodze apoptozy [Schindowski i wsp., 2003].

Przypuszczenia, że przynajmniej część neuronów u chorych na AD obumiera na drodze apoptozy potwierdzają: obecność pofragmentowanego DNA w tkance mózgowej chorych na AD [Shimohama, 2000], obecność aktywowanych form kaspazy-3, -8 i -9 [Yuan i wsp., 2000] oraz zmiana ekspresji genów związanych ze śmiercią komórkową jak Bcl-2 [Mattson, 2000].

Prawdopodobnie jednym z czynników indukujących śmierć neuronów na drodze apoptozy jest A β . W kilku badaniach potwierdzono, że wewnątrz- jak i zewnątrzpo pochodne ścieżki apoptozy, które angażują mitochondria, siateczkę endoplazmatyczną oraz transbłonowy układ sygnalizacyjny, są mediowane przez A β [Aly i wsp., 2004; Nakagawa i wsp., 2000; Agostinho i wsp., 2003; Li i wsp., 2004].

Zaproponowano kilka mechanizmów, na drodze, których A β miałby indukować apoptozę, m.in.: podniesienie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia i aktywacja kalpajny, [Boland i wsp., 2003], aktywacja kinaz, które regulują ekspresję genów apoptozy [Troy i wsp., 2001], wiązanie A β do zewnątrzkomórkowej domeny receptora p75NTR, co aktywuje kaspazę-3 i uruchamia proces apoptozy [Hashimoto i wsp., 2004] oraz zwiększenie liczby kanałów chlorkowych (CLIC1) i ich przepuszczalności, który to proces odgrywa rolę w aktywacji apoptozy neuronalnej [Novarino i wsp., 2004].

Wykazano również, że zwrotnie, mechanizmy generowane w procesie apoptozy stymulują procesy sprzyjające powstawaniu patologicznych złogów A β . Stwierdzono, że kaspazy *in vivo* są zaangażowane w proces cięcia β APP i indukują powstawanie amyloigenicznych form A β [Gervais i wsp., 1999].

W badaniach na myszach transgenicznym oraz na mózgach chorych na AD zasugerowano, że akumulacja A β wyzwała aktywację kaspaz, enzymów odpowiedzialnych za obróbkę białka tau, co może być wczesnym zjawiskiem w etiopatogenezie AD poprzedzającym powstawanie *NFTs* i wystąpienie objawów klinicznych [Rissman i wsp., 2004]. Wcześniej postulowano, że skoro białko tau jest cięte przez kaspazę-3, to można je uważać za efektor apoptozy [Fasulo i wsp., 2000].

I.1.4.2.2.8. Rola procesów zapalnych

Zaangażowanie procesów zapalnych w etiopatogenezę AD znalazło potwierdzenie w niektórych badaniach, które stwierdzają, że przewlekłe stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych znacząco zmniejsza ryzyko zachorowania na AD [Stewart i wsp., 1997]. Proces zapalny w tkance mózgowej prowadzi głównie do aktywacji komórek mikrogleju, astrocytów i w mniejszym stopniu neuronów [Akiyama i wsp., 2000]. Jednocześnie dochodzi do aktywacji całego zestawu czynników zapalnych: cytokin, chemokin, białek ostrej fazy oraz składników dopełniacza [Tuppo i wsp., 2005]. Wiadomo, że plaki amyloidowe związane są z aktywowanymi komórkami mikrogleju i reaktywnymi astrocytami. Stwierdzono, że komórki mikrogleju pozostające w związku z plakami wykazują nadekspresję prozapalnych receptorów oraz białek powierzchniowych, takich jak: antygen CD45, receptory antygeny powierzchniowego MHC II (CR3, CR4, LFA-1) oraz receptory immunoglobulin Fc γ (RI, RII, RIII). W sąsiedztwie plak amyloidowych stwierdzono również podniesiony poziom białek ostrej fazy (białka P, białka c-reaktywne) oraz inhibitorów proteaz (α 1-antychymotrypsyny, α 1-antytrypsyny), które są wskaźnikami aktywnego procesu zapalnego [Tuppo i wsp., 2005; Bamberger i wsp., 2002]. Ponadto fibrylarna postać A β indukuje syntezę i uwalnianie przez mikroglej prozapalnych cytokin (IL-1, IL-6, TNF- α) oraz chemokin [Yates i wsp., 2000]. Te uwalniane przez mikroglej czynniki prozapalne aktywują astrocyty, które poprzez produkcję cytokin, chemokin i białek ostrej fazy zwrotnie zwiększają aktywność mikrogleju [Tuppo i wsp., 2005; Bamberger i wsp., 2002]. Obecność aktywowanego mikrogleju wokół złogów A β może świadczyć o zaangażowaniu tych komórek w proces ich usuwania [Rogers i wsp., 2002]. Wykazano również, że włóknienkowa

postać A β wpływa na fagocytarną aktywność mikrogleju [Koenigsknecht i wsp., 2004]. Przypuszcza się, że za interakcje A β -mikroglej odpowiedzialne są receptory błonowe takie jak: CD36, α 6 β 1 integryny oraz CD47 [Bamberger i wsp., 2003]. Zdolność fagocytarna mikrogleju może być wspomagana przez aktywowane astrocyty [D'Andrea i wsp., 2004]. Równocześnie na podstawie obserwacji, że astrocyty mogą zawierać A β w postaci lizosomalnych ziarnistości, stwierdzono, że komórki te również mogą odgrywać rolę w eliminacji złogów amyloidowych [D'Andrea i wsp., 2004]. Wynika z tego, że mikroglej i aktywowane astrocyty mogą współdziałać w podtrzymaniu procesu zapalnego.

W związku z powyższym wydaje się, że skoro aktywowany mikroglej bierze udział w usuwaniu złogów amyloidowych, zahamowanie niespecyficznie jego aktywności może sprzyjać dalszemu postępowi choroby [D'Andrea i wsp., 2004].

I.1.5. Leczenie i profilaktyka choroby Alzheimera

Pomimo ogromnej liczby badań podejmujących próbę wyjaśnienia mechanizmu rozwoju AD, etiopatogeneza tej choroby ciągle nie jest dokładnie poznana. Z tego powodu nie znane jest leczenie przyczynowe tej choroby ani skuteczne metody profilaktyki. Jedyne dostępne leczenie ma wyłącznie charakter objawowy. Cały czas trwają jednak intensywne poszukiwania preparatów mających wpływ na różne etapy patofizjologii AD (Tabela 3).

I.1.5.1. Leki modulujące neurotransmisję

Jedyną dotychczas zaakceptowaną i szeroko wykorzystywaną metodą leczenia AD jest stosowanie preparatów mających wpływ na neurochemiczne podłoże choroby, a dokładnie na układ cholinergiczny i glutaminergiczny.

I.1.5.1.1. Leki modulujące neurotransmisję w układzie cholinergicznym

Neuroprzekaźnikiem w układzie cholinergicznym jest acetylocholina, która jest syntetyzowana za pomocą acetylocholintransferazy w zakończeniach neuronów cholinergicznym z cholicy i aktywowanego octanu (acetylokoenzymu A). Jest ona pakowana w pęcherzykach synaptycznych, skąd jest uwalniana do szczeliny synaptycznej pod wpływem potencjału czynnościowego. W AD aktywność acetylocholintransferazy w korze mózgowej i hipokampie spada od 50 do 90% [Blennow, de Leon, Zetterberg, 2006].

Istnieje kilka dróg, które teoretycznie mogą zwiększać przekąźnictwo w układzie cholinergicznym: bezpośrednie podawanie acetylocholicy; zwiększone podawanie jej prekursorów, np. lecytyny; zwiększenie uwalniania acetylocholicy z pęcherzyków presynaptycznych; hamowanie jej rozkładu oraz bezpośrednie działanie na jej receptory. Spośród wyżej wymienionych sposobów zwiększania przekąźnictwa w układzie cholinergicznym jedynie w wypadku preparatów hamujących rozkład acetylocholicy (AChEI) wykazano skuteczne działanie objawowe i jednocześnie zadawalający profil bezpieczeństwa.

Esteraza acetylocholinowa to enzym, który rozkłada acetylocholinę będącą najważniejszym neuroprzekaźnikiem biorącym udział w procesach poznawczych. Zahamowanie jej

aktywności powoduje, poprzez podwyższenie stężenia acetylocholiny w przestrzeni synaptycznej, poprawę przekazywania cholinergicznego i funkcji poznawczych.

Obecnie w Polsce zarejestrowane są trzy preparaty: donepezil (Aricept®, Yasnal®, Donepex®, Cogiton®) rywastygmina (Exelon®) oraz galantamina (Reminyl®).

Badania oceniające efekt działania wszystkich preparatów z grupy AChEI stwierdzają, że osiągają one podobne wyniki i wykazują umiarkowany efekt objawowy (różnica pomiędzy leczonymi AChEI w porównaniu z placebo oceniana w standardowej skali oceny funkcji poznawczych ADAS-cog (*ang. Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive subscale*), wynosi zwykle 3-5 punktów w czasie około 6 miesięcy), ponadto poprawiają aktywność dnia codziennego oraz redukują niektóre zaburzenia psychiczne towarzyszące otępieniu (omamy, urojenia, apatia, pobudzenie i nadaktywność) [Rogers i wsp., 1998; Rosler i wsp., 1999; Wilcock i wsp., 2000]. Poniżej przedstawiono wyniki opublikowanej w 2006 r. zbiorczej analizy na temat skuteczności leczenia AD donepezilem, rywastygminą i galantaminą [Takeda i wsp., 2006]. W analizie tej wzięto pod uwagę 26 randomizowanych badań, które oceniały skuteczność terapii jednym z leków z grupy AChEI w porównaniu z pozostałymi lub z grupą kontrolną. Liczba pacjentów biorących udział w badaniach oceniających skuteczność leczenia donepezilem wahała się od 34 do 273. W różnych badaniach z rywastygminą brało udział od 23 do 243 pacjentów, a z galantaminą od 55 do 253. Czas obserwacji w 13 badaniach oceniających skuteczność donepezilu wahał się od 12 do 60 tygodni, w czterech badaniach oceniających skuteczność leczenia rywastygminą od 13 do 26 tygodni, a czas trwania badań oceniających skuteczność galantaminy od 12 do 26 tygodni. Do analizy włączono również 3 badania porównujące dwa leki, donepezil z rywastygminą oraz jedno porównujące donepezil z galantaminą. Spośród skal oceniających funkcje poznawcze najczęściej stosowane były: skala ADAS-cog i skala MMSE. W prawie wszystkich badaniach (w 20 na 26) w końcowej ocenie skuteczności leczenia stosowano skalę ADAS-cog. W ostatecznych wnioskach stwierdzono, że stosowanie AChEI istotnie spowalnia postęp choroby w czasie 6 miesięcznego leczenia.

Również profil działań ubocznych wszystkich AChEI jest podobny. Należą do nich głównie objawy wynikające z obwodowej stymulacji przekazywania cholinergicznego, np.: nudności, wymioty, biegunka, spadek łaknienia, skurcze mięśni, łzawienie, surowiczy wyciek z nosa a także bóle głowy i uczucie ogólnego osłabienia.

Choć większość badań oceniających skuteczność leczenia AChEI przeprowadzana była u chorych na AD w stopniu łagodnym lub umiarkowanym i stosowanie leków tej grupy rekomendowane jest właśnie u tych chorych, w ostatnich latach wykazano, że leki te mogą przynieść korzyść również chorym na AD w stopniu zaawansowanym. W badaniu Wilkinsona i wsp. brało udział 906 chorych na AD w stopniu od umiarkowanego do nasilonego (w skali MMSE w chwili włączenia do badania osiągnęli od 10 do 27 punktów). Po okresie 24 tygodni, w którym pacjenci otrzymywali donepezil lub placebo, stwierdzono, że w grupie leczonej donepezilem procent chorych, którzy spełniali kryterium pogorszenia był znacząco niższy niż w grupie placebo. Ponadto stwierdzono, że u chorych, którzy spełnili kryterium pogorszenia, a leczeni byli donepezilem, pogorszenie to w ocenie MMSE było mniej nasilone w porównaniu z placebo [Wilkinson i wsp., 2009].

Kolejnym lekiem z grupy AChEI jest odkryty w latach 80' huperzine A (wyciąg z zioła *Huperzia serrata*). W 2007 roku zakończyło się badanie kliniczne II fazy oceniające skuteczność leczenia huperzine A u chorych na AD, w którym wykazano znaczącą poprawę funkcji poznawczych ocenianych za pomocą skali ADAS-cog u chorych otrzymujących 400ug dwa razy dziennie przez 16 tygodni w porównaniu z grupą placebo [Huperzine A in Alzheimer's disease. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00083590>, 2009]. Jednocześnie stwierdzono, że lek ten był dobrze tolerowany, nawet przez chorych, którzy wcześniej mieli nasilone działania uboczne po stosowaniu zarejestrowanych leków z grupy AChEI. Inny preparat huperzine A, tzw. ZT-1 (DEBIO-9902 SR), postać o przedłużonym uwalnianiu, podawana w postaci iniekcji, jest obecnie w trakcie badań klinicznych II fazy [Efficacy study of a ZT-1 implant in patients suffering from Alzheimer's disease (BRAINz), 2009].

I.1.5.1.2. Leki modulujące neurotransmisję w układzie glutaminergicznym

Inną strategią stosowaną w terapii AD jest blokowanie nadmiernej transmisji glutaminergicznej, która prowadzi do ekscytotoksyczności. Jest to proces, który na drodze nadmiernego napływu jonów wapnia do komórki nerwowej, odpowiedzialny jest za dysfunkcję i śmierć neuronów [Michaelis, i wsp., 1998].

Memantyna (Axura®) jest częściowym antagonistą receptora NMDA (ang. *N-methyl-D-aspartic acid*), który stanowi element układu glutaminergicznego. W badaniach przedklinicznych wykazano, że memantyna prawdopodobnie blokuje NMDA i chroni przed

niekontrolowanym napływem jonów wapnia do komórek nerwowych tylko w wypadku nadmiernej stymulacji neuronów. Pozostawia ona kanały wapniowe częściowo otwarte, wtedy, gdy transmisja glutaminergiczna jest prawidłowa [Lipton, i wsp., 2004].

W 28-tygodniowym podwójnie ślepy i kontrolowanym placebo badaniu, przeprowadzonym u chorych z nasileniem choroby od stopnia średniego do zaawansowanego, wykazano, że osoby leczone memantyną charakteryzuje lepsze funkcjonowanie w codziennym życiu i wyższy poziom funkcji poznawczych w porównaniu z osobami otrzymującymi placebo [Reisberg i wsp., 2003].

Jednoczenie lek ten był dobrze tolerowany i pacjenci leczeni memantyną nie zgłaszali więcej działań ubocznych w porównaniu z chorymi otrzymującymi placebo. W innym badaniu wykazano też, że, u chorych na AD z nasileniem choroby od stopnia średniego do zaawansowanego, donepezil podawany w połączeniu z memantyną daje lepszy efekt niż sam donepezil [Tariot i wsp., 2004].

Najczęstsze raportowane działania uboczne memantyny to: ból i zawroty głowy, nadciśnienie tętnicze, senność, zaparcia.

Dimebon, preparat dotychczas stosowany w Rosji ze względu na jego działanie antyhistaminowe, jednocześnie wykazuje właściwości hamujące wobec acetylocholinesterazy i receptorów NMDA – dwóch głównych mechanizmów, na których opiera się dotychczasowa terapia AD. Coraz więcej badań wskazuje jednak, że dodatkowym mechanizmem, dzięki któremu dimebon może być skuteczny w leczeniu AD jest zdolność do stabilizacji funkcji mitochondriów [Bachurin i wsp., 2003]. W 2008 roku opublikowano obiecujące wyniki randomizowanego, podwójnie ślepego, kontrolowanego placebo badania klinicznego II fazy oceniającego skuteczność i bezpieczeństwo stosowania dimebonu. [Doody i wsp., 2008].

W badaniu tym brało udział 183 chorych na AD, którzy po 26 tygodniach stosowania dimebonu w dawce 20mg trzy razy dziennie, wykazywali znamienne poprawę funkcji poznawczych ocenianych w skali ADAS-cog w porównaniu z grupą placebo. W ocenie bezpieczeństwa stosowania badanego leku wykazano, że u osób leczonych dimebonem w porównaniu z placebo częściej występowała depresja. Obecnie dimebon badany jest w III fazie wielośrodkowego badania klinicznego [An efficacy study of dimebon in patients with moderate to severe Alzheimer's disease., 2009].

I.1.5.2. Inne koncepcje terapeutyczne

I.1.5.2.1. Terapia antyoksydacyjna

Coraz liczniejsze doniesienia na temat znaczenia stresu oksydacyjnego i gromadzenia w nadmiarze wolnych rodników w tkance mózgowej w etiopatogenezie AD, przyczyniły się do postrzegania antyoksydantów jako substancji mogących potencjalnie przynieść korzyść w leczeniu tej choroby. Spośród antyoksydantów największe znaczenie w leczeniu AD przypisuje się α -tokoferolowi (witamina E) oraz selegiline. Witamina E jest zaliczana do witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, jest głównym przeciwutleniaczem występującym w komórkach, natomiast selegilina jest selektywnym inhibitorem monoaminooksydazy B o własnościach antyoksydacyjnych. W 1997 roku opublikowano wyniki wieloośrodkowego, podwójnie ślepego, randomizowanego badania, w którym porównywano efekt leczenia chorych na AD w średnim stopniu nasilenia choroby, witaminą E (2000IU/dobę), selegiliną (10mg/dobę), ich kombinacją lub placebo [Sano i wsp., 1997]. W badaniu tym, w ocenie funkcji poznawczych po dwóch latach stosowania leków, nie wykazano różnic pomiędzy czterema badanymi grupami. Okazało się jednak, że zaproponowana terapia może modyfikować przebieg choroby. Obserwowano opóźnienie wystąpienia niektórych niekorzystnych zdarzeń w naturalnym przebiegu choroby, jak: konieczność zapewnienia stałej opieki, umieszczenie w placówce opiekuńczej czy śmierć pacjenta. Należy jednak zwrócić uwagę, że w badaniu tym witamina E podawana była w bardzo dużych dawkach, więc powszechnie stosowana praktyka dołączania witaminy E, w rutynowych dawkach, do AChEI nie jest zasadna, a według niektórych badań nieskuteczna [Sobów i wsp., 1999]. Ponadto po ponownym przeanalizowaniu danych opublikowanych w 1997 roku i uwzględnieniu różnic pomiędzy badanymi grupami wydaje się, że wyniki badania Sano i wsp. są niewystarczające do rekomendowania witaminy E w leczeniu AD [Tabet i wsp., 2000].

Okazało się natomiast, że stosowanie witaminy E jest zasadne w profilaktyce AD. Wykazano, że stosowanie kombinacji witamin E i C jako suplementu diety może zmniejszać zapadalność na AD [Zandi i wsp., 2004]. Obserwacje te potwierdzono w badaniu Engelharta i wsp., w którym badano czy stosowanie w diecie antyoksydantów takich jak: witamina C i E, β -karoten, flawonoidy ma znaczenie dla ryzyka zachorowania na AD. Stwierdzono, że po uwzględnieniu takich parametrów jak: wiek, płeć, ilość spożywanego alkoholu, poziom wykształcenia, palenie papierosów, BMI, ilość spożywanych kalorii oraz stan funkcji

poznawczych w chwili włączenia do badania, spożywanie dużej ilości witamin C i E związane jest z mniejszym ryzykiem zachorowania na AD [Engelhart i wsp., 2002].

W innym badaniu, przeprowadzonym przez Laurin i wsp., jednak nie wykazano, aby stosowanie witaminy C i E, β -karotenu oraz flawonoidów przez osoby w średnim wieku zmniejszało ryzyko wystąpienia otępienia w starszym wieku [Laurin i wsp., 2004].

Do grupy antyoksydantów, potencjalnie mogących mieć znaczenie w leczeniu AD, należy również kwas α -liponowy. Jest on koenzymem dla mitochondrialnej dehydrogenazy pirogronianowej i może wspomagać działanie innych antyoksydantów, jak witamina C, E i glutation [Packer i wsp., 1997]. Na modelu zwierzęcym wykazano, że suplementacja kwasu α -liponowego w późnym wieku może poprawiać funkcje mitochondriów, zmniejszać szkody powstałe w wyniku stresu oksydacyjnego oraz poprawiać metabolizm komórkowy [Hagen i wsp., 1999].

W jednym z badań wykazano, że stosowanie 600 mg/dobę kwasu α -liponowego u pacjentów chorych na AD przez okres średnio 337 dni, wspomagało stabilizację postępu choroby [Hager i wsp., 2001].

Należy dodać jednak, że w badaniu Frölicha i wsp. wykazano, że kwas α -liponowy poprawia działanie dehydrogenazy pirogronianowej u chorych z otępieniem naczynioopchodnym, natomiast nie u chorych na AD [Frölich i wsp., 2004].

Wpływ ekstraktów *Ginkgo biloba* na funkcje poznawcze u chorych na AD badano kilkakrotnie. Wyniki badań dostarczyły sprzecznych informacji. Wykazano, że *Ginkgo biloba*, który zawiera m.in. flawonoidy i terpenoidy, poprzez działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne oraz udział w mechanizmach cholinergicznym, może modyfikować procesy warunkujące przebieg AD [Perry i wsp., 1999].

W jednym z badań, w którym stosowano EGb 716, ekstrakt *Ginkgo biloba*, u chorych na otępienie (w tym AD lub otępienie naczyniopochodne), wykazano, że w porównaniu z osobami otrzymującymi placebo, chorzy stosujący *Ginkgo biloba* uzyskiwali wyraźnie lepsze wyniki w skalach oceniających funkcje poznawcze, codzienną aktywność oraz zachowania społeczne [Le Bars i wsp., 1997].

Innych danych natomiast dostarcza ostatnio opublikowane badanie (randomizowane, kontrolowane placebo, podwójnie ślepe), w którym brało udział 3069 osób w wieku 72 do 96 lat, u których przez okres ponad 6 lat, ekstrakt *Ginkgo biloba* stosowano 2 razy dziennie w dawce 120 mg [Snitz i wsp., 2009]. W badaniu tym nie wykazano, aby

w porównaniu z osobami otrzymującymi placebo, osoby leczone *Ginkgo biloba* wykazywały mniej nasilone zaburzenia funkcji poznawczych.

I.1.5.2.2. Leki wpływające na procesy zapalne

Retrospektywne obserwacje wykazały, że stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych może chronić przed rozwojem AD [Etminan i wsp., 2003; in t' Vel i wsp., 2001; Zandi i wsp., 2002; Beard i wsp., 1998; Breitner i wsp., 1994; McGee i wsp., 1996].

Na podstawie metaanalizy opublikowanej w 2003 roku, do której włączono dziewięć badań, wysunięto wniosek, że stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych zmniejsza ryzyko zachorowania na AD, a większe korzyści niesie ze sobą długotrwałe stosowanie tych leków niż stosowanie ich z przerwami [Etminan i wsp., 2003].

Jednakże ten ochronny efekt działania niesteroidowych leków przeciwzapalnych nie dotyczy osób z już stwierdzoną AD. W badaniach, w których stosowano te leki u osób chorujących na AD nie zarejestrowano ich korzystnego działania [Aisen i wsp., 2003; Van Gool, 2001] lub skuteczność była minimalna [Rogers i wsp., 1993; Aisen i wsp., 2002].

W związku z powyższym niesteroidowe leki przeciwzapalne nie są rekomendowane w leczeniu AD.

I.1.5.2.3. Hormonoterapia zastępcza

Wykazano, że hormony płciowe uczestniczą w procesach różnicowania komórek nerwowych, ich plastyczności oraz w neurotransmisji. Na podstawie dotychczasowych badań wydaje się, że estrogeny mogą sprzyjać stymulacji receptorów NMDA i w ten sposób wywierać pozytywny wpływ na procesy uczenia się i zapamiętywania oraz na synaptogenezę w strukturach hipokampa [McEwen i wsp., 2001].

Ponadto estrogeny mogą również wywierać działanie antyoksydacyjne [Behl i wsp., 1997].

W pojedynczych badaniach wykazano, że u kobiet w wieku post-menopauzalnym stosujących estrogeny, ryzyko wystąpienia AD jest mniejsze [Tang i wsp., 1996; Baldereschi i wsp., 1998].

Ponadto w badaniach neuroobrazowych stwierdzono poprawę metabolizmu mózgowego u kobiet stosujących estrogeny [Maki i wsp., 2001].

Pomimo udowodnionego neuroprotektoryjnego działania estrogenów nie wykazano, aby ich

stosowanie u chorych na AD wpływało na poprawę funkcji poznawczych, czy na jakość życia [Mulnard i wsp., 2000].

A dodatkowo wykazano, że stosowanie preparatów zawierających jednocześnie estrogeny i progesteron może zwiększać ryzyko wystąpienia udaru i otępienia [Shumakeri wsp., 2003].

Powyższe dane przekonują, że nie ma w chwili obecnej podstaw do rekomendowania hormonoterapii zastępczej w leczeniu AD.

I.1.5.2.4. Terapie wpływające na biologię A β

I.1.5.2.4.1. Inhibitory γ - i β -sekretyz

Odkąd wykazano znaczenie γ -sekretyz oraz β -sekretyz w procesie powstawania A β trwają poszukiwania inhibitora tych enzymów, jako potencjalnej strategii terapeutycznej w leczeniu AD. Zidentyfikowano trzy grupy inhibitorów γ -sekretyzy: peptydowe, arylosulfonamidowe oraz laktamowe [Josien, 2002].

W badaniach na modelach zwierzęcych wykazano, że inhibitory γ -sekretyz o symbolach: BMS-299897 i LY411,575 zmniejszają ilość A β w mózgach badanych zwierząt [Barten i wsp., 2005; Wong i wsp., 2004].

Natomiast spośród wszystkich badanych inhibitorów γ -sekretyz do badań klinicznych III fazy wszedł tylko preparat o symbolu LY450139 [Effect of LY450139 on the long term progression of Alzheimer's disease., 2009; Effects of LY450139 on the progression of Alzheimer's disease as compared with placebo (IDENTITY-2), 2009]. W fazie drugiej badań klinicznych oceniających skuteczność tego leku brało udział 51 pacjentów. Badanie trwało 14 tygodni. Wykazano, że u chorych stosujących badany lek poziom A β w surowicy (ale nie w płynie mózgowo-rdzeniowym) był znamienne niższy w porównaniu z osobami przyjmującymi placebo [Fleisher i wsp., 2008]. Nie wykazano jednak wpływu badanego leku na poprawę funkcji poznawczych. Jedyne działania uboczne stosowania badanego leku, jakie zaraportowano to przejściowe zaparcia i wysypka.

Wykorzystanie inhibitorów γ -sekretyz w badaniach klinicznych może być trudne i obarczone licznymi działaniami niepożądanymi. Wynika to z faktu, że hamowany enzym wpływa również na inne substraty, takie jak: receptor Notch (może to mieć znaczenie dla układu krwiotwórczego i odpornościowego) [De Strooper i wsp., 1999; Hadland i wsp., 2001] czy Erb-B4 (odgrywa rolę w procesie proliferacji i różnicowania komórek) [Ni i wsp., 2001].

Unieczynnienie tego enzymu może skutkować również odkładaniem się toksycznych metabolitów β APP, m.in. CTF β (cytoplazmatyczny produkt cięcia APP przez β -sekretazę) [Mao i wsp., 2009].

Bardziej obiecującą strategią terapeutyczną wydaje się być zahamowanie β -sekretazy.

W badaniach z wykorzystaniem myszy, u których unieczynniono gen BACE1, wykazano, że u zwierząt tych nie stwierdza się wytwarzania A β (co może potwierdzać, że BACE1 jest główną β -sekretażą), bez istotnych działań ubocznych. [Cai i wsp., 2001; Luo i wsp., 2001].

Znajomość specyficzności substratowej β -sekretazy pozwoliła zaprojektować ich inhibitory peptydowe (m.in. OM99-1, OM99-2, [Ghosh i wsp., 2008] OM00-3 [Hong i wsp., 2002] oraz inhibitory niepeptydowe, o teoretycznie lepszej biodostępności i lepszej penetracji do centralnego systemu nerwowego [Francotte i wsp., 2004].

Wykazano też, że MG132 (aldehyd białkowy) znany jako inhibitor γ -sekretazy, ma również aktywność hamującą wobec β -sekretazy [Steinhilb i wsp., 2000].

Aktywowanie α -sekretazy niesie ze sobą duże ryzyko z tego względu, że istnieje wiele enzymów wykazujących taką aktywność i ich bezpośrednia farmakologiczna stymulacja może spowodować wiele działań ubocznych. Warto zauważyć jednak, że obecnie stosowane leki, jak AChEI, prawdopodobnie stymulują także aktywność α -sekretazy poprzez pośrednie aktywowanie kinazy proteinowej C [Pakaski i wsp., 2003].

W warunkach laboratoryjnych wykazano również inne drogi stymulowania nieamyloidogennej drogi metabolizmu β APP. Substancje, które w tym mechanizmie mogą obniżać poziom A β to m.in.: forbolowo-estrowe inhibitory kinazy proteinowej C, inhibitory fosfataz proteinowych 1 i 2A, inhibitory kinazy syntazy glikogenu-3 β (GSK3 β) (np. sole litu) czy niektóre hormony (estradiol, dihydroepiandrosteron) [Gandy, 2002].

I.1.5.2.4.2. Leki wpływające na eliminację amyloidu- β

Zaproponowano trzy główne strategie mające na celu usunięcie zgromadzonego już w tkance mózgowej A β : immunizację anty-A β , rozbicie włókien lub złogów A β oraz modyfikację mediowanego cholesterolem transportu A β [Scarpini i wsp., 2003].

Wyniki pierwszych badań przeprowadzonych przez Schenka i wsp., w których wykorzystywano aktywną immunizację anty-A β jako jedną z metod usuwania złogów A β z mózgu, opublikowano w 1999 roku [Schenk i wsp., 1999].

Eksperyment ten przeprowadzono na myszach transgenicznym, u których dokonano ekspresji zmutowanego genu β APP i w ten sposób spowodowano u nich rozwój amyloidozy mózgowej. Zaobserwowano, że podawanie obwodowo małych dawek A β młodym zwierzętom (6-tygodniowym) zapobiega rozwojowi amyloidozy, a gdy podawano tę szczepionkę zwierzętom, u których choroba jest zaawansowana (11-miesięcznym) odnotowano u nich znaczne zmniejszenie nasilenia amyloidozy. Na tej podstawie wyciągnięto wnioski, że szczepionka ta może mieć zarówno działanie zapobiegawcze jak i lecznicze. Wyniki tego doświadczenia potwierdzono w badaniu przeprowadzonym na tak samo zmodyfikowanych myszach, którym podawano szczepionkę donosowo [Weiner i wsp., 2000].

W innych badaniach przeprowadzonych na myszach transgenicznym wykazano, że aktywna immunizacja ma wpływ nie tylko na odkładanie się A β , ale też na procesy poznawcze i zachowanie zwierząt [Janus i wsp., 2000; Morgan i wsp., 2000].

Wykazano redukcję złogów amyloidowych o około 50% oraz wpływ na funkcje poznawcze, ale nie na całkowite stężenie A β w mózgu. Możliwe, zatem jest, że działanie prokognitywne szczepionki polega na wiązaniu się przeciwciał z rozpuszczalnymi, ale toksycznymi formami A β .

Stwierdzono również skuteczność bezpośredniego podawania przeciwciał, czyli pasywnej immunizacji. Strategia ta prowadzi do zmniejszenia ilości złogów amyloidowych u myszy transgenicznym poprzez fagocytowanie ich przez komórki mikroglejowe oraz usuwanie amyloidu do krążenia [Bard i wsp., 2000; DeMattos i wsp., 2001].

Udowodniono również pozytywny wpływ aktywnej immunizacji na funkcje poznawcze u zwierząt transgenicznym [Dodart i wsp., 2002]. Niestety wykazano, że wraz ze wzrostem ilości złogów amyloidowych odpowiedź na szczepionkę zmniejsza się, co może świadczyć o jej nieskuteczności w zaawansowanych stadiach choroby [Das i wsp., 2001].

Przeprowadzone u chorych na AD badanie kliniczne II fazy z zastosowaniem szczepionki musiało zostać przerwane ze względu na poważne działania niepożądane (u około 5% badanych wystąpiło zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu) [Gilman, i wsp., 2005]. Na tej podstawie można przypuszczać, że aktywna immunizacja może okazać się niemożliwa do zastosowania w badaniach na ludziach.

Szanse pozostawia jednak zastosowanie immunizacji pasywnej lub immunizacji aktywnej, ale wykorzystującej immunogeny zawierające niepełną sekwencję A β [Sigurdsson i wsp., 2002].

Obecnie trwają badania II fazy oceniające skuteczność i bezpieczeństwo dwóch preparatów aktywnie immunizujących: ACC-001 i CAD106 [Study evaluating safety, tolerability, and immunogenicity of ACC-001 in subjects with Alzheimer's disease.; Safety and tolerability of repeated subcutaneous injections of CAD106 in mild Alzheimer's patients].

Spośród kilku badanych preparatów działających w oparciu o immunizację pasywną, jedynie bapineuzumab (AAB-001) przeszedł do III fazy badań klinicznych. Bapineuzumab jest przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko A β . Cztery niezależne, trwające 18 miesięcy badania, do których zarekrutowano w sumie około 4 tysiące chorych na AD w stopniu łagodnym lub umiarkowanym, ma za zadanie ocenić skuteczność różnych dawek bapineuzumabu w porównaniu z placebo [Study evaluating the efficacy and safety of bapineuzumab in Alzheimer disease patients, 2009; Study evaluating the safety and efficacy of bapineuzumab in Alzheimer disease patients, 2009; Bapineuzumab in patients with mild to moderate Alzheimer's disease, 2009].

Badanie II fazy, którego wyniki opublikowano w 2008 roku, ukończyło 78 pacjentów [Grundman i Black, 2008]. W badaniu tym stwierdzono, że pacjenci, którym podawano bapineuzumab przez 18 miesięcy, wykazywali znamienne poprawę w skali ADAS-cog w porównaniu z chorymi otrzymującymi placebo. Stwierdzono, że działania niepożądane badanego leku wystąpiły u ponad 5 % pacjentów leczonych bapineuzumabem i były one w tej grupie ponad dwa razy częstsze w porównaniu z grupą placebo. Objawy te miały jedynie umiarkowane nasilenie i nie miały wpływu na przedterminowe zakończenie udziału w badaniu. Ostateczne wnioski, co do skuteczności i bezpieczeństwa stosowania bapineuzumabu będą możliwe dopiero w 2011 roku, kiedy to zaplanowano zakończenie III fazy badań klinicznych.

Możliwość rozbicia włókien lub złogów A β stała się kolejnym punktem uchwytu dla poszukiwań nowych strategii terapeutycznych w AD. Wykazano, że łączenie jonów cynku i miedzi z A β stymuluje jego agregację [Cherny i wsp., 1999]. Na tej podstawie wyciągnięto wniosek, że zastosowanie klio chinolu, który jest hydrofobowym chelatorem jonów miedzi i cynku i który swobodnie przenika przez barierę krew-mózgu, może być obiecującą koncepcją terapeutyczną w leczeniu AD.

W badaniach na myszach transgenicznym wykazano, że doustne podawanie kliochoinu zwiększa ilość rozpuszczalnego A β w mózgach badanych zwierząt oraz zmniejsza ilość plak amyloidowych. [Masters, 2002].

W 2003 roku opublikowano wyniki pilotażowego badania klinicznego II fazy, do którego zrandomizowano 36 pacjentów chorych na AD z umiarkowanym nasileniem choroby, którym podawano kliochoin przez okres od 25 do 36 tygodni [Ritchie i wsp., 2003]. W badaniu tym wykazano, że u chorych, szczególnie z większym nasileniem choroby, stosujących kliochoin narastanie zaburzeń funkcji poznawczych jest znacznie mniej nasilone w porównaniu z chorymi otrzymującymi placebo. Ponadto obserwowano zmniejszenie poziomu A β 42 w surowicy chorych leczonych kliochoinonem w porównaniu z grupą placebo. W badaniu tym nie obserwowano poważnych działań nieporządkanych. Dane te przekonywały, że leki z grupy chelatorów metali mogą wpływać na przebieg AD i polepszać rokowanie w tej chorobie. Ostatecznie jednak, zaniechano dalszych badań ze względu na poważne powikłanie związane ze stosowaniem tego leku, jakim jest podostra neuropatia rdzeniowo-oczna [Cahoon, 2009].

Kolejna koncepcja terapeutyczna, wpływająca na zmniejszenie ilości A β związana jest z białkiem SAP (ang. *serum amyloid P*) i roli, jaką odgrywa w stabilizacji włókien amyloidowych [Pepys i wsp., 2002]. Białko SAP jest glikoproteiną występującą w normalnych warunkach w surowicy i ma zdolność wiązania się z wszystkimi typami włókien amyloidowych, w tym z A β , chroniąc je przed destabilizacją i degradacją. Wykazano obecność tego białka w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych na AD oraz w patologicznych zmianach typowych dla tej choroby, w plakach amyloidowych i zwyrodnieniu włóknkowym [Tennent i wsp., 1995].

W badaniach na zwierzęcym modelu amyloidozy systemowej wykazano, że delecja w genie białka SAP daje pozytywne efekty terapeutyczne i w związku z tym zaprojektowanie inhibitora tego białka dało szansę na skuteczną terapię chorych na AD [Pepys i wsp., 2002].

W badaniu Kolstoe i wsp. brało udział pięciu pacjentów w wieku od 53 do 67 lat z rozpoznaną prawdopodobną AD, którym przez 12 tygodni, trzy razy dziennie, podskórną podawano preparat o nazwie CPHPC (ang.: *bis(D-proline) compound, (R)-1-[6-[(R)-2-carboxy-pyrrolidin-1-yl]-6-oxo-hexanoyl]pyrrolidine-2-carboxylic acid*). Uważa się, że substancja ta hamuje wiązanie się SAP z włóknami amyloidowymi [Pepys i wsp., 2002].

U chorych leczonych CPHPC obserwowano zmniejszenie ilości SAP w krążeniu oraz praktycznie jego eliminację z płynu mózgowo-rdzeniowego. Jednocześnie nie obserwowano

poważnych działań ubocznych tego leczenia. Choć u leczonych chorych nie wykazano poprawy w zakresie funkcji poznawczych, te wstępne obserwacje zachęcają do rozwinięcia tej koncepcji terapeutycznej w dalszych badaniach.

Opisano również substancje, które hamują zmiany konformacyjne amyloidu prowadzące do formowania struktur arkusza β , który to proces jest kluczowy w procesie formowania złogów amyloidowych. Substancje te nazwano „beta-łamaczami (ang.: *beta-breakers*). Są to krótkie peptydy, przypominające odcinek 17-21 peptydu $A\beta$, który odgrywa kluczową rolę w procesie tworzenia amyloidowego rdzenia. Zawierają one aminokwasy, które uniemożliwiają formowanie struktur β . Peptydy te łącząc się z sekwencjami $A\beta$, uniemożliwiają formowanie struktur β i hamują ich agregację. Pierwszym peptydem o takich właściwościach był amid PPI-368. Nie tylko hamował on proces nukleacji, ale jednocześnie redukował długość już istniejących włókien amyloidowych [Findeis i wsp., 1999].

Okazało się jednak, że PPI-368 jest podatny na działanie proteolityczne enzymów osocza, co uniemożliwia jego stosowanie w terapii.

Przeżytnictwo oparte na działaniu insuliny jest znanym czynnikiem wpływającym na procesy pamięciowe oraz może odgrywać rolę w regulacji metabolizmu APP i $A\beta$ [Watson i Draft, 2003]. Jednocześnie stwierdzono, że wzmożona kumulacja $A\beta$ w mózgach chorych na AD może być związana z upośledzeniem jego usuwania na skutek dysfunkcji enzymów uczestniczących w tym procesie, m.in. metaloendopeptydaz rozkładających insulinę [Wang i wsp., 2006]. Na tej podstawie wysunięto tezę, że insulinozależne zmiany patologiczne w centralnym systemie nerwowym mogą powodować zaburzenia funkcji poznawczych i w związku z tym leczenie insulinooporności może zmniejszyć ryzyko zachorowania na AD [Watson i Draft, 2003]. Rosiglitazon jest agonistą receptora aktywowanego przez proliferatory peroksisomów (ang. *peroxisome proliferator activated receptors, PPAR*). Dotychczas był rekomendowany w leczeniu cukrzycy i jednocześnie wydaje się być potencjalnie skutecznym lekiem w leczeniu AD w kontekście znaczenia insulinooporności w etiopatogenezie AD.

Na modelu zwierzęcym wykazano, że karmienie produktami bogatocholesterolowymi i jednocześnie leczenie statynami [Fassbender i wsp., 2001] lub BM15766 (czynnik hamujący ostatni etap syntezy cholesterolu) [Refolo i wsp., 2001] zmniejsza akumulację $A\beta$. Pomimo, że mechanizm, poprzez który cholesterol wpływa na gospodarkę $A\beta$ nie jest do końca

poznany, wydaje się, że cholesterol wywiera wpływ na działanie sekretaz. Wykazano, że cholesterol negatywnie wpływa na działanie α -sekretaz, natomiast aktywuje działanie β - i γ -sekretaz [Golde i Eckman, 2001]. Wydaje się, że zmniejszenie poziomu cholesterolu prowadzi do aktywowania szlaku α -sekretaz i jednocześnie do zmniejszenia aktywności β - i γ -sekretaz, co w sumie prowadzi do zmniejszenia produkcji $A\beta$ [Golde i Eckman 2001]. W niektórych retrospektywnych, epidemiologicznych badaniach wykazano, że przewlekłe stosowanie statyn było związane z mniejszym ryzykiem rozwoju otępienia [Wolozin i wsp., 2000]. Jednak równie pozytywnych obserwacji nie poczyniono w prospektywnych lub klinicznych badaniach dotyczących leczenia AD [Kandiah i Feldman, 2009]. W związku z czym statyny nie są jednoznacznie rekomendowane w leczeniu AD.

I.1.5.2.4.3. Leki stabilizujące mikrotubule i inhibitory kinaz

Leki chroniące przed patologicznymi procesami w obrębie neurofibrilli mogą spowalniać proces obumierania komórek nerwowych. Trwają poszukiwania preparatu, który mógłby chronić przed zaburzeniami strukturalnymi mikrotubul lub ich nadmierną fosforylacją. Kinazy zaangażowane w proces fosforylacji białka tau wydają się być obiecującym celem terapeutycznym. Szczególnie dotyczy to kinazy syntazy glikogenu-3 β (ang. *glycogen synthase kinase 3 beta* - GSK-3 β) oraz cyklinozależnej kinazy 5 (ang. *Cyclin-dependent kinase 5-cdk5*), które są związane z mikrotubulami, fosforylacją białka tau oraz są zaangażowane w proces apoptozy [Lau i wsp., 2002]. Wykazano, że paklitaxel, lek stabilizujący mikrotubule, chroni neurony przed toksycznym działaniem $A\beta$ [Michaelis i wsp., 1998]. Ponadto w badaniach prowadzonych *in vitro* stwierdzono, że leki stabilizujące mikrotubule jednocześnie hamują indukowaną poprzez $A\beta$ fosforylację białka tau [Li i wsp., 2003].

Wydaje się, że najkorzystniejszy efekt leczenia AD dałby lek, który przejawiałby wielokierunkowe działanie na patomechanizm powstawania tej choroby. Taki wielokierunkowy potencjał w profilaktyce i leczeniu AD wydaje się wykazywać kompleks polipeptydowy izolowany z siary owczej zwany ColostrininaTM. Na podstawie dotychczasowych badań wydaje się, że Colostrinina wywiera wpływ na ekspresję genów związanych z syntezą APP, fosforylacją białka tau oraz indukującą aktywność enzymów związanych z eliminacją $A\beta$ [Szaniszlo i wsp., 2009]. Ponadto lek ten wykazuje działanie zmniejszające stres oksydacyjny oraz aktywność prozapalnych chemokin i cytokin.

Jego pozytywne działanie w leczeniu AD potwierdzono w dwuletnich badaniach klinicznych oraz potwierdzono w wieloośrodkowym badaniu prowadzonym w 6 polskich ośrodkach. Do badań tych włączono ponad sto osób. Badania te obejmowały 15-tygodniowy etap pierwszy, będący podwójnie ślepą próbą kontrolowaną przez placebo oraz 15-tygodniowy etap podawania badanego leku. Na ich podstawie wykazano skuteczność terapii przejawiającą się jako poprawa w testach I.A.D.L i ADAS-cog, które oceniają aktywność w życiu codziennym oraz funkcje poznawcze. Ponadto nie obserwowano poważnych działań ubocznych stosowanego leczenia [Bilikiewicz i Gaus, 2004; Leszek i wsp., 2002; Leszek i wsp., 1999]. Te obiecujące wyniki wstępne muszą jednak zostać potwierdzone w dalszym badaniach przed wyciągnięciem ostatecznych wniosków.

Tabela 3. Lista preparatów, które w badaniach klinicznych II lub III fazy wykazały skuteczność w leczeniu AD lub badania nad ich skutecznością nie zostały jeszcze ukończone (w czerwcu 2009r. nadal trwały). Na podstawie: Sabbagh MN. Drug development for Alzheimer's disease: where are we now and where are we headed? Am J Geriatr Pharmacother. 2009 Jun; 7(3):167-85. Modyfikacja własna.

Nazwa substancji czynnej	Mechanizm działania	Status
Badania III fazy, randomizowane, kontrolowane placebo, podwójnie ślepe		
Bapineuzumab (AAB-001)	Pasywna immunizacja A β	Nie ukończone
Dimebon	Stabilizacja funkcji mitochondriów	Nie ukończone
LY450139	Inhibicja γ -sekreazy	Nie ukończone
LY2062430 (solanezumab)	Pasywna immunizacja A β	Nie ukończone
Badania II fazy, randomizowane, kontrolowane placebo, podwójnie ślepe		
ACC-001	Aktywna immunizacja A β	Nie ukończone
CAD106	Aktywna immunizacja A β	Nie ukończone
CX717	Modulator receptora glutaminergicznego-AMPA	Nie ukończone
ELND005	Inhibitor formowania oligomerów A β	Nie ukończone
Huperzine A	ChEI	Ukończone pozytywnie
Insulina (donosowa)	Stymulacja przekąźnictwa insulinowego	Nie ukończone
Immunoglobuliny dożylne	Pasywna immunizacja	Ukończone pozytywnie
LY2062430 (solanezumab)	Pasywna immunizacja A β	Nie ukończone
PF-04360365	Pasywna immunizacja A β	Nie ukończone
PF-04494700	Inhibitor receptora dla końcowych produktów glikozylacji białek (ang.receptor for advanced glykation end products, RAGE)	Nie ukończone
PRX-03140	Agonista 5-HT $_4$	Nie ukończone
Raloxifen (tylko kobiety)	Selektywny modulator receptorów estrogenowych	Nie ukończone
RO5313534	Selektywny agonista α 7-NNR	Nie ukończone
SB742457	Antagonista 5-HT $_6$	Nie ukończone
SK-PC-B70M	Właściwości neuroprotekcyjne i neurotroficzne	Nie ukończone
T-817MA	Właściwości neuroprotekcyjne i neurotroficzne	Nie ukończone
TRx0014	Rozpuszczanie i hamowanie formowania zwyrodnienia włóknkowego	Ukończone pozytywnie
ZT-1	ChEI (długodziałające iniekcje)	Nie ukończone

I.2. PARAOKSONAZY

I.2.1. Ogólna charakterystyka

Paraoksonazy to enzymy z rodziny hydrolaz, odkryte w 1946 roku [Mazur, 1946], które wykazują aktywność w stosunku do dużej liczby różnorodnych substratów [Harel i wsp., 2004]. Zidentyfikowano trzy paraoksonazy, kodowane przez trzy geny, tzn. *PON1*, *PON2*, *PON3*, zlokalizowane na ramieniu długim chromosomu 7 (7q21.3–22.1) [Primo–Parmo i wsp., 1996].

Aktywność paraoksonaz można podzielić na: laktonazową, dla której przykładowym substratem jest tiolakton homocysteiny, arylesterazową, dla której przykładowym substratem jest octanu fenylu i aktywność fosfotriesterazową, dla której przykładowym substratem jest paraokson [Rosenblat i wsp., 2006]. Białko *PON1* charakteryzują te wszystkie wyżej wymienione aktywności. Białka *PON2* i *PON3* prezentują jedynie aktywność laktonazową [Reddy i wsp., 2001, Draganov i La Du, 2004, Draganov i wsp., 2005, Tavori i wsp., 2008]. Według niektórych autorów *PON3* wykazuje także niewielką aktywność arylesterazową i paraoksonazową [Draganov i wsp., 2000].

Aktywność fosfotriesterazowa i arylesterazowa paraoksonaz jest ukierunkowana na związki fosforoorganiczne [Draganov i La Du, 2004]. Obecnie uważa się, że tylko laktony są fizjologicznymi substratami paraoksonaz. Laktony to pochodne hydrokys kwasów. Stanowią naturalny składnik pokarmów roślinnych i zwierzęcych. Powstają także w organizmie ludzkim w trakcie utleniania kwasów tłuszczowych [Khersonsky i Tawfik, 2006].

I.2.1. Paraoksonaza 1 (*PON1*)

Białko *PON1* wykazuje aktywność laktonazową, arylesterazową i fosfotriesterazową. Jest produkowane w wątrobie, a następnie wydzielane do krwi, gdzie wiąże się z frakcją HDL za pomocą hydrofobowego N–końca [Draganov i La Du, 2004]. *PON1* jest stabilizowane w cząsteczce HDL za pomocą apoA1 (apolipoproteina A1) [Rosenblat i wsp., 2006]. Poza wątrobą obecność *PON1* wykazano również w innych tkankach, m.in. w sercu i jelitach [Draganov i wsp., 2005].

Paraoksonaza ludzka składa się z 354 aminokwasów o masie od 43 do 47 kDa.

Cząsteczka *PON1* składa się z 6 walcowatych struktur; każda z nich składa się z 4 pasm. Połączenie między pasmami jest wzmocnione mostkiem dwusiarczkowym. W kanale

centralnym enzymu znajdują się 2 jony wapnia. Pierwszy z nich (Ca 1) nazywany jest „wapniem katalitycznym”. Ca 1 jest wiązany przez atomy tlenu z łańcuchów bocznych pięciu aminokwasów (Asn224, Asn270, Asn168, Asp269, Glu53). Dwa inne ligandy „wapnia katalitycznego” to cząsteczka wody i atom tlenu w anionie fosforanowym. Z kolei jon Ca 2 określany jest jako „wapń strukturalny”; jego dysocjacja powoduje nieodwracalną denaturację PON1 [Harel i wsp., 2004].

Główne elementy centrum katalitycznego tworzą stabilną strukturę, w skład, której, oprócz „wapnia katalitycznego” wchodzi także łańcuchy boczne aminokwasów wiążących Ca 1, aminokwasów tworzących wiązania wodorowe z poprzednimi oraz pary histydyn katalitycznych (His115, His134) [Harel i wsp., 2004]. Obecność pary histydyn katalitycznych w cząsteczce PON1 decyduje o jej aktywności laktonazowej i arylesterazowej [Kheronsky i Tawfik 2006, Rosenblat i wsp., 2006]. Specyficzność substratowa PON1 zależy od aminokwasów, które zlokalizowane są w pobliżu centrum katalitycznego tego enzymu [Harel i wsp., 2004, Tavori i wsp., 2008].

Działanie PON1 polega na ochronie LDL i HDL przed modyfikacją oksydacyjną oraz na hydrolizie związków fosforoorganicznych [Harel i wsp., 2004, Draganov i La Du, 2004].

W pierwszym przypadku PON1 hydrolizuje nadtlenki fosfolipidowe, wodorotlenki estrów cholesterolu, nadtlenek wodoru [Aviram i wsp., 2000], a także utlenione już reszty lipidowe w tych lipoproteinach [Aviram i wsp., 1998 (a)], w blaszkach miażdżycowych [Aviram i wsp., 2000] i w makrofagach [Fuhrman, Volkova i Aviram, 2002]. PON1 hamuje także syntezę cholesterolu w makrofagach [Rozenberg, Shih i Aviram, 2003] oraz stymuluje wpływ cholesterolu z tych komórek [Aviram i wsp., 1998 (a), Rosenblat i wsp., 2006]. PON1 hydrolizuje także tiolakton homocysteiny [Jakubowski, 2000]. Działanie przeciwmiażdżycowe PON1 może wynikać nie tylko z hamowania modyfikacji oksydacyjnej lipidów i ich gromadzenia w LDL, ale również z hydrolizy tiolaktonu homocysteiny.

Tiolakton homocysteiny to pochodna homocysteiny, która jest udokumentowanym czynnikiem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Coraz więcej badań wskazuje, że najprawdopodobniej to tiolakton homocysteiny, a nie sama homocysteina jest czynnikiem ryzyka. Tiolakton homocysteiny uszkadza białka poprzez homocysteinylację reszt lizynowych, co nasila agregację LDL i aktywuje makrofagi [Jakubowski, 2000; Billecke i wsp., 2000]. W surowicy ludzkiej tylko PON1 hydrolizuje tiolakton homocysteiny. Ta reakcja hamuje proces homocysteinylacji [Jakubowski, 2000].

Inne działanie PON1 polega na hydrolizie związków fosforoorganicznych (parathion, diazinon, chlorpyrifos) oraz gazów bojowych (soman, sarin) [Draganov i La Du, 2004]. PON1 metabolizuje także leki o budowie laktonów, np. inhibitory reduktazy hydroksymetyloglutarylo koenzymu A, HMG-CoA [Billecke i wsp., 2000], a także hydrolizuje czynnik aktywujący płytki krwi (PAF, ang. *platelet-activating factor*) [Rodrigo i wsp., 2001].

Aktywność PON1 jest zależna od czynników genetycznych oraz środowiskowych. Zidentyfikowano ponad 200 wariantów genu *PON1* [Draganov i La Du, 2004]. Dwa polimorfizmy miejsca kodującego tego genu są odpowiedzialne za zamianę aminokwasów w pozycjach 192 i 55: Gln192Arg (Q192R rs662) i Leu55Met (L55M rs854560). W pierwszym przypadku obecność glutaminy w pozycji 192 warunkuje fenotyp Q, obecność argininy determinuje fenotyp R. Te dwa alloenzymy różnią się powinowactwem i aktywnością w stosunku do substratów PON1. Niektóre z nich, np. paraokson, są hydrolizowane szybciej przez alloenzym R, podczas gdy inne, np. octan fenylu, sarin czy soman są szybciej hydrolizowane przez alloenzym Q [Aviram i wsp., 1998 (b), Draganov i La Du, 2004]. Polimorfizm w pozycji 192 ma też wpływ na właściwości przeciwmiażdżycowe PON1. Allel Q w większym stopniu chroni przed oksydacją [Aviram i wsp., 1998 (b), Aviram i wsp., 2000].

Polimorfizm genu *PON1* odpowiedzialny za zamianę leucyny na metioninę w pozycji 55 wpływa na aktywność i stężenie PON1 [Garin i wsp., 1997]. Obecność leucyny w pozycji 55 charakteryzuje większa aktywność enzymu [Draganov i La Du, 2004, Deakin i James, 2004].

Aktywność paraoksonazowa jest najsilniejsza u osób z fenotypami PON1 192RR i PON1 55LL, a najsłabsza u osób z fenotypami PON1 192QQ i PON1 55MM. Natomiast zdolność do ochrony LDL przed oksydacją jest najsilniejsza u osób z fenotypem PON1 192QQ i PON1 55MM [Li, Liu i Liang, 2003].

W genie *PON1* występują także polimorfizmy w miejscu regulatorowym, np. –C108T, –C126G, –A162G, –A832G i –C909G, które też mogą wpływać na aktywność i stężenie PON1 [Brophy i wsp., 2001 (a)]. Aktualnie uważa się, że największy wpływ na aktywność PON1 względem octanu fenylu mają dwa polimorfizmy: –C108T i –A162G [Brophy i wsp., 2001 (b)]. Obecność alleli –108C i –162A zwiększa ekspresję PON1 [Brophy i wsp., 2001 (b)]. Wykazano również, że pojedyncze polimorfizmy w regionach promotorowych genu *PON1* mogą modyfikować stężenie i aktywność PON1 w surowicy [Camps i wsp., 2009].

Aktywność PON1 nie jest tylko uwarunkowana genetycznie, ale zależy także od wieku i od różnych czynników środowiskowych, takich jak: dieta, używki, zażywane leki, toksyczne czynniki chemiczne i inne. [Draganov i La Du, 2004].

Aktywność PON1 w surowicy wzrasta od urodzenia do około 15–25 miesiąca życia, osiąga *plateau* w okresie dojrzałości, następnie zmniejsza się wraz z wiekiem [Li, Liu i Liang, 2003]. Jest mniejsza w okresie ciąży i menopauzy [Li, Liu i Liang, 2003]. Zaobserwowano, że zmiana aktywności PON1 wraz z wiekiem jest zdeterminowana genetycznie; homozygoty QQ w pozycji 192 wykazują znacznie większy spadek aktywności paraoksonazy w czasie [Sentí i wsp., 2001].

Wpływ diety na aktywność PON1 badano u zwierząt oraz ludzi. U myszy stwierdzono spadek aktywności PON1 we krwi po zastosowaniu diety bogatotłuszczowej [Forte i wsp., 2002]. Badania u kobiet z cukrzycą wykazały, że stosowanie oliwy z oliwek zwiększało aktywności PON1 u kobiet z cukrzycą typu 2 [Wallace i wsp., 2001]. Także aktywność tego enzymu zwiększało zażywanie antyoksydantów (witamina C czy E) [Jarvik i wsp., 2002].

Udokumentowano, że palenie papierosów ma niekorzystny wpływ na aktywność PON1 w surowicy [Nishio i Watanabe 1997]. W badaniach przeprowadzonych u osób z chorobą niedokrwienną serca [James, Leviev i Righetti, 2000] wykazano, że stężenie i aktywność PON1 były obniżone w grupie palących w porównaniu z niepalącymi. Byli palacze mieli poziom aktywności i stężenia PON1 porównywalny do grupy niepalących.

Palenie papierosów obniża poziom i aktywność PON1 najprawdopodobniej wskutek modyfikacji wolnych grup tiolowych enzymu [Nishio i Watanabe, 1997].

Spożywanie alkoholu w stopniu umiarkowanym powoduje wzrost aktywności PON1, najprawdopodobniej poprzez zwiększenie stężenia frakcji HDL i APOA1 w osoczu [van der Gaag i wsp., 1999], natomiast osoby uzależnione od alkoholu mają aktywność enzymu w surowicy mniejszą w porównaniu z niepijącymi. Spożywanie dużych ilości alkoholu przez długi okres hamuje ekspresję genu i aktywność enzymatyczną PON1 niezależnie od polimorfizmu [Costa i wsp., 2005].

Różne badania dotyczące wpływu leków obniżających poziom cholesterolu na aktywność PON1 dostarczyły odmienne wyniki [Balogha i wsp., 2001; Paragha i wsp., 2003; Durrington i wsp., 1998]. Podobnie, rozbieżne wyniki uzyskano w badaniach dotyczących wpływu statyn na aktywność PON1. Na przykład Tomás i wsp. [2000] oraz Deakin i wsp. [2003] wykazali zwiększoną aktywności PON1 w surowicy u osób z rodzinną hipercholesterolemią oraz osób z hipercholesterolemią i chorobą niedokrwienną serca w trakcie leczenia simwastatyną.

Natomiast inne badania u leczonych atorwastatyną [Tsimihodimos i wsp., 2002] nie wykazały takiego wpływu na aktywność PON1 w surowicy.

Obniżona aktywność PON1 występuje w wielu przewlekłych schorzeniach, np. w cukrzycy [Abbott i wsp., 1995], chorobach nerek [Dantoine i wsp., 1998], hipercholesterolemii [Tomás i wsp., 2000], chorobie niedokrwiennej serca [Mackness i wsp., 2001] i przewlekłych chorobach wątroby [Ferre i wsp., 2002].

Zmniejszenie zawartości PON1 w cząsteczkach HDL zaobserwowano też w stanach zapalnych [Van Lenten i wsp., 1995].

I.2.2. Paraoksonaza 2 (PON2)

Produktem genu PON2 jest białko o strukturze podobnej do PON1. Też zawiera reszty cysteinowe i mostki dwusiarczkowe, reszty histydynowe oraz potencjalne odpowiedniki struktur wiążących jony wapnia jak w PON1 [Mochizuki i wsp., 1998].

Ekspresja PON2 zachodzi we wszystkich komórkach organizmu ludzkiego [Mochizuki i wsp., 1998]. PON2 nie występuje w surowicy, nie wiąże się z lipoproteinami, pozostaje wewnątrzkomórkowo związana z błoną komórkową [Ng i wsp., 2001, Ng i wsp., 2006]. PON2 ma właściwości antyoksydacyjne podobnie jak PON1 i PON3, ale swój wpływ wywiera na poziomie komórkowym [Ng i wsp., 2001].

Badania eksperymentalne wykonane na ludzkiej linii komórkowej HeLa, wykazały, że PON2 hamuje oksydacyjną modyfikację LDL oraz hydrolizuje już utlenione reszty lipidowe [Ng i wsp., 2001]. Natomiast badanie na modelu zwierzęcym wykazało, że brak ekspresji PON2 koreluje z zaawansowaniem miażdżycy [Ng i wsp., 2006]. W genie PON2 zidentyfikowano wiele polimorfizmów. Dwa z nich są odpowiedzialne za substytucję aminokwasów w pozycjach 148 i 311: Ala148Gly (A148G) i Cys311Ser (C311S rs6954345) [Mochizuki i wsp., 1998].

Wykazano, że struktura i funkcja białka PON2 może być zależna od wprowadzenia dodatkowej reszty cysteinowej w polimorfizmie 311 [Mochizuki i wsp., 1998]. Obecność allelu C polimorfizmu C311S genu *PON2* wiąże się ze zwiększonym poziomem w surowicy dialdehydu malonowego, który uważany jest za marker peroksydacji lipidów [Martinelli i wsp., 2004]. Wykazano, że wśród osób palących papierosy ryzyko wystąpienia zawału mięśnia sercowego wiązało się z polimorfizmem C311S genu *PON2*, a ryzyko zachorowania było pięciokrotnie wyższe u homozygot CC w porównaniu do homozygot SS.

Osoby palące papierosy miały zwiększone ryzyko wystąpienia zawału serca, jeżeli były nosicielami przynajmniej jednego allelu C.

Wielokrotnie wykazywano związek tych polimorfizmów z chorobami układu sercowo-naczyniowego [Martinelli i wsp., 2004], cukrzycą typu 2 [Hegele i wsp., 1997], chorobą Alzheimera [Shi i wsp., 2004] oraz takimi stanami jak hiperglikemia [Hegele i wsp., 1997] i hiperlipidemia [Hegele i wsp., 1998].

I.2.3. Paraoksonaza 3 (PON3)

PON3 (białko o masie 40 kDa) syntetyzowane jest w wątrobie, a następnie wydzielane do krwi gdzie wiąże się z frakcją HDL [Rosenblat i wsp., 2003]. Według niektórych badaczy obecność PON3 w surowicy jest wynikiem zachodzących procesów patologicznych, a w warunkach fizjologicznych występuje tylko wewnątrzkomórkowo [Draganov, 2007].

Eksperymentalne badania przeprowadzone na myszach transgenicznym i liniach komórkowych wskazują, że PON3 ma działanie antyoksydacyjne i przeciwmiażdżycowe [Draganov i wsp., 2000]. Wykazano wręcz, że PON3 może być bardziej skuteczne niż PON1 w ochronie LDL przed modyfikacją oksydacyjną sztucznie indukowaną jonami miedzi [Draganov i wsp., 2000]. W jednym z badań na myszach transgenicznym wykazano, że zwiększona ekspresja ludzkiej *PON3* u osobników płci męskiej, znacząco zmniejsza nasilenie procesu tworzenia blaszek miażdżycowych i redukuje otyłość [Shih i wsp., 2007]. Ostatnio wykazano, że polimorfizmy A10340C i A2115T genu *PON3* mają wpływ na aktywność PON1 w surowicy [Sanghera i wsp., 2008].

I.2.2. Paraoksonazy a ryzyko choroby Alzheimera

Związek paraoksonaz z ryzykiem AD był analizowany pod kątem znaczenia różnych polimorfizmów genów *PON* dla ryzyka wystąpienia tej choroby. Tylko niektóre badania wykazały związek allelu R polimorfizmu Q192R [Scacchi i wsp., 2003; He i wsp., 2006; Erlich i wsp., 2006], allelu T polimorfizmu -161C/T [Erlich i wsp., 2006], allelu M polimorfizmu L55M [Erlich i wsp., 2006; Leduc i wsp., 2008; Leduc i wsp., 2009] genu *PON1* z ryzykiem AD. Spośród trzech badań oceniających znaczenie polimorfizmu C311S genu *PON2*, w badaniu Erlich i wsp. wykazano, że polimorfizm ten ma wpływ na ryzyko AD jako składnik haplotypu, natomiast Shi i wsp. stwierdzili, że allel C jest czynnikiem ryzyka AD u osób rasy żółtej [Erlich i wsp., 2006; Shi i wsp., 2004].

Zaplanowane badanie poszukiwania związku wybranych polimorfizmów paraoksonaz z ryzykiem AD będzie przeprowadzone po raz pierwszy na materiale pozyskanym od pacjentów rekrutowanych w populacji polskiej. W badaniu zostaną zbadane polimorfizmy genów *PON*, które wcześniej były udokumentowane jako czynniki ryzyka AD w innych populacjach.

I.2.3. Paraoksonazy a patomechanizm choroby Alzheimera

W maju 2008 roku ukazało się pierwsze badanie, które udokumentowało, że nasilenie zmian patologicznych typowych dla AD jest zdeterminowane przez niektóre polimorfizmy funkcjonalne genu *PON1* [Leduc V i Poirier J., 2008]. Analizie poddano związek polimorfizmów L55M i Q192R genu *PON1* z markerami neuropatologicznymi choroby Alzheimera, tzn. zawartością A β 40 i A β 42 w korze płata czołowego, z gęstością receptorów nikotynowych w korze płata skroniowego oraz aktywnością acetylocholintransferazy w korze płata skroniowego, u chorych z AD i w grupie osób zdrowych. Badanie wykazało, że osoby chore na AD, które są nosicielami genotypu 55MM mają znacznie wyższy stosunek A β 42 do A β 40 w porównaniu do osób z AD bez takiego genotypu i do osób zdrowych. Z kolei osoby z AD, które są nosicielami genotypu QQ mają znacznie wyższy stosunek A β 42 do A β 40 w porównaniu do osób z AD, które są nosicielami przynajmniej jednego allelu R i porównywalny stosunek A β 42 do A β 40 do osób zdrowych.

Stwierdzono również, że tylko polimorfizm L55M determinuje gęstość receptorów nikotynowych oraz aktywność transferazy acetylocholinylu. Osoby z AD, które mają genotyp MM w pozycji 55 mają znacznie niższe stężenie receptorów nikotynowych i niższą aktywność acetylocholinesterazy w porównaniu do kontroli. Stężenie receptorów nikotynowych i aktywność acetylocholintransferazy u osób z AD, które nie były nosicielami genotypu MM i osób zdrowych była podobna. Uzyskane wyniki sugerują, że genotypy genu *PON1*, które charakteryzuje niższa aktywność PON1, odpowiedzialna m.in. za gorsze zdolności antyoksydacyjne tego enzymu, determinują nasilenie procesów patologicznych w mózgu charakterystycznych dla AD.

I.2.4. Paraoksonazy a reakcja na leczenie inhibitorami acetylocholinesterazy chorych na chorobę Alzheimera

Inhibitory acetylocholinesterazy są uważane za jedyne skuteczne leki objawowe w leczeniu AD. Niedawno udokumentowano, że osoby, które odpowiadają na przewlekłą terapię AChEI mają znacznie częściej allel R polimorfizmu Q192R genu *PON1* niż osoby, które nie odpowiadają na leczenie tymi lekami [Pola R i wsp., 2005]. W badaniu tym uczestniczyło 73 osoby; 17 osób, które po okresie około 9- miesięcznej terapii uzyskały, co najmniej 2 punkty więcej w skali MMSE oraz nie uzyskały gorszych wyników w skali I.A.D.L i ADL w stosunku do stanu wyjściowego, zakwalifikowano jako osoby reagujące na terapię. Wyniki tego badania sugerują, że PON1 może działać synergistycznie z AChEI i osoby, które są nosicielami genów odpowiedzialnych za większą aktywność enzymu mogą znacznie lepiej odpowiadać na tę terapię. Jak dotąd wyniki te nie były potwierdzone w innych populacjach, nie zbadano też czy inne funkcjonalne polimorfizmy genów *PON* mają wpływ na reakcje pacjentów z AD na leczenie AChEI.

II. CEL NAUKOWY PROJEKTU I ZADANIA BADAWCZE

II.1. CEL NAUKOWY

Celem prezentowanej pracy jest:

- 1) Określenie wpływu polimorfizmów genów *PON1* i *PON2*, które zostały udokumentowane jako czynniki ryzyka choroby Alzheimera w innych populacjach (L55M, Q192R, -161C/T genu *PON1* oraz C311S genu *PON2*) na ryzyko tej choroby w populacji polskiej z uwzględnieniem wieku, płci oraz polimorfizmu genu *APOE*;
- 2) Określenie wpływu badanych polimorfizmów genów *PON* i *APOE* na skuteczność leczenia AChEI;

II.2. ZADANIA BADAWCZE

- 1) Porównanie częstości występowania wybranych polimorfizmów genu *PON1* (Q192R, M55L, -161C/T) w grupie chorych na AD i w grupie kontrolnej;
- 2) Porównanie częstości występowania polimorfizmu C311S genu *PON2* w grupie chorych na AD i w grupie kontrolnej;
- 3) Analiza związku między badanymi polimorfizmami genów *PON* i *APOE* a odpowiedzią na leczenie AChEI;
- 4) Wykonanie metaanalizy oceniającej znaczenie badanych polimorfizmów genów *PON* uwzględniającej wyniki własne oraz wyniki wszystkich opublikowanych badań udostępniających wyniki surowe;

III. MATERIAŁ

III.1. GRUPA BADANA

Do badania zostały włączone kolejne osoby z diagnozą klinicznie prawdopodobnej AD postawioną według kryteriów DSM-IV (Załącznik 1) i NINCDS-ADRDA (Załącznik 2), które były diagnozowane i leczone w Poradni Zaburzeń Pamięci Kliniki Neurologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie oraz w Klinice Neurologii Centralnego Szpitala Klinicznego MSWiA w Warszawie i które wyraziły pisemną zgodę na udział w badaniu. Wszystkie zakwalifikowane osoby należały do rasy kaukaskiej i były polskiego pochodzenia.

III.2. GRUPA KONTROLNA

Do grupy kontrolnej zakwalifikowano kolejne osoby, bez wywiadu w kierunku chorób neurologicznych oraz bez objawów w badaniu neurologicznym. Żadna z osób nie podawała zaburzeń pamięci. Wszyscy byli samodzielni w życiu codziennym. Wszyscy też wyrazili świadomą pisemną zgodę na udział w badaniu. Osoby te były rekrutowane wśród pracowników Kliniki Neurologii UJ CM, współmałżonków pacjentów leczonych w Klinice Neurologii z powodu innych chorób niż AD oraz innych osób odwiedzających. Zakwalifikowane osoby należały do rasy kaukaskiej i były polskiego pochodzenia.

III.3. MATERIAŁ BIOLOGICZNY

Materiał biologiczny stanowiła krew żylna pobrana od chorych na AD i osób z grupy kontrolnej. W celu przeprowadzenia izolacji DNA i wykonania badań genetycznych od wszystkich uczestników badania pobrano 5 ml krwi żyłnej.

IV. METODY

IV.1. METODYKA PROCEDUR DIAGNOSTYCZNYCH PRZEPROWADZONA U

CHORYCH KWALIFIKOWANYCH DO BADANIA

IV.1.1. Kryteria włączenia do badania

Procedura rozpoznawania prawdopodobnej AD u pacjentów leczonych w Poradni Zaburzeń Pamięci Kliniki Neurologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie oraz w Klinice Neurologii Centralnego Szpitala Klinicznego MSWiA w Warszawie jest taka sama i opiera się na kryteriach DSM-IV i NINCDS-ADRDA uwzględniających następujące elementy:

- wywiad od chorego i jego rodziny/opiekuna potwierdzający występowanie deficytów poznawczych (od ponad 6 miesięcy), które powodują istotne zaburzenia w funkcjonowaniu społecznym i zawodowym oraz istotne pogorszenie dotychczasowego poziomu funkcjonowania,
- wynik badania neuropsychologicznego, które oceniało: pamięć, mowę, prakcję, gnozę, funkcje wykonawcze (planowanie, organizację, porządkowanie, abstrakcyjne myślenie),
- wynik neuroobrazowania oraz wyniki badań laboratoryjnych (pełna morfologia krwi, OB, glukoza, elektrolity, kreatynina, aminotransferazy, TSH lub inne testy oceny funkcji tarczycy, witamina B12, kwas foliowy, VDRL, badanie moczu) pozwalające wykluczyć inne niż AD przyczyny otępienia,
- wynik badania neurologicznego, na podstawie, którego wykluczono występowanie deficytów ogniskowych oraz objawów pozapiramidowych.

IV.1.2. Kryteria wykluczenia

Rozpoznanie AD wykluczano, gdy: zaburzenia poznawcze miały nagły początek i stosunkowo wcześnie w przebiegu choroby pojawiły się zaburzenia równowagi, drgawki i zaburzenia zachowania. Do grupy badanej nie włączano też osób, u których w początkowym okresie choroby w badaniu neurologicznym stwierdzono deficyty ogniskowe w postaci

niedowładu połowiczego, zaburzeń czucia czy ubytków w polu widzenia oraz objawy pozapiramidowe.

Wykluczono osoby, które: nie wyraziły zgody na udział w badaniu, u których stwierdzono współistniejące choroby mogące przebiegać z zaburzeniami funkcji poznawczych, takie jak: choroba Parkinsona, choroba Huntingtona, krwihak wewnątrzczaszkowy, wodogłowie normotensyjne, guz, duża depresja, choroby układowe (kiła układu nerwowego, HIV), toksyczne lub metaboliczne nieprawidłowości (niedoczynność tarczycy, niedobór witaminy B12, niedobór kwasu foliowego, niacyny, hiperkalcemia), a także, u których MRI mózgu wskazywał na podejrzenie obecności zmian zapalnych lub ognisk naczyniopochodnych.

IV.2. ETAPY BADANIA

Etap I:

W pierwszym etapie badania u wszystkich zakwalifikowanych osób zarejestrowano wiek zachorowania i płeć oraz wykonano oznaczenia 4 wybranych polimorfizmów genów *PON* oraz polimorfizmu *APOE* i sprawdzono czy mają one wpływ na ryzyko AD.

Etap II:

W drugim etapie badania, który rozpoczął się we wrześniu 2008 sprawdzono, jaka jest skuteczność leczenia AChEI podawanymi przez okres minimum 16 tygodni u pacjentów z rozpoznaniem AD leczonych w Poradni Zaburzeń Pamięci w Krakowie. Do tego etapu badania zakwalifikowano osoby, u których była możliwość stwierdzenia czy reagują (ang. *responders*) czy też nie (ang. *non-responders*) na to leczenie. Wszystkie osoby zakwalifikowane do tego etapu przed i po minimum 16 tygodniach leczenia były poddane ocenie za pomocą następujących skal: MMSE, skali oceny podstawowych czynności życia codziennego Katz'a - Skala ADL (ang.: *Activities of Daily Living*) (Załącznik 3) oraz skali oceny złożonych czynności życia codziennego (skala Lawtona) – I.A.D.L (ang. *Instrumental Activities of Daily Living*) (Załącznik 4).

Odpowiedź na leczenie (ang. *responders*) została stwierdzona u osób chorych na AD, które w czasie, 16-tygodniowej terapii AChEI: donepezilem w dawce 10mg/d lub rywastygminą w dawce 9-12mg/d, uzyskały poprawę, co najmniej o 1 punkt w skali MMSE oraz u których

liczba punktów w skali ADL i I.A.D.L. nie zmniejszyła się w tym czasie. W prezentowanym badaniu pozytywną reakcję na leczenie zdefiniowano w oparciu o definicję National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE), stwierdzającej dobrą odpowiedź na leczenie wtedy, gdy po 4 miesiącach leczenia pacjenci uzyskują, co najmniej taką samą liczbę punktów w skali MMSE oraz poprawę w skalach oceniających codzienne funkcjonowanie [O'Brien i Ballard, 2001].

Brak odpowiedzi na leczenie (ang. *non-responders*) został stwierdzony u osób, u których po okresie, co najmniej 16-tygodniowej terapii liczba punktów w skali MMSE była taka sama lub niższa, a liczba punktów w skali ADL i/lub I.A.D.L. była niższa w stosunku do stanu wyjściowego.

IV.3. METODYKA BADAŃ LABORATORYJNYCH

IV.3.1. Izolowanie DNA

Izolacja DNA została wykonana z 5 ml krwi żyłnej. Leukocytarne DNA zostało wyizolowane przy użyciu DNAzolu (DNAzol Reagent) firmy Invitrogen, część DNA uzyskano przy użyciu zestawu QIAamp DNA Blood Mini kit firmy Qiagen.

IV.3.2. Oznaczenie polimorfizmów genów

W celu zbadania polimorfizmu Q192R i L55M genu *PON1* oraz C311S genu *PON2* została przeprowadzona reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR, ang. *polymerase chain reaction*) oraz proces trawienia enzymami restrykcyjnymi z rozdziałem otrzymanych fragmentów na żelu agarozowym (4,0% lub 4,5%) barwionym bromkiem etydyny. Polimorfizm –161C/T genu *PON1* został oznaczony przy pomocy reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR) za pomocą aparatu firmy Applied Biosystems z zastosowaniem protokołu badania podanego przez firmę Applied Biosystems.

IV.3.2.1. Polimorfizm Q192R genu *PON1*

W końcowej objętości 15 μ L mieszaniny reakcyjnej została przeprowadzona reakcja łańcuchowa polimerazy. Mieszanina reakcyjna zawierała 0,7 μ L każdego ze starterów o stężeniu 10 μ M, 10x bufor (Qiagen), 0,3 μ L dNTP o stężeniu 10 mM (Qiagen), 0,08 μ L Taq DNA polimerazy (Qiagen) oraz 1,5 μ L ludzkiego DNA o stężeniu 100 ng/ μ L. Sekwencje

starterów zastosowane w reakcji PCR były następujące: 5'–TAT TGT TGC TGT GGG ACC TGA G–3' i 5'–CAC GCT AAA CCC AAA TAC ATC TC–3' (Tib–Mol Biol). Reakcję PCR przeprowadzono przy użyciu aparatu UNO I firmy Biometra.

Po wstępnej denaturacji DNA przez 5 minut w 95°C, mieszanina reakcyjna została poddana 30 cyklom: denaturacja (1 minuta w 94°C), przyłączanie (30 sekund w 61°C) i polimeryzacja (1 minuta w 72°C). Końcowy etap polimeryzacji odbywał się w 72°C przez 6 minut. Uzyskany produkt o długości 99 bp trawiono enzymem restrykcyjnym Alw I (New England Biolabs).

Trawienie przeprowadzono w objętości 18 µL zawierającej 15 µL produktu, 10x bufor i enzym (0,3 µL). Mieszaninę inkubowano przez 12 godzin w 37°C. Otrzymane produkty trawienia rozdzielano następnie na 4,5% żelu agarozowym (Sigma) barwionym bromkiem etydyny (Gibco BRL) przez 30 minut przy 125 V. W przypadku homozygot A/A uzyskiwano produkt 99 bp, homozygot B/B – produkty 65 bp i 34 bp, oraz heterozygot – produkty 99 bp, 65 bp i 34 bp.

IV.3.2.2. Polimorfizm L55M genu *PON1*

W końcowej objętości 15 µL mieszaniny reakcyjnej została przeprowadzona reakcja łańcuchowa polimerazy. Mieszanina reakcyjna zawierała 0,5 µL każdego ze starterów o stężeniu 10 µM, 10x bufor, 0,3 µL dNTP o stężeniu 10 mM (Qiagen), 0,08 µL Taq DNA polimerazy (Qiagen) oraz 1 µL ludzkiego DNA o stężeniu 100 ng/µL. Sekwencje starterów zastosowane w reakcji PCR były następujące: 5'–GAA GAG TGA TGT ATA GCC CCA G–3' i 5'–TTT AAT CCA GAG CTA ATG AAA GCC–3' (Invitrogen). Reakcję PCR przeprowadzono przy użyciu aparatu UNO I firmy Biometra.

Po wstępnej denaturacji DNA przez 4 minuty w 94°C, mieszanina reakcyjna została poddana 34 cyklom: denaturacja (45 sekund w 94°C), przyłączanie (50 sekund w 61°C) i polimeryzacja (45 sekund w 72°C). Końcowy etap polimeryzacji odbywał się w 72°C przez 6 minut.

Uzyskany produkt o długości 170 bp trawiono enzymem restrykcyjnym Hsp 92 II (Promega). Trawienie przeprowadzono w objętości 18 µL zawierającej 15 µL produktu, 10x bufor K, 100x BSA i enzym (0,3 µL). Mieszaninę inkubowano przez 12 godzin w 37°C. Otrzymane produkty trawienia rozdzielano następnie na 4% żelu agarozowym (Sigma) barwionym bromkiem etydyny (Gibco BRL) przez 30 minut przy 125 V. W przypadku homozygot L/L

uzyskiwano produkt 170 bp, homozygot M/M – produkty: 126 bp i 44 bp, oraz heterozygot – produkty: 170 bp, 126 bp i 44 bp.

IV.3.2.3. Polimorfizm C311S genu *PON2*

W końcowej objętości 15 µL mieszaniny reakcyjnej została przeprowadzona reakcja łańcuchowa polimerazy. Mieszanina reakcyjna zawierała 0,5 µL każdego ze starterów o stężeniu 10 µM, 10x bufor, 0,3 µL dNTP o stężeniu 10 mM (Qiagen), 0,08 µL Taq DNA polimerazy (Qiagen) oraz 1,5 µL ludzkiego DNA o stężeniu 100 ng/µL. Sekwencje starterów zastosowane w reakcji PCR były następujące: 5'–ACA TGC ATG TAC GGT GGT CTT ATA–3' i 5'–AGC ATT TCA TAG ATT AAT TGT TA–3' (Invitrogen). Reakcję PCR przeprowadzono przy użyciu aparatu UNO I firmy Biometra.

Po wstępnej denaturacji DNA przez 4 minuty w 94°C, mieszanina reakcyjna została poddana 30 cyklom: denaturacja (50 sekund w 94°C), przyłączanie (1 minuta w 50°C), i polimeryzacja (1,5 minuty w 72°C). Końcowy etap polimeryzacji odbywał się w 72°C przez 7 minut.

Uzyskany produkt o długości 262 bp trawiono enzymem restrykcyjnym DdeI (Promega). Trawienie przeprowadzono w objętości 18 µL zawierającej 15 µL produktu, 10x bufor D, 100x BSA i enzym (0,2 µL). Mieszaninę inkubowano przez 12 godzin w 37°C. Otrzymane produkty trawienia rozdzielano następnie na 4,5% żelu agarozowym (Sigma) barwionym bromkiem etydyny (Gibco BRL) przez 30 minut przy 125 V. W przypadku homozygot C/C uzyskiwano produkty 120bp i 142 bp, homozygot S/S – produkty 120 bp i 67 bp i 75 bp, oraz heterozygot – produkty 120 bp, 142 bp, 75 bp i 67 bp.

IV.3.2.4. Polimorfizm –161C/T genu *PON1*

Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym została przeprowadzona przy użyciu aparatu ABI PRISM® 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Wykorzystany do oznaczeń zestaw firmy Applied zawierał TaqMan Universal PCR Master Mix i specyficzną parę sond znakowanych fluorochromami VIC i FAM oraz startery. Reakcja była przeprowadzona w końcowej objętości 25 µL.

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.

Wykorzystany zestaw z firmy Applied Biosystems as Pre–Designed/Validated Assays był zaprojektowany i przygotowany do oznaczenia polimorfizmu genu *PON1* (rs705381) w miejscu -161.

IV.3.2.5. Polimorfizm genu *APOE*

W końcowej objętości 25 µL mieszaniny reakcyjnej została przeprowadzona reakcja łańcuchowa polimerazy. Mieszanina reakcyjna zawierała 0,8 µL każdego ze starterów o stężeniu 0.52 µM, 10x bufor, 0,5 µL dNTP o stężeniu 10 mM (Qiagen), 0,09 µL Taq DNA polimerazy (Eurex), 2,5 µL DMSO oraz 2,5 µL ludzkiego DNA o stężeniu 100 ng/µL. Sekwencje starterów zastosowane w reakcji PCR były następujące: 5'–ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC–3' i 5'–TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A–3' (TIB Molbiol) Reakcję PCR przeprowadzono przy użyciu aparatu UNO I firmy Biometra.

Po wstępnej denaturacji DNA przez 5 minut w 94°C, mieszanina reakcyjna została poddana 39 cyklom: denaturacja (30 sekund w 94°C), przyłączanie (30 sekund w 65°C) i polimeryzacja (1,5 minuty w 70°C). Końcowy etap polimeryzacji odbywał się w 70°C przez 10 minut.

Uzyskany produkt o długości 227 bp podzielono na dwie części i jedną część trawiono enzymem restrykcyjnym Afl III a drugą Hae II (New England Bio Labs). Trawienie przeprowadzono w objętości 14 µL zawierającej 11 µL produktu, 10x bufor D, 100x BSA i enzym (0,25 µL). Mieszaninę inkubowano przez 12 godzin w 37°C. Otrzymane produkty trawienia rozdzielano następnie na 2,5% żelu agarozowym (Sigma) barwionym bromkiem etydy (Gibco BRL) przez 30 minut przy 125 V. W przypadku homozygot APOE 3/3 uzyskiwano produkty: trawienia enzymem Hae II: 195bp i trawienia enzymem Afl III: 177 bp, homozygot APOE 4/4 – produkty: trawienia enzymem Hae II: 195 bp i trawienia enzymem Afl III: 227 bp, homozygot APOE 2/2 uzyskiwano produkty: trawienia enzymem Hae II: 227bp i trawienia enzymem Afl III: 177 bp oraz heterozygot APOE 3/4– produkty trawienia enzymem Hae II: 195 bp i trawienia enzymem Afl III: 177 bp i 227 bp, heterozygot APOE 2/3– produkty trawienia enzymem Hae II: 195 bp, 227 bp i trawienia enzymem Afl III: 177 bp oraz heterozygot APOE 2/4– produkty trawienia enzymem Hae II: 195 bp i 227 bp oraz trawienia enzymem Afl III: 177 bp i 227 bp.

IV.4. STATYSTYCZNE OPRACOWANIE WYNIKÓW

Wyniki opisujące dane ilościowe zostały przedstawione w postaci średniej i odchylenia standardowego (SD). Potencjalną różnicę w rozkładzie płci między grupami sprawdzono testem χ^2 , a w rozkładzie wieku testem t-studenta. Za pomocą testu χ^2 sprawdzono czy istnieje ewentualna niezgodność częstości występowania badanych genotypów z rozkładem Hardy – Weinberga. Związek polimorfizmów z ryzykiem choroby badano w modelu dominującym, recesywnym i addytywnym. Oceniano także różnicę częstości występowania badanych alleli w grupie chorych na AD i 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.

Wykonano test asocjacji haplotypów. Interakcje między badanymi wariantami genetycznymi genów *PON* a polimorfizmem *APOE* zbadano za pomocą regresji logistycznej przy użyciu modułu SAS Genetics wersja 1,9.

Wpływ wieku i płci oraz genotypu z allelem $\epsilon 4$ genu *APOE* na rozkład genotypów i alleli w badanych grupach testowano za pomocą regresji logistycznej. Przeprowadzono także metaanalizę używając modelu z efektami stałymi (ang. *fixed effect model*) oraz modelu efektów losowych (ang. *random effect model*). Odpowiedź na leczenie u osób odpowiadających i nie odpowiadających na leczenie z uwzględnieniem testowanych wariantów genetycznych porównywano za pomocą testu χ^2 .

Ze względu na równoczesne testowanie znaczenia 5 różnych wariantów genetycznych, uwzględniono korektę Bonferoniego i za próg istotności statystycznej przyjęto wartość $p < 0.01$.

Całość opracowano przy użyciu modułu SAS Genetics wersja 1,9.

V. WYNIKI

V.1. CHARAKTERYSTYKA BADANYCH GRUP- DANE DEMOGRAFICZNE

Kryteria włączenia do badania spełniło 360 chorych na AD. Wiek chorych w czasie wystąpienia pierwszych objawów choroby wahał się od 60 do 92 lat (średnia wieku: 74.34 ± 6.72 lat). W grupie chorych na AD było 230 kobiet (63.89%).

Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 354 osoby w wieku od 60 do 94 lat (średnia wieku: 71.50 ± 8.37 lat). W grupie tej było 201 kobiet (56.78%).

Chorzy na AD i osoby z grupy kontrolnej nie różnili się pod względem rozkładu płci ($p=0,052$). Osoby chore na AD były starsze od osób z grupy kontrolnej ($p=0,000001$). Z powodu istotnie statystycznej różnicy wieku między badanymi grupami wszystkie analizy związku badanych polimorfizmów z ryzykiem zachorowania na AD testowano nie tylko za pomocą analizy jednoczynnikowej, ale także za pomocą analizy regresji logistycznej uwzględniającej dane demograficzne.

W przypadku polimorfizmu -161C/T genu *PON1* nie udało się określić genotypu u jednego chorego na AD ze względu na brak DNA. W badaniu polimorfizmu C311S genu *PON2* nie udało się określić genotypu też u jednego chorego, ze względu na niespecyficzne produkty reakcji, mimo kilkukrotnego powtarzania oznaczenia. W grupie kontrolnej nie uzyskano wyniku oznaczenia polimorfizmu -161C/T genu *PON1* u 6 osób ze względu na brak DNA.

Wszystkie badane polimorfizmy nie wykazywały odchylenia od równowagi Hardy–Weinberga, zarówno w całej analizowanej grupie, jak i oddzielnie w grupie chorych na AD i grupie kontrolnej dla każdego z polimorfizmów ($p>0,05$).

Częstość poszczególnych genotypów i alleli w badanych grupach była porównywalna do rozkładu w innych populacjach należących do rasy kaukaskiej [Erlich i wsp., 2006].

V.2. BADANIA GENETYCZNE

V.2.1. Związek badanych polimorfizmów z ryzykiem zachorowania na chorobę Alzheimera

V.2.1.1. Polimorfizm Q192R genu *PON1* a ryzyko choroby Alzheimera

Zarówno analiza jednoczynnikowa, jak i analiza regresji logistycznej uwzględniająca wpływ wieku i płci, w żadnym z testowanych modeli dziedziczenia nie wykazały związku testowanych genotypów polimorfizmu Q192R genu *PON1* z ryzykiem AD.

Nie stwierdzono również różnicy częstości alleli między badanymi grupami (allel R: chorzy na AD: 188 (26.11%) vs. grupa kontrolna: 172 (24.29%); OR=0.91 (0.72-1.15), p=0.35) po uwzględnieniu wieku i płci (Tabela 4).

Tabela 4. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu Q192R genu *PON1* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej.

	AD (N=360) (%)	Grupa kontrolna (N=354) (%)	OR (95%CI) (p)	OR (95%CI) (p)
Genotypy				
QQ	205 (56.94)	203 (57.34)	1.02 (0.74-1.39) (0.91)*	1.05 (0.78-1.42) (0.74)**
QR	122 (33.88)	130 (36.72)	1.60 (0.90-2.83) (0.10)#	1.62 (0.91-2.89) (0.10)##
RR	33 (9.17)	21 (5.93)	1.09 (0.86-1.39) (0.43)§	1.12 (0.88-1.42) (0.34)§§
Allele				
Q	532 (73.88)	536 (75.79)	0.91 (0.72-1.15) (0.35)‡	0.32‡‡
R	188 (26.11)	172 (24.29)		

- * Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt dominujący allelu R (RR+QR vs. QQ) w obu badanych grupach (grupa AD i grupa kontrolna).
- ** Model regresji logistycznej testujący wpływ efektu dominującego allelu R (QQ+QR vs. RR) na ryzyko zachorowania na 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 R (QQ+QR vs. RR) w obu badanych grupach (grupa AD i grupa kontrolna).
- ## Model regresji logistycznej testujący wpływ efektu recesywnego allelu R (QQ+QR vs. RR) 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 (RR vs. QR vs. QQ) na ryzyko zachorowania na AD uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa AD i grupa kontrolna).
- ‡ Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach Q i R w dwóch badanych grupach (grupa AD i grupa kontrolna).
- ‡‡ Model regresji logistycznej wykonany na allelach Q i R w dwóch badanych grupach (grupa AD i grupa kontrolna) uwzględniający wpływ wieku i płci

V.2.1.2. Polimorfizm L55M genu *PON1* a ryzyko choroby Alzheimer

Zarówno analiza jednoczynnikowa jak i analiza regresji logistycznej uwzględniająca wpływ wieku i płci wykazały, że polimorfizm L55M (obecność allelu M) ma wpływ na ryzyko zachorowania na AD w modelu addytywnym, ale na poziomie istotności równym 0.03. Ze względu na równoczesne testowanie wielu hipotez dla prezentowanego badania uwzględnienie korekty Bonferoniego pozwoliło ustalić poziom istotności statystycznej na 0.01. Z tego powodu uzyskany wynik nie można uznać za istotny statystycznie. Pozostałe testowane modele (dominujący i recesywny) także takiej zależności nie wykazały (Tabela 5).

Tabela 5. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu L55M genu *PON1* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej.

	AD (N=360) (%)	Grupa kontrolna (N=354) (%)	OR (95%CI) (p)	OR (95%CI) (p)
Genotypy				
MM	154 (42.78)	130 (36.72)	0.78 (0.57-1.05) (0.09) *	0.77 (0.56-1.04) (0.09)**
LM	171 (47.50)	177 (50.00)	0.70 (0.44-1.12) (0.09) #	0.65 (0.40-1.04) (0.07)##
LL	35 (9.72)	49 (13.28)	1.24 (0.99-1.56) (0.049)§	1.28 (1.02-1.61) (0.03)§§
Allele				
M	479 (66.52)	437 (61.72)	1.25 (1.01-1.55) (0.04)‡	0.037‡‡
L	241 (33.47)	275 (38.84)		

* Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt dominujący allelu M (MM+ML vs. LL) w obu badanych grupach (grupa AD i grupa kontrolna).

** Model regresji logistycznej testujący wpływ efektu dominującego allelu M (MM+ML vs. LL) na ryzyko zachorowania na 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 M (LL+LM vs MM) w obu badanych grupach (grupa AD i grupa kontrolna).
- ## Model regresji logistycznej testujący wpływ efektu recesywnego allelu M (LL+LM vs. MM) 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 (MM vs.LM vs. LL) na ryzyko zachorowania na AD uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa AD i grupa kontrolna).
- ‡ Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach L i M w dwóch badanych grupach (grupa AD i grupa kontrolna).
- ‡‡ Model regresji logistycznej wykonany na allelach M i L w dwóch badanych grupach (grupa AD i grupa kontrolna) uwzględniający wpływ wieku i płci.

V.2.1.3. Polimorfizm –161C/T genu *PON1* a ryzyko choroby Alzheimera

W przypadku polimorfizmu –161C/T genu *PON1* zarówno analiza jednoczynnikowa jak i analiza regresji logistycznej uwzględniająca wpływ wieku i płci, w żadnym z testowanych modeli dziedziczenia nie wykazały wpływu badanych genotypów i alleli tego polimorfizmu na ryzyko wystąpienia AD (Tabela 6).

Tabela 6. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu –161C/T genu *PON1* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej.

	AD (N=359) (%)	Grupa kontrolna (N=348) (%)	OR (95%CI) (p)	OR (95%CI) (p)
Genotypy				
CC	209 (58.22)	192 (55.17)	0.88 (0.66-1.19) (0.41)*	0.88 (0.65-1.19) (0.56)**
CT	126 (35.10)	135 (38.79)	1.16 (0.61-2.04) (0.72)#	1.08 (0.58-2.01) (0.81)##
TT	24 (6.69)	21 (6.03)	0.94 (0.74-1.20) (0.63)§	0.93 (0.73-1.19) (0.57)§§
Allele				
C	544 (75.76)	519 (74.56)	1.07 (0.84-1.36) (0.60)‡	0.57‡‡
T	174 (24.23)	177 (25.43)		

* Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt dominujący allelu T (TT+CT vs CC) w obu badanych grupach (grupa AD i grupa kontrolna).

** Model regresji logistycznej testujący wpływ efektu dominującego allelu T (TT+CT vs. CC) na ryzyko zachorowania na 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 T (CC+CT vs TT) w obu badanych grupach (grupa AD i grupa kontrolna).

- ## Model regresji logistycznej testujący wpływ efektu recesywnego allelu T (CC+CT vs. TT) 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 (CC vs. CT vs. TT) na ryzyko zachorowania na AD uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa AD i grupa kontrolna).
- ‡ Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach C i T w dwóch badanych grupach (grupa AD i grupa kontrolna).
- ‡‡ Model regresji logistycznej wykonany na allelach C i T w dwóch badanych grupach (grupa AD i grupa kontrolna) uwzględniający wpływ wieku i płci.

V.2.1.4. Polimorfizm C311S genu *PON2* a ryzyko choroby Alzheimera

Zarówno analiza jednoczynnikowa jak i analiza regresji logistycznej także w przypadku testowania wpływu polimorfizmu C311S genu *PON2* na ryzyko AD w modelu dominującym, recesywnym i addytywnym nie wykazały jego znaczenia dla ryzyka AD (Tabela 7).

Tabela 7. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu C311S genu *PON2* u chorych na AD i u osób z grupy kontrolnej.

	AD (N=359) (%)	Grupa kontrolna (N=354) (%)	OR (95%CI) (p)	OR (95%CI) (p)
Genotypy				
SS	191 (53.20)	212 (59.89)	1.31 (0.97-1.77) (0.07)*	1.35 (0.99-1.83) (0.053)**
SC	140 (39.00)	117 (33.05)	1.11 (0.63-1.97) (0.71)#	1.07 (0.60-1.90) (0.82)##
CC	28 (7.80)	25 (7.06)	1.21 (0.95-1.52) (0.11)§	1.22 (0.96-1.55) (0.10)§§
Allele				
S	522 (72.70)	541 (76.41)	0.82 (0.65-1.04) (0.11)‡	0.09‡‡
C	196 (27.29)	167 (23.58)		

* Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt dominujący allelu C (CC+CS vs SS) w obu badanych grupach (grupa AD i grupa kontrolna).

** Model regresji logistycznej testujący wpływ efektu dominującego allelu C (CC+CS vs. SS) na ryzyko zachorowania na 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 C (SS + SC vs CC) w obu badanych grupach (grupa AD i grupa kontrolna).

Model regresji logistycznej testujący wpływ efektu recesywnego allelu C (SS+SC vs. CC) 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 (SS vs. SC vs. CC) na ryzyko zachorowania na AD uwzględniający wpływ wieku i płci (grupa AD i grupa kontrolna).
 - ‡ Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach C i T w dwóch badanych grupach (grupa AD i grupa kontrolna).
 - ‡‡ Model regresji logistycznej wykonany na allelach C i T w dwóch badanych grupach (grupa AD i grupa kontrolna) uwzględniający wpływ wieku i płci

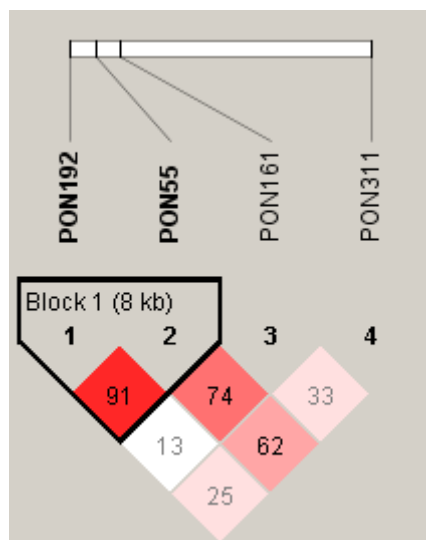
V.2.1.5. Analiza haplotypów

Za pomocą modułu SAS Genetics wersja 9,1 sprawdzono czy badane polimorfizmy genów *PON* znajdują się w nierównowadze sprzężeń (ang. *linkage disequilibrium*, *LD*). Obliczono wskaźniki D' i r^2 (Tabela 8) na podstawie, których za pomocą programu Haplowiew wersja 4,1 wyznaczono haploblok (Rycina 4). Z wykonanych analiz wynika, że dwa z czterech badanych loci polimorfizmów: Q192R, L55M, -161C/T oraz C311S, genów *PON* występują w nierównowadze sprzężeń i dziedziczą się razem z wysokim prawdopodobieństwem ($D' > 0,91$).

Tabela 8. Współczynniki nierównowagi sprzężeń D' i r^2 .

Pary polimorfizmów	D'	r^2
Q192R/L55M	...0.91.....	0.157
Q192R/-T161C	...0.14.....	0.002
Q192R/C311S	...0.25.....	0.063
L55M/-T161C	...0.75.....	0.103
L55M/C311S	...0.63.....	0.075
-T161C/C311S	...0.33.....	0.108

Ryc 4. Graficzne przedstawienie *LD*. W kwadratach są zamieszczone wartości D' pomnożone przez 100.



Wartość p dla ogólnego testu asocjacji haplotypów złożonych z polimorfizmu Q192R i L55M genu *PON1* z ryzykiem zachorowania na AD wyniosła 0.29. Z tego powodu nie przeprowadzono dalszej analizy wpływu haplotypów na ryzyko zachorowania na AD.

Wartości p testów asocjacji dla poszczególnych haplotypów z ryzykiem zachorowania umieszczono w Tabeli 9.

Tabela 9. Częstość występowania haplotypów dwóch wariantów polimorficznych Q192R i L55M genu *PON1* u chorych na AD i w grupie kontrolnej.

Haplotypy <i>PON1</i>	AD	Grupa Kontrolna	Istotność statystyczna (p)
QM	37.4%	32.8%	0.069
RL	23.3%	25.4%	0.35
QL	38.4%	41.1%	0.30
RM	1%	1%	0.61

V.2.1.6. Polimorfizm genu *APOE* a ryzyko choroby Alzheimera

Osoby chore na AD charakteryzowało znacznie częstsze występowanie genotypu $\epsilon 4\epsilon 4$ i genotypu z allelem $\epsilon 4$ ($\epsilon 3\epsilon 4$ i $\epsilon 4\epsilon 4$ i $\epsilon 4\epsilon 2$) w porównaniu do osób z grupy kontrolnej (Tabela 10).

Tabela 10. Rozkład genotypów polimorfizmu genu *APOE* u pacjentów chorych na AD i w grupie kontrolnej.

	AD (N=360) (%)	Grupa kontrolna (N=354) (%)	Istotność statystyczna (p)	Istotność statystyczna (p)
$\epsilon 2\epsilon 2$	0	4 (1.13)	* <0.00001 # <0.00001 § <0.0001	** <0.00001 ## <0.0001 §§ <0.0001
$\epsilon 2\epsilon 3$	21 (5.83)	45 (12.71)		
$\epsilon 3\epsilon 3$	150 (41.67)	221 (62.43)		
$\epsilon 2\epsilon 4$	6 (1.67)	13 (3.67)		
$\epsilon 3\epsilon 4$	158 (43.89)	71 (20.06)		
$\epsilon 4\epsilon 4$	25 (6.94)	0		

- * Test χ^2 (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt dominujący allelu $\epsilon 4$ ($\epsilon 4\epsilon 4 + \epsilon 3\epsilon 4 + \epsilon 2\epsilon 4$ 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 $\epsilon 4$ ($\epsilon 4\epsilon 4 + \epsilon 3\epsilon 4 + \epsilon 2\epsilon 4$ 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 $\epsilon 4$ ($\epsilon 4\epsilon 4$ 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 11. Rozkład alleli polimorfizmu *APOE* u pacjentów chorych na AD i w grupie kontrolnej.

	AD (N=360)	Grupa kontrolna (N=354)	Istotność statystyczna (p)
ε2	27	66	< 0.0001
ε3	479	560	
ε4	214	84	

Test χ^2 (dwa stopnie swobody, tabela 3x2) wykonany na allelach ε2, ε3, ε4 w dwóch badanych grupach (grupa AD i grupa kontrolna).

V.2.1.7. Testowanie interakcji między badanymi polimorfizmami.

Testowanie interakcji między badanymi polimorfizmami genów *PON* oraz genu *APOE*

Przeprowadzone analizy wykazały, że polimorfizmu L55M genu *PON1* (model addytywny) i genotypu z allelem C polimorfizmu C311S genu *PON2* (model dominujący) bez uwzględniania korekty Bonferoniego są granicznie związane ryzykiem AD. Ta zależność zanika po uwzględnieniu korekty Bonferoniego. Nie można wykluczyć, że znaczenie tych wariantów dla ryzyka AD może się ujawnić, jeśli weźmie się pod uwagę ich interakcję z polimorfizmem genu *APOE*. Taką strategię zastosowali wcześniej Janka i wsp. [Janka i wsp., 2002], którzy nie wykazali związku polimorfizmu *PON* C311S z ryzykiem AD, natomiast stwierdzili, że występuje interakcja allelu S tego polimorfizmu i allelu ε4 genu *APOE* w kontekście ryzyka AD.

Z tego powodu sprawdzano, czy istnieją następujące interakcje:

- 1) interakcja między obecnością allelu M polimorfizmu L55M genu *PON1* i genotypu z allelem C polimorfizmu C311S genu *PON2*,
- 2) interakcja między obecnością allelu M polimorfizmu L55M genu *PON1* i genotypem z allelem E4 genu *APOE*,
- 3) interakcja między obecnością genotypu z allelem C polimorfizmu C311S genu *PON2* i genotypem z allelem E4 genu *APOE*,

Nie stwierdzono występowania interakcji pomiędzy allelem M polimorfizmu L55M genu *PON1* a genotypem z allelem C polimorfizmu C311S genu *PON2* ($p = 0.64$, $OR = 0.9$; $95\%CI:0.57-1.41$). Nie wykazano także interakcji pomiędzy allelem M polimorfizmu L55M a genotypem z allelem ε4 genu *APOE* ($p = 0.45$, $OR = 0.83$; $95\%CI:0.52 - 1.33$) ani interakcji pomiędzy genotypem z allelem C polimorfizmu C311S genu *PON2* a genotypem z allelem ε4 genu *APOE* w badanej grupie chorych ($p = 0.55$).

Ponieważ nie stwierdzono interakcji między badanymi polimorfizmami, wpływ tych polimorfizmów na ryzyko AD testowano za pomocą modelu regresji logistycznej.

Analiza regresji logistycznej wykazała, że allel M polimorfizmu L55M genu *PON1* dziedziczony w sposób addytywny wykazuje związek z ryzykiem AD niezależnie od wieku

i genotypu z allelem $\epsilon 4$ genu *APOE* na poziomie istotności statystycznej równym 0.03. Zastosowanie korekty Bonferoniego i obniżenie progu istotności statystycznej dla prezentowanego badania do poziomu 0.01 nie pozwala jednak uznać, że ten wynik jest pozytywny. Można natomiast stwierdzić, że zarówno starszy wiek oraz genotyp z allelem $\epsilon 4$ genu *APOE* spełniają kryteria obliczonej istotności statystycznej dla tego badania i są niezależnymi czynnikami ryzyka AD (Tabela 12).

Tabela 12. Analiza regresji logistycznej uwzględniająca wiek, płeć, genotyp z allelem $\epsilon 4$ genu *APOE*, allel M polimorfizmu L55M genu *PON1*.

	OR	95%CI	P
Wiek	1.05	1.03-1.07	0,00001
Płeć	1.22	0.88-1.68	0.22
Genotyp z allelem $\epsilon 4$ genu <i>APOE</i>	3.81	2.73-5.32	<0.00001
Allel M polimorfizmu L55M genu <i>PON1</i>	1.29	1.01-1.64	0.03

V.2.2. Związek badanych polimorfizmów z odpowiedzią na leczenie inhibitorami acetylocholinesterazy

W drugiej części badania uczestniczyło 101 pacjentów leczonych AChEI przez okres 16 tygodni, których obserwowano pod kątem odpowiedzi na leczenie. 67 chorych spełniło przyjęte kryterium odpowiedzi na leczenie, a 34 chorych tego kryterium nie spełniło. Osoby z obu grup nie różniły się pod względem płci i wieku (średnia wieku osób odpowiadających na leczenie wynosiła 71.96 $\pm$ 7.22 lat a osób bez odpowiedzi na leczenie: 70.09 $\pm$ 7.71 lat, $p=0.23$). W pierwszej grupie było 43 kobiety (64.2%) a w drugiej 20 kobiet (58.8%) ($p=0.60$).

Tabela 13. Rozkład genotypów polimorfizmu Q192R u pacjentów leczonych AChEI, którzy odpowiadali lub nie na to leczenie.

Genotyp Q192 R	Osoby odpowiadające na leczenie (%)	Osoby nie odpowiadające na leczenie (%)	OR (95%CI) (p)
QQ	40 (67.00)	18 (31.03)	*1.32 (0.57-3.03) (0.52)
QR	22 (62.86)	13 (37.14)	# 1.2 (0.27-5.35) (0.81)
RR	5 (62.50)	3 (37.50)	§0.79(0.33-1.86) (0.59)
Donepezil			
QQ	27 (62.79)	10 (58.82)	*1.18 (0.38-3.72) (0.78)
QR	12 (27.91)	6 (35.29)	# 0.61 (0.06-5.88) (0.67)
RR	4 (9.3)	1 (5.88)	§0.71(0.21-2.35) (0.57)
Ryvastigmina			
QQ	12 (52.17)	8 (47.06)	*1.23 (0.35-4.31) (0.75)
QR	10 (43.48)	7 (41.18)	# 2.93 (0.24-35.33) (0.38)
RR	1 (4.35)	2 (11.76)	§1.1 (0.31-3.91) (0.88)

* QQ vs. QR+RR

QQ+QR vs. RR

§ QR vs QQ+RR

Tabela 14. Rozkład genotypów polimorfizmu M55L genu *PONI* u pacjentów leczonych AChEI, którzy odpowiadali lub nie na to leczenie.

Genotyp M55L	Osoby odpowiadające na leczenie (%)	Osoby nie odpowiadające na leczenie (%)	OR (95%CI) (p)
MM	26 (38.81)	14 (41.18)	*0.91 (0.31-2.10) (0.82)
ML	37 (55.22)	18 (52.94)	#0.98 (0.17-5.66) (0.99)
LL	4 (6.00)	2 (5.88)	§1.10 (0.48-2.51) (0.83)
Donepezil			
MM	16 (37.21)	9 (52.94)	*0.53 (0.17-1.64) (0.27)
ML	25 (58.14)	8 (47.06)	#NA
LL	2 (4.65)	0	§1.56(0.51-4.83) (0.44)
Ryvastigmina			
MM	10 (43.48)	5 (29.41)	*1.84 (0.49-6.98) (0.36)
ML	11 (47.83)	10 (58.82)	#1.40 (0.18-11.08) (0.75)
LL	2 (8.70)	2 (11.76)	§0.64 (0.18-0.28) (0.49)

*MM vs. ML+LL

#MM+ML vs. LL

§ML vs. MM+LL

Tabela 15. Rozkład genotypów polimorfizmu -161C/T genu *PON1* u pacjentów leczonych AChEI, którzy odpowiadali lub nie na to leczenie

Genotyp- 161C/T	Osoby odpowiadające na leczenie (%)	Osoby nie odpowiadające na leczenie (%)	OR (95%CI) (p)
CC	35 (52.24)	22 (64.71)	*0.60 (0.25-1.40) (0.23)
CT	30 (44.78)	10 (29.41)	#2.03 (0.27 -15.90) (0.48)
TT	2 (3.00)	2 (5.88)	§1.95(0.81-4.70) (0.14)
Donepezil			
CC	18 (41.86)	10 (58.82)	*0.50 (0.16-5.58) (0.24)
CT	24 (55.81)	6 (35.29)	#2.63 (0.15-44.53) (0.49)
TT	1 (2.33)	1 (5.88)	§2.32 (0.72-7.41) (0.15)
Ryvastigmina			
CC	16 (69.57)	12 (70.59)	*0.95 (0.24-3.75) (0.94)
CT	6 (26.09)	4 (23.53)	#1.38 (0.08-23.67) (0.83)
TT	1 (4.35)	1 (5.88)	§1.15 (0.27-4.92) (0.85)

*CC vs. CT+TT

#CC+CT vs. TT

§ CT vs. CC+TT

Tabela 16. Rozkład genotypów polimorfizmu C311S genu *PON2* u pacjentów leczonych AChEI, którzy odpowiadali lub nie na to leczenie.

Genotyp C311S	Osoby odpowiadające na leczenie (%)	Osoby nie odpowiadające na leczenie (%)	OR (95%CI) (p)
SS	33 (49.25%)	20 (58.82%)	*0.68 (0.30-1.56) (0.36)
CS	30 (44.78%)	13 (38.24%)	# 0.48 (0.05-1.44) (0.51)
CC	4 (5.97%)	1 (2.94%)	§ 1.31 (0.56-3.04) (0.53)
Donepezil			
SS	21 (48.84%)	10 (58.82%)	*0.67 (0.21-2.08) (0.49)
CS	20 (46.51%)	6 (35.29%)	#1.28 (0.11-15.13) (0.84)
CC	2 (4.65%)	1 (5.88%)	§ 1.54 (0.50-5.09) (0.43)
Ryvastigmina			
SS	19 (52.17%)	10 (58.82%)	*1.21 (0.36-4.09) (0.76)
CS	9 (39.13%)	7 (41.18%)	#NA
CC	2 (8.70%)	0	§0.61(0.18-2.12) (0.44)

*SS vs. SS + CC

#SS+CS vs. CC

§CS vs. CC+SS

Tabela 17. Rozkład genotypów polimorfizmu *APOE* u pacjentów leczonych AChEI, którzy odpowiadali lub nie na to leczenie.

Polimorfizm APOE	Osoby odpowiadające na leczenie (%)	Osoby nie odpowiadające na leczenie (%)	OR (95%CI) (p)
Genotyp z allelem E4	32 (62.70)	19 (37.25)	*0.72 (0.31-1.65) (0.44)
Genotyp z allelem E2	4 (57.14)	3 (42.86)	#0.63 (0.27-1.48) (0.29)
Genotyp E3E3	31 (72.09)	12 (27.90)	§0.65 (0.27-1.56) (0.34)
			‡0.52 (0.10-2.66) (0.42)
Donepezil			
Genotyp z allelem E4	18 (41.86)	9 (52.94)	*0.64 (0.21-1.99) (0.44)
Genotyp a allelem E2	4 (9.30)	0	#0.93 (0.30-2.87) (0.90)
Genotyp E3E3	21 (48.83)	8 (47.06)	§0.76 (0.24-2.39) (0.64)
			‡NS
Ryvastigmina			
Genotyp z allelem E4	14 (66.87)	10 (58.82)	*1.09 (0.30-3.91) (0.90)
Genotyp a allelem E2	0	3 (17.65)	#0.48 (0.12-1.94) (0.30)
Genotyp E3E3	9 (33.13)	4 (23.53)	§0.62(0.15-2.60) (0.51)
			‡NS

*Genotyp z allelem E4 vs. pozostałe genotypy

#Genotyp z allelem E4 lub E2 vs. genotyp E3E3

§ Genotyp z allelem E4 vs. Genotyp E3E3

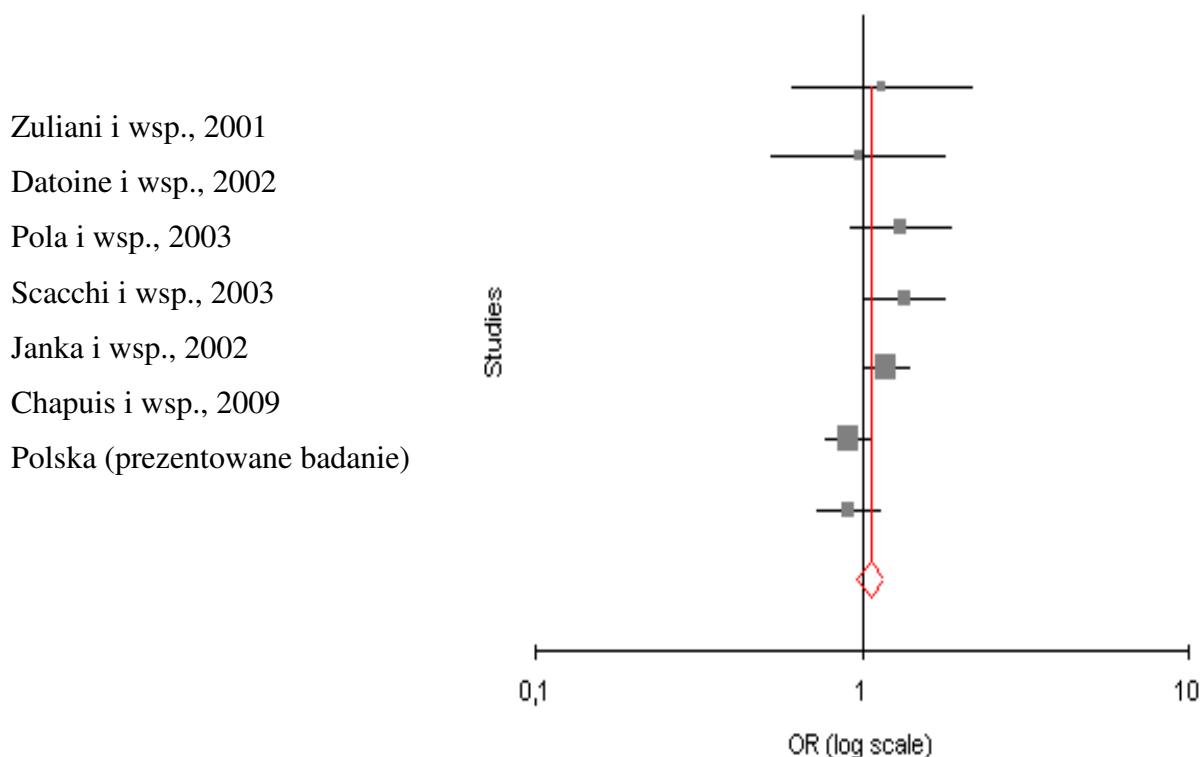
‡ Genotyp z allelem E2vs genotyp E3E3

V.2.3. Metaanalizy

W prezentowanej pracy wykonano trzy metaanalizy oceniające znaczenie posiadania genotypów RR polimorfizmu Q192R genu *PON1* (Rycina 5), genotypu TT polimorfizmu –161C/T genu *PON1* (Rycina 6) oraz genotypu MM polimorfizmu L55M genu *PON1* (Rycina 7) dla ryzyka AD. Wykorzystano wyniki opublikowanych badań kliniczno-kontrolnych, w których dostarczono wyniki surowe oraz dołączono wyniki własne. Uwzględniono wiek i płeć jako potencjalne źródła zmienności.

Nie stwierdzono heterogenności pod względem wieku i płci. Zastosowano model efektów stałych (ang. *fixed effect model*) i model efektów losowych (ang. *random effect model*). Wyniki uzyskane w obu przypadkach nie różniły się. Prezentowane metaanalizy nie wykazały związku badanych genotypów z ryzykiem zachorowania na AD.

Ryc 5. Graficzne przedstawienie metaanalizy oceniającej znaczenie posiadania genotypu RR genu *PON1* dla ryzyka AD u osób rasy kaukaskiej (linia czerwona przedstawia iloraz szans (OR) metaanalizy z 95% przedziałem ufności).

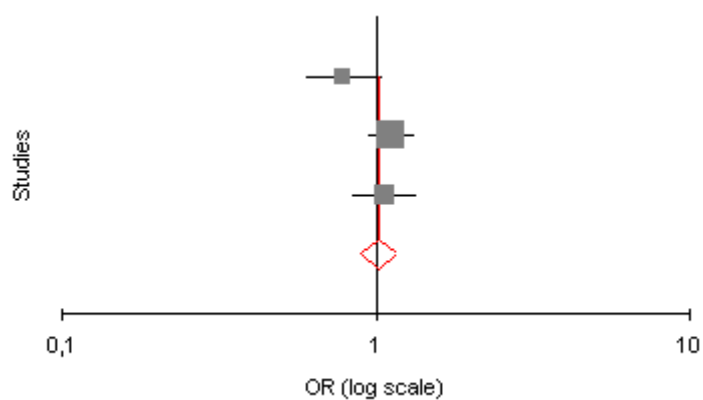


Ryc 6. Graficzne przedstawienie metaanalizy oceniającej znaczenie posiadania genotypu TT polimorfizmu –161C/T genu PON1 dla ryzyka AD u osób rasy kaukaskiej (linia czerwona przedstawia iloraz szans (OR) metaanalizy z 95% przedziałem ufności).

Cellini i wsp., 2006

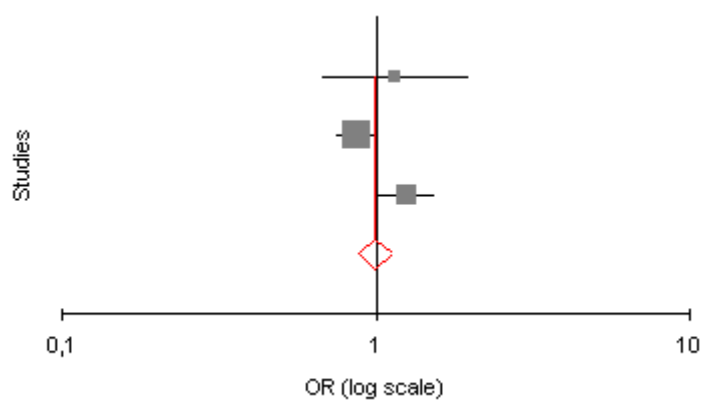
Chapuis i wsp., 2009

Polska (prezentowane badanie)



Ryc 7. Graficzne przedstawienie metaanalizy oceniającej znaczenie posiadania genotypu MM polimorfizmu L55M genu PON1 dla ryzyka AD u osób rasy kaukaskiej (linia czerwona przedstawia iloraz szans (OR) metaanalizy z 95% przedziałem ufności).

Dantoine i wsp., 2002
 Chapuis i wsp., 2009
 Polska (prezentowane badanie)



VI. DYSKUSJA

VI.1. Związek badanych polimorfizmów z ryzykiem zachorowania na chorobę Alzheimera

Prezentowane badanie wykazało, że spośród analizowanych polimorfizmów genów *PON* tylko wariant L55M genu *PONI* ma związek z ryzykiem zachorowania na AD, ale tę zależność udokumentowano na poziomie istotności równym 0.03. Ze względu na to, że w prezentowanym badaniu wykonywano równoczesną analizę 5 polimorfizmów (4 genów *PON* oraz jednego genu *APOE*) obliczono, stosując korektę Bonferoniego polegającą na podzieleniu poziomu istotności przez liczbę rozważanych hipotez, że granica tego poziomu dla prezentowanego badania wynosi 0.01. W tym kontekście uzyskany w tym badaniu wynik nie może zostać uznany za pozytywny.

Powodem podejmowania badań na temat znaczenia paraoksonaz w AD jest zaangażowanie tych enzymów w działanie antyoksydacyjne. W AD zaobserwowano z jednej strony nadmierną peroksydację lipidów i z drugiej, upośledzoną aktywność enzymów antyoksydacyjnych, w tym paraoksonaz. Dowodzi to, że jednym z patomechanizmów tej choroby zwyrodnieniowej jest stres oksydacyjny.

Stres oksydacyjny to stan, w którym dochodzi do zaburzenia równowagi pomiędzy produkcją wolnych rodników, a ich usuwaniem przez ustrojowe systemy antyoksydacyjne [Fischer-Wellman i Bloomer, 2009]. Wolny rodnik to każdy atom lub cząsteczka (pochodzące z tlenu lub azotu), które na zewnętrznej powłoce posiadają jeden lub więcej niesparowanych elektronów [Gendźwił, 2007]. Większość energii pozyskiwanej przez organizm pochodzi z fosforylacji oksydacyjnej zachodzącej w mitochondriach. W reakcji tej jako główny produkt powstaje adenosynotrójfosforan (ATP), a jednocześnie tlen (O_2) jest redukowany do wody (H_2O). Produktem ubocznym tej reakcji mogą być wolne rodniki tlenowe, inaczej reaktywne formy tlenu (RFT, ang. *reactive oxygen species-ROS*). Związki te są bardzo aktywne i mogą uszkadzać różne cząsteczki, w tym lipidy, białka i DNA, powodując nieodwracalne zmiany w ich strukturze i funkcji [Huang i Manton, 2004].

W żywych organizmach powstawanie wolnych rodników jest stałym elementem prawidłowych procesów przemiany materii. W warunkach normy istnieje równowaga pomiędzy procesami oksydacyjnymi i wydolnością systemu antyoksydacyjnego.

Mózg jest szczególnie wrażliwy na uszkodzenie przez wolne rodniki, ponieważ jest stosunkowo słabo wyposażony w system enzymów antyoksydacyjnych, a jednocześnie błony komórek nerwowych są bogate w wielonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. *polyunsaturated fatty acids* – PUFA) wrażliwe na peroksydację [Mariani i wsp., 2005].

Peroksydacja lipidów jest jedną z głównych konsekwencji uszkadzającego wpływu wolnych rodników na tkankę mózgową. Peroksydacja PUFA, głównie fosfolipidów błonowych, jest reakcją łańcuchową, która ulega zahamowaniu dopiero w momencie zużycia substratów dla tej reakcji lub zadziałania antyoksydantów. Peroksydacja lipidów powoduje strukturalne lub funkcjonalne uszkodzenia błon komórkowych oraz indukuje powstawanie wtórnych toksycznych produktów [Mariani i wsp., 2005].

Paraoksonazy to jeden z elementów enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego. Do innych składników tego systemu zalicza się dysmutazę nadtlenkową zależną od jonów miedzi i cynku, dysmutazę nadtlenkową zależną od manganu, peroksydazę glutationową, katalazę, ceruloplazminę, białka hemowe, tioredoksyny. Do antyoksydantów nieenzymatycznych zalicza się glutation, witaminę E, witaminę C, albuminy, bilirubinę, kwas moczowy, kreatyninę, cysteinę, karotenoidy, flawonoidy i koenzym Q (zredukowany) [Łuszczewski, 2007].

Paraoksonazy to enzymy o właściwościach oksydoreduktaz, które potrafią zredukować produkty modyfikacji oksydacyjnej lipidów. W kilku badaniach oceniano aktywność paraoksonaz u chorych na AD. Pierwsze badanie nie wykazało różnicy aktywności paraoksonazowej PON1 w surowicy między chorymi na AD i grupą kontrolną [Dantoine i wsp., 2002]. W badaniu autorów polskich w surowicy 120 chorych na otępienie (51 chorych na AD, 28 na otępienie naczyniopochodne i 41 chorych na otępienie mieszane), 45 chorych na łagodne zaburzenia poznawcze oraz 61 osób z grupy kontrolnej oznaczano aktywność paraoksonaz względem octanu fenylu i homocysteiny [Wehr i wsp., 2009]. Wykazano mniejszą aktywność paraoksonaz u chorych na AD i otępienie mieszane w porównaniu z grupą kontrolną. Również w badaniu Paragha i wsp. oceniano aktywność PON w surowicy chorych na AD [Paragh i wsp., 2002]. W badaniu tym brało udział 30 chorych na AD, 40 pacjentów z otępieniem naczyniopochodnym oraz 40 osób z grupy kontrolnej. W surowicy pobranej od osób badanych oceniano aktywność PON względem paraoksonu. Stwierdzono mniejszą aktywność PON w obu grupach pacjentów w porównaniu

z aktywnością PON oznaczaną w grupie kontrolnej. Nie wykazano jednak różnic aktywności PON pomiędzy oboma badanymi grupami chorych na otępienie.

Warianty genów *PON* były badane również pod kątem ich znaczenia jako genetycznych czynników ryzyka AD. Ich rola w tym aspekcie była testowana w AD już kilkanaście razy, 11 razy u osób rasy kaukaskiej, siedem u osób rasy żółtej oraz jeden raz u Afroamerykanów. Największy materiał wśród rasy kaukaskiej liczył 669 pacjentów chorych na AD i 629 osób z grupy kontrolnej. Były to osoby rekrutowane we Francji. Prezentowane badanie jest czwarte, co do liczebności zakwalifikowanych uczestników pochodzących z jednej populacji. Co prawda Erlich i wsp. przeprowadzili badanie u 730 uczestników, ale były to osoby rekrutowane w 17 ośrodkach zamieszkujących różne kraje, w tym: USA, Grecję, Kanadę i Niemcy. Autorzy tego badania przeanalizowali wyniki uzyskane od wszystkich uczestników łącznie, nie uwzględniając odmienności między populacjami wynikającej z różnic rozkładu wariantów genetycznych paraoksonaz w różnych obszarach geograficznych czy wpływu lokalnych czynników środowiskowych. Już w badaniach opublikowanych w 1986 roku stwierdzono, że częstość występowania poszczególnych alleli polimorfizmów genów *PON* różni się znamienne w różnych populacjach [Diepgen i Geldmacher-von Mallinckrodt, 1986]. Przykładem wpływu lokalnych czynników środowiskowych na znaczenie wariantów genetycznych jako czynników ryzyka choroby są wyniki badania wskazujące na odmienne znaczenie wariantów genów *PON* jako czynników ryzyka autyzmu w USA i we Włoszech. Uważa się, że powodem tej różnicy jest wielokrotnie większe narażenie na chemiczne środki domowego użytku w USA, które u osób z genetycznie uwarunkowaną niską aktywnością paraoksonaz skutkuje większym prawdopodobieństwem wystąpienia choroby [D'Amelio i wsp., 2005]. Z wyżej wymienionych względów nie poddaje się analizie zsumowanych wyników uzyskiwanych w różnych populacjach, ale zaleca się wykonywanie metaanaliz wyników pochodzących z różnych populacji. W tym kontekście uzyskane przez Erlicha i wsp. wyniki wskazujące na związek polimorfizmu -161C/T genu *PONI* z ryzykiem AD mogą być przypadkowe. Wyniki te nie zostały potem powtórzone w prezentowanej pracy, ani przez badaczy włoskich i francuskich.

Dotychczas w większości opublikowanych badań oceniano znaczenie pojedynczych wariantów genów *PON* dla ryzyka AD, np. Q192R genu *PONI* [Scacchi i wsp., 2003; Zuliani i wsp., 2001; Sodeyama i wsp., 1999; He i wsp., 2006; Pola i wsp., 2003], -161C/T genu *PONI* [Cellini i wsp., 2006], C311S genu *PON2* [Shi i wsp., 2004; Janka i wsp., 2002];

rzadko analizie poddawano równocześnie dwa warianty, np. Q192R i L55M genu *PON1* [Dantoine TF, 2002; Leduc i wsp., 2008; Leduc i wsp., 2009].

Tylko Chapuis przeanalizował, podobnie jak w prezentowanej pracy, znaczenie wariantu Q192R, L55M i –161C/T genu *PON1* oraz dodatkowo wariantu –107G/A [Chapuis i wsp., 2009].

Opublikowana w 2006 roku praca Erlicha i wsp. testowała równocześnie znaczenie aż 29 wariantów genetycznych w genach *PON*. Warianty genetyczne do tego badania dobierano biorąc pod uwagę: ich wcześniejszy związek z ryzykiem innych chorób, znaczenie funkcjonalne, częstość występowania rzadszego allelu, powiązanie z innymi wariantami genetycznymi oraz możliwość wykonania analizy znaczenia danego wariantu na posiadanej platformie do badań genetycznych. W żadnym z dotychczas opublikowanych badań nie dobierano polimorfizmów w genach *PON* pod kątem ich znaczenia jako tzw. polimorfizmów znacznikowych (ang. *tag polymorphism*). Dopiero analiza z uwzględnieniem tych wariantów pozwoliłaby na dokładne przeszukanie wszystkich genów *PON* w celu wykrycia wariantów związanych z ryzykiem choroby. Obecnie biblioteki wariantów znacznikowych są dostępne na różnych stronach internetowych (<http://www.hapmap.org>).

Wpływ polimorfizmu Q192R genu *PON1* na ryzyko AD, oceniano w 10 badaniach, tylko w 2 uzyskano wynik pozytywny. W badaniu Scacci i wsp. brało udział 236 pacjentów chorych na AD i 226 osób z grupy kontrolnej. Wykazano, że allel R znamienne rzadziej występował u chorych na AD w porównaniu z grupą kontrolną i genotyp RR chronił przed zachorowaniem na AD [Scacchi i wsp., 2003]. W innym badaniu przeprowadzonym na osobach rasy żółtej, 521 chorych na AD i 578 osobach z grupy kontrolnej, również wykazano, że obecność przynajmniej jednego allelu R była znamienne rzadsza u chorych na AD w porównaniu z grupą kontrolną [He i wsp., 2006]. Natomiast w badaniu Erlicha i wsp. przeprowadzonym na 730 pacjentach rasy kaukaskiej, 467 rasy afroamerykańskiej oraz 224 osobach z grupy kontrolnej rasy kaukaskiej i 453 rasy afroamerykańskiej, stwierdzono, że indywidualnie analizowany polimorfizm Q192R genu *PON1* nie ma znaczenia dla ryzyka zachorowania na AD, ale ma znaczenie jako składnik haplotypu [Erlich i wsp., 2006].

Polimorfizm L55M genu *PON1* w kontekście ryzyka zachorowania na AD badano 5 razy. Tylko w 2 badaniach Leduc i wsp. potwierdzono znaczenie tego polimorfizmu dla ryzyka choroby. W badaniu opublikowanym w 2008 roku brało udział 136 chorych na AD i 91 osób z grupy kontrolnej [Leduc i wsp., 2008]. W badaniu tym wykazano, że genotyp MM jest

częstszy u chorych na AD w porównaniu z grupą kontrolną. Wzrost ryzyka zachorowania na AD związany z nosicielstwem allelu M polimorfizmu L55M genu *PON1* potwierdzono również w badaniu opublikowanym w 2009 roku, które wykonano na znacznie większym materiale (632 chorych na AD i 434 osobach z grupy kontrolnej) [Leduc i wsp., 2009]. W badaniu Erlicha i wsp. również stwierdzono, że polimorfizm L55M genu *PON1* ma wpływ na ryzyko zachorowania na AD jedynie jako element haplotypu [Erlich i wsp., 2006].

Znaczenie polimorfizmu -161C/T genu *PON1* dla ryzyka zachorowania na AD wykazano w jednej spośród trzech opublikowanych prac. Jest to badanie przeprowadzone przez Erlicha i wsp., w którym brało udział łącznie 1197 chorych na AD (w tym 730 chorych rasy kaukaskiej) i 677 osób z grupy kontrolnej (w tym 224 osoby rasy kaukaskiej). Wykazano, że nosicielstwo allelu T tego genu jest czynnikiem ryzyka zachorowania na AD [Erlich i wsp., 2006].

Polimorfizm C311S genu *PON2* badano trzykrotnie. W badaniu Shi i wsp. przeprowadzonym u 165 chorych na AD i 174 osób z grupy kontrolnej rasy żółtej wykazano, że nosicielstwo allelu C związane jest z większym ryzykiem zachorowania na AD [Shi i wsp., 2004]. W badaniu Erlicha i wsp. stwierdzono, że polimorfizm ten ma znaczenie jako czynnik ryzyka AD wyłącznie, gdy analizowany był jako składnik haplotypu. Natomiast Janka i wsp. wykazali, że allel S znamienne częściej występował u chorych na AD i u chorych na otępienie naczyniopochodne w porównaniu z grupą kontrolną, ale tylko u nosicieli allelu $\epsilon 4$ genu *APOE* [Janka i wsp., 2002].

Od kilku lat coraz więcej zwolenników poszukiwania wariantów genetycznych zwiększających ryzyko różnych chorób ma metoda GWAS. Podkreśla się, że wynik pozytywny badania przeprowadzonego w taki sposób musi być udokumentowany na odpowiednio dużej grupie badawczej (nawet do 20 000 osób), różnica częstości występowania wariantów genetycznych między pacjentami i grupą kontrolną musi być stwierdzona na poziomie istotności statystycznej poniżej 10^{-8} , a wynik pozytywny musi być potwierdzony w niezależnych populacjach [Mullen i wsp., 2009]. Dotychczas opublikowano 8 badań GWAS u chorych na AD. Cztery z nich były wykonane u mniej niż tysiąca pacjentów i osób z grupy kontrolnej razem [Coon i wsp., 2007; Reiman i wsp., 2007; Liu i wsp., 2007; Beeham i wsp., 2009], kolejne badania były wykonane u około 2000 osób

[Carrasquillo i wsp., 2009] , 4000 i [Grupe i wsp., 2007] 7500 osób [Lambert i wsp., 2009]. Dopiero ostatnie badanie było wykonane u ponad 10 000 osób [Harold i wsp., 2009].

Wymagany dla badań GWAS poziom istotności $p < 10^{-8}$ w pierwszym etapie (ang. *discovery sample*) uzyskano w 3 badaniach [Reiman i wsp., 2007; Lambert i wsp., 2009; Harold i wsp., 2009], a replikacja tych wyników na wymaganym poziomie istotności została uzyskana tylko dwukrotnie [Lambert i wsp., 2009; Harold i wsp., 2009].

Wszystkie trzy warunki jakości dla badań GWAS spełniło tylko ostatnio opublikowane w 2009 roku badanie Harolda i wsp. Było ono wykonane na materiale 12000 uczestników, poziom istotności dla wyników pozytywnych wynosił poniżej 10^{-8} , a wynik pozytywny został potwierdzony w niezależnych populacjach. W badaniu tym, poza potwierdzeniem znaczenia polimorfizmu genu *APOE* w AD, wykazano również, że warianty genetyczne genu *CLU* (zwanego również *APOJ*) oraz genu *PICALM* wykazują związek z ryzykiem zachorowania na AD. Gen *CLU* koduje białko zwane klasteryną. Jest to białko, które wykazuje ekspresję we wszystkich tkankach ssaków. Ponadto stwierdzono, że jego ekspresja wzrasta w różnych patologicznych procesach przebiegających w tkance nerwowej, takich jak uraz czy przewlekły stan zapalny [Calero, 2000]. W zwierzęcym modelu AD stwierdzono, że klasteryna wchodzi w interakcje z rozpuszczalnymi formami A β , wiążąc je i formując kompleksy zdolne do przekraczania bariery krew - mózg [Zlokovic i wsp., 1994]. Gen *PICALM* koduje białko o tej samej nazwie, ulegające ekspresji we wszystkich tkankach a w szczególności w neuronach. Białko *PICALM* zaangażowane jest w proces endocytozy mediowanej klatryną (ang. *clathrin-mediated endocytosis- CME*), który to proces odpowiada za dystrybucję wielu białek i tłuszczów (składników pokarmowych, czynników wzrostu oraz neurotransmiterów) [Tebar i wsp., 1999], m.in. białka VAMP2. Rola tego białka w AD związana jest z jego udziałem w procesie przyłączania pęcherzyków synaptycznych do błony presynaptycznej, co odgrywa kluczową rolę w neuroprzekaznictwie [Harel i wsp., 2008].

Żadne z dotychczas opublikowanych badań GWAS u chorych na AD nie udokumentowało znaczenia wariantów genetycznych w genach *PON* dla ryzyka tej choroby.

W prezentowanym badaniu po raz pierwszy wykonano metaanalizy znaczenia wariantów genów *PON*, które uwzględniały wyniki własne oraz wyniki wszystkich wcześniejszych badań wykonanych u osób rasy kaukaskiej, których autorzy udostępnili wyniki surowe.

Metaanalizę znaczenia wariantu –161C/T wykonano u 1266 chorych na AD i 1286 osób z grupy kontrolnej, wariantu Q192R u 1406 chorych i 1496 osób z grupy kontrolnej, natomiast wariantu L55M u 1006 chorych i 1081 osób z grupy kontrolnej. Okazało się, po wykonaniu metaanaliz, że te warianty genetyczne nie mają związku z ryzykiem zachorowania na AD. Wyniki te dowodzą, że niepodważalna wartość poszczególnych, genetycznych badań kliniczno-kontrolnych, wykonywanych nawet na bardzo niewielkim materiale, ujawnia się, gdy mogą one stanowić element metaanalizy, tzn. gdy ich autorzy w sposób szczegółowy i uporządkowany przedstawiają w publikacji wyniki surowe. Okazało się, że brak szczegółowej charakterystyki uzyskanych wyników nie pozwolił włączyć do metaanalizy wyników jednego badania oceniającego znaczenie wariantu –161C/T (954 osoby), wyników trzech badań oceniających znaczenie wariantu Q192R (2247 osób) oraz wyników trzech badań oceniających znaczenie wariantu L55M (2247 osób).

Według obowiązujących standardów metaanaliza powinna być wykonywana z uwzględnieniem i bez uwzględnienia wyników pierwszego pozytywnego badania (ang. *discovery study*). Niestety, w przypadku prezentowanej pracy takie rozróżnienie nie zawsze było możliwe. W przypadku wariantu –161C/T publikacja pierwszego pozytywnego badania u osób rasy kaukaskiej nie zawiera wyników surowych, tak więc w tym przypadku wykonano metaanalizę dostępnych wyników badań replikacyjnych. W przypadku wariantów Q192R i L55M genu *PON1* pierwsze badania wykazujące ich związek z ryzykiem AD były kolejnymi po pierwszych negatywnych na ten temat. W związku z tym badania na temat znaczenia tych dwu wariantów w AD przeanalizowano jednoetapowo, bez osobnej analizy badań replikacyjnych.

Nie wszyscy autorzy opublikowanych dotychczas badań sprawdzali, czy analizowane warianty genetyczne genów *PON* mają znaczenie dla ryzyka AD po uwzględnieniu genotypu genu *APOE* jako niepodważalnego czynnika ryzyka tej choroby. Taką analizę przeprowadzono zaledwie w 6 z 11 dotychczas przeprowadzonych badań dotyczących omawianych polimorfizmów w genach *PON* [Scacchi i wsp., 2003; Zuliani i wsp., 2001; Sodeyama i wsp., 1999; Chapuis i wsp., 2009; Leduc i wsp., 2009; Cellini i wsp., 2006].

W prezentowanym badaniu, podobnie jak w poprzednich, nie stwierdzono interakcji między polimorfizmem genu *APOE* i badanymi wariantami genów *PON*.

Analiza dotychczas opublikowanych badań wykazała, że w przypadku badania kilku polimorfizmów równocześnie analizę haplotypów wykonano zaledwie w 2 z 5 badań [Erllich i wsp., 2006; Chapuis i wsp., 2007].

Prezentowane badanie wykazało, że polimorfizmy Q192R i L55M są w nierównowadze sprzężeń i tworzą haplotypy, ale różnica częstości występowania haplotypu QM między pacjentami i grupą kontrolną nie była istotna statystycznie ($p=0.06$).

W przeprowadzonym badaniu, z punktu widzenia współczesnych wymagań metodycznych dotyczących genetycznych badań kliniczno-kontrolnych, uwzględniono korektę Bonferoniego oraz w celu maksymalnego zwiększenia siły badania, zarekrutowano możliwie największą liczbę uczestników.

Jednym z powodów częstych trudności w replikacji pozytywnych wyników genetycznych badań kliniczno –kontrolnych jest brak uwzględniania korekty Bonferoniego w przypadku równoczesnego testowania wielu hipotez. Brak tej korekty może odpowiadać za fałszywie pozytywną interpretację wyników. Na przykład, analiza znaczenia 100 wariantów genetycznych równocześnie przy pozostawieniu wartości p na poziomie 0.05 powoduje, że ryzyko uzyskania wyniku fałszywie pozytywnego wynosi 99.4% [Atria i wsp., 2009]. Uwzględnienie korekty Bonferoniego powoduje, że w tym przypadku, poziom wartości p powinien wynosić 0.0005.

Stosowanie korekty Bonferoniego w badaniach poszukiwania genetycznych czynników ryzyka różnych chorób stało się powszechne wraz z wprowadzeniem badań GWAS. Okazuje się, że badania te analizujące równocześnie nawet 500 000 wariantów genetycznych wymagają udokumentowania wyniku faktycznie pozytywnego na poziomie istotności statystycznej $< 10^{-8}$.

Analizując dotychczasowe badania oceniające związek wariantów genetycznych genów *PON* z ryzykiem zachorowania na AD okazuje się, że w żadnym przypadku, gdy testowano wiele hipotez, korekta Bonferoniego nie była uwzględniana.

Istotnym warunkiem dobrze zaplanowanych badań genetycznych jest też odpowiednio duża liczba uczestników. Prezentowane badanie jest wykonane na materiale genetycznym pozyskanym od największej w Polsce liczby chorych na AD. Dotychczasowe publikacje na

temat genetycznych czynników ryzyka AD w tej populacji były prowadzone na materiale nie większym niż 250 pacjentów i porównywalnej liczbowo grupie kontrolnej. Uzyskanie w prezentowanym badaniu materiału genetycznego od tak dużej liczby pacjentów (n=360) było możliwe dzięki nawiązaniu współpracy naukowej z zespołem badawczym Kliniki Neurologii Centralnego Szpitala Klinicznego MSWiA w Warszawie. W prezentowanym badaniu wykorzystano materiał genetyczny od 200 pacjentów chorych na AD rekrutowanych w tym ośrodku. Materiał genetyczny od 160 osób był zebrany w Poradni Zaburzeń Pamięci Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Nie stwierdzono różnic wieku, płci ani rozkładu badanych wariantów genetycznych między pacjentami rekrutowanymi w tych dwu ośrodkach. Wszystkie osoby były tej samej rasy, a chorobę diagnozowano według tego samego standardu. To wszystko pozwoliło na łączną analizę zebranego materiału. Prezentowane badanie jest czwarte pod względem liczebności analizowanych przypadków. Większą grupą badawczą dysponowali tylko Erlich i wsp. (łącznie: 1197 chorych) [Erlich i wsp., 2006], Chapuis i wsp. (669 chorych) [Chapuis i wsp., 2009] oraz Leduc i wsp. (632 chorych) [Leduc i wsp., 2009].

Nawiązanie współpracy naukowej między ośrodkiem warszawskim i krakowskim jest potwierdzeniem światowej tendencji tworzenia narodowych lub nawet ponadnarodowych zespołów naukowych, które w sposób uporządkowany gromadzą materiał badawczych od pacjentów o określonym fenotypie. Wartość współpracy naukowej widać na przykładzie tworzących się międzynarodowych konsorcjów badawczych. Wymóg najnowocześniejszych badań genetycznych, GWAS, wymusza tworzenie takich grup.

VI.2. Związek badanych polimorfizmów z odpowiedzią na leczenie inhibitorami acetylocholinesterazy

Znaczenie upośledzenia funkcjonowania układu cholinergicznego w etiopatogenezie AD wykazano już w latach 70' ubiegłego stulecia [Davies i Maloney, 1976; Perry i wsp., 1982].

Stwierdzenie tej dysfunkcji stało się podstawą do prowadzenia intensywnych badań nad wynalezieniem preparatu, który poprzez poprawę przekąźnictwa w układzie cholinergicznym pozwoliłby walczyć z przyczyną rozwoju AD. Stwierdzono, że istnieje kilka dróg, które teoretycznie poprawiają przekąźnictwo cholinergiczne w centralnym systemie nerwowym, m.in.: stosowanie prekursorów acetylocholiny (cholina, fosfatydylocholina, dimetyloaminoetanol, fosfatydyloseryna, alfosceran choliny) i substancji zwiększających

uwalnianie acetylocholiny do przestrzeni synaptycznej (linopirydyna), hamowanie rozkładu acetylocholiny w szczelinie synaptycznej (AChEI) oraz stosowanie leków, które bezpośrednio wpływają na receptory postsynaptyczne (agoniści receptora muskarynowego M1, modulatory receptorów nikotynowych). Spośród wyżej wymienionych, jedynie AChEI są lekami cholinomimetycznymi powszechnie stosowanymi w leczeniu otępień. Leki te, budząc wielkie nadzieje, po raz pierwszy zostały wprowadzone do terapii otępień w 1990 roku [Pepeu i Giovannini, 2009].

Obserwacje kliniczne wskazują, że nie wszyscy chorzy na AD reagują na leczenie AChEI. Szacuje się, że odsetek osób odpowiadających na leczenie waha w zakresie od 10 do 90%. Ta duża rozbieżność zależy od przyjętych kryteriów odpowiedzi na leczenie. Kryteria odpowiedzi na leczenie w różnych badaniach, czasem wybiórczo, a czasem łącznie razem uwzględniają następujące elementy: postęp choroby w czasie trwania obserwacji; czas trwania tej obserwacji; etap w naturalnym przebiegu choroby, w którym rozpoczęto obserwację.

Postęp choroby w czasie trwania terapii badano zazwyczaj za pomocą skal oceniających ogólny stan funkcjonowania (skala CIBIC-Plus, ADL i I.A.D.L), skal oceniających funkcje poznawcze (MMSE i ADAS-cog), skal oceny jakości życia (QOL, ang. *Quality of Life*) oraz skal oceniających zachowanie i nastrój (ang. *Neuropsychiatric Inventory*). Autorzy poszczególnych badań odmiennie definiowali odpowiedź na leczenie w różnych skalach. W większości przypadków pozytywna odpowiedź na leczenie w skali MMSE była definiowana jako uzyskanie po okresie terapii takiej samej lub większej liczby punktów [Pilotto i wsp., 2009; Babiloni i wsp., 2006]. Z kolei według Raschettiego i wsp. definicja pozytywnej odpowiedzi na leczenie była bardziej restrykcyjna, tzn. stwierdzano ją w przypadkach, gdy pacjent, po 9 miesięcznym okresie leczenia, uzyskiwał, co najmniej 2 punkty więcej w skali MMSE niż przed leczeniem [Raschetti i wsp., 2005]. Yoshida i wsp. poprawę definiowali na podstawie wyniku w skali ADAS-cog. Pozytywna odpowiedź na leczenie była zdefiniowana jako poprawa w tej skali, o co najmniej 3 punkty [Yoshida i wsp., 2007]. Niektórzy autorzy badań oceniających odsetek osób odpowiadających na leczenie, w celu zdefiniowania odpowiedzi na leczenie, stosowali skomplikowane algorytmy. Na przykład Saumier i wsp. odpowiedź na leczenie oceniali według wzoru matematycznego wyliczanego na podstawie punktów uzyskanych w skalach ADAS-cog, MMSE oraz CIBIC-plus [Saumier i wsp., 2007]. W badaniu Jelica i wsp. odpowiedź na leczenie była uznana za pozytywną, gdy po leczeniu, pacjent uzyskiwał przynajmniej taką samą liczbę punktów lub rejestrowano poprawę w 5 różnych skalach oceny [Jelic i wsp., 2008].

W prezentowanym badaniu przyjęto definicję pozytywnej odpowiedzi na leczenie, zalecaną przez National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE), zakładającą, że występuje ona wtedy, gdy po 4 miesiącach leczenia pacjenci uzyskują, co najmniej taką samą liczbę punktów w skali MMSE oraz poprawę w skalach oceniających codzienne funkcjonowanie [O'Brien i Ballard, 2001].

Czas trwania obserwacji w badaniach oceniających odpowiedź na leczenie wahał się od 1 dnia (ocena odpowiedzi po podaniu jednej dawki leku) [Almkvist i wsp., 2001] do 12 miesięcy [Babiloni i wsp., 2006].

Zalecany przez NICE okres obserwacji w tym przypadku powinien wynosić podobnie jak w prezentowanym badaniu 4 miesiące.

Ważnym elementem oceny odpowiedzi na leczenie jest czas rozpoczęcia tej obserwacji jak najwcześniej od początku choroby. Udokumentowano, że odpowiedź na leczenie jest odmienna w zależności od etapu choroby. Jak wykazano w badaniu Rogersa i wsp. odpowiedź na leczenie jest najlepsza przez pierwsze 6 do 9 miesięcy leczenia, potem, mimo leczenia, następuje stopniowo progresja choroby [Rogers i wsp., 2000].

Z powodu odmiennych kryteriów pozytywnej odpowiedzi na leczenie, trudno jest porównać wyniki prezentowanej pracy w odniesieniu do odsetka osób odpowiadających na leczenie w innych badaniach. Odsetek osób odpowiadających na leczenie w prezentowanym badaniu wynosił 60.7%. W innych badaniach opierających się na definicjach o różnym poziomie restrykcyjności wynosił on od 15 do 90%. Należy podkreślić, że badacze, którzy zastosowali definicje pozytywnej odpowiedzi na leczenie, rekomendowaną przez NICE uzyskali podobny jak w prezentowanej pracy odsetek osób odpowiadających na leczenie. Na przykład, w badaniu Pilotto i wsp. odsetek takich pacjentów wynosił 60% [Pilotto i wsp., 2009].

Wielokrotnie podejmowano próbę zidentyfikowania czynników odpowiedzialnych za brak odpowiedzi na leczenie AChEI u chorych na AD. Wyniki tych badań często są sprzeczne, choć można stwierdzić, że niektóre zależności zarejestrowano nieco częściej, np. wykazywano, że młodsze osoby reagują lepiej na leczenie, że kobiety, nosicielki allelu $\epsilon 4$ genu *APOE* reagują gorzej na leczenie, że im mniej zaawansowana choroba tym lepsza reakcja, oraz że występowanie działań niepożądanych AChEI uniemożliwia stosowanie dawek terapeutycznych i tym samym determinuje gorszą odpowiedź na leczenie.

Coraz więcej badań dowodzi, że znaczący wpływ na odpowiedź na leczenie AChEI mają czynniki genetyczne [Cacabelos, 2005; Cacabelos i Takeda, 2006; Cacabelos, 2005 (a)]. Szacuje się, że czynniki te mogą modyfikować odpowiedź na leczenie w 60 do 90% [Cacabelos i wsp., 2008].

Genetyczne uwarunkowania odpowiedzi na leczenie z jednej strony związane są z genami mającymi związek z etiopatogenezą choroby i z drugiej, z genami, których produkty modyfikują metabolizm AChEI.

Wśród genów z tej pierwszej grupy testowano znaczenie polimorfizmu genu *APOE*; wśród genów z tej drugiej grupy testowano znaczenie wariantów genetycznych genu *CYP2D6* i jeden wariant, Q192R, genu *PON1*. Ten pierwszy gen determinuje szybkość metabolizmu AChEI, natomiast paraoksanaza jako endogenne AChEI działa synergistycznie z egzogennymi AChEI. Jej aktywność jest zdeterminowana genetycznie i osoby będące nosicielami wariantów z allelem R polimorfizmu Q192R, mają większą aktywność *PON1*. W odniesieniu do *PON2* nie ma danych w literaturze na temat roli tego enzymu jako AChEI.

Choć związek polimorfizmu genu *APOE* z ryzykiem zachorowania na AD jest niepodważalny, wyniki dotychczasowych badań dostarczają sprzecznych danych na temat związku tego polimorfizmu z odpowiedzią na leczenie.

Dotychczas opublikowano 22 badania oceniające wpływ polimorfizmu genu *APOE* na reakcje na leczenie AChEI.

Pierwsze badania na ten temat analizowały wpływ tego polimorfizmu na skuteczność leczenia takryną. Każde z 6 badań oceniających skuteczność leczenia takryną było inaczej zaplanowane. Pierwsze trzy badania, trwające 8,5 miesiąca przeprowadzono na materiale 40, [Poirier i wsp., 1995], 460 [Farlow i wsp., 1996] i 528 [Farlow i wsp., 1998] chorych na AD. Kolejne badania przeprowadzone były na materiale 76 [Rigaud i wsp., 2000] i 145 [Sjögren i wsp., 2001] osób przez okres odpowiednio 1.5 i 12 miesięcy. Jedno badanie za pomocą prostych testów psychometrycznych oceniało wpływ pojedynczej dawki leku na różne funkcje poznawcze u 24 chorych na AD [Almkvist i wsp., 2001].

Trzy z wyżej wymienionych badań wykazały, że nosiciele allelu $\epsilon 4$ genu *APOE* gorzej odpowiadają na leczenie takryną [Poirier i wsp., 1995], w dwu z nich taka zależność dotyczyła wyłącznie kobiet nosierek allelu $\epsilon 4$ genu *APOE* [Farlow i wsp., 1996]. W jednym badaniu wykazano, że nosiciele allelu $\epsilon 4$ genu *APOE* lepiej wypadali w testach oceniających funkcje poznawcze, w porównaniu z grupą otrzymującą placebo, po podaniu pojedynczej dawki takryny [Almkvist i wsp., 2001]. Tylko w trwających stosunkowo krótko obserwacjach: w badaniu Rigauda i wsp. [Rigaud i wsp., 2000], które trwało 1.5 miesiąca oraz

w początkowej 6 miesięcznej fazie badania Sjogrena i wsp. [Sjögren i wsp., 2001] nie wykazano związku polimorfizmu genu *APOE* z odpowiedzią na leczenie takryną.

Pozostałe badania oceniały związek polimorfizmu genu *APOE* ze skutecznością leków nowej generacji: donepezylu (8 badań) [Borroni i wsp., 2002; Rigaud i wsp., 2002; Petersem i wsp., 2005; Bizzarro i wsp., 2005; Choi i wsp., 2008; Winblad i wsp., 2001; Suh i wsp., 2006; Rigaud i wsp., 2002], galantaminy (3 badania) [Aerssens i wsp., 2001; Raskind i wsp., 2000; Babić i wsp., 2004.] i rywastygminy (2 badania) [Farlow i wsp., 2004; Blesa i wsp., 2006]. W jednym badaniu porównywano skuteczność leczenia tymi trzema lekami z uwzględnieniem wpływu allelu $\epsilon 4$ genu *APOE* [Santoro i wsp., 2010]. W kolejnym, jednocześnie porównywano skuteczność leczenia galantaminą i takryną [MacGowan i wsp., 1998].

Wyniki dotychczasowych badań można podzielić na dwie grupy. Takie, które wykazywały, że osoby z allelem $\epsilon 4$ lepiej reagują na leczenie, oraz takie, w których polimorfizm *APOE* nie ma wpływu na leczenie. Tylko w jednym badaniu wykazano, że u osób nie będących nosicielami allelu $\epsilon 4$ genu *APOE* odpowiedź na leczenie donepezilem jest lepsza [Borroni i wsp., 2002]. Okazuje się, że badania, w których wykazano korzystny wpływ allelu $\epsilon 4$ na skuteczność leczenia trwały znacznie dłużej niż badania, w których takiego związku nie wykazano. Te pierwsze badania trwały zazwyczaj powyżej 1 roku (36 miesięcy, 12, 12-16 miesięcy), rzadziej 6 miesięcy; a drugie trwały zawsze poniżej roku (3 miesiące, 6 miesięcy, 9 miesięcy, 3 do 12 miesięcy, 12 miesięcy). Nie można wykluczyć, że stosunkowo krótki czas obserwacji skuteczności terapii w prezentowanym badaniu jest odpowiedzialny za brak zarejestrowania wpływu polimorfizmu genu *APOE* na efekt leczenia.

Na podstawie dotychczasowych wyników badań można wnioskować, że przynajmniej 15% chorych na AD w nieprawidłowy sposób metabolizuje AChEI z powodu wadliwego funkcjonowania enzymów, kodowanych przez gen *CYP2D6* [Cacabelos, 2008 (a)]. Przynajmniej 50% spośród tych chorych wykazuje bardzo szybki metabolizm leków z grupy AChEI i wymaga stosowania znacznie większych dawek dla osiągnięcia poziomu terapeutycznego.

Gen odpowiedzialny za ekspresję enzymu CYP2D6 znajduje się na chromosomie 22q13.1. Znanych jest około 100 alleli genu *CYP2D6*, spośród których ponad 20 znacząco zmienia metabolizm leków będących substratami tego enzymu grupując nosicieli poszczególnych alleli na 4 grupy. Do pierwszej należą osoby o małej aktywności enzymatycznej i wolnym

metabolizowaniu (ang. *Poor Metabolizers- PM*), do drugiej o prawidłowej aktywności enzymatycznej i tempie metabolizowania (ang. *Intermediate Metabolizers- IM*), do trzeciej osoby o wzmożonej aktywności enzymatycznej i nadmiernie szybkim metabolizowaniu (ang. *Extensive Metabolizers-EM*) a do czwartej o bardzo nasilonej aktywności enzymatycznej i tempie metabolizowania (ang. *Ultra –rapid Metabolizers- UM*) [Griese i wsp., 1998].

W populacji kaukaskiej najczęściej występuje allel dziki CYP2D6*1, warunkujący prawidłową aktywność enzymu. Częstość jego występowania wynosi 33-36,4%. Spośród alleli odpowiedzialnych za defekt enzymatyczny CYP2D6 w tej populacji największe znaczenie kliniczne mają: CYP2D6*3, CYP2D6*4 i CYP2D6*5. Najczęściej występuje w niej zmutowany allel (12-21%) CYP2D6*4 (G1934A). Mutacja CYP2D6*3 jest spowodowana delecją jednej pary zasad w eksonie 5 (delecja A2637), natomiast występowanie allelu CYP2D6*5 jest skutkiem delecji całego genu. Częstość występowania alleli CYP2D6*3 i CYP2D6*5 w populacji kaukaskiej wynosi odpowiednio około 2-3% i 2-7% [Ingelman-Sundberg, 2005].

W wieloośrodkowym badaniu Pilotto i wsp. brało udział 115 pacjentów z AD, którzy przez 6 miesięcy leczenia byli donepezilem. Po tym czasie obserwacji stwierdzono, że 40% chorych nie reagowało na leczenie według przyjętych przez autorów kryteriów oraz stwierdzono w tej grupie znamienne więcej nosicieli allelu G polimorfizmu genu *CYP2D6* [Pilotto i wsp., 2009].

W ostatnich latach wykazano, że nosicielstwo allelu G polimorfizmu rs1080985 (C-15843G) genu *CYP2D6* związane jest z większą ekspresją tego genu i większą aktywnością enzymatyczną jego produktu [Gaedigk i wsp., 2003; Zanger i wsp., 2001].

Również w badaniu Varsaldi i wsp. wykazano związek polimorfizmu genu *CYP2D6* i odpowiedzi na leczenie AChEI [Varsaldi i wsp., 2006]. W badaniu tym brało udział 42 chorych na AD rasy kaukaskiej, którzy przez przynajmniej 3 miesiące leczenia byli donepezilem. Stwierdzono, że 30 chorych spełniało kryteria dla homozygot EMs, 10 dla heterozygot EMs i 2 dla UM. Nie stwierdzono w badanej grupie pacjentów spełniających kryteria dla PM. Heterozygoty EMs wykazywały lepszą odpowiedź na leczenie donepezilem w porównaniu z heterozygotami. Pacjenci UM wykazywali brak poprawy po stosowanym leczeniu.

Niedawno udokumentowano, że polimorfizm Q192R genu *PON1* ma wpływ na odpowiedź na leczenie AChEI [Pola i wsp., 2005]. W badaniu tym uczestniczyły 73 osoby: 17 osób zakwalifikowano jako osoby odpowiadające na terapię (tzn. osoby, które po okresie około 9- miesięcznej terapii uzyskały, co najmniej 2 punkty więcej w skali MMSE oraz nie uzyskały gorszych wyników w skali I.A.D.L i ADL w stosunku do stanu wyjściowego), a 56 osób jako osoby nie odpowiadające na terapię (pozostali chorzy). Osoby, które odpowiedziały na terapię miały ponad dwukrotnie częściej allel R niż osoby, które nie odpowiedziały na terapię.

W prezentowanym badaniu nie potwierdzono tej obserwacji. Było ono przeprowadzone na większym materiale (n=101 osób), zastosowano podobną definicję pozytywnej reakcji na leczenie, w analizie uzyskanych wyników wzięto pod uwagę poziom edukacji pacjentów, jedyna różnica między badaniem Poli i wsp. i badaniem prezentowanym odnosiła się do czasu trwania obserwacji. W badaniu Poli i wsp. wynosił on 9 miesięcy i był dwa razy dłuższy niż w prezentowanym badaniu. W kontekście obserwacji dotyczących znaczenia wariantów genu *APOE* dla odpowiedzi na leczenie inhibitorami, wskazujących, że różnica reakcji na leczenie w zależności od genotypu ujawnia się po dłuższym okresie obserwacji, nie można wykluczyć, że taka sama reguła odnosi się do znaczenia wariantów genów *PON*. W prezentowanej pracy przeanalizowano znaczenie wszystkich badanych wariantów *PON1* w odniesieniu do reakcji na leczenie. Wiadomo, że *PON1* ma właściwości AChEI, ale nie wiadomo, czy i które warianty genetyczne, poza Q192R determinują tę odpowiedź.

VI.3. Podsumowanie

Prezentowane badanie nie wykazało związku analizowanych polimorfizmów genów *PON* z ryzykiem AD. Potwierdziło natomiast, że genotyp z allelem $\epsilon 4$ genu *APOE* jest istotnym czynnikiem ryzyka tej choroby w populacji polskiej.

Wartość tego badania, mimo jego negatywnego wyniku polega na bardzo rygorystycznym przestrzeganiu wymogów metodycznych: zastosowano korektę Bonferoniego, przeprowadzono analizy mające na celu stwierdzenie lub wykluczenie potencjalnych interakcji między badanymi wariantami, sprawdzono, czy badane warianty genetyczne tworzą haplotypy. Ze względu na to, że siła badania, mimo tak dużego materiału badawczego, okazała się stosunkowo niska przeprowadzono metaanalizę uzyskanych wyników z wynikami dotychczas opublikowanych badań na ten temat. Pozwoliło to uniknąć fałszywie pozytywnej lub fałszywie negatywnej interpretacji wyników własnych. Metaanalizy na temat znaczenia badanych wariantów genów *PONI*, wykonane po raz pierwszy, obejmowały stosunkowo duży materiał. W przypadku polimorfizmu Q192R łącznie zakwalifikowano 2900 osób, L55M – 2087 osób a –161C/T 2552 osoby.

Prezentowane badanie było wykonane na największym w Polsce materiale genetycznym pochodzącym od chorych na AD. Pozyskanie tak dużej liczby uczestników było możliwe dzięki nawiązaniu współpracy naukowej między Kliniką Neurologii w Krakowie i w Kliniką Neurologii Centralnego Szpitala Klinicznego MSWiA w Warszawie.

W prezentowanym badaniu do oceny odpowiedzi na leczenie zastosowano zalecaną przez NICE definicję pozytywnej reakcji na leczenie i porównując z badaniami, w których zastosowano tę lub podobną definicję zarejestrowano podobny odsetek osób odpowiadających na leczenie. Dowodzi to rzetelności metodycznej prezentowanego badania.

Prezentowane badanie, w przeciwieństwie do pierwszego i jedyne na ten temat, nie wykazało związku badanych wariantów genetycznych genu *PON* z odpowiedzią na leczenie AChEI. Jedyna różnica między tymi dwoma badaniami polegała na długości obserwacji skuteczności leczenia. Nie można wykluczyć, w kontekście wiedzy z wcześniejszych badań na temat odpowiedzi na leczenie w zależności od genotypu *APOE*, że dopiero dłuższy czas obserwacji pozwala na ustalenie różnic odpowiedzi na leczenie w zależności od genotypu.

VII. WNIOSKI

- 1) Polimorfizmy Q192R, M55L, -161C/T genu *PON1* nie są czynnikami ryzyka AD;
- 2) Polimorfizm C311S genu *PON2* nie jest czynnikiem ryzyka AD;
- 3) Polimorfizmy genów *PON* i *APOE* nie mają wpływu na odpowiedź na leczenie AChEI;
- 4) Badane polimorfizmy nie są czynnikiem ryzyka AD również w łącznej analizie uwzględniającej wyniki własne oraz wyniki wszystkich opublikowanych badań udostępniających wyniki surowe.

VIII. STRESZCZENIE

Choroba Alzheimera (AD) jest chorobą zwyrodnieniową układu nerwowego, dla której najbardziej charakterystyczne są narastające zaburzenia pamięci i innych funkcji poznawczych, co prowadzi do upośledzenia codziennego funkcjonowania chorego i z czasem, do zupełnego uzależnienia od pomocy osób drugich. AD jest najczęstszą przyczyną otępienia w społeczeństwach zachodnich i drugą, co do częstości w krajach Dalekiego Wschodu.

AD jest chorobą o złożonej etiologii. Spośród czynników ryzyka determinujących rozwój tej choroby bierze się pod uwagę wpływ czynników środowiskowych (np. starszy wiek) i genetycznych (np. nosicielstwo allelu $\epsilon 4$ genu *APOE*).

Etiopatogeneza AD również jest złożona i nie w pełni poznana. Jak dotąd wydaje się, że proces rozwoju AD najlepiej opisuje hipoteza kaskady amyloidowej, która tłumaczy powstawanie i odkładanie w tkance mózgowej dwóch charakterystycznych dla tego procesu białek: amyloidu- β ($A\beta$) oraz białka- τ . Również hipoteza dysfunkcji cholinergiczej znalazła praktyczne zastosowanie, szczególnie jako podstawa dla poszukiwania leków mogących modyfikować przebieg choroby. Jak dotąd preparatami najszerzej stosowanymi w leczeniu AD są inhibitory acetylocholinesterazy (AChEI), których mechanizm działania polega na poprawie, upośledzonego w AD, przekazywania cholinergicznego.

Paraoksonazy (PON) to białka kodowane przez trzy geny paraoksonaz (*PON1*, *PON2*, *PON3*) zlokalizowane na chromosomie 7 (7q21.3–22.1). Podstawowa funkcja, jaką odgrywają paraoksonazy w organizmie związana jest z ich udziałem w procesach antyoksydacyjnych, a w wypadku *PON1* dodatkowo w hydrolizie związków fosforoorganicznych.

Wykazano, że polimorfizm genów *PON* ma znaczenie dla ryzyka zachorowania na AD.

Trzy z 10 dotychczas przeprowadzonych badań wykazały, że nosicielstwo allelu R polimorfizmu Q192R genu *PON1* zmniejsza ryzyko zachorowania.

Jedno z trzech badań analizujących związek polimorfizmu -161C/T genu *PON1* z ryzykiem zachorowania na AD potwierdziło, że allel T niezależnie oraz jako część haplotypu jest czynnikiem ryzyka AD.

Polimorfizm L55M genu *PON1* badano pięciokrotnie u pacjentów chorych na AD rasy kaukaskiej. W dwóch badaniach potwierdzono, że allel M jest czynnikiem ryzyka AD: w pierwszym- jako czynnik niezależny, w drugim- jako część składowa haplotypu.

W trzech badaniach analizowano związek polimorfizmu C311S genu *PON2* z ryzykiem zachorowania na AD. Stwierdzono, że polimorfizm ten ma znaczenie dla ryzyka zachorowania na AD jako składnik haplotypu w populacji kaukaskiej oraz, że allel C jest czynnikiem ryzyka AD u osób rasy żółtej.

Badania wykazały, że znaczny odsetek chorych na AD nie odpowiada na leczenie AChEI. Wśród czynników determinujących odpowiedź na leczenie wymienia się między innymi: wiek i płeć chorych, stopień zaawansowania choroby, oraz czynniki genetyczne (polimorfizm genów: *APOE*, *CYP2D6*, *PON*).

Niedawno wykazano związek polimorfizmu Q192R genu *PON1* z odpowiedzią na leczenie AChEI (osoby, które odpowiadają na terapię AChEI są znacznie częściej nosicielami allelu R).

Celem przedstawionego badania było określenie wpływu polimorfizmów genów *PON1* i *PON2*, które zostały udokumentowane jako czynniki ryzyka choroby Alzheimera w innych populacjach (L55M, Q192R, -161C/T genu *PON1* oraz C311S genu *PON2*) na ryzyko tej choroby w populacji polskiej oraz sprawdzenie, czy badane polimorfizmy mają wpływ na odpowiedź chorych na AD na leczenie AChEI. Cel projektu zrealizowano w następujący sposób: 1) porównano częstości występowania wybranych polimorfizmów genu *PON1* (R192Q, L55M, -161C/T) w grupie chorych na AD i w grupie kontrolnej; 2) porównano częstości występowania polimorfizmu C311S genu *PON2* w grupie chorych na AD i w grupie kontrolnej; 3) zbadano, czy polimorfizm genu *APOE*, wiek zachorowania i płeć modyfikują znaczenie wybranych polimorfizmów paraoksonaz jako czynników ryzyka AD; 4) zbadano, czy reakcja pacjentów z AD na leczenie AChEI jest modyfikowana przez zbadane polimorfizmy genów *PON* i *APOE*;

Badanie genetyczne wykonano u 360 chorych na AD (osoby z diagnozą klinicznie prawdopodobnej AD postawioną według kryteriów DSM-IV i NINCDS-ADRDA) oraz 354 zdrowe osoby z grupy kontrolnej. U 101 pacjentów leczonych AChEI przeanalizowano wpływ polimorfizmów genów *PON* i *APOE* na odpowiedź na leczenie.

Badania polimorfizmów Q192R, L55M genu *PON1* oraz C311S genu *PON2* wykonywano za pomocą reakcji PCR i trawienia odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi; polimorfizm -161C/T genu *PON1* oznaczano metodą real time-PCR.

Odpowiedź na leczenie (ang. *responders*) została stwierdzona u osób z AD, które w czasie, co najmniej 16-tygodniowej terapii AChEI uzyskały poprawę przynajmniej o 1 punkt w skali MMSE oraz u których liczba punktów w skali ADL i I.A.D.L nie zmniejszyła się w tym czasie.

Osoby chore na AD były starsze od osób z grupy kontrolnej ($p=0,000001$). Z powodu istotnie statystycznej różnicy wieku między badanymi grupami wszystkie analizy związku badanych polimorfizmów z ryzykiem zachorowania na AD testowano nie tylko za pomocą analizy jednoczynnikowej, ale także za pomocą analizy regresji logistycznej uwzględniającej dane demograficzne. W prezentowanym badaniu zarówno analiza jednoczynnikowa jak i analiza regresji logistycznej uwzględniająca wpływ wieku i płci wykazały, że polimorfizm L55M (obecność allelu M) ma wpływ na ryzyko zachorowania na AD w modelu addytywnym, ale na poziomie istotności równym 0.03. Ze względu na równoczesne testowanie wielu hipotez dla prezentowanego badania uwzględnienie korekty Bonferoniego pozwoliło ustalić poziom istotności statystycznej na 0.01. Z tego powodu uzyskany wynik nie można uznać za istotny statystycznie. Pozostałe testowane modele (dominujący i recesywny) także takiej zależności nie wykazały. Zarówno analiza jednoczynnikowa, jak i analiza regresji logistycznej uwzględniająca wpływ wieku i płci, w żadnym z testowanych modeli dziedziczenia nie wykazały związku testowanych genotypów polimorfizmów Q192R, -161C/T genu *PON1* oraz C311S genu *PON2* z ryzykiem AD.

Wykonane w prezentowanej pracy metaanalizy uwzględniające opublikowane wyniki zawierające dane surowe na temat posiadania genotypów RR polimorfizmu Q192R genu *PON1*, genotypu TT polimorfizmu -161C/T genu *PON1* oraz genotypu MM polimorfizmu L55M genu *PON1* oraz wyniki prezentowanego badania nie wykazały związku badanych genotypów z ryzykiem zachorowania na AD.

W prezentowanym badaniu potwierdzono, że osoby chore na AD charakteryzowało znacznie częstsze występowanie genotypów z allelem $\epsilon 4$ genu *APOE* w porównaniu do osób z grupy kontrolnej.

Badanie nie potwierdziło wpływu badanych polimorfizmów genów *PON* ani polimorfizmu genu *APOE* na odpowiedź na leczenie AChEI.

IX. SUMMARY

Alzheimer's disease (AD) is a degenerative disease of the nervous system, for which the most characteristic features are escalating memory complaints and other cognitive dysfunctions, what leads to impairment of everyday functioning and, in time, complete dependence in everyday life. AD is the most frequent cause of dementia in Western societies and second, in countries of the Far East. AD is a complex disease. Environmental factors (e.g. older age) and genetics (e.g. carrying of the ϵ 4 allele of the APOE gene) are considered as prominent factors determining its development. Etiopathogenesis of AD is also complex and not fully understood. It seems, so far, that the development of AD is described in the best way by the amyloid cascade hypothesis, which explains the appearance and accumulation of the two characteristic proteins for this process in cerebral tissue: amyloid- β (A β) and τ proteins. Hypothesis of the cholinergic dysfunction has also practical application, especially for seeking medication being able to modify the course of the disease. So far the most widely applied drugs for the treatment of AD are acetylcholinesterase inhibitors (AChEI), which improve poor cholinergic transmission in AD.

Paraoxonases (PON) are proteins which are coded by the three paraoxonase genes (*PON1*, *PON2*, *PON3*) located on chromosome 7 (7q21. 3-22.1).

The main role of paraoxonases is their participation in antyoxidative processes, and the hydrolysis of toxic organophosphates in case of PON1.

It was shown that the polymorphisms of the *PON* genes may affect the risk of AD. Three out of 10 studies conducted so far showed that the possession of the R allele of the Q192R polymorphism of the *PON1* gene decreased the risk of AD. One out of three studies analyzing the correlation between the -161 C/T polymorphism of the *PON1* gene with the risk of AD showed that possession of the T allele independently or as the part of the haplotype increased the risk of AD. The L55M polymorphism of the *PON1* gene was examined in five studies in Caucasian AD patients. The M allele was shown to be a risk factor of AD in two studies: in the first- as the independent factor, in second- as a part of the haplotype. The three studies analyzed the association between the C311S polymorphism of the *PON3* gene and the risk of AD. They showed that this polymorphism affected the risk of AD as a part of the haplotype in the Caucasian population and the C allele was a risk factor of AD in an Asian population.

Studies showed that the considerable percentage of AD patients did not respond to the AChEI treatment. The following factors are considered to determine this response: age and gender, severity of the disease, and genetic factors (polymorphism of the following genes: *APOE*, *CYP2D6* and *PON*). Recently, a link between the Q192R polymorphism of the *PON1* gene and the response to the AChEI treatment was established: persons who responded to AChEI therapy were much more often carriers of the R allele.

The aim of this study was to assess the influence of the polymorphisms of the *PON1* and the *PON2* genes and the risk of AD in a Polish population. The polymorphism of the *PON* genes which were shown to affect the risk of AD in different populations (M55L, Q192R, -161C/T of the *PON1* and C311S of the *PON2* gene) were studied. We also studied whether the examined polymorphisms influenced the response to the AChEI treatment in patients with AD.

The purpose of the project was accomplished in the following manner: 1) frequencies of the studied polymorphisms of the *PON1* gene were compared (R192Q, M55L, -161 C/T) between the AD patients and the controls; 2) frequencies of the C311S polymorphism of the *PON2* gene were compared between the AD patients and the controls; 3) the influence of the *APOE* polymorphism, age of the disease onset and gender on the relation between the studied *PON* gene polymorphisms and the risk of AD was studied; 4) the response of the AD patients to the AChEI treatment in respect of carrying the tested polymorphisms of the *PON* and the *APOE* genes was analyzed.

Genetic studies were performed in 360 AD patients (the diagnosis of clinically probable AD made according to criteria DSM-IV and NINCDS-ADRDA) and in 354 healthy control subjects. The influence of the studied polymorphisms on the response to the treatment was analyzed in 102 AD cases.

Examinations of the Q192R and the L55M polymorphisms of the *PON1* gene and the C311S of the *PON2* gene were carried out with PCR reaction with appropriate restriction enzymes; polymorphism – 161C/T of the *PON1* gene was being indicated with real time-PCR method. Responders were defined as patients with MMSE score improvement of 1 and more points from baseline and did not reduce the score achieved in the ADL scale and I.A.D.L after 16 weeks of treatment.

AD patients were older than controls ($p = 0.000001$). Because of the significant difference in age between the studied groups all statistical analyses of the link between examined polymorphisms with the risk of AD were tested not only with one-way analysis, but also with the logistic regression analysis adjusted for demographic data.

In this study both one-way analysis as well as the logistic regression analysis adjusted for the age and the gender, demonstrated, that the L55M polymorphism (the presence of the allele M) affects the risk of AD in the additive model, but with p value equal 0.03. Because of simultaneous testing of many hypotheses in the presented study, the Bonferoni correction decreased the expected p value to 0.01. For this reason the achieved result is not considered as statistically significant. Remaining tested models (dominant and recessive) did not demonstrate significant correlation.

Both one-way analysis and logistic regression analysis taking into account the influence of the age and the gender, did not establish the link of the other tested polymorphisms and the risk of AD.

Metaanalyses performed in the presented study including all published results containing raw data about the possession of the RR genotypes of the Q192R polymorphism of the *PON1* gene, the TT genotype of the -161C/T polymorphism of the *PON1* gene and the MM genotype of the L55M polymorphism of the *PON1* gene and results of the study did not establish the link between the studied polymorphisms and the risk of AD.

The presented study confirmed, that AD patients had much more often the ϵ 4 allele of the *APOE* gene as compared with the controls.

The study did not confirm the influence of the tested polymorphisms of the *PON* genes or the polymorphism of the *APOE* gene on the response to the AChEI treatment.

X. ZAŁĄCZNIKI

ZAŁĄCZNIK 1

Kryteria diagnostyczne rozpoznania otępienia typu alzheimerowskiego wg DSM-IV Amerykańskiego Towarzystwa Psychiatrycznego [American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, wyd 4., 1994].

A. Rozwój licznych deficytów poznawczych przejawiających się przez:

1. zaburzenia pamięci (osłabiona zdolność do uczenia się nowych albo przypominania poprzednio wyuczonych informacji)
2. obecność jednego lub więcej z następujących objawów
 - (a) afazja,
 - (b) apraksja,
 - (c) agnozja,
 - (d) zaburzenie działań wykonawczych (planowanie, organizacja, abstrakcja).

B. Zaburzenia poznawcze w kryterium A1 i A2 powodują znaczące zaburzenie funkcjonowania społecznego lub zawodowego i wykazują znaczące pogorszenie w porównaniu z poprzednim poziomem funkcjonowania.

C. Przebieg charakteryzuje się stopniowym początkiem i ciągłym narastaniem zaburzeń poznawczych.

D. Zaburzenia poznawcze w kryterium A1 i A2 nie są spowodowane żadną z wymienionych przyczyn:

1. inne stany patologiczne OUN powodujące deficyt pamięci i poznawania (otępienie naczyniopochodne, choroba Parkinsona, choroba Huntingtona, krwaki, wodogłowie normotensyjne, guz),
2. choroby układowe, o których wiadomo, że są przyczyną otępienia (niedoczynność tarczycy, awitaminoza B12, niedobór kwasu foliowego, niacyny, hiperkalcemia, kiła układu nerwowego, HIV),
3. stany spowodowane substancjami toksycznymi

E. Deficyty poznawcze nie występują wyłącznie z zaburzeniami świadomości.

ZAŁĄCZNIK 2

Kryteria rozpoznania choroby Alzheimera według: National Institute of Neurologic, Communicative Disorders and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) [McKhan i wsp., 1984].

Zrewidowane w 2007r. [Dubois i wsp., 2007].

Prawdopodobną chorobę Alzheimera stwierdza się, gdy występują cechy wymienione poniżej jako podstawowe w panelu A plus jedna lub więcej cech wymienionych jako wspomagające z grup B, C, D i E.

Kryteria podstawowe

A. Obecność wczesnych i znaczących zaburzeń pamięci epizodycznej, charakteryzujące się poniższymi cechami:

- stopniowe i postępujące zaburzenia pamięci zgłaszane przez chorego lub informatora trwające dłużej niż 6 miesięcy;
- obiektywnie potwierdzone za pomocą testów i znamienne zaburzenie pamięci epizodycznej, przede wszystkim polegające na upośledzeniu przypominania, które nie ulegają normalizacji przy kontrolowanej uprzednio skuteczności zapamiętania informacji;
- zaburzenia pamięci epizodycznej mogą być izolowane albo mogą dotyczyć także innych funkcji poznawczych, zarówno na początku choroby jak i wraz z jej rozwojem.

Cechy wspomagające

B. Stwierdzenie zaniku przyśrodkowych części płata skroniowego:

- zmniejszenie objętości hipokampa, kory śródwęchowej, jąder migdałowych udokumentowane w badaniu MRI w ocenie ilościowej na podstawie wizualnych skal punktowych (odnośnie do istniejących norm wiekowych) lub oceny wolumetrycznej powyższych rejonów w porównaniu z normami wiekowymi.

C. Stwierdzenie nieprawidłowych stężeń biomarkerów w PMR:

- niskie stężenie Ab1–42, wzrost stężenia całkowitego białka *tau* lub wzrost zawartości nieprawidłowo fosforyzowanego białka *tau*, lub kombinacja wszystkich wymienionych.

D. Stwierdzenie swoistego wzorca w obrazowaniu czynnościowym w badaniu PET:

- obniżenie metabolizmu glukozy obustronnie w płatach skroniowo-ciemieniowych;
- twierdzenie obecności innych dobrze i swoście opisanych złazisk uwidocznionych przez znakowanie PIB lub FDDNP.

E. Wykazanie w rodzinie obecności mutacji dziedziczonej autosomalnie-dominująco.

Kryteria wyłączenia

W wywiadzie stwierdza się:

- nagły początek;
- wczesne pojawienie się: zaburzeń równowagi, drgawek, zaburzeń zachowania.

W badaniu klinicznym występują:

- deficyty ogniskowe: niedowłady połowicze, zaburzenia czucia, ubytki w polu widzenia;
- wczesne objawy pozapiramidowe.

Obecne inne choroby przebiegające z zaburzeniami pamięci:

- otępienia niealzheimerowskie;
- duża depresja;
- choroba naczyniowa mózgu;
- toksyczne lub metaboliczne nieprawidłowości wymagające specjalistycznych badań;
- stwierdzenie w MRI, w sekwencji FLAIR lub w obrazach T2-zależnych, zaburzeń w przyśrodkowych częściach płatów skroniowych typowych dla zapalenia lub ogniska naczyniopochodnego.

Kryteria pewnej choroby Alzheimer:

- stwierdzenie w biopsji przyżyciowo lub w badaniu autopsyjnym cech typowych dla choroby Alzheimer w liczbie spełniającej kryteria Instytutu Regana dla rozpoznania choroby Alzheimer;
- stwierdzenie jednocześnie dowodów klinicznych i genetycznych (mutacje na chromosomach: 1, 14,21) obecności choroby Alzheimer.

ZAŁĄCZNIK 3

Skala oceny podstawowych czynności życia codziennego Katz'a - Skala ADL (ang. Activities of Daily Living) [Abrams i wsp., 1999].

- Za każdą twierdzącą odpowiedź badany otrzymuje 1 punkt.
- Za odpowiedź przeczącą - 0 punktów.

Czynności życia codziennego	Pacjent	TAK
Kąpanie się nie wymaga pomocy lub pomoc potrzebna tylko przy myciu jednej części ciała	nie wymaga pomocy lub pomoc potrzebna tylko przy myciu jednej części ciała	.
Ubieranie się ubiera się bez żadnej pomocy lub pomoc potrzeba tylko przy wiązaniu sznurówek	ubiera się bez żadnej pomocy lub pomoc potrzeba tylko przy wiązaniu sznurówek	.
Korzystanie z toalety idzie do toalety, korzysta z niej, poprawia ubranie i wraca z toalety bez pomocy (może używać laski, chodzika, w nocy basenu lub nocnika)	idzie do toalety, korzysta z niej, poprawia ubranie i wraca z toalety bez pomocy (może używać laski, chodzika, w nocy basenu lub nocnika)	.
Poruszanie się przemieszcza się z/do łóżka lub na krzesło bez pomocy (może używać laski lub chodzika)	przemieszcza się z/do łóżka lub na krzesło bez pomocy (może używać laski lub chodzika)	.
Kontrolowane wydalanie moczu i stolca całkowicie panuje nad zwieraczami	całkowicie panuje nad zwieraczami	.
Jedzenie spożywa posiłek bez pomocy (ewentualnie wymaga pomocy w krojeniu mięsa lub smarowaniu pieczywa masłem)	spożywa posiłek bez pomocy (ewentualnie wymaga pomocy w krojeniu mięsa lub smarowaniu pieczywa masłem)	.
RAZEM:	.	.

Wynik:

- 0-2 punkty – znaczne upośledzenie sprawności w zakresie ADL
- 3-4 punkty – umiarkowane upośledzenie sprawności w zakresie ADL
- 5-6 punktów – osoby sprawne w zakresie czynności życia codziennego

ZAŁĄCZNIK 4

Skala oceny złożonych czynności życia codziennego (skala Lawtona) – I.A.D.L (ang. *instrumental activities of daily living*) [Lawton i Brody, 1969].

1. Czy potrafisz korzystać z telefonu?

3 = bez pomocy

2 = z niewielką pomocą

1 = zupełnie nie jesteś w stanie korzystać

2. Czy jesteś w stanie dotrzeć do miejsc poza odległością spaceru?

3 = bez pomocy

2 = z niewielką pomocą

1 = zupełnie nie jesteś w stanie podróżować, dopóki nie poczyni się specjalnych przygotowań

3. Czy wychodzisz na zakupy po artykuły spożywcze?

3 = bez pomocy

2 = z niewielką pomocą

1 = zupełnie nie jesteś w stanie robić jakichkolwiek zakupów

4. Czy możesz samodzielnie przygotować sobie posiłki ?

3 = bez pomocy

2 = z niewielką pomocą

1 = nie jesteś w stanie

5. Czy możesz samodzielnie wykonywać prace domowe (np. sprzątanie)?

3 = bez pomocy

2 = z niewielką pomocą

1 = zupełnie nie jesteś w stanie

6. Czy możesz samodzielnie majsterkować / wyprać swoje rzeczy?

3 = bez pomocy

2 = z niewielką pomocą

1 = nie jesteś w stanie

7. Czy samodzielnie przygotowujesz i przyjmujesz leki?

3 = bez pomocy

2 = z niewielką pomocą

1 = nie jesteś w stanie

8. Czy samodzielnie gospodarujesz pieniędzmi?

3 = bez pomocy

2 = z niewielką pomocą

1 = nie jesteś w stanie

Wynik końcowy...../24

XI. PIŚMIENNICTWO

1. Abrams W.B., Beers M.H., Berkow R., (Galus K., Kocemba J. red. wydania polskiego): MSD Podręcznik geriatry. Wrocław 1999.
2. Aerssens J, Raeymaekers P, Lilienfeld S, Geerts H, Konings F, Parys W. APOE genotype: no influence on galantamine treatment efficacy nor on rate of decline in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2001; 2:69–77 44.
3. Aggarwal NT, Bienias JL, Bennett DA, et al. The relation of cigarettesmoking to incident Alzheimer's disease in a biracial urban community population. *Neuroepidemiology*. 2006; 26:140-146.
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. Aisen, P.S., Schafer, K.A., Grundman, M., Pfeiffer, E., Sano, M., Davis, K.L., Farlow, M.R., Jin, S., Thomas, R.G. Thal, L.J. Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on Alzheimer disease progression: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003, 289: 2819-2826.
6. Aisen, P.S., Schmeidler, J. Pasinetti, G.M. Randomized pilot study of nimesulide treatment in Alzheimer's disease. *Neurology* 2002, 58: 1050-1054.
7. Akiyama H, Arai T, Kondo H, Tanno E, Haga C, Ikeda K. Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2000;14 Suppl 1:S47-53
8. Akomolafe A, Beiser A, Meigs JB, et al. Diabetes mellitus and risk of developing Alzheimer disease: results from the Framingham Study. *Arch Neurol*. 2006; 63:1551-1555.
9. Albuquerque EX, Alkondon M, Pereira EF, Castro NG, Schrattenholz A, Barbosa CT, Bonfante-Cabarcas R, Aracava Y, Eisenberg HM, Maelicke A. Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological characterization and modulation of synaptic function. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997 Mar; 280(3):1117-36.
10. Almkvist O, Jelic V, Amberla K, Hellström-Lindahl E, Meurling L, Nordberg A. Responder characteristics to a single oral dose of cholinesterase inhibitor: a double-blind placebo-controlled study with tacrine in Alzheimer patients. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2001 Jan-Feb; 12(1):22-32.
11. Alzheimer's Association. 2009 Alzheimer's disease Facts and Figures. www.alz.org/national/documents/report_alzfactsfigures2009.pdf. Accessed April 6, 2009.
12. Alzheimer's Association. Early-Onset Dementia: A National Challenge, A Future Crisis. (Washington, D.C.: Alzheimer's Association, June 2006). Available at www.alz.org.

13. 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.
14. Anderton BH, Breinburg D, Downes MJ, Green PJ, Tomlinson BE, Ulrich J, Wood JN, Kahn J. Monoclonal antibodies show that neurofibrillary tangles and neurofilaments share antigenic determinants. *Nature*. 1982;298:84–86.
15. An efficacy study of dimebon in patients with moderate to severe Alzheimer's disease. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00912288>. Accessed June 8, 2009.
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. Anttila T, Helkala EL, Viitanen M, et al. Alcohol drinking in middle age and subsequent risk of mild cognitive impairment and dementia in old age: a prospective population based study. *BMJ*. 2004;329:539.
18. Apelt J, Bigl M, Wunderlich P, Schliebs R. Aging-related increase in oxidative stress correlates with developmental pattern of beta-secretase activity and beta-amyloid plaque formation in transgenic Tg2576 mice with Alzheimer-like pathology. *Int J Dev Neurosci*. 2004 Nov;22(7):475-84.
19. Arendt T, Zvegintseva HG, Leontovich TA. Dendritic changes in the basal nucleus of Meynert and in the diagonal band in Alzheimer disease. A quantitative Golgi investigation. *Neuroscience*. 1986;19:1265–1278.
20. 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.
21. 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.
22. Attia J, Ioannidis JP, Thakkinstian A, McEvoy M, Scott RJ, Minelli C, Thompson J, Infante-Rivard C, Guyatt G. How to use an article about genetic association: B: Are the results of the study valid? *JAMA*. 2009 Jan 14; 301(2):191-7.
23. 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.
24. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, Billicke S, Draganov D, Rosenblat M. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation* 2000; 101:2510–7.

25. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998; 101:1581–90. (a)
26. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Eroglu J, Hsu C, Dunlop C, La Du B. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:1617–24. (b)
27. Babić T, Mahović Lakusić D, Sertić J, Petrovečki M, Stavljenić-Rukavina A. ApoE genotyping and response to galanthamine in Alzheimer's disease--a real life retrospective study. *Coll Antropol.* 2004 Jun;28(1):199-204.
28. Babiloni C, Cassetta E, Dal Forno G, Del Percio C, Ferreri F, Ferri R, Lanuzza B, Miniussi C, Moretti DV, Nobili F, Pascual-Marqui RD, Rodriguez G, Luca Romani G, Salinari S, Zanetti O, Rossini PM. Donepezil effects on sources of cortical rhythms in mild Alzheimer's disease: Responders vs. Non-Responders. *Neuroimage*. 2006 Jul 15;31(4):1650-65. Epub 2006 Apr 5.
29. Bachman D.L., Wolf P.A., Linn R.T., Knoefel J.E., Cobb J.L., Belanger A.J., White L.R., D'Agostino R.B.: Incidence of dementia and probable Alzheimer's disease in a general population: the Framingham Study. *Neurology*, 1993; 43: 515–519
30. Bachurin SO, Shevtsova EP, Kireeva EG, et al. Mitochondria as a target for neurotoxins and neuroprotective agents. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 993:334–344.
31. Baldereschi M, Di Carlo A, Lepore V, Bracco L, Maggi S, Grigoletto F, Scarlato G, Amaducci L. Estrogen-replacement therapy and Alzheimer's disease in the Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurology*. 1998 Apr; 50(4):996-1002.
32. Balogh Z, Seres I, Harangi M, Kovács P, Kakuk G, Paragh G. Gemfibrozil increases paraoxonase activity in type 2 diabetic patients. A new hypothesis of the beneficial action of fibrates? *Diabetes Metab*. 2001; 27:604–10.
33. Bamberger ME, Landreth GE. Inflammation, apoptosis, and Alzheimer's disease. *Neuroscientist*. 2002 Jun; 8(3):276-83.
34. Bamberger ME, Harris ME, McDonald DR, Husemann J, Landreth GE. A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. *J Neurosci*. 2003 Apr 1;23(7):2665-74.
35. Bapineuzumab in patients with mild to moderate Alzheimer's disease. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00575055>. Accessed June 3, 2009.
36. Bard F., Cannon C., Barbour R. i wsp: Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat. Med.*2000; 6: 916-919.
37. Barten DM, Guss VL, Corsa JA, et al. Dynamics of {beta}-amyloid reductions in brain, cerebrospinal fluid, and plasma of {beta}-amyloid precursor protein transgenic

- mice treated with a γ -secretase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005; 312:635–643.
38. Beard, C.M., Waring, S.C., O'Brien, P.C., Kurland, L.T. Kokmen, E. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and Alzheimer's disease:a case-control study in Rochester, Minnesota, 1980 through 1984. *Mayo Clin. Proc*. 1998, 73: 951-955.
 39. Beecham GW, Martin ER, Li YJ, Slifer MA, Gilbert JR, Haines JL, Pericak-Vance MA. Genome-wide association study implicates a chromosome 12 risk locus for late-onset Alzheimer disease. *Am J Hum Genet*. 2009 Jan; 84(1):35-43.
 40. Bell, R.D., Sagare, A.P., Friedman, A.E., Bedi, G.S., Holtzman, D.M., Deane,R., and Zlokovic, B.V. 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.
 41. Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, Holsboer F. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol*. 1997 Apr; 51(4):535-41.
 42. Bergem AL. Heredity in dementia of the Alzheimer type. *Clin Genet*. 1994 Jul;46(1 Spec No):144-9.
 43. Bertilsson L., Dahl M.L., Dalen P. i wsp.: Molecular genetics of CYP2D6: Clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *Br J Clin Pharmacol*. 2002 Feb;53(2):111-22.
 44. Bertram L, Lange C, Mullin K, Parkinson M, Hsiao M, Hogan MF, Schjeide BM, Hooli B, Divito J, Ionita I, Jiang H, Laird N, Moscarillo T, Ohlsen KL, Elliott K, Wang X, Hu-Lince D, Ryder M, Murphy A, Wagner SL, Blacker D, Becker KD, Tanzi RE. Genome-wide association analysis reveals putative Alzheimer's disease susceptibility loci in addition to APOE. *Am J Hum Genet*. 2008 Nov;83(5):623-32. Epub 2008 Oct 30.
 45. Bertram L., Alzheimer's disease genetics current status and future perspectives, *Int Rev Neurobiol*. 2009; 84:167-84.
 46. Bilikiewicz A, Gaus W. Colostrinin (a naturally occurring, proline-rich, polypeptide mixture) in the treatment of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2004 Feb;6(1):17-26.
 47. Billecke S, Draganov D, Counsell R, Stetson P, Watson C, Hsu C, La Du BN. Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metab Dispos* 2000;28:1335–42.
 48. Bird T, Genetic Aspects of Alzheimer Disease, *Genet Med*. 2008 April; 10(4): 231–239.
 49. Bizzarro A, Marra C, Acciarri A, Valenza A, Tiziano FD, Brahe C, Masullo C. Apolipoprotein E epsilon4 allele differentiates the clinical response to donepezil in

Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2005; 20(4):254-61. Epub 2005 Aug 9.

50. Blass JP. Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia? *J Neurosci Res*. 2001 Dec 1;66(5):851-6.
51. Blesa R, Aguilar M, Casanova JP, Boada M, Martínez S, Alom J, de la Hoz CH, Sancho J, Fernández O, Gil-Neciga E, Massó JF. Relationship between the efficacy of rivastigmine and apolipoprotein E (epsilon4) in patients with mild to moderately severe Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2006 Oct-Dec; 20(4):248-54.
52. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2007 Feb 28; 297(8):842-57.
53. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2006 Jul; 29;368(9533):387-403.
54. 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.
55. Borroni B, Colciaghi F, Pastorino L et al (2002) ApoE genotype influences the biological effects of donepezil on APP metabolism in Alzheimer disease: evidence from a peripheral model. *Eur Neuropsychopharmacol* 12:195–200.
56. 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.
57. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991;82(4):239-59.
58. Braak H, Braak E (1988) Neuropil threads occur in dendrites of tangle-bearing nerve cells. *Neuropathol Appl Neurobiol* 14:39–44.
59. Breitner JC. APOE genotyping and Alzheimer's disease. *Lancet* 1996;347:1184–5.
60. Breitner JC, Wyse BW, Anthony JC, Welsh-Bohmer KA, et al. APOE-epsilon4 count predicts age when prevalence of AD increases, then declines: the Cache County Study. *Neurology* 1999;53:321–31.
61. Breitner, J.C., Gau, B.A., Welsh, K.A., Plassman, B.L., McDonald, W.M., Helms, M.J. Anthony, J.C. Inverse association of anti-inflammatory treatments and Alzheimer's disease: initial results of a co-twin control study. *Neurology* 1994, 44: 227-232.
62. Brickell KL, Steinbart EJ, Rumbaugh M, Payami H, Schellenberg GD, Van Deerlin V, Yuan W, Bird TD. Early-onset Alzheimer disease in families with late-onset Alzheimer disease: a potential important subtype of familial Alzheimer disease. *Arch*

Neurol. 2006 Sep;63(9):1307-11.

63. Brophy VH, Hastings MD, Clendenning JB, Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics* 2001;11:77–84. (a)
64. Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinsty LA, Jarvik GP, Furlong CE. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet* 2001;68:1428–36. (b)
65. 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.
66. Büchner M, Huber R, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Riepe MW. Impaired hypoxic tolerance and altered protein binding of NADH in presymptomatic APP23 transgenic mice. *Neuroscience*. 2002;114(2):285-9.
67. Burns MP, Noble WJ, Olm V, Gaynor K, Casey E, LaFrancois J, Wang L, Duff K. Co-localization of cholesterol, apolipoprotein E and fibrillar Abeta in amyloid plaques. *Brain Res Mol Brain Res*. 2003 Jan 31;110(1):119-25.
68. Bush AI, Masters CL, Tanzi RE., Copper, beta-amyloid, and Alzheimer's disease: tapping a sensitive connection., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 30;100(20):11193-4.
69. 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.
70. Cacabelos R: Pharmacogenomics and therapeutic prospects in Alzheimer's disease. *Expert Opin Pharmacother* 2005; 6: 1967–1987.
71. Cacabelos R: Pharmacogenomics, nutrigenomics and therapeutic optimization in Alzheimer's disease. *Aging Health* 2005; 1: 303–348 (a).
72. Cacabelos R, Takeda M: Pharmacogenomics, nutrigenomics and future therapeutics in Alzheimer's disease. *Drugs Future* 2006; 31(suppl B):5–146.
73. Cacabelos R: Molecular pathology and pharmacogenomics in Alzheimer's disease: Polygenic-related effects of multifactorial treatments on cognition, anxiety, and depression. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2007; 29(Suppl B):1–91
74. Cacabelos R: Donepezil in Alzheimer's disease: from conventional trials to pharmacogenetics. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2007; 3:303–333 (a)
75. Cacabelos R. Influence of pharmacogenetic factors on Alzheimer's disease therapeutics. *Neurodegener Dis*. 2008;5(3-4):176-8. Epub 2008 Mar 6.

76. Cacabelos R. Pharmacogenomics and therapeutic prospects in dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2008 Mar; 258 Suppl 1:28-47. Review (a)
77. Cahoon L. The curious case of clioquinol. *Nat Med.* 2009 Apr; 15(4):356-9.
78. Cai H., Wang Y., McCarthy D. i wsp: BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat. Neurosci.* 2001; 4: 233-234.
79. Cairns NJ, Chadwick A, Luthert PJ, Lantos PL (1992) Astrocytosis, beta A4-protein deposition and paired helical filament formation in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 112:68–75.
80. Calero, M. et al. Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer's disease. *Microsc. Res. Tech.* 2000; 50, 305–315.
81. 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.
82. Camps J, Marsillach J, Joven J. The paraoxonases: role in human diseases and methodological difficulties in measurement. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2009; 46(2):83-106.
83. Carson JA, Turner AJ. Beta-amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases? *J Neurochem.* 2002 Apr;81(1):1-8.
84. Carrasquillo MM, Zou F, Pankratz VS, Wilcox SL, Ma L, Walker LP, Younkin SG, Younkin CS, Younkin LH, Bisceglia GD, Ertekin-Taner N, Crook JE, Dickson DW, Petersen RC, Graff-Radford NR, Younkin SG. Genetic variation in PCDH11X is associated with susceptibility to late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2009 Feb;41(2):192-8.
85. Cecchi C, Fiorillo C, Sorbi S, Latorraca S, Nacmias B, Bagnoli S, et al. Oxidative stress and reduced antioxidant defences in peripheral cells from familiar Alzheimer's patients. *Free Rad Biol Med* 2002; 33:1372-1379.
86. Cellini E, Tedde A, Bagnoli S, Nacmias B, Piacentini S, Bessi V, Bracco L, Sorbi S. Association analysis of the paraoxonase-1 gene with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2006 Nov 20; 408(3):199-202.
87. Chan SL, Furukawa K, Mattson MP. Presenilins and APP in neuritic and synaptic plasticity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's diseases. *Neuromolecular Med.* 2002;2(2):167-96
88. 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.

89. 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.
90. Chapuis J, Boscher M, Bensemain F, Cotel D, Amouyel P, Lambert JC. Association study of the paraoxonase 1 gene with the risk of developing Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2009 Jan; 30(1):152-6. Epub 2007 Jul 12.
91. Chen X, Xia Y, Alford M et al. The CYP2D6B allele is associated with a milder synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1995; 38:653–658.
92. Cherny RA, Legg JT, McLean CA, Fairlie DP, Huang X, Atwood CS, Beyreuther K, Tanzi RE, Masters CL, Bush AI. Aqueous dissolution of Alzheimer's disease Abeta amyloid deposits by biometal depletion. *J Biol Chem.* 1999 Aug 13;274(33):23223-8.
93. Choi SH, Kim SY, Na HR, Kim BK, Yang DW, Kwon JC, Park MY. Effect of ApoE genotype on response to donepezil in patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2008; 25(5):445-50.
94. Ciarleglio L.J., Bennett R.L., Williamson J. i wsp. Genetic counseling throughout the life cycle. *J Clin Invest* 2003; 112: 1280-1286.
95. 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
96. Coleman PD, Yao PJ. Synaptic slaughter in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2003 Dec; 24(8):1023-7.
97. Coon, K.D., Myers, A.J., Craig, D.W., Webster, J.A., Pearson, J.V., Lince, D.H., Zismann, V.L., Beach, T.G., Leung, D., Bryden, L., et al. A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *J. Clin. Psychiatry.* 2007; 4, 613–618.
98. Corder, E.H., Saunders, A.M., Risch, N.J., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Jr., Rimmler, J.B., Locke, P.A., Conneally, P.M., Schmechel, K.E., et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat. Genet.* 1994; 7, 180–184.
99. Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol* 2005; 69:541-50.
100. Cras P., Kawai M., Lowery D. i wsp. Senile plaque neurites in Alzheimer's disease accumulate amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88: 7552-7556.
101. Cras P, Smith MA, Richey PL, Siedlak SL, Mulvihill P, Perry G. Extracellular neurofibrillary tangles reflect neuronal loss and provide further evidence of extensive protein cross-linking in Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.* 1995;89:291–295.

102. Crook R, Verkkoniemi A, Perez-Tur J, Mehta N, Baker M, Houlden H, Farrer M, Hutton M, Lincoln S, Hardy J, Gwinn K, Somer M, Paetau A, Kalimo H, Ylikoski R, Poyhonen M, Kucera S, Haltia M. A variant of Alzheimer's disease with spastic paraparesis and unusual plaques due to deletion of exon 9 of presenilin 1. *Nat Med*. 1998; 4:452–455.
103. 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.
104. Cruts M., Van Broeckhoven C. Presenilin mutations in Alzheimer's disease. *Hum Mutat* 1998; 11: 183-190.
105. D'Amelio M, Ricci I, Sacco R, et al. Paraoxonase gene variants are associated with autism in North America, but not in Italy: possible regional specificity in gene-environment interactions. *Mol Psychiatry* 2005; 10:1006–1016.
106. D'Andrea MR, Cole GM, Ard MD. The microglial phagocytic role with specific plaque types in the Alzheimer disease brain. *Neurobiol Aging*. 2004 May-Jun;25(5):675-83.
107. Dantoine TF, Debord J, Charmes JP, Merle L, Marquet P, Lachatre G, Leroux–Robert C. Decrease of serum paraoxonase activity in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:2082–8.
108. Dantoine TF, Drouet M, Debord J, Merle L, Cogne M, Charmes JP. Paraoxonase 1 192/55 gene polymorphisms in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Nov; 977:239-44.
109. Das P., Murphy M.P., Younkin L.H. i wsp: Reduced effectiveness of Abeta1-42 immunization in APP transgenic mice with significant amyloid deposition. *Neurobiol. Aging* 2001; 22: 721-727.
110. Davies, P., Maloney, A.J. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*. 1976; 2, 1403.
111. Davies CA, Mann DM, Sumpter PQ, Yates PO. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*. 1987 Apr; 78(2):151-64.
112. Davies P, Maloney AJF. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*. 1976 Dec 25; 2(8000):1403.
113. Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase–1. *Clin Sci (Lond)*. 2004; 107:435–47.

114. Deakin S, Leviev I, Guernier S, James RW. Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:2083–9.
115. DeKosky ST, Scheff W. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol*.1990;27:457–464
116. Delacère P, Duyckaerts C, He Y, Piette F, Hauw J-J. Subtypes and differential laminar distributions of bA4 deposits in Alzheimer's disease: relationship with the intellectual status of 26 cases. *Acta Neuropathol*. 1991; 81:328–335.
117. Delacourte A. General and dramatic glial reaction in Alzheimer brains. *Neurology*. 1990; 40:33–37.
118. DeMattos R.B., Bales K.R., Cummins D.J. i wsp. Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer.s disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 8850-8855.
119. De Strooper B., Saftig P., Craessaerts K. i wsp. Deficiency of presenilin 1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 1998; 391: 387-390.
120. De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*.1999 Apr 8; 398(6727):518-22.
121. Dickson TC, Vickers JC, The morphological phenotype of beta-amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2001; 105(1):99-107.
122. Diepgen TL, Geldmacher-von Mallinckrodt M. Interethnic differences in the detoxification of organophosphates: the human serum paraoxonase polymorphism. *Arch Toxicol Suppl*. 1986; 9:154-8.
123. Dobarro D, Gómez-Rubín MC, Sanchez-Recalde A, Moreno R, Galeote G, Jimenez-Valero S, Calvo L, de Sá EL, López-Sendón JL.Current pharmacological approach to restore endothelial dysfunction.*Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2009 Jul;7(3):212-22.
124. Dodart JC, Mathis C, Bales KR, Paul SM, Ungerer A. Early regional cerebral glucose hypometabolism in transgenic mice overexpressing the V717F beta-amyloid precursor protein. *Neurosci Lett*. 1999 Dec 17;277(1):49-52.
125. Dodart J.C., Bales K.R., Gannon K.S. i wsp. Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer.s disease model. *Nat. Neurosci*. 2002; 5: 452-457.

126. Doraiswamy PM. Non-cholinergic strategies for treating and preventing Alzheimer's disease. *CNS Drugs*. 2002; 16(12):811-24.
127. Doody RS, Gavrilova SI, Sano M, et al, for the Dimebon Investigators. Effect of dimebon on cognition, activities of daily living, behaviour, and global function in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: A randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet*. 2008; 372:207–215.
128. Draganov DI. Human PON3, effects beyond the HDL: clues from human PON3 transgenic mice. *Circ Res* 2007; 100:1104–5.
129. Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004;369:78–88.
130. Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res* 2005; 46:1239–47.
131. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 2000; 275:33435–42.
132. Dubois B., Feldman H.H., Jacova C. i wsp. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol*. 2007; 6: 734–746.
133. Durrington PN, Mackness MI, Bhatnagar D, Julier K, Prais H, Arrol S, Morgan J, Wood GN. Effects of two different fibric acid derivatives on lipoproteins, cholesteryl ester transfer, fibrinogen, plasminogen activator inhibitor and paraoxonase activity in type IIb hyperlipoproteinaemia. *Atherosclerosis* 1998; 138:217–25.
134. Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol*. 2009 Jul; 118(1):5-36. Epub 2009 Apr 21.
135. 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.
136. Eikelenboom P, Veerhuis R, Familian A, Hoozemans JJ, van Gool WA, Rozemuller AJ Neuroinflammation in plaque and vascular beta-amyloid disorders: clinical and therapeutic implications. *Neurodegener Dis*. 2008; 5(3-4):190-3. Epub 2008 Mar 6.
137. Effect of LY450139 on the long term progression of Alzheimer's disease. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00594568>. Accessed January 8, 2009
138. Effects of LY450139 on the progression of Alzheimer's disease as compared with placebo (IDENTITY-2). <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00762411>. Accessed June 3, 2009.

139. Efficacy study of a ZT-1 implant in patients suffering from Alzheimer's disease (BRAINz). <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00423228>. Accessed June 4, 2009.
140. Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol.* 2003 Jan 6; 160(1):113-23.
141. Engelhart MJ, Geerlings MI, Ruitenberg A, van Swieten JC, Hofman A, Witteman JC, Breteler MM. Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *JAMA.* 2002 Jun 26;287(24):3223-9.
142. 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.
143. Erlich PM, Lunetta KL, Cupples LA, Huyck M, Green RC, Baldwin CT, Farrer LA; MIRAGE Study Group. Polymorphisms in the PON gene cluster are associated with Alzheimer disease. *Hum Mol Genet.* 2006 Jan 1;15(1):77-85. Epub 2005 Nov 30.
144. Esler W.P., Wolfe M.S. A portrait of Alzheimer secretases –new features and familial faces. *Science* 2002; 293: 1449-1454.
145. Etminan, M., Gill, S. Samii, A. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ* 2003, 327: 128.
146. Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook NR, Chown MJ, Hebert LE, Hennekens CH, Taylor JO. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA.* 1989 10;262:2551-6.
147. Farlow MR, Cyrus PA, Nadel A, Lahiri DK, Brashear A, Gulanski B. Metrifonate treatment of AD: influence of APOE genotype. *Neurology.* 1999 Dec 10;53(9):2010-6.
148. Farlow MR, Lahiri DK, Poirier J, Davignon J, Hui S. Apolipoprotein E genotype and gender influence response to tacrine therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 1996 Dec 16;802:101-10.
149. Farlow MR, Lahiri DK, Poirier J, Davignon J, Schneider L, Hui SL. Treatment outcome of tacrine therapy depends on apolipoprotein genotype and gender of the subjects with Alzheimer's disease. *Neurology.* 1998 Mar; 50(3):669-77.

150. Farlow M, Lane R, Kudaravalli S, He Y. Differential qualitative responses to rivastigmine in APOE epsilon 4 carriers and noncarriers. *Pharmacogenomics J*. 2004;4(5):332-5.
151. Farrer, L.A., Cupples, L.A., Haines, J.L., Hyman, B., Kukull, W.A., Mayeux, R., Myers, R.H., Pericak-Vance, M.A., Risch, N., and van Duijn, C.M. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *J. Am. Med. Assoc.* 278, 1349–1356.
152. Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D, Keller P, Runz H, Kuhl S, Bertsch T, von Bergmann K, Hennerici M, Beyreuther K, Hartmann T. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 May 8;98(10):5856-61.
153. Fasulo L, Ugolini G, Visintin M, Bradbury A, Brancolini C, Verzillo V, Novak M, Cattaneo A. The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis. *J Neurochem*. 2000 Aug;75(2):624-33.
154. Feng Z, Zhang JT. Protective effect of melatonin on beta-amyloid-induced apoptosis in rat astrogloma C6 cells and its mechanism. *Free Radic Biol Med*. 2004 Dec 1;37(11):1790-801.
155. Findeis MA, Musso GM, Arico-Muendel CC, Benjamin HW, Hundal AM, Lee JJ, Chin J, Kelley M, Wakefield J, Hayward NJ, Molineaux SM. Modified-peptide inhibitors of amyloid beta-peptide polymerization. *Biochemistry*. 1999 May 25;38(21):6791-800.
156. Fleisher AS, Raman R, Siemers ER, et al. Phase 2 safety trial targeting amyloid beta production with a gammasecretase inhibitor in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2008; 65:1031–1038.
157. Fleminger S, Oliver DL, Lovestone S, Rabe-Hesketh S, Giora A. Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease: the evidence 10 years on; a partial replication. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003;74:857-862.
158. Fonseca AC, Resende R, Oliveira CR, Pereira CM. Cholesterol and statins in Alzheimer's disease: Current controversies. *Exp Neurol*. 2009 Sep 25.
159. Forte TM, Subbanagounder G, Berliner JA, Blanche PJ, Clermont AO, Jia Z, Oda MN, Krauss RM, Bielicki JK. Altered activities of anti-atherogenic enzymes LCAT, paraoxonase, and platelet-activating factor acetylhydrolase in atherosclerosis-susceptible mice. *J Lipid Res* 2002;43:477–85.
160. Fox NC, Black RS, Gilman S, Rossor MN, Griffith SG, Jenkins L, Koller M (2005) Effects of Abeta immunization (AN1792) on MRI measures of cerebral volume in Alzheimer disease. *Neurology* 64:1563–1572.

161. Francotte P, Graindorge E, Boverie S, de Tullio P, Pirotte B. New trends in the design of drugs against Alzheimer's disease. *Curr Med Chem*. 2004 Jul;11(13):1757-78.
162. Fraser PE, Yang DS, Yu G, Lévesque L, Nishimura M, Arawaka S, Serpell LC, Rogaeva E, St George-Hyslop P. Presenilin structure, function and role in Alzheimer disease. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Jul 26;1502(1):1-15.
163. 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.
164. Fratiglioni L, Wang HX. Smoking and Parkinson's and Alzheimer's disease: review of the epidemiological studies. *Behav Brain Res*. 2000;113:117-120.
165. Frölich L, Götz ME, Weinmüller M, Youdim MB, Barth N, Dirr A, Gsell W, Jellinger K, Beckmann H, Riederer P. (r)-, but not (s)-alpha lipoic acid stimulates deficient brain pyruvate dehydrogenase complex in vascular dementia, but not in Alzheimer dementia. *J Neural Transm*. 2004 Mar;111(3):295-310.
166. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase. *Atherosclerosis* 2002;161:307-16.
167. Fung HC, Scholz S, Matarin M, Simón-Sánchez J, Hernandez D, Britton A, Gibbs JR, Langefeld C, Stiegert ML, Schymick J, Okun MS, Mandel RJ, Fernandez HH, Foote KD, Rodríguez RL, Peckham E, De Vrieze FW, Gwinn-Hardy K, Hardy JA, Singleton A. Genome-wide genotyping in Parkinson's disease and neurologically normal controls: first stage analysis and public release of data. *Lancet Neurol*. 2006 Nov;5(11):911-6.
168. Furuno T, Kawanishi C, Iseki E et al (2001) No evidence of an association between CYP2D6 polymorphisms among Japanese and dementia with Lewy bodies. *Psychiatry Clin Neurosci* 55:89-92.
169. 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.
170. 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.
171. Gacia M, Safranow K, Gabryelewicz T, Styczyńska M, Peplowska B, Dziedziczko 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.

172. Gacia M, Safranow K, Styczyńska M, Jakubowska K, Peplowska B, Chodakowska-Zebrowska M, Przekop I, Słowik A, Golańska E, Hulaś-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.
173. Gaedigk A, Ryder DL, Bradford LD, Leeder JS. CYP2D6 poor metabolizer status can be ruled out by a single genotyping assay for the -1584G promoter polymorphism. *Clin Chem.* 2003;49(pt1):1008 –1011.
174. Games D., Adams D., Alessandrini R. i wsp. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature* 1995; 373: 523-527.
175. Gandy S.: Molecular basis for anti-amyloid therapy in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 2002; 23: 1009-1016.
176. Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanché H, Passa P, Froguel P, Ruiz J. Paraoxonase polymorphism Met–Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest.* 1997;99:62–6.
177. 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.
178. Ghosh AK, Gemma S, Tang J. beta-Secretase as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics.* 2008 Jul;5(3):399-408
179. Gilman, S., Koller, M., Black, R.S., Jenkins, L., Griffith, S.G., Fox, N.C., Eisner, L., Kirby, L., Rovira, M.B., Forette, F. Orgogozo, J.M. Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology.* 2005, 64: 1553-1562.
180. Golde TE, Eckman CB. Cholesterol modulation as an emerging strategy for the treatment of Alzheimer's disease. *Drug Discov Today.* 2001 Oct 15;6(20):1049-1055.
181. Gray SL, Anderson ML, Crane PK, et al. Antioxidant vitamin supplement use and risk of dementia or Alzheimer's disease in older adults. *J Am Geriatr Soc.* 2008;56:291-295.
182. Griesse E-U, Zanger UM, Brudermanns U et al. Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. *Pharmacogenetics.* 1998;8:15–26.

183. Grutzendler J, Helmin K, Tsai J, Gan WB. Various dendritic abnormalities are associated with fibrillar amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1097:30–39
184. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature.* 1991 Feb 21;349(6311):704-6.
185. 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.
186. 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.
187. 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.
188. 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.
189. Gołąb-Janowska M., Honczarenko K., Gawrońska-Szkларz B. i wsp.: CYP2D6 gene polymorphism as a probable risk factor for Alzheimer's disease and Parkinson's disease with dementia. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 2007, 41, 113.
190. Götz J., Chen G., van Dorpe J. i wsp. Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by Aβ42 fibrils. *Science* 2001; 293: 1491-1495
191. Grehan, S., Tse, E., and Taylor, J.M. Two distal downstream enhancers direct expression of the human apolipoprotein E gene to astrocytes in the brain. *J. Neurosci.* 2001;21, 812–822.
192. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein τ (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83: 4913–17.
193. Grundman M, Black R. Clinical trials of bapineuzemab, a beta-amyloid-targeted immunotherapy in patients with mild to moderate Alzheimer's disease. *Alzheimer Dement.* 2008;4(Suppl 1):T166.

194. Grupe A, Abraham R, Li Y, Rowland C, Hollingworth P, Morgan A, Jehu L, Segurado R, Stone D, Schadt E, Karnoub M, Nowotny P, Tacey K, Catanese J, Sninsky J, Brayne C, Rubinsztein D, Gill M, Lawlor B, Lovestone S, Holmans P, O'Donovan M, Morris JC, Thal L, Goate A, Owen MJ, Williams J. Evidence for novel susceptibility genes for late-onset Alzheimer's disease from a genome-wide association study of putative functional variants. *Hum Mol Genet.* 2007 Apr 15;16(8):865-73.
195. Gouédard C, Koum-Besson N, Barouki R, Morel Y. Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON-1 by fenofibrate and statins. *Mol Pharmacol* 2003;63:945-56.
196. Gulcher JR, Gretasdottir S, Helgadottir A, Stefansson K. Genes contribution to risk for common forms of stroke. *Trends in Mol Med* 2005;11:217-224.
197. 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.]
198. 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.
199. Häcki J, Egger L, Monney L, Conus S, Rossé T, Fellay I, Borner C. Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene.* 2000 May 4; 19(19):2286-95.
200. Hadland BK, Manley NR, Su D, Longmore GD, Moore CL, Wolfe MS, Schroeter EH, Kopan R. Gamma -secretase inhibitors repress thymocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jun 19; 98(13):7487-91.
201. Hagen TM, Ingersoll RT, Lykkesfeldt J, Liu J, Wehr CM, Vinarsky V, Bartholomew JC, Ames AB. (R)-alpha-lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *FASEB J.* 1999 Feb; 13(2):411-8.
202. Hager K, Marahrens A, Kenklies M, Riederer P, Münch G. Alpha-lipoic acid as a new treatment option for Alzheimer type dementia. *Arch Gerontol Geriatr.* 2001 Jun;32(3):275-28.
203. Hansen LA, Masliah E, Terry RD, Mirra SS. A neuropathological subset of Alzheimer's disease with concomitant Lewy body disease and spongiform change. *Acta Neuropathol.* 1989; 78(2):194-201.
204. Hansson CA, Frykman S, Farmery MR, Tjernberg LO, Nilsberth C, Pursglove SE, Ito A, Winblad B, Cowburn RF, Thyberg J, Ankarcrona M. Nicastrin, presenilin, A β 1, and PEN-2 form active gamma-secretase complexes in mitochondria. *J Biol Chem.* 2004 Dec 3; 279(49):51654-60.
205. Hardy J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer disease. *Trends Neurosci.* 1997;20, 154–159.

206. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992 Apr 10; 256(5054):184-5.
207. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli RB, McCarthy A, Toker L, Silman I, Sussman JL, Tawfik DS. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11:412–9.
208. Harel, A., Wu, F., Mattson, M.P., Morris, C.M. & Yao, P.J. Evidence for CALM in directing VAMP2 trafficking. *Traffic*.2008;9, 417–429.
209. Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina 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.
210. 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.
211. Haughey NJ, Nath A, Chan SL, Borchard AC, Rao MS, Mattson MP. Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2002 Dec; 83(6):1509-24.
212. Hayn M, Kremser K, Singewald N, Cairns N, Nemethova M, Lubec B, Lubec G. Evidence against the involvement of reactive oxygen species in the pathogenesis of neuronal death in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Life Sci* 1996; 59:537-544.
213. He XM, Zhang ZX, Zhang JW, Zhou YT, Tang MN, Wu CB, Hong Z. Gln192Arg polymorphism in paraoxonase 1 gene is associated with Alzheimer disease in a Chinese Han ethnic population. *Chin Med J (Engl)*. 2006 Jul 20; 119(14):1204-9.

214. Hebert, LE; Scherr, PA; Bienias, JL; Bennett, DA; Evans, DA. "Alzheimer's disease in the U.S. population: Prevalence estimates using the 2000 census." *Archives of Neurology* 2003;60:1119–1122.
215. Helgadóttir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdóttir S, Blondal T, Jonasdóttir A, Jonasdóttir A, Sigurdsson A, Baker A, Palsson A, Masson G, Gudbjartsson DF, Magnusson KP, Andersen K, Levey AI, Backman VM, Matthiassdóttir S, Jonsdóttir T, Palsson S, Einarsdóttir H, Gunnarsdóttir S, Gylfason A, Vaccarino V, Hooper WC, Reilly MP, Granger CB, Austin H, Rader DJ, Shah SH, Quyyumi AA, Gulcher JR, Thorgeirsson G, Thorsteinsdóttir U, Kong A, Stefansson K. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science*. 2007 Jun 8; 316(5830):1491-3.
216. Hegele RA, Connelly PW, Scherer SW, Hanley AJ, Harris SB, Tsui LC, Zinman B. Paraoxonase-2 gene (PON2) G148 variant associated with elevated fasting plasma glucose in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3373–7.
217. Hegele RA, Harris SB, Connelly PW, Hanley AJ, Tsui LC, Zinman B, Scherer SW. Genetic variation in paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Canadian Ojibwe. *Clin Genet* 1998; 54:394–9.
218. Hendriks L., van Duijn C. M., Cras P. et al. 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.
219. Hill G, Connelly J, Hébert R, Lindsay J, Millar W. Neyman's bias re-visited. *J Clin Epidemiol.* 2003; 56:293-296.
220. Hirano A, Malamud N, Elizan TS, Kurland LT. Amyotrophic lateral sclerosis and Parkinsonism-dementia complex on Guam. Further pathologic studies. *Arch Neurol.* 1966 Jul;15(1):35-51.
221. Hoffman LB, Schmeidler J, Lesser GT, et al. Less Alzheimer disease neuropathology in medicated hypertensive than nonhypertensive persons. *Neurology.* 2009;72:1720-1726.
222. Holmes C .Genotype and phenotype in Alzheimer's disease.*Br J Psychiatry.* 2002 Feb; 180:131-4.
223. Hong L, Turner RT 3rd, Koelsch G, Shin D, Ghosh AK, Tang J. Crystal structure of memapsin 2 (beta-secretase) in complex with an inhibitor OM00-3. *Biochemistry.* 2002 Sep 10; 41(36):10963-7.
224. Honig LS, Tang MX, Albert S, et al. Stroke and the risk of Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2003; 60:1707-1712.
225. 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.

226. Huang TL, Zandi PP, Tucker KL, et al. Benefits of fatty fish on dementia risk are stronger for those without APOE ϵ 4. *Neurology*. 2005; 65:1409-1414.
227. Huang H, Manton KG. The role of oxidative damage in mitochondria during aging: a review. *Front Biosci*. 2004 May 1; 9:1100-17.
228. Huperzine A in Alzheimer's disease.
<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00083590>. Accessed January 8, 2009.
229. in t' Veld, B.A., Ruitenberg, A., Hofman, A., Launer, L.J., van Duijn, C.M., Stijnen, T., Breteler, M.M. Stricker, B.H. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *N.Engl. J. Med*. 2001, 345: 1515-1521.
230. Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J*. 2005;5(1):6-13.
231. Irie F, Fitzpatrick AL, Lopez OL, et al. Enhanced risk for Alzheimer disease in persons with type 2 diabetes and APOE ϵ 4: the Cardiovascular Health Study Cognition Study. *Arch Neurol*. 2008; 65:89-93.
232. Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1739: 198–210.
233. Itzhaki RF, Lin WR, Shang D, Wilcock GK, Faragher B, Jamieson GA. Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease. *Lancet* 1997; 349:241–244.
234. Jakubowski H. Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation. *J Biol Chem* 2000; 275:3957–62.
235. James RW, Leviev I, Righetti A. Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2000;101:2252–7.
236. Janka Z, Juhász A, Rimanóczy A A, Boda K, Márki-Zay J, Kálmán J. Codon 311 (Cys --> Ser) polymorphism of paraoxonase-2 gene is associated with apolipoprotein E4 allele in both Alzheimer's and vascular dementias. *Mol Psychiatry*. 2002;7(1):110-2.
237. Janus C., Pearson J., McLaurin J. i wsp.: A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer.s disease. *Nature* 2000; 408: 979-982.
238. Jarvik GP, Tsai NT, McKinsty LA, Wani R, Brophy VH, Richter RJ, Schellenberg GD, Heagerty PJ, Hatsukami TS, Furlong CE. Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1329–33.

239. Jelic V, Haglund A, Kowalski J, Langworth S, Winblad B. Donepezil treatment of severe Alzheimer's disease in nursing home settings. A responder analysis. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2008;26(5):458-66. Epub 2008 Nov 4.
240. Jiang, Q., Lee, C.Y., Mandrekar, S., Wilkinson, B., Cramer, P., Zelcer, N., Mann, K., Lamb, B., Willson, T.M., Collins, J.L., et al. (2008). ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta. *Neuron* 58, 681–693.
241. Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA. Statins and the risk of dementia. *Lancet*. 2000; 356:1627-1631.
242. Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, Greenberg DA (2004) Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:343–347.
243. Johnson DK, Wilkins CH, Morris JC. Accelerated weight loss may precede diagnosis in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2006; 63:1312-1317.
244. Johannsen P. Long-term cholinesterase inhibitor treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drugs*. 2004; 18(12):757-68.
245. Josien H.: Recent advances in the development of g-secretase inhibitors. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*2002; 5: 513-525
246. Kandiah N, Feldman HH. Therapeutic potential of statins in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*. 2009 Aug 15;283(1-2):230-4. Epub 2009 Mar 24.
247. 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.
248. 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.
249. Khersonsky O, Tawfik DS. The histidine 115–histidine 134 dyad mediates the lactonase activity of mammalian serum paraoxonases. *J Biol Chem* 2006; 281:7649–56.
250. Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2009 Aug 13;63(3):287-303.
251. Kim YH, Kim EY, Gwag BJ, Sohn S, Koh JY. Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: mediation by free radicals. *Neuroscience*. 1999 Mar; 89(1):175-82.

252. Kivipelto M, Ngandu T, Fratiglioni L, et al. Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2005;62:1556-1560.
253. Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, et al. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ.* 2001; 322:1447-1451.
254. Khachaturian AS, Zandi PP, Lyketsos CG, et al. Antihypertensive medication use and incident Alzheimer disease: the Cache County Study. *Arch Neurol.* 2006; 63:686-692.
255. Klein WL, Stine WB Jr, Teplow DB. Small assemblies of unmodified amyloid beta-protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2004 May-Jun; 25(5):569-80.
256. Koenigsknecht J, Landreth G. Microglial phagocytosis of fibrillar beta-amyloid through a beta1 integrin-dependent mechanism. *J Neurosci.* 2004 Nov 3;24(44):9838-46.
257. Kowalska A., Poradnictwo i testowanie genetyczne dla rodzin z chorobą Alzheimer, *Neurologia i Neurochirurgia Polska* 2004; 38, 6: 495–501.
258. 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.
259. 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.
260. Kowalska A. Amyloid precursor protein gene mutations responsible for early-onset autosomal dominant Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol.* 2003; 41(1):35-40. Review
261. 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.
262. 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.
263. LaFerla FM. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2002 Nov;3(11):862-72.
264. 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.
265. 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.
 266. Larson EB, Wang L, Bowen JD, et al. Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. *Ann Intern Med.* 2006;144:73-8
 267. Lau LF, Schachter JB, Seymour PA, Sanner MA. Tau protein phosphorylation as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem.* 2002 Apr;2(4):395-415.
 268. Lauderback CM, Kanski J, Hackett JM, Maeda N, Kindy MS, Butterfield DA. Apolipoprotein E modulates Alzheimer's Abeta(1-42)-induced oxidative damage to synaptosomes in an allele-specific manner. *Brain Res.* 2002 Jan 4;924(1):90-7.
 269. Launer LJ, Ross GW, Petrovitch H, et al. Midlife blood pressure and dementia: the Honolulu-Asia aging study. *Neurobiol Aging.* 2000; 21:49-55.
 270. Laurin D, Masaki KH, Foley DJ, White LR, Launer LJ. Midlife dietary intake of antioxidants and risk of late-life incident dementia: the Honolulu-Asia Aging Study. *Am J Epidemiol.* 2004 May 15; 159(10):959-67.
 271. Lawrence AD, Sahakian BJ. The cognitive psychopharmacology of Alzheimer's disease: focus on cholinergic systems. *Neurochem Res.* 1998; 23:787-794.
 272. Lawton, M. P. & Brody, E. M. Assessment of older: self-maintaining and instrumental activities of daily living. *Gerontologist.* 1969;9, 179-186.
 273. Le Bars PL, Katz MM, Berman N, Itil TM, Freedman AM, Schatzberg AF. A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of an extract of Ginkgo biloba for dementia. North American EGb Study Group. *JAMA.* 1997 Oct 22-29;278(16):1327-32.
 274. Leduc V, Poirier J. Polymorphisms at the paraoxonase 1 L55M and Q192R loci affect the pathophysiology of Alzheimer's disease: emphasis on the cholinergic system and beta-amyloid levels. *Neurodegener Dis.* 2008;5(3-4):225-7.
 275. Leduc V, Thérout L, Dea D, Robitaille Y, Poirier J. Involvement of paraoxonase 1 genetic variants in Alzheimer's disease neuropathology. *Eur J Neurosci.* 2009 Nov;30(9):1823-30. Epub 2009 Oct 26.

276. Leszek J, Inglot AD, Janusz M, Byczkiewicz F, Kiejna A, Georgiades J, Lisowski J. Colostrinin proline-rich polypeptide complex from ovine colostrum--a long-term study of its efficacy in Alzheimer's disease. *Med Sci Monit.* 2002 Oct;8(10):PI93-6.
277. Leszek J, Inglot AD, Janusz M, Lisowski J, Krukowska K, Georgiades JA. Colostrinin: a proline-rich polypeptide (PRP) complex isolated from ovine colostrum for treatment of Alzheimer's disease. A double-blind, placebo-controlled study. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 1999;47(6):377-85.
278. Lewis J., Dickson D.W., Lin W.L. i wsp. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 2001; 293: 1487-1491.
279. Levy-Lahad,E., Wasco,W., Poorkaj,P., Romano,D.M., Oshima,J., Pettingell, W.H., Yu,C., Jondro,P.D., Schmidt,S.D., Wang,K., Crowley,A.C., Fu,Y., Guenette,S.Y., Galas,D., Nemens,E., Wijsman,E.M., Bird,T.D., Schellenberg, G.D. and Tanzi,R.E. (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*, 269, 973–977.
280. Li, H., Wetten, S., Li, L., St Jean, P.L., Upmanyu, R., Surh, L., Hosford, D., Barnes, M.R., Briley, J.D., Borrie, M., et al. Candidate single-nucleotide polymorphisms from a genome wide association study of Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 2008;1, 45–53.
281. Li HL, Liu DP, Liang CC. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J Mol Med* 2003; 81:766–79.
282. 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.
283. Li G, Faibushevich A, Turunen BJ, Yoon SO, Georg G, Michaelis ML, Dobrowsky RT. Stabilization of the cyclin-dependent kinase 5 activator, p35, by paclitaxel decreases beta-amyloid toxicity in cortical neurons. *J Neurochem.* 2003 Jan;84(2):347-62.
284. Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology.* 1995; 45:1594-1601.
285. Lovell MA, Ehmann WD, Mattson MP, Markersbery WR. Elevated 4-hydroxynonenal in ventricular fluid in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 1997;18:457-461.

286. Luo Y., Bolon B., Kahn S. i wsp.: Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat. Neurosci.* 2001;4: 231-232.
287. Liberski PP, Kłoszewska I., Boellaard I., et.al. Dystrophic neurites of Alzheimer's disease and Gerstmann-Strausset-Scheinker's disease dissociate from the formation of paired helical filaments. *Alzheimer's Res.*1995;1: 89-93.
288. Lipton, S.A. Chen, H.S. Paradigm shift in neuroprotective drug development: clinically tolerated NMDA receptor inhibition by memantine. *Cell Death Differ.* 2004, 11: 18-20.
289. Liu F, Arias-Vásquez A, Sleegers K, Aulchenko YS, Kayser M, Sanchez-Juan P, Feng BJ, Bertoli-Avella AM, van Swieten J, Axenovich TI, Heutink P, van Broeckhoven C, Oostra BA, van Duijn CM. A genomewide screen for late-onset Alzheimer disease in a genetically isolated Dutch population. *Am J Hum Genet.* 2007 Jul; 81(1):17-31.
290. Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci.* 1998 Jun 11; 158(1):47-52.
291. Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 1999 Sep;155(3):853-62.
292. Łuszczewski A, Matyska-Piekarska E, Trefler J, Wawer I, Łacki J, Śliwińska-Stańczyk P. Reaktywne formy tlenu – znaczenie w fizjologii i stanach patologii organizmu. *Reumatologia* 2007; 45:284-9.
293. Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, Roberts C, Durrington PN, Mackness MI. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1451-7.
294. MacGowan SH, Wilcock GK, Scott M (1998) Effect of gender and apolipoprotein E genotype on response to anticholinesterase therapy in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 13:625–630.
295. Maki PM, Resnick SM. Effects of estrogen on patterns of brain activity at rest and during cognitive activity: a review of neuroimaging studies. *Neuroimage.* 2001 Oct; 14(4):789-801.
296. Malouf M, Grimley EJ, Areosa SA. Folic acid with or without vitamin B12 for cognition and dementia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003:CD004514.
297. Manczak M, Park BS, Jung Y, Reddy PH. Differential expression of oxidative phosphorylation genes in patients with Alzheimer's disease: implications for early mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Neuromolecular Med.* 2004;5(2):147-62.

298. 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. Review.
299. Mao G, Tan J, Cui MZ, Chui D, Xu X. The GxxxG motif in the transmembrane domain of Aβ plays an essential role in the interaction of CTFβ with the gamma-secretase complex and the formation of amyloid-beta. *J Alzheimers Dis.* 2009; 18(1):167-76.
300. Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P. Oxidative stress in brain ageing, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr* 2005; 827:65-75.
301. Mark RJ, Hensley K, Butterfield DA, Mattson MP. Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis and cell death. *J Neurosci.* 1995 Sep; 15(9):6239-49.
302. Martin BK, Szekely C, Brandt J, et al. 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.
303. Martinelli N, Girelli D, Olivieri O, Stranieri C, Trabetti E, Pizzolo F, Friso S, Tenuti I, Cheng S, Grow MA, Pignatti PF, Corrocher R. Interaction between smoking and PON2 Ser311Cys polymorphism as a determinant of the risk of myocardial infarction. *Eur J Clin Invest* 2004; 34:14-20.
304. Masters C.L.: Alzheimer's disease: modulation of the APP/Aβ pathway towards rational therapeutic intervention. *Neurobiol. Aging* 2002; 23 (supl. 1): 279.
305. Mattson MP., Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives., *Physiol Rev.* 1997 Oct;77(4):1081-132.
306. Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000 Nov; 1(2):120-9.
307. Mattson MP, Chan SL. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium.* 2003 Oct-Nov; 34(4-5):385-97.
308. Mazur A. An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. *J Biol Chem* 1946; 164:271-89.
309. Mayeux R, Sano M. Treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 1999 Nov 25;341(22):1670-9.
310. McEwen B, Akama K, Alves S, Brake WG, Bulloch K, Lee S, Li C, Yuen G, Milner TA. Tracking the estrogen receptor in neurons: implications for estrogen-induced synapse formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jun 19; 98(13):7093-100.

311. McGeer, P.L., Schulzer, M. McGeer, E.G. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology* 1996, 47: 425-432.
312. McGrath LT, McGleenon BM, Brennan S, McColl D, McIlroy S, Pasmore AP. Increased oxidative stress in Alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonenal but not malondialdehyde. *QJM* 2001; 94:485-490.
313. McKhan G., Drachman D., Folstein M. i wsp. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology* 1984; 34: 939-944.
314. Mehta KM, Ott A, Kalmijn S, et al. Head trauma and risk of dementia and Alzheimer's disease: the Rotterdam Study. *Neurology*, 1999; 53:1959-1962.
315. Mellick G.D.: CYP450, genetic and Parkinson's disease: gene x environment interactions hold the key. *J. Neural. Transm. Suppl.*, 2006, 70, 159.
316. Merchant C, Tang MX, Albert S, Manly J, Stern Y, Mayeux R. The influence of smoking on the risk of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1999; 52:1408-1412.
317. Michaelis, E.K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. Neurobiol.* 1998, 54: 369-415.
318. Michaelis ML, Ranciat N, Chen Y, Bechtel M, Ragan R, Hepperle M, Liu Y, Georg G. Protection against beta-amyloid toxicity in primary neurons by paclitaxel (Taxol). *J Neurochem.* 1998 Apr;70(4):1623-7.
319. Mirra SS, Hyman B.T. (2002), Ageing and Dementia [w:] Greenfield's Neuopathology, Vol.2, Graham D.I., Lantos P.L. (eds), Arnold, London, 195-272.
320. Mochizuki H, Scherer SW, Xi T, Nickle DC, Majer M, Huizenga JJ, Tsui LC, Prochazka M. Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gene* 1998; 213:149-57.
321. Montine, T.J. et al. F2-isoprostanes in Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Antioxid. Redox. Signal.* 2005; 7: 269-275.
322. Moreira P, Pereira C, Santos MS, Oliveira C. Effect of zinc ions on the cytotoxicity induced by the amyloid beta-peptide. *Antioxid Redox Signal.* 2000 Summer;2(2):317-25.
323. Morgan D., Diamond D.M., Gottschall P.E. i wsp.: A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 2000; 408: 982-985.

324. 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.
325. 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.
326. Muller M, Tang MX, Schupf N, Manly JJ, Mayeux R, Luchsinger JA. Metabolic syndrome and dementia risk in a multiethnic elderly cohort. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2007; 24:185-192.
327. 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.
328. Mulnard RA, Cotman CW, Kawas C, van Dyck CH, Sano M, Doody R, Koss E, Pfeiffer E, Jin S, Gamst A, Grundman M, Thomas R, Thal LJ. Estrogen replacement therapy for treatment of mild to moderate Alzheimer disease: a randomized controlled trial. Alzheimer's Disease Cooperative Study. *JAMA.* 2000 Feb 23; 283(8):1007-15.
329. Multhaup G, Ruppert T, Schlicksupp A, Hesse L, Bill E, Pipkorn R, Masters CL, Beyreuther K. Copper-binding amyloid precursor protein undergoes a site-specific fragmentation in the reduction of hydrogen peroxide. *Biochemistry.* 1998 May 19; 37(20):7224-30.
330. 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-beta. *Nature.* 2000 Jan 6; 403(6765):98-103.
331. Näslund J., Harutunian V., Mohs R. i wsp. Correlation between elevated levels of amyloid β -peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 2000; 283: 1571-1577.
332. 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.
333. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 2001; 276:44444-9.
334. Ng CJ, Bourquard N, Grijalva V, Hama S, Shih DM, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ, Young S, Reddy ST. Paraoxonase-2 deficiency aggravates atherosclerosis in mice despite lower apolipoprotein-B-containing lipoproteins: anti-atherogenic role for paraoxonase-2. *J Biol Chem* 2006; 281:29491-500.

335. Ni CY, Murphy MP, Golde TE, Carpenter G. gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science*. 2001 Dec 7; 294(5549):2179-81.
336. Nickerson, D.A., Taylor, S.L., Fullerton, S.M., Weiss, K.M., Clark, A.G., Stengard, J.H., Salomaa, V., Boerwinkle, E., and Sing, C.F. Sequence diversity and large-scale typing of SNPs in the human apolipoprotein E gene. *Genome Res*. 2000; 10, 1532–1545.
337. Nicoll JA, Barton E, Boche D, Neal JW, Ferrer I, Thompson P, Vlachouli C, Wilkinson D, Bayer A, Games D, Seubert P, Schenk D, Holmes C (2006) Abeta species removal after abeta42immunization. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:1040–1048.
338. Nilsberth C., Westlind-Danielsson A., Eckman C. B. et al. The ‘Arctic’ APP mutation (E693G) causes Alzheimer’s disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat. Neurosci*. 2001;4, 887–893.
339. Nishio E, Watanabe Y. Cigarette smoke extract inhibits plasma paraoxonase activity by modification of the enzyme's free thiols. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236:289–93.
340. Nordberg, A. Human nicotinic receptors—their role in aging and dementia. *Neurochem. Int*. 1994; 25, 93–97.
341. Nordberg, A., Lundqvist, H., Hartvig, P., Lilja, A., La° ngstro°m, 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.
342. 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.
343. O'Brien JT, Ballard CG. Drugs for Alzheimer's disease. *BMJ*. 2001 Jul 21; 323(7305):123-4.
344. Ott A, Slioter AJ, Hofman A, et al. Smoking and risk of dementia and Alzheimer’s disease in a population-based cohort study: the Rotterdam Study. *Lancet*. 1998; 351:1840-1843.
345. Packer L, Tritschler HJ, Wessel K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med*. 1997; 22(1-2):359-78.
346. Pakaski M, Kasa P. Role of acetylcholinesterase inhibitors in the metabolism of amyloid precursor protein. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2003 Jun; 2(3):163-71.
347. Paragh G, Seres I, Harangi M, Balogh Z, Illyés L, Boda J, Szilvássy Z, Kovács P. The effect of micronised fenofibrate on paraoxonase activity in patients with

coronary heart disease. *Diabetes Metab* 2003;29:613–8.

348. Paragh G, Balla P, Katona E, Seres I, Egerházi A, Degrell I. Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2002 Apr;252(2):63-7.
349. Parent A, Linden DJ, Sisodia SS, Borchelt DR. Synaptic transmission and hippocampal long-term potentiation in transgenic mice expressing FAD-linked presenilin 1. *Neurobiol Dis*. 1999 Feb;6(1):56-62.
350. 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.
351. 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.
352. Pepeu G, Giovannini MG. Cholinesterase inhibitors and beyond. *Curr Alzheimer Res*. 2009 Apr;6(2):86-96.
353. Peplowska B, Zekanowski C, Religa D, Czyzewski K, Styczyńska M, Pfeffer A, Gabryelewicz T, Gołbiowski 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.
354. Pepys MB, Herbert J, Hutchinson WL, Tennent GA, Lachmann HJ, Gallimore JR, Lovat LB, Bartfai T, Alanine A, Hertel C, Hoffmann T, Jakob-Roetne R, Norcross RD, Kemp JA, Yamamura K, Suzuki M, Taylor GW, Murray S, Thompson D, Purvis A, Kolstoe S, Wood SP, Hawkins PN. Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis. *Nature*. 2002 May 16; 417(6886):254-9.
355. Perez-Gracia E, Blanco R, Carmona M, Carro E, Ferrer I. Oxidative stress damage and oxidative stress responses in the choroid plexus in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2009 Oct; 118(4):497-504. Epub 2009 Jul 14.
356. Perry EK, Pickering AT, Wang WW, Houghton PJ, Perry NS. Medicinal plants and Alzheimer's disease: from ethnobotany to phytotherapy. *J Pharm Pharmacol*. 1999 May; 51(5):527-34.
357. Perry RH, Candy JM, Perry EK, Irving D, Blessed G, Fairbairn AF, Tomlinson BE. Extensive loss of choline acetyltransferase activity is not reflected by neuronal loss in the nucleus of Meynert in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 1982;33: 311–315.
358. Peters R, Poulter R, Warner J, Beckett N, Burch L, Bulpitt C. Smoking, dementia and cognitive decline in the elderly, a systematic review. *BMC Geriatr*. 2008; 8:36.

359. Petersen RC, Thomas RG, Grundman M et al. Vitamin E and donepezil for the treatment of mild cognitive impairment. *N Engl J Med*. 2005;352:2379–2388.
360. Pilotto A, Franceschi M, D'Onofrio G, Bizzarro A, Mangialasche F, Cascavilla L, Paris F, Matera MG, Pilotto A, Daniele A, Mecocci P, Masullo C, Dallapiccola B, Seripa D. Effect of a CYP2D6 polymorphism on the efficacy of donepezil in patients with Alzheimer disease. *Neurology*. 2009 Sep 8;73(10):761-7.
361. Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Hui D, Weisgraber KH., Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain, *J Biol Chem*. 1987 Oct 15;262(29):14352-60.
362. Plassman, BL; Langa, KM; Fisher, GG; Heeringa, SG; Weir, DR; Ofstedal, MB; et al. "Prevalence of dementia in the United States: The Aging, Demographics and Memory Study." *Neuroepidemiology* 2007;29:125–132
363. Poirier J, Delisle MC, Quirion R, Aubert I, Farlow M, Lahiri D, Hui S, Bertrand P, Nalbantoglu J, Gilfix BM, Gauthier S. Apolipoprotein E4 allele as a predictor of cholinergic deficits and treatment outcome in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Dec 19; 92(26):12260-4.
364. Pola R, Gaetani E, Flex A, Gerardino L, Aloï F, Flore R, Serricchio M, Pola P, Bernabei R. Lack of association between Alzheimer's disease and Gln-Arg 192 Q/R polymorphism of the PON-1 gene in an Italian population. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2003; 15(2):88-91.
365. Poon HF, Joshi G, Sultana R, Farr SA, Banks WA, Morley JE, Calabrese V, Butterfield DA. Antisense directed at the Abeta region of APP decreases brain oxidative markers in aged senescence accelerated mice. *Brain Res*. 2004 Aug 20; 1018(1):86-96.
366. Pratico D, Clark C, Lee VM, Trojanowski JQ, Rokach J, Fitzgerald GA. Increased 8, 12-iso-iPF(2 alpha)-IV in Alzheimer disease: correlation with noninvasive index of lipid peroxidation with disease severity. *Ann Neurol* 2000; 48:809-812.
367. Pratico, D., 2005. Peripheral biomarkers of oxidative damage in Alzheimer's disease: the road ahead. *Neurobiol. Aging* 26, 581–583.
368. Price DL, Altschuler RJ, Struble RG, Casanova MF, Cork LC, Murphy DB (1986) Sequestration of tubulin in neurons in Alzheimer's disease. *Brain Res* 385:305–310.
369. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996; 33:498–507.

370. Probst A, Basler V, Bron B, Ulrich J. Neuritic plaques in senile dementia of the Alzheimer type: a Golgi analysis in the hippocampal region. *Brain Res.* 1983; 268:249–254.
371. Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM. Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci.* 2003 Apr; 6(4):345-51.
372. Qiu C, Winblad B, Fratiglioni L. The age-dependent relation of blood pressure to cognitive function and dementia. *Lancet Neurol.* 2005; 4:487-499.
373. Qiu C, Winblad B, Marengoni A, Klarin I, Fastbom J, Fratiglioni L. Heart failure and risk of dementia and Alzheimer disease: a populationbased cohort study. *Arch Intern Med.* 2006;166:1003-1008.
374. Qizilbash N, Whitehead A, Higgins J, Wilcock G, Schneider L, Farlow M. Cholinesterase inhibition for Alzheimer disease: a meta-analysis of the tacrine trials. Dementia Trialists' Collaboration. *JAMA.* 1998 Nov 25;280(20):1777-82.
375. 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; 7:23-37.
376. Raschetti R, Maggini M, Sorrentino GC, Martini N, Caffari B, Vanacore N. A cohort study of effectiveness of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Eur J Clin Pharmacol.* 2005 Jul;61(5-6):361-8. Epub 2005 May 24.
377. Raskind MA, Peskind ER, Wessel T, Yuan W. Galantamine in AD: A 6-month randomized, placebo-controlled trial with a 6-month extension. The Galantamine USA-1 Study Group. *Neurology.* 2000 Jun 27;54(12):2261-8.
378. 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.
379. Rea TD, Breitner JC, Psaty BM, et al. Statin use and the risk of incident dementia: the Cardiovascular Health Study. *Arch Neurol.* 2005; 62:1047-1051.
380. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusi AJ, Navab M, Fogelman AM. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:542–7.
381. Reiman EM, Webster JA, Myers AJ, Hardy J, Dunckley T, Zismann VL, Joshupura 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.

382. 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.
383. Reisberg, B., Doody, R., Stoffler, A., Schmitt, F., Ferris, S. Mobius, H.J. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N.Engl. J. Med.* 2003, 348: 1333-1341.
384. 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.
385. 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, apolipoprotein E and methylenetetrahydrofolate reductase in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2003; 16(2):64-70.
386. Rigaud AS, Traykov L, Caputo L, Guelfi MC, Latour F, Couderc R, Moulin F, de Rotrou J, Forette F, Boller F. The apolipoprotein E epsilon4 allele and the response to tacrine therapy in Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*. 2000 May;7(3):255-8.
387. Rigaud AS, Traykov L, Latour F et al. Presence of absence of at least one epsilon 4 allele and gender are not predictive for the response to donepezil treatment in Alzheimer's disease. *Pharmacogenetics*. 2002; 12:415-420.
388. Ringman JM, Younkin SG, Pratico D, Seltzer W, Cole GM, Geschwind DH, Rodriguez-Agudelo Y, Schaffer B, Fein J, Sokolow S, Rosario ER, Gyls KH, Varpetian A, Medina LD, Cummings JL. Biochemical markers in persons with preclinical familial Alzheimer disease. *Neurology*. 2008 Jul 8;71(2):85-92. Epub 2008 May 28.
389. Rissman RA, Poon WW, Blurton-Jones M, Oddo S, Torp R, Vitek MP, LaFerla FM, Rohn TT, Cotman CW. Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *J Clin Invest*. 2004 Jul;114(1):121-30.
390. Ritchie K.: *Epidemiology of the Dementias and Alzheimer's Disease*, w: *Evidence-based 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.
391. Ritchie CW, Bush AI, Mackinnon A, Macfarlane S, Mastwyk M, MacGregor L, Kiers L, Cherny R, Li QX, Tammer A, Carrington D, Mavros C, Volitakis I,

- Xilinas M, Ames D, Davis S, Beyreuther K, Tanzi RE, Masters CL. Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Abeta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial. *Arch Neurol*. 2003 Dec;60(12):1685-91.
392. Rockwood K, Kirkland S, Hogan DB, et al. Use of lipid-lowering agents, indication bias, and the risk of dementia in community-dwelling elderly people. *Arch Neurol*. 2002; 59:223-227.
 393. Rodrigo L, Mackness B, Durrington PN, Hernandez A, Mackness MI. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J* 2001; 354:1-7.
 394. Rogers S.L., Farlow M.R., Doody R.S. i wsp.: A 22-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. Donepezil Study Group. *Neurology* 1998; 50: 136-145.
 395. Rogers JT, Lahiri DK. Metal and inflammatory targets for Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets*. 2004 Aug; 5(6):535-51.
 396. Rogers J, Strohmeyer R, Kovelowski CJ, Li R. Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia*. 2002 Nov;40(2):260-9.
 397. Rogers, J., Kirby, L.C., Hempelman, S.R., Berry, D.L., McGeer, P.L., Kaszniak, A.W., Zalinski, J., Cofield, M., Mansukhani, L., Willson, P., Kogan, F. Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease. *Neurology* 1993, 43: 1609-1611.
 398. Rogers SL, Friedhoff LT. The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: results of a US Multicentre, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. The Donepezil Study Group. *Dementia*. 1996 Nov-Dec;7(6):293-303.
 399. Rogers SL, Doody RS, Pratt RD, Ieni JR. Long-term efficacy and safety of donepezil in the treatment of Alzheimer's disease: final analysis of a US multicentre open-label study. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2000 May; 10(3):195-203.
 400. 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.
 401. Rondi-Reig, L., Libbey, M., Eichenbaum, H. Tonegawa, S. CA1-specific N-methyl-D-aspartate receptor knockout mice are deficient in solving a nonspatial transverse patterning task. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2001, 98: 3543-3548.
 402. Rosenblat M, Draganov D, Watson CE, Bisgaier CL, La Du BN, Aviram M. Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:468-74.

403. Rosenblat M, Gaidukov L, Khersonsky O, Vaya J, Oren R, Tawfik DS, Aviram M. The catalytic histidine dyad of high density lipoprotein-associated serum paraoxonase-1 (PON1) is essential for PON1-mediated inhibition of low density lipoprotein oxidation and stimulation of macrophage cholesterol efflux. *J Biol Chem* 2006; 281:7657–65.
404. Roses, A.D. (1996). Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Med.* 47, 387–400.
405. Rosler M., Anand R., Cicin-Sain A. i wsp.: Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease: international randomised controlled trial. *BMJ* 1999; 318: 633-638.
406. Rozenberg O, Shih DM, Aviram M. Human serum paraoxonase 1 decreases macrophage cholesterol biosynthesis: possible role for its phospholipase-A2-like activity and lysophosphatidylcholine formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:461–7.
407. Rovio S, Kåreholt I, Helkala EL, et al. Leisure-time physical activity at midlife and the risk of dementia and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2005;4:705-711.
408. Ruitenberg A, van Swieten JC, Witteman JC, et al. Alcohol consumption and risk of dementia: the Rotterdam Study. *Lancet.* 2002; 359:281-286.
409. Safety and tolerability of repeated subcutaneous injections of CAD106 in mild Alzheimer's patients. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00733863>. Accessed January 8, 2009.
410. Saito S, Ishida A, Sekine A et al. Catalog of 680 variants among eight cytochrome P450 (CYP) genes: nine esterase genes, and two other genes in the Japanese population. *J Hum Genet.* 2003; 48:249–270.
411. Sanghera DK, Manzi S, Minster RL, Shaw P, Kao A, Bontempo F, Kamboh MI. Genetic variation in the paraoxonase-3 (PON3) gene is associated with serum PON1 activity. *Ann Hum Genet* 2008;72:72–81.
412. Sano, M., Ernesto, C., Thomas, R.G., Klauber, M.R., Schafer, K., Grundman, M., Woodbury, P., Growdon, J., Cotman, C.W., Pfeiffer, E., Schneider, L.S. Thal, L.J. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N. Engl. J. Med.* 1997, 336: 1216-1222.
413. Santoro A, Siviero P, Minicuci N, Bellavista E, Mishto M, Olivieri F, Marchegiani F, Chiamenti AM, Benussi L, Ghidoni R, Nacmias B, Bagnoli S, Ginestroni A, Scarpino O, Feraco E, Gianni W, Cruciani G, Paganelli R, Di Iorio A, Scognamiglio M, Grimaldi LM, Gabelli C, Sorbi S, Binetti G, Crepaldi G, Franceschi C. Effects of donepezil, galantamine and rivastigmine in 938 italian patients with Alzheimer's disease: a prospective, observational study. *CNS Drugs.* 2010 Feb 1;24(2):163-76. doi: 10.2165/11310960-000000000-00000.

414. Saumier D, Murtha S, Bergman H, Phillips N, Whitehead V, Chertkow H. Cognitive predictors of donepezil therapy response in Alzheimer disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2007; 24(1):28-35.
415. Saunders, A.M., et al. 1993. Association of Apolipoprotein E allele Epsilon 4 with late-onset Alzheimer's disease. *Neurology*. 43:1467–1472.
416. Sawamura N, Morishima-Kawashima M, Waki H, Kobayashi K, Kuramochi T, Frosch MP, Ding K, Ito M, Kim TW, Tanzi RE, Oyama F, Tabira T, Ando S, Ihara Y. Mutant presenilin 2 transgenic mice. A large increase in the levels of Abeta 42 is presumably associated with the low density membrane domain that contains decreased levels of glycerophospholipids and sphingomyelin. *J Biol Chem*. 2000 Sep 8;275(36):27901-8.
417. Scacchi R, Gambina G, Martini MC, Broggio E, Vilardo T, Corbo RM. Different pattern of association of paraoxonase Gln192-->Arg polymorphism with sporadic late-onset Alzheimer's disease and coronary artery disease. *Neurosci Lett*. 2003 Mar 13;339(1):17-20.
418. Scarmeas N, Stern Y, Mayeux R, Luchsinger JA. Mediterranean diet, Alzheimer disease, and vascular mediation. *Arch Neurol*. 2006;63:1709-1717.
419. Scarpini E, Scheltens P, Feldman H. Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. *Lancet Neurol*. 2003 Sep;2(9):539-47.
420. Schechter R, Yen SH, Terry RD. Fibrous astrocytes in senile dementia of the Alzheimer type. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1981;40:95–101.
421. Schenk D., Barbour R., Dunn W. i wsp.: Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-diseaselike pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 1999;400: 173-177.
422. Schindowski K, Kratzsch T, Peters J, Steiner B, Leutner S, Touchet N, Maurer K, Czech C, Pradier L, Frölich L, Müller WE, Eckert A. Impact of aging: sporadic, and genetic risk factors on vulnerability to apoptosis in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*. 2003; 4(3):161-78.
423. 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.
424. Scordo MG, Dahl ML, Spina E, Cordici F, Arena MG. No association between CYP2D6 polymorphisms and Alzheimer's disease in an Italian population. *Pharmacol Res*. 2006; 53:162–165.
425. Selkoe D.J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 1991; 6: 487-498.

426. Sentí M, Tomás M, Vila J, Marrugat J, Elosua R, Sala J, Masiá R. Relationship of age-related myocardial infarction risk and Gln/Arg 192 variants of the human paraoxonase1 gene: the REGICOR study. *Atherosclerosis* 2001;156:443–9.
427. 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.
428. Sherrington,R., Rogaev,E.I., Liang,Y., Rogaeva,E.A., Levasque,G., Ikeda,M., Chi,H., Lin,C., Li,G., Holman,K., Tsuda,T., Mar,L., Foncin,J.F., Bruni,A.C., Montesi,M.P., Sorbi,S., Rainero,I., Pinessi,L., Nee,L., Chumakov, I., Pollen,D., Brookes,A., Sansosu,P., Polinsky,R.J., Wasco,W., Da Silva,H.A.R., Haines,J.L., Pericak-Vance,M.A., Tanzi,R.E., Roses,A.D., Fraser,P.E., Rommens,J.M. and St George-Hyslop,P. (1995) Cloning of a gene bearing mis-sense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 375, 754–760.
429. Shi J, Zhang S, Tang M, Liu X, Li T, Han H, Wang Y, Guo Y, Zhao J, Li H, Ma C. Possible association between Cys311Ser polymorphism of paraoxonase 2 gene and late-onset Alzheimer's disease in Chinese. *Brain Res Mol Brain Res.* 2004 Jan 5;120(2):201-4.
430. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Wang SS, Bourquard N, Fogelman AM, Lusis AJ, Reddy ST. Decreased obesity and atherosclerosis in human paraoxonase 3 transgenic mice. *Circ Res* 2007; 100:1200–7.
431. Shimohama S. Apoptosis in Alzheimer's disease--an update. *Apoptosis.* 2000 Feb;5(1):9-16.
432. Shumaker SA, Legault C, Rapp SR, Thal L, Wallace RB, Ockene JK, Hendrix SL, Jones BN 3rd, Assaf AR, Jackson RD, Kotchen JM, Wassertheil-Smoller S, Wactawski-Wende J; WHIMS Investigators. Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2003 May 28; 289(20):2651-62.
433. Sigurdsson E.M., Wisniewski T., Frangione B.: A safer vaccine for Alzheimer.s disease? *Neurobiol. Aging* 2002; 23: 1001-1008.
434. Sistonen J., Fuselli S., Levo A. i wsp.: CYP2D6 genotyping by a multiplex primer extension reaction. *Clin. Chem.*, 2005, 51, 1291.
435. Sjögren M, Hesse C, Basun H et al.Tacrine and rate of progression in Alzheimer's disease—relation to ApoE allele genotype. *J Neural Transm.* 2001;108:451–458.
436. Smith TW, Anwer U, DeGirolami U, Drachman DA. Vacuolar change in Alzheimer's disease. *Arch Neurol.*1987; 44:1225–1228.

437. Smith MA, Harris PL, Sayre LM, Perry G. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Sep 2; 94(18):9866-8.
438. Snitz BE, O'Meara ES, Carlson MC, Arnold AM, Ives DG, Rapp SR, Saxton J, Lopez OL, Dunn LO, Sink KM, DeKosky ST; Ginkgo Evaluation of Memory (GEM) Study Investigators. Ginkgo biloba for preventing cognitive decline in older adults: a randomized trial. *JAMA*. 2009 Dec 23; 302(24):2663-70.
439. Sobów T., Kloszewska I., Karlińska I.: Addition of vitamin E to donepezil as a treatment for Alzheimer's disease. *Alzheimer Rep*. 1999; 2: 143-146.
440. Sodeyama N, Yamada M, Itoh Y, Suematsu N, Matsushita M, Otomo E, Mizusawa H. No association of paraoxonase gene polymorphism with atherosclerosis or Alzheimer's disease. *Neurology*. 1999 Sep 22; 53(5):1146-8.
441. Solomon A, Kåreholt I, Ngandu T, et al. Serum cholesterol changes after midlife and late-life cognition: twenty-one-year follow-up study. *Neurology*. 2007; 68:751-756.
442. Steinhilb ML, Turner RS, Gaut JR. The protease inhibitor, MG132, blocks maturation of the amyloid precursor protein Swedish mutant preventing cleavage by beta-Secretase. *J Biol Chem*. 2001 Feb 9; 276(6):4476-84. Epub 2000 Nov 17.
443. 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.
444. Study evaluating safety, tolerability, and immunogenicity of ACC-001 in subjects with Alzheimer's disease. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00479557>. Accessed January 8, 2009.
445. Study evaluating the efficacy and safety of bapineuzumab in Alzheimer disease patients. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00667810>. Accessed January 8, 2009.
446. Study evaluating the safety and efficacy of bapineuzumab in Alzheimer disease patients. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00676143>. Accessed June 3, 2009.
447. 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.
448. 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.

449. 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.
450. Subbarao KV, Richardson JS, Ang LC. Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. *J Neurochem.* 1990; 55:342-345.
451. Suh GH, Jung HY, Lee CU, Oh BH, Lee SK, Lee N, Kim J, Kee BS, Ko D, Kim YH, Ju YS, Hong I, Choi S; Korean Galantamine Study Group. Effect of the apolipoprotein E epsilon4 allele on the efficacy and tolerability of galantamine in the treatment of Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2006; 21(1):33-9. Epub 2005 Oct 25.
452. Szaniszló P, German P, Hajas G, Saenz DN, Kruzel M, Boldogh I. New insights into clinical trial for Colostrinin in Alzheimer's disease. *J Nutr Health Aging.* 2009 Mar; 13(3):235-41.
453. Szekely CA, Thorne JE, Zandi PP, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of Alzheimer's disease: a systematic review. *Neuroepidemiology.* 2004; 23(4):159-169.
454. Tabet N, Birks J, Grimley Evans J. Vitamin E for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000; (4).
455. Takeda A, Loveman E, Clegg A, Kirby J, Picot J, Payne E, Green C. A systematic review of the clinical effectiveness of donepezil, rivastigmine and galantamine on cognition, quality of life and adverse events in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2006 Jan;21(1):17-28.
456. Tamagno E, Robino G, Obbili A, Bardini P, Aragno M, Parola M, Danni O. H₂O₂ and 4-hydroxynonenal mediate amyloid beta-induced neuronal apoptosis by activating JNKs and p38MAPK. *Exp Neurol.* 2003 Apr;180(2):144-55.
457. Tan ZS, Beiser AS, Vasan RS, et al. Inflammatory markers and the risk of Alzheimer disease: the Framingham Study. *Neurology.* 2007; 68:1902-1908.
458. Tang MX, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, Andrews H, Mayeux R. Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet.* 1996 Aug 17;348(9025):429-32.
459. Tanzi RE. A genetic dichotomy model for the inheritance of Alzheimer's disease and common age-related disorders. 1999 Nov;104(9):1175-9.
460. Tanzi RE, Moir RD, Wagner SL. Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition. *Neuron.* 2004 Sep 2; 43(5):605-8.
461. Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, Patterson D, Pagan S, Kurnit DM, Neve RL. Amyloid beta protein gene:

cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science*. 1987 Feb 20; 235(4791):880-4.

462. Tariot, P.N., Farlow, M.R., Grossberg, G.T., Graham, S.M., McDonald, S., Gergel, I. Group., M.S. Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004, 291: 317-324.
463. Tavori H, Khatib S, Aviram M, Vaya J. Characterization of the PON1 active site using modeling simulation, in relation to PON1 lactonase activity. *Bioorg Med Chem* 2008; 16:7504–9.
464. Teaktong, T., Graham, A.J., Court, J.A., Perry, R.H., Jaros, E., Johnson, M., Hall, R., Perry, E.K. 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.
465. Tebar, F., Bohlander, S.K. & Sorkin, A. Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic. *Mol. Biol. Cell.*1999;10, 2687–2702.
466. Tennent GA, Lovat LB, Pepys MB. Serum amyloid P component prevents proteolysis of the amyloid fibrils of Alzheimer disease and systemic amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 May 9;92(10):4299-303.
467. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol.*1991; 30:572–580.
468. Teter B, Ashford JW (2002) Neuroplasticity in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 70:402–437.
469. Thomas D Bird, Genetic Aspects of Alzheimer Disease, *Genet Med.* 2008 April; 10(4): 231–239.
470. Tomás M, Sentí M, García-Faria F, Vila J, Torrents A, Covas M, Marrugat J. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2113–9.
471. 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.
472. Tsimihodimos V, Karabina SA, Tambaki AP, Bairaktari E, Goudevenos JA, Chapman MJ, Elisaf M, Tselepis AD. Atorvastatin preferentially reduces LDL-associated platelet-activating factor acetylhydrolase activity in dyslipidemias of type IIA and type IIB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:306–11.

473. Tun H, Marlow L, Pinnix I, Kinsey R, Sambamurti K. Lipid rafts play an important role in A beta biogenesis by regulating the beta-secretase pathway. *J Mol Neurosci.* 2002 Aug-Oct;19(1-2):31-5.
474. Tuppo EE, Arias HR. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Feb;37(2):289-305.
475. Tuppo EE, Forman LJ, Spur BW, Cheng-Ting RE, Chopra A, Cavalieri A. Sign of lipid peroxidation as measure in the urine of patients with probable Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 2001; 54:565-568.
476. Tyas SL, White LR, Petrovitch H, et al. Mid-life smoking and late-life dementia: the Honolulu-Asia Aging Study. *Neurobiol Aging.* 2003;24:589-596.
477. Utermann G, Langenbeck U, Beisiegel U, Weber W. Genetics of the apolipoprotein E system in man. *Am J Hum Genet.* 1980 May;32(3):339-47.
478. Waddington E, Croft K, Clarnette, Artins R. Plasma F2 isoprostane levels are increased in Alzheimer disease: evidence of increased oxidative stress in vivo. *Alzheimer's Rep* 1999; 2:227-282.
479. Wallace AJ, Sutherland WH, Mann JI, Williams SM. The effect of meals rich in thermally stressed olive and safflower oils on postprandial serum paraoxonase activity in patients with diabetes. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:951-8.
480. Walsh DM, Selkoe DJ. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron.* 2004 Sep 30;44(1):181-93.
481. Wang HX, Fratiglioni L, Frisoni GB, Viitanen M, Winblad B. Smoking and the occurrence of Alzheimer's disease: cross-sectional and longitudinal data in a population-based study. *Am J Epidemiol.* 1999; 149:640-644.
482. Wang DS, Dickson DW, Malter JS. Beta-amyloid degradation and Alzheimer's disease. *J Biomed Biotechnol.* 2006; 2006:58406.
483. 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.
484. Watson GS, Craft S. The role of insulin resistance in the pathogenesis of Alzheimer's disease: Implications for treatment. *CNS Drugs.* 2003;17:27-45.
485. Wehr H, Bednarska-Makaruk M, Graban A, Lipczyńska-Łojkowska W, Rodo M, Bochyńska A, Ryglewicz D. Paraoxonase activity and dementia. *J Neurol Sci.* 2009 Aug 15;283(1-2):107-8. Epub 2009 Mar 5.

486. Weidemann A, Eggert S, Reinhard FB, Vogel M, Paliga K, Baier G, Masters CL, Beyreuther K, Evin G. A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry*. 2002 Feb 26;41(8):2825-35.
487. Weiner H.L., Lemere C.A., Maron R. i wsp.: Nasal administration of amyloid-beta peptide decreases cerebral amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Ann. Neurol*. 2000; 48: 567-579.
488. Whitwell JL, Josephs KA, Murray ME, Kantarci K, Przybelski SA, Weigand SD, Vemuri P, Senjem ML, Parisi JE, Knopman DS, Boeve BF, Petersen RC, Dickson DW, Jack CR Jr. MRI correlates of neurofibrillary tangle pathology at autopsy: a voxel-based morphometry study. *Neurology*. 2008 Sep 2; 71(10):743-9.
489. Wilcock G.K., Lilienfeld S., Gaens E.: Efficacy and safety of galantamine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: multicentre randomised controlled trial. Galantamine International-1 Group. *BMJ* 2000; 321: 1445-1449.
490. Wilkinson D, Schindler R, Schwam E, Waldemar G, Jones RW, Gauthier S, Lopez OL, Cummings J, Xu Y, Feldman HH. Effectiveness of donepezil in reducing clinical worsening in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2009; 28(3):244-51. Epub 2009 Sep 25.
491. Wilson PW, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM, Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996 Oct;16(10):1250-5.
492. Winblad B.: Choroba Alzheimera; epidemiologia, koszty i strategia leczenia. *Neur. Neurochir. Pol*. 1999, (Supl. 3), 77.
493. Winblad B, Engedal K, Soininen H, Verhey F, Waldemar G, Wimo A, Wetterholm AL, Zhang R, Haglund A, Subbiah P; Donepezil Nordic Study Group. A 1-year, randomized, placebo-controlled study of donepezil in patients with mild to moderate AD. A 1-year, randomized, placebo-controlled study of donepezil in patients with mild to moderate AD. *Neurology*. 2001 Aug 14;57(3):489-95.
494. Wisniewski HM, Sadowski M, Jakubowska-Sadowska K, Tarnawski M, Wegiel J. Diffuse, lake-like amyloid-beta deposits in the paraventricular layer of the presubiculum in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998;57:674-683.
495. Wisniewski K.E., Dalton A.J., Crapper-McLachlan D.R. i wsp. Alzheimer's disease in Down's syndrome: clinicopathologic studies. *Neurology* 1985; 35: 957-961.
496. Wolozin B, Kellman W, Rousseau P, Celesia GG, Siegel G. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol*. 2000 Oct;57(10):1439-43.
497. Wong GT, Manfra D, Poulet FM, et al. Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters

lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *J Biol Chem.* 2004;279:12876–12882.

498. Vanhanen M, Koivisto K, Moilanen L, et al. Association of metabolic syndrome with Alzheimer disease: a population-based study. *Neurology.* 2006; 67:843-847.
499. Van Broeckhoven CL. Molecular genetics of Alzheimer disease: identification of genes and gene mutations. *Eur Neurol.* 1995; 35(1):8-19.
500. Van der Gaag MS, van Tol A, Scheek LM, James RW, Urgert R, Schaafsma G, Hendriks HF. Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity; a diet-controlled, randomised intervention study in middle-aged men. *Atherosclerosis* 1999; 147:405–10.
501. Van Gool, W.A., Weinstein, H.C., Scheltens, P., Walstra, G.J. Scheltens, P.K. Effect of hydroxychloroquine on progression of dementia in early Alzheimer's disease: an 18-month randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet* 2001, 358: 455-460.
502. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM, Navab M. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest* 1995;96:2758–67.
503. van Oijen M, de Jong FJ, Witteman JC, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. Atherosclerosis and risk for dementia. *Ann Neurol.* 2007;61:403-410.
504. Varsaldi F, Miglio G, Scordo MG, Dahl ML, Villa LM, Biolcati A, Lombardi G. Impact of the CYP2D6 polymorphism on steady-state plasma concentrations and clinical outcome of donepezil in Alzheimer's disease patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2006 Sep;62(9):721-6. Epub 2006 Jul 15.
505. Veeranna, Kaji T, Boland B, Odrlic T, Mohan P, Basavarajappa BS, Peterhoff C, Cataldo A, Rudnicki A, Amin N, Li BS, Pant HC, Hungund BL, Arancio O, Nixon RA. Calpain mediates calcium-induced activation of the erk1,2 MAPK pathway and cytoskeletal phosphorylation in neurons: relevance to Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 2004 Sep;165(3):795-805.
506. Vermeer SE, Prins ND, den Heijer T, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. Silent brain infarcts and the risk of dementia and cognitive decline. *N Engl J Med.* 2003;348:1215-1222
507. 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.

508. 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.
509. Yamada H, Dahl ML, Viitanen M, Winblad B, Sjoqvist F, Lannfelt L. No association between familial Alzheimer disease and cytochrome P450 polymorphisms. *Alzheimer Dis Assoc Disord*.1998; 2:204–207.
510. Yanagisawa K, Odaka A, Suzuki N, Ihara Y. GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein (A beta): a possible form of preamyloid in Alzheimer's disease. *Nat Med*. 1995 Oct;1(10):1062-6.
511. Yasar S, Corrada M, Brookmeyer R, Kawas C. Calcium channel blockers and risk of AD: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neurobiol Aging*. 2005; 26:157-163.
512. 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.
513. Yoshida T, Ha-Kawa S, Yoshimura M, Nobuhara K, Kinoshita T, Sawada S. Effectiveness of treatment with donepezil hydrochloride and changes in regional cerebral blood flow in patients with Alzheimer's disease. *Ann Nucl Med*. 2007 Jul; 21(5):257-65.
514. Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature*.2000 Oct 12; 407(6805):802-9.
515. Zandi PP, Sparks DL, Khachaturian AS, et al. Do statins reduce risk of incident dementia and Alzheimer disease? The Cache County Study. *Arch Gen Psychiatry*. 2005; 62:217-224.
516. Zandi PP, Anthony JC, Khachaturian AS, et al. Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: the Cache County Study. *Arch Neurol*. 2004;61:82-88
517. Zandi PP, Carlson MC, Plassman BL, Welsh-Bohmer KA, Mayer LS, Steffens DC, Breitner JC; Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women: the Cache County Study.Cache County Memory Study Investigators. *JAMA*. 2002 Nov 6;288(17):2123-9
518. Zandi, P.P., Anthony, J.C., Hayden, K.M., Mehta, K., Mayer, L. Breitner, J.C. Reduced incidence of AD with NSAID but not H2 receptor antagonists: the Cache County Study. *Neurology* 2002, 59: 880-886.
519. Zanger UM, Fischer J, Raimundo S, et al. Comprehensive analysis of the genetic factors determining expression and function of hepatic CYP2D6. *Pharmacogenetics* 2001; 11:573–585.

520. Zarkovic K. 4-hydroxynonenal and neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med.* 2003; 24:293-303.
521. Zlokovic, B.V. et al. Brain uptake of circulating apolipoproteins J and E complexed to Alzheimer's amyloid beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 205, 1431–1437.
522. Zuliani G, Ble' A, Zanca R, Munari MR, Zurlo A, Vavalle C, Atti AR, Fellin R. Genetic polymorphisms in older subjects with vascular or Alzheimer's dementia. *Acta Neurol Scand.* 2001 May;103(5):304-8.
523. Zekanowski C, Styczyńska M, Peplowska 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.
524. Zekanowski C, Religa D, Safranow K, Maruszak A, Dziedziczko V, Styczyńska M, Gacia M, Golan M, Peplowska 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.
525. Zekanowski C, Peplowska 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.