

Received: 2012.04.11
Accepted: 2012.11.19
Published: 2013.01.16

Stres oksydacyjny i naturalne mechanizmy antyoksydacyjne – znaczenie w procesie neurodegeneracji. Od mechanizmów molekularnych do strategii terapeutycznych

Oxidative stress and natural antioxidant mechanisms: the role in neurodegeneration. From molecular mechanisms to therapeutic strategies

Agata Karpińska¹, Grażyna Gromadzka²

¹ Warszawski Uniwersytet Medyczny, Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej

² Instytut Psychiatrii i Neurologii w Warszawie, Pracownia Neuroimmunologii

Streszczenie

Wiele obserwacji wskazuje, że procesem leżącym u podłoża neurodegeneracji jest stres oksydacyjny. Neurony są bardziej niż inne komórki narażone na uszkodzenie oksydacyjne, ze względu na bardziej intensywny metabolizm tlenowy, mniejszą aktywność enzymów antyoksydacyjnych, większą zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w błonie komórkowej, dużą liczbę mitochondriów, niekorzystny stosunek powierzchni do objętości oraz sąsiedztwo komórek mikrogleju, które mogą wytwarzać duże ilości anionorodnika nadtlenkowego. Z powodu tendencji do magazynowania metali przejściowych w mózgu występują warunki sprzyjające zachodzeniu reakcji Fentona prowadzącej do powstawania rodnika hydroksylowego.

U chorych z chorobami neurodegeneracyjnymi odnotowano obniżoną aktywność naturalnych systemów obrony przeciwoksydacyjnej, a także podwyższone wartości markerów oksydacyjnego uszkodzenia lipidów, białek i DNA.

Prowadzonych jest wiele badań, których celem jest określenie skuteczności oraz bezpieczeństwa stosowania różnych substancji przeciwutleniających w terapii chorób neurodegeneracyjnych. Powszechnie znane antyoksydanty nie okazały się skuteczne i/lub bezpieczne. Trwają poszukiwania nowych cząsteczek, które mogłyby być bardziej swoiste względem procesów wewnątrzkomórkowych generujących wolne rodniki tlenowe.

Słowa kluczowe:

neurodegeneracja • stres oksydacyjny • naturalne antyoksydanty • wolne rodniki tlenowe

Summary

A lot of evidence exists that oxidative stress is the primary cause of neurodegeneration. Neurons are more susceptible to oxidative damage than other cells due to their high oxygen consumption, low activity of antioxidant enzymes, elevated concentration of polyunsaturated fatty acids in the cell membrane, high number of mitochondria, unfavorable space/volume ratio and vicinity of microglia cells which are likely to produce increased amounts of superoxide radical. Moreover,

the tendency to accumulate transition metals in the brain creates a higher probability of Fenton's reaction occurring, a product of which is a hydroxyl radical.

Lower activities of natural antioxidants as well as higher concentrations of markers of oxidative damage to proteins, lipids and DNA were observed in patients with neurodegenerative diseases in relation to healthy individuals. There is a lot of research being conducted to develop effective and safe antioxidants that would be useful in the therapy or prevention of neurodegenerative diseases.

Key words: neurodegeneration • oxidative stress • natural antioxidants • radical oxygen species

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1029530>

Word count: 3776

Tables: –

Figures: 3

References: 93

Adres autorki: lek. dent. Agata Karpińska, Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-927 Warszawa; e-mail: karpinska.agata@gmail.com

Wykaz skrótów: **AD** – choroba Alzheimera (Alzheimer's disease); **ALS** – stwardnienie zanikowe boczne (amiothrophic lateral sclerosis); **ARE** – regiony odpowiedzi przeciwoksydacyjnej (antioxidant response elements); **CAT** – katalaza (catalase); **Cdk5** – zależna od cyklin kinaza 5 (cyclin dependent kinase 5); **CoQ₁₀** – koenzym Q₁₀; **GPx** – peroksydaza glutationowa (glutathione peroxidase); **GRd** – reduktaza glutationowa (glutathione reductase); **GSH** – zredukowana postać glutationu; **GSSG** – utleniona postać glutationu; **GST** – S-transferaza glutationowa (glutathione S-transferase); **Keap1** – białko sensorowe (Kleeh-like ECH associating protein 1); **MB** – błękit metylenowy (methylene blue); **NOS** – syntaza tlenu azotu (nitric oxide synthase); **Nrf2** – czynnik transkrypcyjny (nuclear arthroid 2-related factor); **p35, p25** – białka regulatorowe; **PD** – choroba Parkinsona (Parkinson's disease); **ROS** – wolne rodniki tlenowe (reactive oxygen species); **SOD** – dysmutaza ponadtlenkowa (superoxide dismutase); **UPDRS** – międzynarodowa skala oceniająca stopień zaawansowania choroby Parkinsona (Unified Parkinson's Disease Rating Scale); **WNKT** – wielonienasycone kwasy tłuszczowe; **WS – CoQ₁₀** – rozpuszczalny w wodzie koenzym Q₁₀.

WSTĘP

Tlenowy sposób oddychania komórkowego to proces pozwalający wyzwolić znaczną ilość energii niezbędnej do życia komórek. Metabolizm tlenowy zachodzi w mitochondriach, a opiera się na procesie utleniania glukozy, jednak bez bezpośredniej reakcji glukozy z tlenem cząsteczkowym. W mitochondrialnym łańcuchu oddechowym, tworzonym przez białka transportujące pojedyncze elektrony, tlen jest jedynie akceptorem elektronów. Końcowym efektem czterech reakcji transferu elektronów w łańcuchu oddechowym jest redukcja cząsteczki tlenu do wody. Jednak na skutek zjawiska „przecieku elektronów z łańcucha oddechowego” cząsteczka tlenu nie zawsze ulega pełnej, czteroelektronowej redukcji. Redukcja cząsteczki tlenu jednym, dwoma lub trzema elektronami prowadzi do tworzenia się wolnych rodników tlenowych (reactive oxygen species – ROS) [2,9,22,37,56,76].

Wolne rodniki to cząsteczki zawierające przynajmniej jeden niesparowany elektron na zewnętrznej powłoce elektronowej. Są one bardzo reaktywne, gdyż dążą do sparowania elektronów przez odebranie lub oddanie ich innym cząsteczkom. Łańcuch oddechowy jest źródłem około 90% wolnych rodników generowanych w organizmie. Pozostałe

10% powstaje w trakcie reakcji fizjologicznych, zachodzących w różnych strukturach komórki (np. reakcji katalizowanych przez oksydazy czy cytochrom p450) albo w wyniku autooksydacji związków biologicznie czynnych (np. hydrochinonów, epinefryny, hemoglobiny czy związków tiolowych) [13,33]. Wolne rodniki powstają również w wyniku oddziaływania na komórkę czynników fizycznych (np. promieniowania ultrafioletowego, jonizującego, ultradźwięków czy podwyższonej temperatury) oraz w procesach metabolizmu różnych egzogennych związków chemicznych, w tym także leków [17].

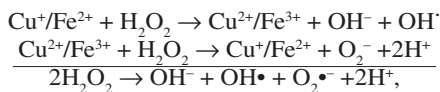
Wolne rodniki są niezbędne do prawidłowego przebiegu wielu procesów życiowych. Odgrywają one rolę w regulacji ekspresji genów, procesów fosforylacji białek czy stężenia wapnia w komórkach, aktywują białka kontrolujące podziały komórkowe, uczestniczą w eliminowaniu drobnoustrojów. Nadmiar wolnych rodników prowadzi jednak do destrukcji elementów strukturalnych i funkcjonalnych komórek, zaburzeń homeostazy i śmierci w wyniku apoptozy lub nekrozy [2,9,13,17,22,25,33,37,56,58,76].

W ostatnim czasie pojawiło się wiele doniesień wskazujących na znaczenie wolnych rodników w patogenezie neurodegeneracji.

STRES OKSYDACYJNY I NATURALNE MECHANIZMY ANTYOKSYDACYJNE

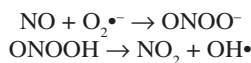
Do najbardziej reaktywnych ROS występujących w systemach biologicznych należą: rodnik hydroksylowy (OH•) i rodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$).

W warunkach fizjologicznych rodnik ponadtlenkowy powstaje głównie w mitochondriach, jako produkt uboczny transportu elektronów w łańcuchu oddechowym [3,11]. Szacuje się, że w łańcuchu oddechowym prawie 2% tlenu cząsteczkowego ulega przemianom w $O_2^{\cdot-}$. W uszkodzonych lub starzejących się mitochondriach proporcja ta zwiększa się na korzyść tworzenia wolnego rodnika. Rodnik ponadtlenkowy ma zdolność do utleniania jonów metali przejściowych, przez co może zmniejszać działanie enzymów zawierających metale w centrach aktywnych. Ma też zdolność do utleniania cysteiny, co może prowadzić do zmiany konformacji białek z ewentualną utratą ich własności biologicznych. Z udziałem enzymu dysmutazy ponadtlenkowej (superoxide dismutase – SOD) $O_2^{\cdot-}$ może ulec redukcji do nadtlenu wodoru (H_2O_2), który nie jest wolnym rodnikiem, jednak w wyniku reakcji Fentona w obecności zredukowanych form kationów miedzi lub żelaza, ulega przemianie do najbardziej reaktywnego rodnika w systemach biologicznych – rodnika hydroksylowego:



H_2O_2 może też wchodzić w reakcję z $O_2^{\cdot-}$ (reakcja Habera-Weissa), w której również powstaje rodnik hydroksylowy. Rodnik ten jako bardzo reaktywna cząsteczka mało swoista substratowo, zdolna zarówno do utleniania, jak i redukcji wchodzi w reakcje z różnymi cząsteczkami w komórce.

Rodnik ponadtlenkowy może też wejść w reakcję z tlenkiem azotu (nitric oxide – NO) i utworzyć anion nadazotowy. Anion ten, niebędący rodnikiem, jest bardzo reaktywny i wchodzi w reakcje z białkami, DNA oraz lipidami, powodując ich utlenienie lub nitrację. Jon nadazotowy może się przekształcić w niebezpieczny rodnik hydroksylowy w wyniku reakcji:



Substrat do tworzenia nadazotanu, czyli NO, powstaje w wyniku reakcji katalizowanej przez enzym: syntazę tlenku azotu (nitric oxide syntase – NOS). Ekspresja genu kodującego NOS rośnie wraz ze wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, np. w następstwie uszkodzenia błony komórkowej. Uszkodzenie takie może powstać w wyniku procesów oksydacyjnych. Mechanizm oksydacyjnego uszkodzenia błony komórkowej polega na wytworzeniu utlenionych oraz cyklicznych postaci kwasów tłuszczowych, będących podstawowym składnikiem budulcowym błony komórkowej. W konsekwencji dochodzi do zwiększenia płynności i przepuszczalności błony oraz do uszkodzenia protein błonowych (receptorów, kanałów jonowych, enzymów). Skutkiem wzrostu przepuszczalności błony komórkowej jest wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia kationów wapnia, a w konsekwencji, poza pobudzeniem ekspresji NOS, aktywacja enzymu fosfolipazy A2.

Fosfolipaza A2, z udziałem jonów wapnia i adenylotryfosforanu (adenosine triphosphate – ATP), katalizuje uwalnianie z błon fosfolipidowych kwasu arachidonowego, którego dalsze przemiany z udziałem enzymów: cyklooksygenazy i lipooksygenazy wiążą się z wytwarzaniem rodników hydroksylowych i ponadtlenkowych [14]. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia prowadzi też do wzrostu aktywności białek z rodziny kalpain, które degradują cytoszkielet komórek [70]. Następnym oksydacyjnym uszkodzeniem błony komórkowej jest więc tzw. błędne koło, gdyż pierwotne uszkodzenie wywołuje kaskadę reakcji prowadzących do dalszego uszkodzenia błony, a także innych struktur komórkowych oraz do pogłębienia stresu oksydacyjnego [37].

Skutkiem oddziaływań wolnorodnikowych jest nie tylko uszkodzenie błony komórkowej. W cząsteczce kwasu dezoksyrybonukleinowego (deoxyribonucleic acid – DNA) oksydacyjnej modyfikacji ulegają zasady azotowe, dezoksyryboza, dochodzi do rozrywania wiązań fosfodiestrowych łączących nukleotydy [57]. Utleniające działanie ROS (głównie hydroksylowego) w stosunku do białek prowadzi do powstania głównie rodnika hydroksylowego, alkilowodoranatlenków czy rodników alkoksylowych, co w konsekwencji powoduje rozerwanie łańcucha polipeptydowego [18,61,84]. Rodnik hydroksylowy może też powodować utlenienie niebiałkowych składników związanych z białkami, np. węglowodanów czy jonów metali, czego konsekwencją są zaburzenia funkcji biologicznych białek. Oksydacyjnie zmodyfikowane białka mają tendencję do tworzenia agregatów, które są odporne na degradację, gdyż nie ulegają ubikwitynizacji i nie są rozpoznawane przez proteasomy [33]. W następstwie oksydacyjnych modyfikacji lipidów, białek i DNA dochodzi do zaburzeń homeostazy i śmierci komórek w wyniku apoptozy lub nekrozy [37].

W toku ewolucji komórki organizmów żywych wykształciły mechanizmy pozwalające zapobiegać czy zmniejszać negatywne skutki oddziaływania wolnych rodników. Działanie systemu ochronnego w komórkach polega na niedopuszczeniu do powstawania i oddziaływania reaktywnych rodników ze składnikami komórki lub na przerywaniu łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych [23,84].

W skład wewnątrzkomórkowych systemów antyoksydacyjnych wchodzi antyoksydanty drobnocząsteczkowe (witamina C, E, koenzym Q, karoteny, glutation, pierwiastki śladowe) oraz antyoksydanty wielkocząsteczkowe (enzymatyczne), do których należą: SOD, katalaza (catalase, CAT), peroksydaza glutationu (glutathione peroxidase, GPx) reduktaza glutationu (glutathione reductase, GRd) [28,37,60].

Antyoksydanty drobnocząsteczkowe odpowiadają za nieswoiste reakcje prowadzące do inaktywacji reaktywnych rodników. W większości są to związki pochodzenia egzogenne, dostarczane do organizmu z dietą. Umiejscowiają się w cytoplazmie lub w błonie komórkowej, w zależności od właściwości fizycznych.

Witamina E (alfa-tokoferol), jako związek hydrofobowy jest umiejscowiona w błonie komórkowej. Wykazuje właściwości antyutleniające głównie w stosunku do lipidów, gdyż przerywa lawinowy łańcuch reakcji peroksydacji

oddając wodór rodnikowi nadtlenkowemu kwasu tłuszczowego (LOO•) i przekształcając się w rodnik tokoferolowy (TO•) nieprolongujący łańcucha wolnorodnikowej peroksydacji lipidów [34].

Witamina C (kwas askorbinowy) umiejscowiona jest natomiast w cytoplazmie, gdzie utrzymuje prawidłowy stan redox komórki przyczyniając się do redukcji anionorodnika ponadtlenkowego i rodnika wodorotlenowego, a także w regeneracji aktywnej postaci alfa-tokoferolu z rodnika tokoferolowego. Witamina C jest uważana za najistotniejszy przeciwutleniacz płynów pozakomórkowych oraz ważny antyoksydant wewnątrzkomórkowy [8].

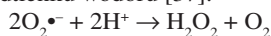
Jednym z najistotniejszych drobnocząsteczkowych przeciwutleniaczy jest glutation, endogenny tripeptyd (γ -Glu-Cys-Gly), który występuje w cytoplazmie, mitochondriach oraz jądrze komórkowym [89]. Glutation pełni funkcję kofaktora antyoksydantów enzymatycznych, takich jak transferaza glutationowa (glutathione S-transferase – GST) czy GPx. Jest też rezerwuarem niebiałkowych grup tiolowych (-SH) w komórkach. Grupa tiolowa glutationu oddziałuje z grupami tiolowymi białek, dzięki czemu dochodzi do ich stabilizacji i utrzymywania ich prawidłowej struktury. Glutation (GSH) łatwo ulega odwracalnym przekształceniom z postaci utlenionej do zredukowanej. Jest to związane z powstawaniem dimerów glutationu (GSSG) i z oddaniem elektronów. Wolne rodniki, przyłączając elektron pochodzący z procesu utleniania GSH, ulegają inaktywacji. Ten mechanizm jest odpowiedzialny za dezaktywację rodników hydroksylowych i tlenu singletowego, a także za redukcję utlenionych grup tiolowych białek. Zredukowana postać GSH jest odtwarzana dzięki aktywności katalitycznej reduktazy glutationowej, w obecności dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH), który ulega utlenieniu i przemianie w NADP⁺.

Kolejny wewnątrzkomórkowy przeciwutleniacz: koenzym Q₁₀ jest elementem łańcucha oddechowego, gdzie pełni jednocześnie funkcje akceptora i donora elektronów – przekazuje elektrony z kompleksów I i II do kompleksu III. Bezpośrednio wpływa na stabilizację błon komórkowych w wyniku interakcji z białkami błonowymi [28,37,60,79].

Pierwiastki śladowe (cynk, selen) są kofaktorami enzymów biorących udział w obronie przeciwoksydacyjnej (np. cynkowo-miedziowej dysmutazy ponadtlenkowej, CuZnSOD).

Nieenzymatyczne antyoksydanty, chroniące komórki przed skutkami stresu oksydacyjnego, są stosunkowo mało skuteczne w ochronie komórek przed oddziaływaniem wolnych rodników [19,20]. Większą skuteczność i swoistość wykazują antyoksydanty enzymatyczne, które katalizują istotne z punktu widzenia eliminacji wolnych rodników reakcje:

- Dysmutaza ponadtlenkowa katalizuje reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego do tlenu cząsteczkowego i nadtlenu wodoru [37]:



- Katalaza jest bifunkcyjnym enzymem, mogącym pełnić rolę katalazy lub peroksydazy. W środowisku o wysokim stężeniu nadtlenu wodoru przeważa aktywność

katalazowa polegająca na katalizowaniu reakcji dysmutacji nadtlenu wodoru do tlenu cząsteczkowego i wody:

$$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$$

Katalaza nie bierze więc bezpośrednio udziału w eliminacji wolnych rodników, jednak dezaktywując nadtlenek wodoru nie dopuszcza do jego przemiany w rodnik hydroksylowy w reakcji Fentona.

- Peroksydaza glutationu to enzym, który katalizuje reakcje między nadtlaniem wodoru i wodoronadtlenkami a zredukowanym glutationem (GSH), których produktami są: utleniony glutation i woda:
- $$\text{ROOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{ROH} + \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O}$$

Umożliwia to redukcję wodoronadtlenków (m.in. nadtlenu wodoru) w komórce [37,60].

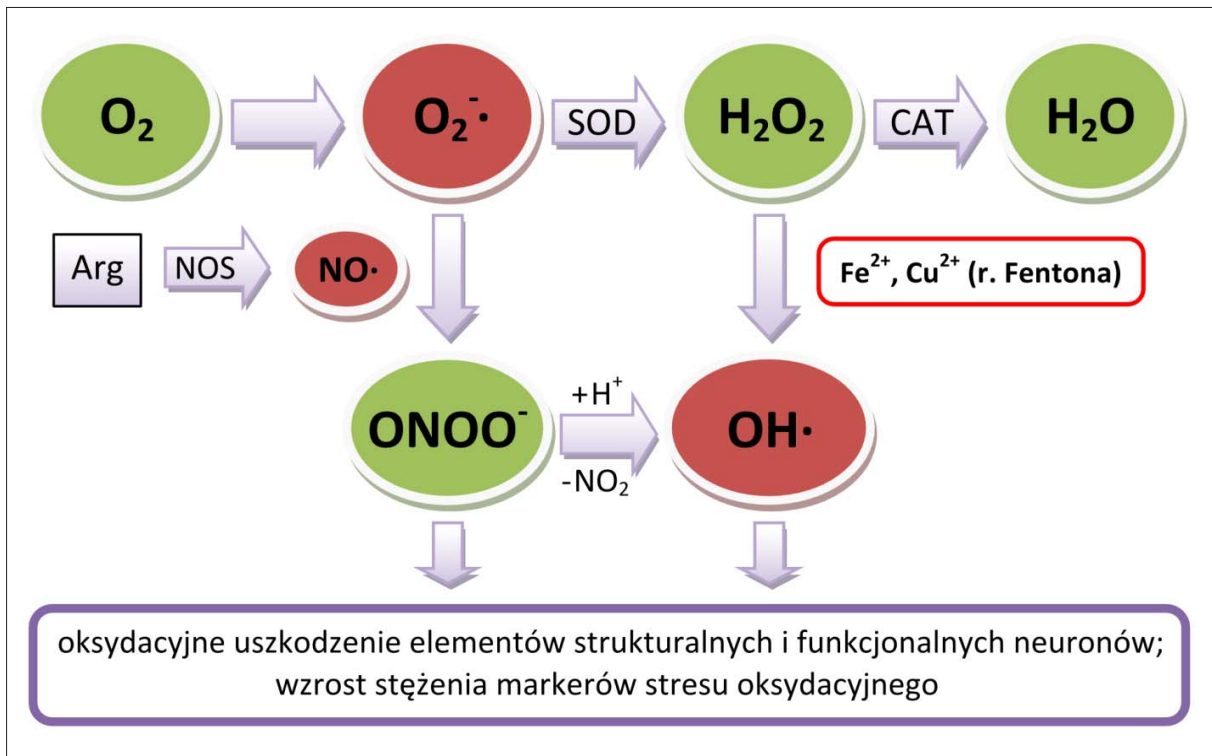
Schemat przekształceń wolnorodnikowych w komórce przedstawia ryc. 1.

W prawidłowej komórce występuje równowaga między wytwarzaniem ROS a ich neutralizacją z udziałem komórkowych systemów antyoksydacyjnych. Zaburzenie tej równowagi może prowadzić do rozwoju stresu oksydacyjnego, czyli stanu, w którym potencjał utleniający wzrasta do poziomu zagrażającego stabilności struktur komórkowych [33,73]. Przyczyną wystąpienia stresu oksydacyjnego mogą być: wzrost szybkości wytwarzania ROS, niedobory niskocząsteczkowych antyoksydantów, dezaktywacja enzymów o działaniu antyoksydacyjnym. Nasilony i/lub długotrwale utrzymujący się stan stresu oksydacyjnego może być przyczyną poważnych uszkodzeń komórki, a nawet prowadzić do jej śmierci [10].

STRES OKSYDACYJNY W CHOROBYCH NEURODEGENERACYJNYCH

Chociaż choroby neurodegeneracyjne charakteryzują się różnym obrazem klinicznym, uważa się, że za ich występowanie odpowiadają wspólne mechanizmy leżące u podłoża degeneracji neuronów. Do mechanizmów tych zalicza się m.in.: agregację białek, zmiany w metabolizmie żelaza, proces zapalny, a także dysfunkcje mitochondrialne i stres oksydacyjny. Zjawiska te były dotąd najczęściej badane w sposób niezależny od siebie. Prawdopodobnym jest jednak, że wszystkie te procesy tworzą sieć/cykl następujących po sobie lub współzależnych zdarzeń [85]. W pracy skupimy się na stresie oksydacyjnym, który jest wymieniany często jako pierwotna przyczyna dalszych patologicznych zjawisk występujących w komórce, prowadzących do wstąpienia w cykl przemian prowadzących do jej śmierci.

Znaczący udział stresu oksydacyjnego w patogenezie neurodegeneracji wynikać może ze szczególnych właściwości komórek nerwowych. Neurony są w większym stopniu niż inne komórki narażone na uszkodzenie wolnorodnikowe, ponieważ tkanka mózgowa zużywa więcej tlenu (w przeliczeniu na jednostkę masy) w porównaniu do innych narządów w procesie uzyskiwania energii [37]. W konsekwencji w mózgu jest wytwarzanych proporcjonalnie więcej wolnych rodników. Jednocześnie wykazano, że mózg charakteryzuje się mniejszą aktywnością enzymów antyoksydacyjnych (CAT, GPx) niż inne tkanki [36]. Błona komórkowa neuronów zawiera więcej wielonienasyconych kwasów

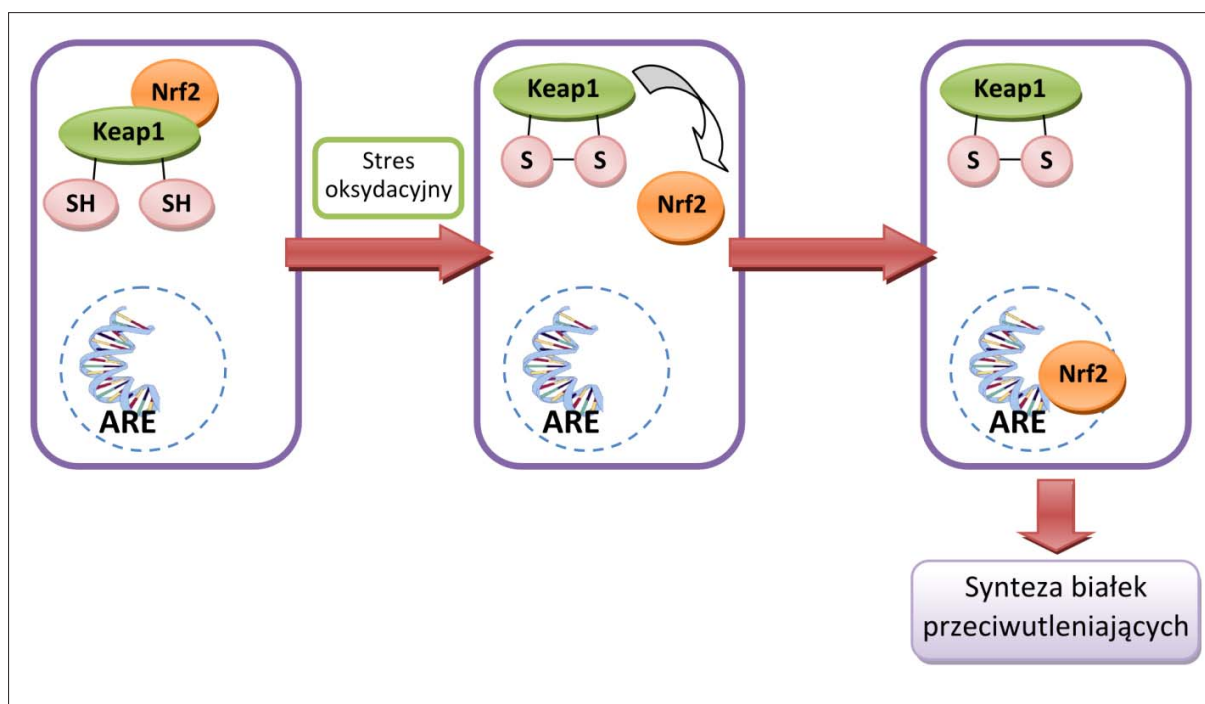


Ryc. 1. Schemat przekształceń wolnorodnikowych w komórce; Arg – arginina, CAT – katalaza, NO – tlenek azotu, NOS – syntaza tlenku azotu, O_2^- – anion ponadtlenkowy, $ONOO^-$ – anion nadazotowy, OH – rodnik hydroksylowy, SOD – dysmutaza ponadtlenkowa. Na czerwono zaznaczono cząstki będące wolnymi rodnikami. Niepełna redukcja tlenu cząsteczkowego w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym powoduje wytworzenie anionu ponadtlenkowego, który z kolei może się połączyć z NO i utworzyć anion nadazotowy albo ulec przekształceniu do nadtlenu wodoru pod wpływem SOD. Nadtlenek wodoru ulega rozkładowi do wody i wolnego tlenu pod wpływem CAT, albo w obecności jonów metali przejściowych (np. Cu^{2+} , Fe^{2+}) przekształca się w rodnik hydroksylowy, odpowiadający za destrukcję elementów strukturalnych i funkcjonalnych komórki. Pod wpływem anionu nadazotowego mogą się tworzyć związki nitrowe (peroksyinitraty białek, tłuszczów, kwasów nukleinowych) lub może się przekształcić w kwaśnym środowisku w niebezpieczny rodnik hydroksylowy

tłuszczowych (WNKT) niż błona innych komórek (mielina składa się w 76% z lipidów, podczas gdy zawartość lipidów w błonach komórkowych innych komórek wynosi około 50%). Kwasy te są bardzo podatne na atak wolnych rodników ze względu na występowanie w ich strukturze wiązań podwójnych. Duża liczba mitochondriów położonych blisko błon komórkowych również ułatwia oksydacyjne uszkodzenie neuronów [29]. Dodatkowo zarówno kształt neuronów, związany z niekorzystnym stosunkiem powierzchni do objętości, jak i sąsiedztwo komórek mikrogleju, które po pobudzeniu mogą wytwarzać duże ilości anionorodnika ponadtlenkowego sprzyjają wolnorodnikowemu uszkodzeniu błon tych komórek. Ponadto w mózgu występują warunki sprzyjające występowaniu opisanej wyżej reakcji Fentona prowadzącej do powstawania rodnika hydroksylowego. Dzieje się tak dlatego, że tkanka mózgowa (szczególnie jądra podstawy i układ pozapiramidowy) ma tendencję do magazynowania nadmiaru metali przejściowych (głównie żelaza i miedzi), będących katalizatorami tej reakcji. Nagromadzenie w mózgu dużych ilości jonów żelaza i miedzi sprzyja też autooksydacji niektórych neuroprzekazników, np. dopaminy, serotoniny czy noradrenaliny (jony te są katalizatorami reakcji), skutkującej upośledzeniem ich funkcji [91].

W miarę poznawania procesów biochemicznych związanych ze stresem oksydacyjnym opracowano metody ilościowej oceny oksydacyjnego uszkodzenia komórek [26].

Dzięki badaniom przeprowadzonym z zastosowaniem tych metod potwierdzono udział stresu oksydacyjnego w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych. Wykazano np. zwiększone stężenia markerów peroksydacji lipidów (4-hydroksynonenalu i dialdehydu malonowego) w korze mózgowej i hipokampie chorych na chorobę Alzheimera, w istocie czarnej u chorych na chorobę Parkinsona oraz w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych na stwardnienie zanikowe boczne (amyotrophic lateral sclerosis – ALS) [6,19,39,67]. Podwyższone stężenie nitrotyrozyny (marker oksydacyjnej modyfikacji białek) obserwowano w hipokampie i korze nowej chorych na AD, w ciałkach Lewy'ego u chorych na PD oraz w motoneuronach u chorych na ALS [4,32,80]. Co ciekawe, nitrotyrozynacja białek dotyczyła w znacznym stopniu białek o udokumentowanym związku z danymi chorobami, czyli białka tau w AD oraz alfa-synukleiny gromadzonej w ciałkach Lewy'ego w PD [30,31,41]. Stwierdzono ponadto obniżoną aktywność enzymów biorących udział w eliminacji wolnych rodników: SOD, CAT, GPx oraz GRd w dotkniętych chorobą regionach mózgu u pacjentów cierpiących na AD [64,92], a także obniżone stężenie zredukowanego glutationu z jednoczesnym zwiększonym stężeniem jego postaci utlenionej w istocie czarnej mózgu u chorych na PD [45,72,81]. U 20% chorych z ALS, u których choroba występuje rodzinnie, zidentyfikowano mutacje w genie kodującym SOD [16]. Obserwacje te wskazują na istnienie związku między obniżoną aktywnością naturalnych systemów obrony



Ryc. 2. Schemat działania czynnika transkrypcyjnego Nrf2; ARE – region odpowiedzi przeciwoksydacyjnej, Keap1 – białko wiążące czynnik Nrf2 w cytoplazmie, Nrf2 – czynnik transkrypcyjny Nrf2, SH – grupy tiolowe białka Keap1. W warunkach fizjologicznych czynnik Nrf2 jest umiejscowiony w cytoplazmie w połączeniu kompleksowym z białkiem Keap1. W warunkach stresu oksydacyjnego reszty tiolowe białka Keap1 ulegają utlenieniu, tworząc mostki siarczkowe, co prowadzi do zmiany struktury białka i uwolnienia z kompleksu czynnika Nrf2. Wolny czynnik Nrf2 ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie łącząc się z regionami ARE, pobudza syntezę enzymów antyoksydacyjnych. Zaburzenie funkcjonowania szlaku związanego z Nrf2 może mieć konsekwencje w postaci braku skutecznej obrony przeciwoksydacyjnej na poziomie komórkowym

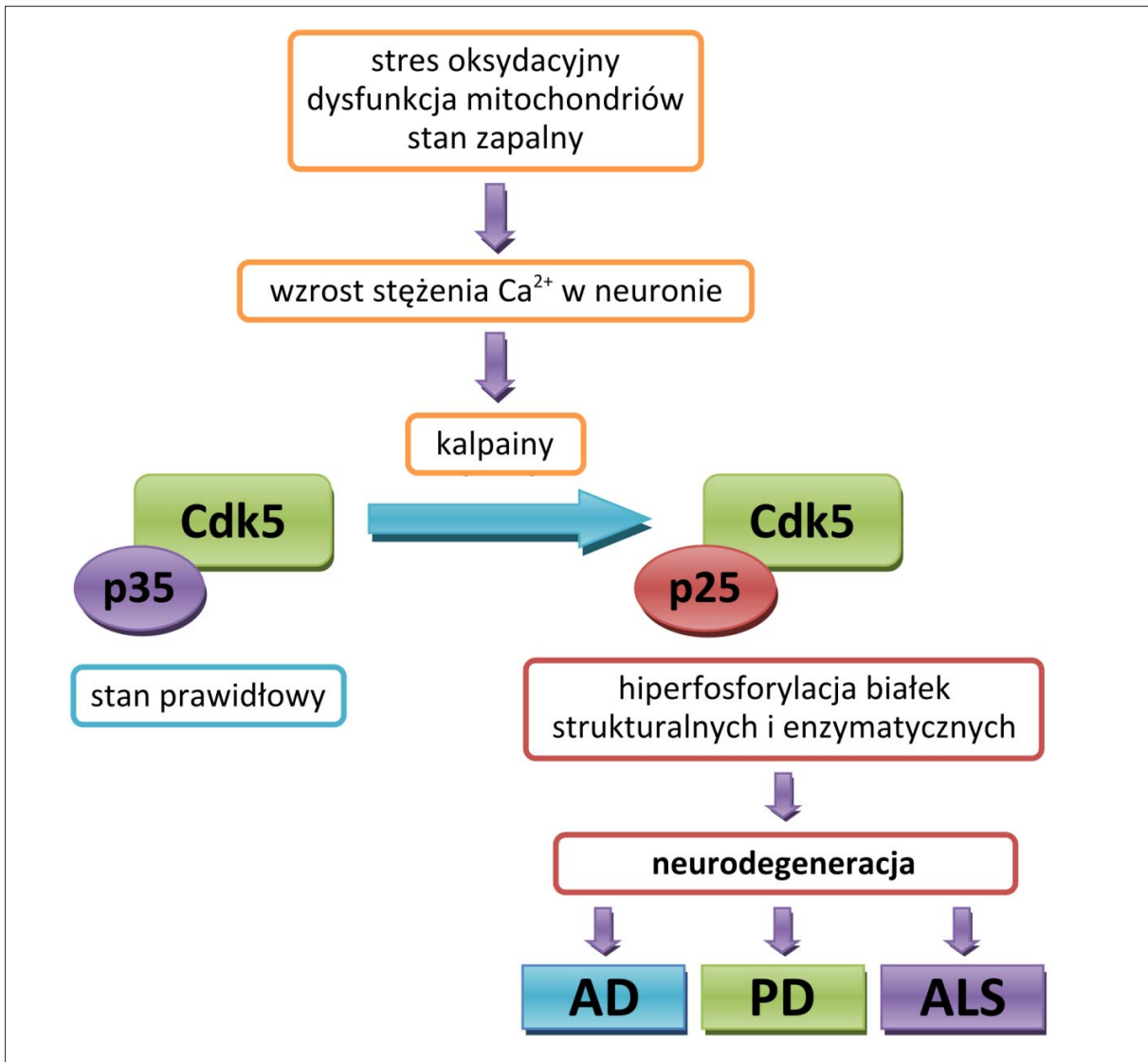
przeciwoksydacyjnej i oksydacyjnym uszkodzeniem lipidów czy białek a neurodegeneracją.

Wydaje się, że jednym z istotnych czynników odpowiedzialnych za neurodegenerację spowodowaną oddziaływaniem stresu oksydacyjnego mogą być zaburzenia regulacji ekspresji czy zaburzenia fosforylacji białek uczestniczących w ochronie antyoksydacyjnej.

Czynnikiem, który odgrywa główną rolę w regulacji ekspresji wielu genów kodujących białka istotne z punktu widzenia prawidłowego funkcjonowania mitochondriów oraz obrony przeciwoksydacyjnej, jest czynnik transkrypcyjny Nrf2 (nuclear arythroid 2-related factor) [53]. Czynnikiem ten jest zaliczany do rodziny białek „cap’n’collar” (CNC) zawierających w swojej strukturze motyw zamka leucynowego umożliwiając wiązanie do jądrowego DNA. W warunkach fizjologicznych Nrf2 znajduje się głównie w cytosolu w postaci nieaktywnego kompleksu z białkiem Keap1 (Kleeh-like ECH associating protein 1). Białko to ma na swojej powierzchni liczne reszty cysteinowe, które mogą ulec utlenieniu (np. w wyniku zwiększenia liczby wolnych rodników w komórce). Natępnym utlenienia reszt cysteinowych jest zmiana struktury białka Keap1 i uwolnienie czynnika Nrf2 z kompleksowego połączenia. Wtedy czynnik Nrf2 ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie może się połączyć z regionami odpowiedzi antyoksydacyjnej (antioxidant responsive element – ARE) o sekwencji 5’-TGAC_{nm}-GCA-3’ w regionach promotorowych genów kodujących białka antyoksydacyjne [21,40,44,51,62]. Białko Keap1 pełni zatem rolę „czujnika” stresu oksydacyjnego i jest częścią pośrednio odpowiedzialną za regulację ekspresji genów zależnych od Nrf2 [44,46,51] (ryc. 2).

Udowodniono, że u osób zdrowych, a także u chorych na PD, czynnik Nrf2 umiejscawia się głównie w jądrze komórkowym neuronów [71]. Natomiast u chorych z AD czynnik Nrf2 umiejscawia się głównie w cytoplazmie. Być może ma to związek z nieprawidłowościami w budowie białka Keap1 lub samego czynnika Nrf2. Hipoteza ta wymaga potwierdzenia w dalszych badaniach. Można jednak przypuszczać, że nieprawidłowa lokalizacja Nrf2 wiąże się z upośledzeniem prawidłowego funkcjonowania systemów antyoksydacyjnych w neuronach, co potencjalnie może prowadzić do neurodegeneracji i wystąpienia objawów AD.

Odkryto także związek między występowaniem chorób neurodegeneracyjnych a nieprawidłową fosforylacją białek związaną z zależną od cyklin kinazą 5 (cyclin dependent kinase 5 – Cdk5). W warunkach fizjologicznych aktywna postać kinazy Cdk5 jest związana z białkami regulatorowymi p35 i/lub p39 [1,20,52]. W sytuacji uszkodzenia błony komórkowej i zwiększonego napływu jonów wapnia do komórki może wzrosnąć aktywność zależnych od jonów wapnia proteaz z rodziny kalpain. Proteazy te mogą prowadzić do degradacji białek p35/p39 z wytworzeniem postaci p25. Postać p25 w połączeniu z kinazą Cdk5 tworzy kompleks, który jest bardziej stabilny, a jednocześnie wykazuje nadmierną aktywność fosforylującą [15,20,52,66,87]. Nadmiar tego kompleksu w komórce może spowodować hiperfosforylację białek, które w warunkach fizjologicznych odpowiadają za dezaktywację wolnych rodników, np. peroksyredoksyny I i II [12,47,88]. Hiperfosforylacja prowadzi do utraty funkcji tych białek, czego następstwem jest wzrost wewnątrzkomórkowej puli wolnych rodników, czyli stres oksydacyjny [83]. Mechanizm ten przedstawiono na ryc.



Ryc. 3. Schemat przemian związanych ze szlakiem kinazy Cdk5, prowadzących do neurodegeneracji; AD – choroba Alzheimer, ALS – stwardnienie zanikowe boczne, Cdk5 – zależna od cyklin kinaza 5, p35 – białko p35, p25 – białko p25, PD – choroba Parkinsona. Prawidłowa fosforylacja białek z udziałem Cdk5 zachodzi, gdy kinaza Cdk5 związana jest z białkiem regulatorowym p35. Pod wpływem bodźców patologicznych, takich jak: stres oksydacyjny, dysfunkcja mitochondriów czy stan zapalny, wzrasta stężenie jonów wapnia wewnątrz neuronów. Pod wpływem jonów wapnia aktywacji ulegają białka proteolityczne z rodziny kalpain, które przekształcają białko p35 w p25. Kompleks kinazy Cdk5 z białkiem p25 jest bardziej stabilny niż kompleks z białkiem p35, ale wykazuje nadmierną aktywność fosforylującą. Wynikiem tego jest hiperfosforylacja białek strukturalnych i enzymatycznych powiązanych z kinazą Cdk5. Efektem hiperfosforylacji tych białek jest utrata ich prawidłowych funkcji, co prowadzić może do degeneracji neuronów i wystąpienia objawów AD, PD czy ALS, w zależności od umiejscowienia zmian w mózgu

3. Na prawdopodobny udział szlaku związanego z kinazą Cdk5 w patomechanizmie AD wskazują również wyniki badań eksperymentalnych, w których odnotowano hiperfosforylację białka tau oraz domeny cytoplazmatycznej białka prekursorowego amyloidu przy jednoczesnym wzroście aktywności Cdk5 oraz zwiększonym stężeniu białka p25 [42,68,93]. Prawdopodobnie to odkrycie doprowadzi w przyszłości do odnalezienia skutecznej terapii choroby Alzheimer, opartej na ingerencji w szlak przemian związanych z kinazą Cdk5.

IMPLIKACJE TERAPEUTYCZNE

Przyjęcie koncepcji, iż stres oksydacyjny jest pierwotną przyczyną chorób neurodegeneracyjnych, stało się podstawą

do prób opracowania nowych strategii zapobiegania i terapii tych chorób. Prowadzonych jest wiele badań, których celem jest określenie efektywności oraz bezpieczeństwa różnych substancji potencjalnie ograniczających skutki neurotoksycznego oddziaływania wolnych rodników. Jednak nie udało się jeszcze odkryć substancji lub ich połączeń, które dostatecznie skutecznie ograniczyłyby efekty stresu oksydacyjnego i zahamowałyby w ten sposób postęp neurodegeneracji. Powszechnie znane antyoksydanty, takie jak witamina C, kwasy β -hydroksylowe, flawonoidy, butylowany hydroksytoluen, kwas nordihydrogwaretowy nie okazały się skuteczne i/lub bezpieczne w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych. Substancje te mają hydrofobowy charakter, dlatego nie mogą być aktywne w odpowiednich miejscach łańcucha oddechowego [54], a więc

tam, gdzie wytwarzanych jest najwięcej wolnych rodników. Dlatego obecnie poszukiwania toczą się w kierunku znalezienia innych cząsteczek, które mogłyby być bardziej swoiste względem procesów wewnątrzkomórkowych generujących wolne rodniki tlenowe.

CHOROBA ALZHEIMERA

Wyniki badań eksperymentalnych prowadzonych *in vitro* sugerowały, że witamina E może zmniejszać toksyczność amyloidu w stosunku do neuronów. W badaniu klinicznym (z zastosowaniem placebo) nie potwierdzono skuteczności alfa-tokoferolu w profilaktyce AD. Suplementacja alfa-tokoferolem w dawce 2000 IU. nie powodowała skrócenia czasu do wystąpienia objawów AD wśród osób cierpiących na łagodne zaburzenia funkcji poznawczych [55].

W innym badaniu klinicznym z zastosowaniem placebo, obejmującym 155 chorych z AD, stosowanie witaminy E w dawce 1000 I.U. dwa razy na dobę powodowało zmniejszenie ryzyka wystąpienia jednego z tzw. „punktów końcowych”, do których zaliczono: śmierć, konieczność umieszczenia w ośrodku opiekuńczym, utratę możliwości wykonywania 2 z 3 codziennych podstawowych czynności życiowych, ciężką demencję (oceniającą za pomocą skali globalnej oceny demencji, Global Dementia Rating). Jednakże terapia taka zwiększała ryzyko wystąpienia napadów drgawkowych [74]. Wyniki tych badań wskazują, że stosowanie witaminy E raczej nie znajdzie szerszego zastosowania w prewencji czy terapii AD [43].

Obiecujące wyniki uzyskano natomiast w badaniach dotyczących użycia błękitu metylenowego (methylene blue – MB) w leczeniu AD. MB jest stosowany w medycynie od ponad 100 lat, m.in. w leczeniu malarii czy wstrząsu septycznego [49,86]. Korzystny wpływ MB na procesy pamięciowe znany jest już od ponad 30 lat [86]. Wyniki pierwszych prób zastosowania tego leku w AD opublikowano w 2008 r. W randomizowanym badaniu klinicznym z podwójnie ślepą próbą potwierdzono, że lek jest dobrze tolerowany oraz ma korzystny profil bezpieczeństwa. Wykazano także, że zastosowanie MB w dawce 60 mg stosowanej 3 razy na dobę przez okres 1 roku pozwalało na zahamowanie postępu choroby w przypadkach jej łagodnej oraz umiarkowanej postaci [90]. Antyoksydacyjny potencjał MB w AD może wynikać ze zdolności tego związku do hamowania aktywności NOS, co powoduje zmniejszenie ilości wytwarzanego NO, a w konsekwencji zmniejszenie liczby wolnych rodników [5]. MB wpływa też na funkcje mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Pełniąc funkcje konkurującego z tlenem alternatywnego akceptora elektronów przyczynia się do zmniejszenia wytwarzania rodnika ponadtlenkowego [63]. MB przyczynia się też do zwiększenia aktywności oksydazy cytochromowej c, przez co zwiększa wydajność metabolizmu tlenowego w mózgu (wzrost zużycia tlenu o 70%) [5,86,90].

Obiecujące wyniki uzyskano również w badaniach doświadczalnych dotyczących AD, przeprowadzonych z zastosowaniem metod inżynierii genetycznej. Udowodniono, że wyłączenie ekspresji genu kodującego kinazę Cdk5 powoduje zmniejszenie fosforylacji białka tau oraz zmniejszenie liczby splątków neurofilamentalnych w hipokampie myszy [69]. Można więc przypuszczać, że oddziaływanie

na szlak przemian związanych z aktywnością kinazy Cdk5, będzie mogło znaleźć zastosowanie w zapobieganiu i/lub leczeniu AD.

CHOROBA PARKINSONA

Najwięcej badań nad skutecznością terapii antyoksydacyjnych w PD dotyczyło zastosowania koenzymu Q₁₀ oraz glutationu. Koenzym Q₁₀ pełni funkcję akceptora elektronów w łańcuchu oddechowym (w kompleksie I i II). Jednocześnie, będąc cząsteczką łatwo oddającą elektrony (w łańcuchu oddechowym przekazuje je do kompleksu III), pełni funkcje przeciwutleniające [27]. W mitochondriach osób z PD odnotowano istotnie mniejsze stężenia koenzymu Q₁₀ [77], zmniejszoną proporcję utlenionej postaci CoQ₁₀ w stosunku do postaci zredukowanej [82], a także obniżoną aktywność kompleksów I i II łańcucha oddechowego [35,65] w porównaniu z grupą kontrolną. Eksperymentalne zablokowanie kompleksu I łańcucha oddechowego u zwierząt doświadczalnych spowodowało wystąpienie objawów neurologicznych typowych dla PD [50]. Wyniki tych badań doprowadziły do podjęcia badań klinicznych dotyczących skuteczności terapii koenzymem Q w tej chorobie.

Udowodniono, że terapia dużymi dawkami koenzymu Q₁₀ (1200 mg na dobę) przez 16 miesięcy prowadziła do wzrostu stężenia koenzymu Q₁₀ w surowicy krwi i wzrostu aktywności mitochondrialnego łańcucha oddechowego w płytkach krwi. Jednocześnie odnotowano poprawę stanu klinicznego chorych ocenianego według skali UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale). W badaniu tym, jednocześnie z koenzymem Q, chorym oraz osobom z grupy placebo podawano witaminę E w dawce 1200 I.U. na dobę. Ponieważ w grupie otrzymującej placebo (nieotrzymującej koenzymu Q) nie odnotowano istotnej zmiany stanu klinicznego, można wysnuć wniosek, że stosowanie witaminy E w monoterapii nie wpływa na przebieg PD. Nie obserwowano różnic w występowaniu działań niepożądanych między grupami, a koenzym Q₁₀ był dobrze tolerowany przez chorych. Można zatem przypuszczać, iż stosowanie koenzymu Q₁₀ może być skuteczną terapią u osób cierpiących na PD [78].

Badania dotyczące przydatności terapeutycznej koenzymu Q₁₀ są trudne, głównie z powodu hydrofobowego charakteru tego związku. Właściwość ta jest przyczyną słabego przenikania CoQ do komórek, zarówno w hodowlach jak też w warunkach *in vivo*. Z tego powodu w badaniach klinicznych CoQ musi być podawany w bardzo dużych dawkach. Żeby pokonać tę trudność, opracowano rozpuszczalne w wodzie połączenie CoQ₁₀ z alfa-tokoferolem i glikolem polietylenowym (WS-CoQ₁₀ – water soluble CoQ₁₀). Kompleks taki umożliwił zmniejszenie nasilenia stresu oksydacyjnego wywołanego bezpośrednim działaniem nadtlenu wodoru na ludzkie neurony (w hodowli komórkowej). Obserwowano też zmniejszenie odsetka komórek wchodzących w apoptozę [59]. W badaniu eksperymentalnym *in vivo* zastosowanie WS-CoQ₁₀ powodowało zmniejszenie stresu oksydacyjnego mierzonego stężeniem glutationu w tkance mózgowej [24].

W badaniu pilotażowym dotyczącym skuteczności zastosowania innego antyoksydantu: glutationu u chorych z PD wykazano, że dożylna dawka glutationu 600 mg podawana 2 razy na dobę przez 30 dni pozwoliły na uzyskanie

znaczącej poprawy stanu klinicznego, która utrzymywała się przez 2–4 miesiące [75].

Przeprowadzono też inne badanie pilotażowe (randomizowane z podwójnie ślepą próbą), którego celem była wstępna ocena skuteczności i bezpieczeństwa dożylnego stosowania glutationu u chorych na PD w porównaniu z placebo. Obserwacji poddano 21 uczestników, u których stosowana dotychczas terapia nie dawała dostatecznie zadowalających wyników w odniesieniu do zaburzeń motorycznych. Glutation w dawce 1400 mg podawano 3 razy w tygodniu przez 4 tygodnie. Badanie wykazało dobrą tolerancję glutationu oraz korzystny profil bezpieczeństwa. Zaobserwowano niewielką poprawę stanu neurologicznego (ocenianego w skali UPDRS) w grupie otrzymującej glutation w okresie pierwszych 4 tygodni (faza terapeutyczna). Jednak zaprzestanie podawania leku prowadziło do pogorszenia stanu neurologicznego, podczas gdy w grupie placebo obserwowano w tym samym czasie poprawę [38]. Badanie było przeprowadzone na bardzo małej próbie, co nie pozwala wyciągać ostatecznych wniosków co do skuteczności terapii. Obydwa badania były badaniami wstępnymi, a grupy chorych różniły się kryteriami włączenia i wyłączenia. Dlatego potwierdzenie

skuteczności stosowania glutationu w leczeniu PD wymaga dalszych badań.

Wyniki badań nad opisanym wyżej czynnikiem transkrypcyjnym Nrf2 dają nadzieję na opracowanie nowych metod terapeutycznych chorób neurodegeneracyjnych. Dotychczas udało się wykazać pobudzający wpływ różnych czynników na aktywność Nrf2 – być może któryś z tych czynników znajdzie zastosowanie w leczeniu tych chorób [7,48].

PODSUMOWANIE

Istnieje coraz więcej danych, które sugerują, że uszkodzenie wolnorodnikowe może być pierwotnym czynnikiem warunkującym degenerację neuronów i odpowiedzialnym za wystąpienie chorób neurodegeneracyjnych. Badania dotyczące markerów uszkodzenia oksydacyjnego, czy też markerów wskazujących na potencjał antyoksydacyjny, stanowią cenne źródło informacji o rozwoju i postępie tych chorób. Wyniki dotychczas prowadzonych badań nie tylko potwierdzają znaczenie stresu oksydacyjnego w patogenezie neurodegeneracji, ale też wskazują nowe cele dla potencjalnie skutecznych metod leczenia.

PIŚMIENICTWO

- [1] Amin M.D., Albers W., Pant H.C.: Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activation requires interaction with three domains of p35. *J. Neurosci. Res.*, 2002; 67: 354–362
- [2] Andersen J.K.: Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Med.*, 2004; 10(Suppl.): S18–S25
- [3] Andreoli T.E.: Free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.*, 2000; 108: 650–651
- [4] Aoyama K.: Nitration of manganese superoxide dismutase in cerebrospinal fluids is a marker for peroxynitrite-mediated oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol.*, 2000; 47: 524–527
- [5] Atamna H., Nguyen A., Schultz C., Boyle K., Newberry J., Kato H., Ames B.N.: Methylene blue delays cellular senescence and enhances key mitochondrial biochemical pathways. *FASEB J.*, 2008; 22: 703–712
- [6] Beal M.F.: Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.*, 1997; 42: 644–654
- [7] Beal M.F.: Therapeutic approaches to mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.*, 2009; 15(Suppl.3): S189–S194
- [8] Biesalski H.K., Tinz J.: Nutritargeting. *Adv. Food Nutr. Res.*, 2008; 54: 179–217
- [9] Brookes P.S.: Mitochondrial H(+) leak and ROS generation: an odd couple. *Free Radic. Biol. Med.*, 2005; 38: 12–23
- [10] Brown G.C., Borutaite V.: Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life*, 2001; 52: 189–195
- [11] Cadenas E.: Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol. Aspects Med.*, 2004; 25: 17–26
- [12] Chang T.S., Jeong W., Choi S.Y., Yu S., Kang S.W., Rhee S.G.: Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 25370–25376
- [13] Chong Z.Z., Li F., Maiese K.: Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Prog. Neurobiol.*, 2005; 75: 207–246
- [14] Conner E.M., Grisham M.B.: Inflammation, free radicals and antioxidants. *Nutrition*, 1996; 12: 274–277
- [15] Cruz J.C., Tsai L.H.: Cdk5 deregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Mol. Med.*, 2004; 10: 452–458
- [16] Cudkovic M.E., McKenna-Yasek D., Sapp P.E., Chin W., Geller B., Hayden D.L., Schoenfeld D.A., Hosler B.A., Horvitz H.R., Brown R.H.: Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.*, 1997; 41: 210–221
- [17] Das K.C., White C.W.: Redox system of the cell: possible links and implications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 9617–9618
- [18] Davies M.J.: Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 305: 761–770
- [19] Dexter D.T.: Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J. Neurochem.*, 1989; 52: 381–389
- [20] Dhavan R., Tsai L.H.: A decade of CDK5. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2001; 2: 749–759
- [21] Dinkova-Kostova A.T., Talalay P., Sharkey J., Zhang Y., Holtzclaw W.D., Wang X.J., David E., Schiavoni K.H., Finlayson S., Mierke D.F., Honda T.: An exceptionally potent inducer of cytoprotective enzymes: elucidation of the structural features that determine inducer potency and reactivity with Keap1. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 33747–33755
- [22] Facchetti K., Fochesato L.A., Ray S.D., Stohs S.J., Pandey S.: Oxidative toxicity in neurodegenerative diseases: role of mitochondrial dysfunction and therapeutic strategies. *J. Toxicol.*, 2011; 2011: ID 683728
- [23] Fang Y.Z., Yang S., Wu G.: Free radical, antioxidants and nutrition. *Nutrition*, 2002; 18: 872–879
- [24] Fetoni A.R., Piacetini R., Fiorita A., Paludetti G., Troiani D.: Water-soluble coenzyme Q₁₀ formulation (Q-ter) promotes outer hair cell survival in a guinea pig model of noise induced hearing loss (NIHL). *Brain Res.*, 2009; 1257: 108–116
- [25] Fridovich I.: Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 18515–18517
- [26] Galasko D., Montine T.J.: Biomarkers of oxidative damage and inflammation in Alzheimer's disease. *Biomark. Med.*, 2010; 1: 27–36
- [27] Galpern W.R., Cudkovic M.E.: Coenzyme Q treatment of neurodegenerative diseases of aging. *Mitochondrion*, 2007; 7(Suppl.): S146–S153
- [28] Galecka E., Mrowicka M., Malinowska K., Galecki P.: Wybrane substancje nieenzymatyczne uczestniczące w procesie obrony przed nadmiernym wytwarzaniem wolnych rodników. *Pol. Merkuriusz Lek.*, 2008; 25: 269–272
- [29] Galecki P., Florkowski A., Zboralski K.: Stres oksydacyjny a schizofrenia. *Valetudinaria*, 2005; 10: 48–51
- [30] Giasson B.I., Duda J.E., Murray I.V., Chen Q., Souza J.M., Hurtig H.I., Ischiropoulos H., Trojanowski J.Q., Lee V.M.: Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science*, 2000; 290: 985–989
- [31] Giasson B.I., Jakes R., Goedert R., Duda J.E., Leight S., Trojanowski J.Q., Lee V.M.: A panel of epitope-specific antibodies detects protein domains distributed throughout human alpha-synuclein in Lewy bodies of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Res.*, 2000; 59: 528–533

- [32] Good P.F., Hsu A., Werner P., Perl D.P., Olanow C.W.: Protein nitration in Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1998; 58: 338–342
- [33] Gutowicz M.: Wpływ reaktywnych form tlenu na ośrodkowy układ nerwowy. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2011; 65: 104–113
- [34] Guz J., Dziaman T., Szpila A.: Czy witaminy antyoksydacyjne mają wpływ na proces kancerogenezy? *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 185–198
- [35] Haas R.H., Nasirian F., Nakano K., Ward D., Pay M., Hill R., Shults C.W.: Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 1995; 37: 714–722
- [36] Halliwell B.: Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*, 2001; 18: 685–716
- [37] Halliwell B.: Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.*, 2006; 97: 1634–1658
- [38] Hauser R.A., Lyons K.E., McClain T.: Randomized, double-blind, pilot evaluation of intravenous glutathione in Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, 2009; 24: 979–983
- [39] Hensley K., Maidt M.L., Yu Z., Sang H., Markesbery W.R., Floyd R.A.: Electrochemical analysis of proteins nitrotyrosine and dityrosine in Alzheimer brain indicates region-specific accumulation. *J. Neurosci.*, 1998; 18: 8126–8132
- [40] Ho H.K., White C.C., Fernandez C., Fausto N., Kavanagh T.J., Nelson S.D., Bruschi S.A.: Nrf2 activation involves an oxidative-stress independent pathway in tetrafluoroethylcysteine-induced cytotoxicity. *Toxicol. Sci.*, 2005; 86: 354–364
- [41] Horiguchi T., Uryu K., Giasson B.I., Ischiropoulos H., Lightfoot R., Bellmann C., Richter-Landsberg C., Lee V.M., Trojanowski J.Q.: Nitration of tau protein is linked to neurodegeneration in tauopathies. *Am. J. Pathol.*, 2003; 163: 1021–1031
- [42] Iijima K.I., Ando K., Takeda S., Satoh Y., Seki T., Itohara S., Greengard P., Kirino Y., Nairn A.C., Suzuki T.: Neuron-specific phosphorylation of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein by cyclin-dependent kinase 5. *J. Neurochem.*, 2000; 75: 1085–1091
- [43] Isaac M.G., Quinn R., Tabet N.: Vitamin E for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2008; Issue 3: CD002854
- [44] Itoh K., Tong K.I., Yamamoto M.: Molecular mechanism activating NRF2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004; 36: 1208–1213
- [45] Jellinger K.A., Kienzl E., Rumpelmaier G., Paulus W., Riederer P., Stachelberger H., Youdim M.B., Ben-Shachar D.: Iron and ferritin in substantia nigra in Parkinson's disease. *Adv. Neurol.*, 1993; 60: 267–272
- [46] Kang M.I., Kobayashi A., Wakabayashi N., Kim S.G., Yamamoto S.G.: Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as a key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 2046–2051
- [47] Kang S.W., Rhee S.G., Chang T.S., Jeong W., Choi M.H.: 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications. *Trends Mol. Med.*, 2005; 11: 571–578
- [48] Kim S.S., Lim J., Bang Y., Gal J., Lee S.U., Cho Y.C., Yoon G., Kang B.Y., Cheon S.H., Choi H.J.: Licochalcone E activates Nrf2/antioxidant response element signaling pathway in both neuronal and microglial cells: therapeutic relevance to neurodegenerative diseases. *J. Nutr. Biochem.*, 2012; 23: 1314–1323
- [49] Kwok E.S., Howes D.: Use of methylene blue in sepsis: a systematic review. *J. Intensive Care Med.*, 2006; 21: 359–363
- [50] Langston J.W., Ballard P., Tetrud J.W., Irwin I.: Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 1983; 219: 979–980
- [51] Lee J.M., Johnson J.A.: An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 2004; 37: 139–143
- [52] Lee M.S., Kwon Y.T., Li M., Peng J., Friedlander R.M., Tsai L.H.: Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature*, 2000; 405: 360–364
- [53] Lewis K.N., Mele J., Hayes J.D., Buffenstein R.: Nrf2, a guardian of healthspan and gatekeeper of species longevity. *Integr. Comp. Biol.*, 2010; 50: 829–843
- [54] Liu Y., Schubert D.R.: The specificity of neuroprotection by antioxidants. *J. Biomed. Sci.*, 2009; 16: 98
- [55] Lu P.H., Edland S.D., Teng E., Tingus K., Petersen R.C., Cummings J.L.: Alzheimer's Disease Cooperative Study Group: Donepezil delays progression to AD in MCI subjects with depressive symptoms. *Neurology*, 2009; 72: 2115–2121
- [56] Mancuso M., Coppede F., Migliore L., Siciliano G., Murri L.: Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. *J. Alzheimers Dis.*, 2006; 10: 59–73
- [57] Marnett L.J., Riggins J.N., West J.D.: Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J. Clin. Invest.*, 2003; 111: 583–593
- [58] Martin K.R., Barrett J.C.: Reactive oxygen species as double-edged swords in cellular processes: low-dose cell signalling versus high-dose toxicity. *Hum. Exp. Toxicol.*, 2002; 21: 71–75
- [59] McCarthy S., Somayajulu M., Sikorska M., Borowy-Borowski H., Pandey S.: Paraquat induces oxidative stress and neuronal cell death: neuroprotection by water-soluble coenzyme Q₁₀. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2004; 201: 21–31
- [60] Miller E., Rutkowski M.: Udział i rola ważniejszych czynników biochemicznych w udarze niedokrwiennym mózgu. *Pol. Merkuriusz Lek.*, 2006; 20: 261–264
- [61] Naskalski J.W., Bartsz G.: Oxidative modifications of protein structures. *Adv. Clin. Chem.*, 2000; 35: 161–253
- [62] Numazawa S., Yoshida T.: Nrf2-dependent gene expression; a molecular toxicological aspect. *J. Toxicol. Sci.*, 2004; 29: 81–89
- [63] Oz M., Lorke D.E., Petroianu G.A.: Methylene blue and Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.*, 2009; 78: 927–932
- [64] Pappolla M.A., Omar R.A., Kim K.S., Robakis N.K.: Immunohistochemical evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.*, 1992; 140: 621–628
- [65] Parker W.D. Jr., Boyson S.J., Parks J.K.: Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 1989; 26: 719–723
- [66] Patrick G.N., Zukerberg I., Nikolic M., de la Monte S., Dikkes P., Tsai L.H.: Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature*, 1999; 402: 615–622
- [67] Pedersen W.A., Fu W., Keller J.N., Markesbery W.R., Appel S., Smith R.G., Kasarskis E., Mattson M.P.: Protein modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Ann. Neurol.*, 1998; 44: 819–824
- [68] Pei J.J., Braak E., Braak H., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Winblad B., Cowburn R.F.: Localization of active forms of C-jun kinase (JNK) and p38 kinase in Alzheimer's disease brains at different stages of neurofibrillary degeneration. *J. Alzheimers Dis.*, 2001; 3: 41–48
- [69] Piedrahita D., Hernandez I., Lopez-Tobon A., Obara B., Manjunath B.S., Boudreau R.L., Davidson B., Laferla F., Gallego-Gomez J.C., Kosik K.S., Cardona-Gomez G.P.: Silencing of Cdk5 reduces neurofibrillary tangles in transgenic Alzheimer's mice. *J. Neurosci.*, 2010; 30: 13966–13976
- [70] Pietsch M., Chua K.C., Abell A.D.: Calpains: attractive targets for the development of synthetic inhibitors. *Curr. Top Med. Chem.*, 2010; 10: 270–293
- [71] Ramsey C.P., Glass C.A., Montgomery M.B., Lindl K.A., Ritson G.P., Chia L.A., Hamilton R.L., Chu C.T., Jordan-Sciutto K.L.: Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2007; 66: 75–85
- [72] Riederer P., Sofic E., Rausch W.D., Schmidt B., Reynolds G.P., Jellinger K., Youdim M.B.: Transition metals, ferritin, glutathione and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J. Neurochem.*, 1989; 52: 515–520
- [73] Roediger B., Armati P.J.: Oxidative stress induces axonal beading in cultured human brain tissue. *Neurobiol. Dis.*, 2003; 13: 222–229
- [74] 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. *N. Engl. J. Med.*, 1997; 336: 1216–1222
- [75] Sechi G., Deledda M.G., Bua G., Satta W.M., Deiana G.A., Pes G.M., Rosati G.: Reduced intravenous glutathione in the treatment of early Parkinson's disease. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 1996; 20: 1159–1170
- [76] Shukla V., Mishra S.K., Pant H.C.: Oxidative stress in neurodegeneration. *Adv. Pharmacol. Sci.*, 2011; 2011: ID 572634
- [77] Shults C.W., Haas R.H., Passov D., Beal M.F.: Coenzyme Q₁₀ levels correlate with the activities of complexes I and II/III in mitochondria from parkinsonian and nonparkinsonian subjects. *Ann. Neurol.*, 1997; 42: 261–264

- [78] Shults C.W., Oakes D., Kiebertz K., Beal M.F., Haas R., Plumb S., Juncos J.L., Nutt J., Shoulson I., Carter J., Kompoliti K., Perlmutter J.S., Reich S., Stern M., Watts R.L., Kurlan R., Molho E., Harrison M., Lew M., Parkinson Study Group: Effects of coenzyme Q₁₀ in early Parkinson disease: evidence of slowing of the functional decline. *Arch. Neurol.*, 2002; 59: 1541–1550
- [79] Siemieniuk E., Skrzydlewska E.: Koenzym Q₁₀ – biosynteza i znaczenie biologiczne w organizmach zwierząt i człowieka. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 150–159
- [80] Smith M.A., Richey Harris P.L., Sayre L.M., Beckman J.S., Perry G.: Widespread peroxynitrate-mediated damage in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.*, 1997; 17: 2653–2657
- [81] Sofic E., Paulus W., Jellinger K., Riederer P., Youdim M.B.: Selective increase in iron in substantia nigra zona compacta of parkinsonian brains. *J. Neurochem.*, 1991; 56: 978–982
- [82] Sohmiya M., Tanaka M., Tak N.W., Yanagisawa M., Tanino Y., Suzuki Y., Okamoto K., Yamamoto Y.: Redox status of plasma coenzyme Q₁₀ indicates elevated systemic oxidative stress in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.*, 2004; 223: 161–166
- [83] Sun K.H., De Pablo Y., Vincent F., Shah K.: Deregulated Cdk5 promotes oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *J. Neurochem.*, 2008; 107: 265–278
- [84] Ścibior-Bentkowska D., Czeczot H.: Komórki nowotworowe a stres oksydacyjny *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 58–72
- [85] Tarawneh R., Galvin J.E.: Potential future neuroprotective therapies for neurodegenerative disorders and stroke *Clin. Geriatr. Med.*, 2010; 1: 125–147
- [86] Tęgowska E., Wosińska A.: Rola nauk biologicznych w zrozumieniu genety i nowego podejścia terapeutycznego do choroby Alzheimer. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2011; 65: 73–92
- [87] Tsai L.H., Delalle I., Caviness V.S.Jr, Chae T., Harlow E.: p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin dependent kinase 5. *Nature*, 1994; 371: 419–423
- [88] Veal E.A., Day A.M., Morgan B.A.: Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol. Cells*, 2007; 26: 1–14
- [89] Wiktorowska-Owczarek A., Nowak J.: Patogeneza i profilaktyka AMD: rola stresu oksydacyjnego i antyoksydantów. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2010; 64: 333–343
- [90] Wischik C.M., Benthall P., Wischik D.J.: Tau aggregation inhibitor (TAI) therapy with Rember™ arrests disease progression in mild and moderate Alzheimer's disease over 50 weeks. *Alzheimer's Association International Conference on AD. Chicago 2008, Therapeutic Strategies 1: T167*
- [91] Wrona M.Z., Dryhurst G.: Oxidation of serotonin by superoxide radical: implications to neurodegenerative brain disorders. *Chem. Res. Toxicol.*, 1998; 11: 639–650
- [92] Zemlan F.P., Thienhaus O.J., Bosmann H.B.: Superoxide dismutase activity in Alzheimer's disease: possible mechanism for paired helical filament formation. *Brain Res.*, 1989; 476: 160–162
- [93] Zhu X., Rottkamp C.A., Hartzler A., Sun Z., Takeda A., Boux H., Shimohama S., Perry G., Smith M.A.: Activation of MKK6, an upstream activator of p38, in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, 2001; 79: 311–318

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.