

lek. med. MARIA STYCZYŃSKA

**JEDNOCZESNA ANALIZA WPŁYWU POLIMORFIZMU GENÓW:
APOLIPOPROTEINY E, α 2MAKROGLOBULINY, KATEPSYNY D,
MIELOPEROKSYDAZY I SYNTAZY TLENKU AZOTU
NA RYZYKO WYSTĄPIENIA
CHOROBY ALZHEIMERA O PÓŹNYM POCZĄTKU**

ROZPRAWA DOKTORSKA



LS 250

Promotor:

H 3688 **Prof. dr hab. n. med. Maria Barcikowska**

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

im. M. J. Mossakowskiego

Warszawa, 2004

*Pani Profesor Marii Barcikowskiej,
promotorowi pracy, pragnę wyrazić ogromną wdzięczność za pomoc i cierpliwość.
Współpracownikom z Zakładu Badawczo-Leczniczego Chorób Zwyrodnieniowych CUN
oraz z Poradni Alzheimerowskiej MSWiA dziękuję za miłą atmosferę pracy.
Mojej Rodzinie bardzo dziękuję za wsparcie.*

Publikacje w których w całości lub częściowo wykorzystano wyniki uzyskane w trakcie realizacji projektu:

1. **Styczyńska M**, Religa D, Pfeffer A, Łuczywek 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; 44(2): 99-102.
2. Żekanowski C, **Styczyńska M**, Peplńska B, Gabryelewicz T, Religa D, Ilkowski J, Kijanowska-Haładyna B, Kotapka-Minc S, Mikkelsen S, Pfeffer A, Barczak A, Łuczywek E, Wasiak B, Chodakowska-Żebrowska M, Gustaw K, Łączkowski J, Sobów T, Kuźnicki J, Barcikowska M.: Mutations in presenilin 1, presenilin 2 and amyloid precursor protein genes in patients with early-onset Alzheimer disease in Poland. *Exp Neurol*. 2003; 184: 991-996.
3. Religa D, **Styczyńska M.**, Peplonska B, Gabryelewicz T, Pfeffer A., Chodakowska M, Łuczywek E., Wasiak B., Stepień K., Gołębiowski 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.
4. **Styczyńska M**, Religa D., Pfeffer A., Łuczywek E , Wasiak B, Gabryelewicz T, Czyżewski K, Gołębiowski M, Barcikowska M : Two patients with early –onset Alzheimer's disease and unique APOE e2/2 genotype. A case report. *Alzheimer's Reports* 2001; 4: 151-153.
5. Pfeffer A, **Styczyńska M**, Czyżewski K, Łuczywek E, Gołębiowski M, Nowicka M, Barcikowska M. Apolipoprotein E genotype and the rate of decline in Alzheimer's disease: the gender effect. *Alzheimer's Reports*. 2001; 4: 131-36.
6. **Styczyńska M**, Wasiak B, Łuczywek E, Pfeffer A, Barcikowska M. Polimorfizm genu $\alpha 2$ makroglobuliny u osób z chorobą Alzheimera. *Neurol Neurochir Pol*. 2001; 35: 1013-20.
7. Peplńska B, Żekanowski C, Religa D, Czyżewski K, **Styczyńska M**, Pfeffer A, Gabryelewicz T, Gołębiowski M, Łuczywek E, Wasiak B, Barczak A, Chodakowska M, Barcikowska M, Kuźnicki J. Strong association between Saitohin gene polymorphism and tau haplotype in Polish population. *Neurosci Lett*. 2003; 348(3): 163-6.
8. Gabryelewicz T, Religa D, **Styczyńska M**, Peplńska B, Pfeffer A, Wasiak B, Łuczywek E, Gołębiowski M, Androsiuk W, Czyżewski K, Przekop I, Barcikowska M. Behavioural Pathology in Alzheimer's Disease with Special Reference to Apolipoprotein E Genotype. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2002; 14(4): 208-12.

9. Gołębiowski M., **Styczyńska M.**, Pfeffer A., Barcikowska M., Cieszanowski A.: Evaluation of the interaction between APOE4 alleles and the occurrence of temporal lobe atrophy. *Alzheimer's Reports* 2001; 4: 173-176.
10. Łuczywek E, Nowicka A, Pfeffer A, Czyżewski K, **Styczyńska M**, Łałowski M, Barcikowska M. Cognitive deficits and polymorphism of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2002; 13(3):171-7.
11. Gołębiowski M, **Styczyńska M**, Pfeffer A, Barcikowska M, Cieszanowski A Ocena związku występowania alleli APOE4 z wielkością hipokampa w obrazie tomografii komputerowej. Doniesienie wstępne. *Neurol Neurochir Pol*. 2001; 35(5): 815-20.
12. Łuczywek E, Pfeffer A, Nowicka A, Czyżewski K, Łałowski M, **Styczyńska M**, Barcikowska M. Wzorce aktywności poznawczej a polimorfizm apolipoproteiny E w chorobie. Alzheimer'a. *Neurol Neurochir Pol*. 2001; 35(6):1021-33.

Przedstawione w rozprawie doktorskiej badania zostały w całości sfinansowane z grantu promotorskiego KBN nr 4 P05B 133 19.

Kierownik grantu : Prof. Maria Barcikowska

Maria Styczyńska otrzymała w roku 2003 stypendium doktoranckie „L'Oreal dla Kobiet i Nauki” oraz Stypendium dla Młodych Naukowców Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej w roku 2004.

SPIS TREŚCI

	str.
Skróty używane w tekście	7
1. Wstęp	10
1.1. Choroby uwarunkowane genetycznie	10
1.1.1. Choroby jednogenowe	11
1.1.2. Choroby wielogenowe	11
1.2. Zmienność genetyczna	12
1.2.1. Polimorfizm pojedynczych nukleotydów	13
1.3. Metody poszukiwania nowych genów warunkujących rozwój choroby	13
1.3.1. Analiza sprzężeń	14
1.3.2. Badania asocjacji	15
1.4. Choroba Alzheimer	15
1.4.1. Objawy	16
1.4.1.1. Kryteria rozpoznawania i różnicowanie	17
1.4.1.2. Ocena zaawansowania choroby i tempa progresji	20
1.4.1.3. Choroba Alzheimer a Łagodne zaburzenia poznawcze	24
1.4.2. Neuropatologia	24
1.4.3. Aktualne teorie na temat patogenez	27
1.4.4. Genetyka choroby Alzheimer	31
1.4.4.1. Choroba Alzheimer o wczesnym początku	31
1.4.4.2. Choroba Alzheimer o późnym początku	34
1.5. Charakterystyka wybranych genetycznych czynników ryzyka	36
1.5.1. Apolipoproteina E	37
1.5.2. α 2makroglobulina	38
1.5.3. Katepsyna D	40
1.5.4. Syntaza tlenku azotu	41
1.5.5. Mieloperoksydaza	42

1.5.6. Inne geny kandydujące	43
2. Cel pracy	44
3. Materiał i metody	45
3.1. Charakterystyka badanej grupy	45
3.2. Metody oceny klinicznej	45
3.3. Metody analizy genetycznej	47
3.3.1. Izolacja DNA z krwi obwodowej	47
3.3.2. Oznaczanie genotypu apolipoproteiny E	47
3.3.3. Oznaczanie genotypu α 2makroglobuliny	49
3.3.4. Oznaczanie genotypu katapsyny D	50
3.3.5. Oznaczanie genotypu syntazy tlenku azotu	51
3.3.6. Oznaczanie genotypu mieloperoksydazy	52
3.4. Analiza statystyczna	54
4. Wyniki	55
4.1. Częstość występowania form polimorficznych badanych genów	55
4.2. Wyniki jednoczesnej analizy badanych genów	62
5. Dyskusja	63
6. Wnioski	83
7. Piśmiennictwo	84
8. Streszczenie	110
9. Spis tabel, rycin i wykresów zamieszczonych w tekście	114

SKRÓTY UŻYWANE W TEKŚCIE

- ACE – ang. angiotensin converting enzyme – enzym konwertujący angiotensynę 1
- ACE* – gen kodujący enzym konwertujący angiotensynę 1
- ACT* – gen kodujący $\alpha 1$ -antychymotrypsynę
- ADAM – ang. **a** desintegrin and **m**etalloprotease – dezintegryna i metaloproteaza
- APOE – apolipoproteina E
- APOE* – gen kodujący apolipoproteinę E
- APP – ang. Amyloid Precursor Protein – białko prekursorowe amyloidu
- APP* – gen kodujący białko prekursorowe amyloidu
- A β – β -amyloid
- $\alpha 2M$ – ang. $\alpha 2$ macroglobulin – $\alpha 2$ makroglobulina
- $\alpha 2M$* – gen kodujący $\alpha 2$ makroglobulinę
- BACE – ang. **B**eta site **A**PP-cleaving enzyme – enzym przecinający APP w miejscu β
- bp – ang. base pair – para zasad
- catD – ang. cathepsin D – katepsyna D
- catD* – gen kodujący katepsynę D
- CDR – Clinical Dementia Rating – Skala klinicznej oceny otępienia
- chA – choroba Alzheimera
- CT – ang. computed tomography – tomografia komputerowa
- CTF – ang. C-terminal fragment – fragment C-końcowy
- CUN – centralny układ nerwowy
- CYP 46* – gen kodujący 24-hydroksylazę cholesterolu.
- DSM – Diagnostic and Statistical Manual – Amerykańska Klasyfikacja Diagnostyczna i Statystyczna
- EEG – badanie elektroencefalograficzne
- eNOS – ang. endothelial nitric oxide synthase – śródbłonkowa syntaza tlenku azotu
- EOAD – ang. early-onset Alzheimer's disease – choroba Alzheimera o wczesnym początku
- GDS – ang. Global Deterioration Scale – Skala ogólnej deterioracji
- ICD – ang. The International Classification of the Diseases – Międzynarodowa Klasyfikacja Chorób
- IDE – ang. Insulin-degrading enzyme – enzym degradujący insulinę
- LDL – ang. Low density lipoprotein – lipoproteina o niskiej gęstości

- LOD score – ang. Logarithm of the odds – logarytm dziesiętny
 LRP – ang. Low density lipoprotein receptor-related protein – białko związane z receptorem dla lipoproteiny o niskiej gęstości
 LTP – ang. long-term potentiation – długotrwałe wzmocnienie synaptyczne
MAP- τ – ang. Microtubule associated protein tau gene – gen kodujący białko tau
 MCI – ang. Mild Cognitive Impairment – Łagodne zaburzenia poznawcze
 MMSE – ang. Mini Mental State Examination – Krótka skala oceny stanu psychicznego
 MPO – ang. myeloperoxidase – mieloperoksydaza
MPO – gen kodujący mieloperoksydazę
 MRI – ang. Magnetic Resonance Imaging – rezonans magnetyczny
 MRS – ang. Magnetic Resonance Spectroscopy – spektroskopia rezonansu magnetycznego
 MTHFR – ang. Metylenetetrahydrofolate Reductase – reduktaza metylenetetrahydrofolianowa
MTHFR – gen kodujący reduktazę metylenetetrahydrofolianową
 NFT – ang. neurofibrillary tangles – zwyrodnienie włóknkowe neuronów
 NINCDS-ADRDA – ang. The National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association - Kryteria Narodowego Instytutu Chorób Neurologicznych i Udarów dla Choroby Alzheimer’a i Chorób Pokrewnych
NOS3 – gen kodujący eNOS
 OUN – ośrodkowy układ nerwowy
 PCR – ang. Polymerase Chain Reaction – łańcuchowa reakcja polimerazy
 PET – ang. Positron Emission Tomography – Pozytonowa tomografia emisyjna
 PHF – ang. Paired Helical Filaments – podwójne helikalne filamenty
 PSEN1 – ang. presenilin1 – presenilina 1
PSEN1 – gen kodujący presenilinę 1
 PSEN2 – ang. presenilin 2 – presenilina 2
PSEN2 – gen kodujący presenilinę 2
 QTL – ang. quantitative trait loci – geny cech ilościowych
 RFLP – ang. Restriction Fragments Length Polymorphism – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych
 rż- rok życia
 SNP – ang. single nucleotide polymorphism – polimorfizm pojedynczego nukleotydu

SPECT – ang. Single Photon Emission Computed Tomography – Emisyjna tomografia pojedynczego fotonu

TACE – ang. Tumor Necrosis Factor α converting enzyme” – enzym konwertujący czynnik martwicy nowotworów (TNF).

WHO – ang. World Health Organization – Światowa Organizacja Zdrowia

α 2M – ang. α 2macroglobulin – α 2makroglobulina

α 2M – gen kodujący α 2makroglobulinę

1. WSTĘP

Znaczna większość przypadków choroby Alzheimera (chA) występująca w wieku późnym (>65 rż) jest uważana za przypadki sporadyczne. Istnieje jednak wiele przesłanek potwierdzających hipotezę, iż także te zachorowania mają tło genetyczne (Ashford i wsp, 2002). Wyniki analizy szczegółowych kwestionariuszy wypełnianych przez amerykańskie zakonnice w wieku 22 lat, podsumowanych po wielu latach w badaniu *The Nun Study* pokazują, że ryzyko rozwoju chA jest zdeterminowane już we wczesnej młodości, a późniejszy wpływ środowiska odgrywa niewielką rolę (Snowdon i wsp, 1996). Podobnych informacji dostarczają badania bliźniąt. U bliźniąt monozygotycznych stwierdza się współczynnik zgodności pod względem ryzyka rozwoju chA rzędu 75-80%, natomiast u dwuzygotycznych około 26-46% (Gatz i wsp, 1997; Bergem i wsp, 1997). Niektórzy autorzy uważają, że czynniki środowiskowe zwiększają prawdopodobieństwo wystąpienia chA tylko u osób z predyspozycjami genetycznymi (Mortimer i wsp, 1998). Geny mogą wywierać również swój wpływ w sposób pośredni, poprzez determinację tzw. naczyniowych czynników ryzyka, jakimi jest wysokość ciśnienia tętniczego krwi, stężenie homocysteiny czy cholesterolu. Na potwierdzenie związku tych ostatnich czynników z patogenezą chA pojawiło się w ostatnim okresie wiele dowodów (Seshadri i wsp, 2002; Kojro i wsp, 2001; Pappolla i wsp, 2003; Borroni i wsp, 2003).

1.1. Choroby uwarunkowane genetycznie

Od czasu gdy James Watson i Francis Crick opisali w 1953 roku strukturę DNA dokonał się olbrzymi postęp w dziedzinie biologii molekularnej (Watson i Crick, 1953). Dzięki rozpoczętym w 1990 roku i zakrojonym na szeroką skalę badaniom objętym wspólną nazwą „Projekt poznania ludzkiego genomu” (ang. „Human Genome Project”) oszacowano, iż każdy człowiek posiada około 30 000 genów, których sekwencja jest już znana (Lander i wsp, 2001). Zmiany w tych genach mogą być przyczyną wystąpienia

różnych zaburzeń genetycznych, a liczba zidentyfikowanych mutacji leżących u podłoża tych chorób wciąż rośnie. Zaburzenia genetyczne można zakwalifikować do czterech głównych grup: choroby jedno- i wielogenowe, aberracje chromosomowe i choroby mitochondrialne. W przypadku choroby Alzheimera badania genetyczne są utrudnione ze względu na heterogenność jej etiologii. W zależności od postaci choroby podstawowej znaczenie może odgrywać dziedziczenie jedno- lub wielogenowe, dlatego też te dwa sposoby dziedziczenia zostały omówione poniżej.

1.1.1. Choroby jednogenowe

Zaburzenia, u których podłoża leży mutacja (substytucja pary zasad, insercja, delecja lub duplikacja) w obrębie pojedynczego genu zwane są jedno- lub monogenowymi. Choroby te określane również jako „mendlowskie” są najlepiej poznaną grupą chorób genetycznych. Dziedziczą się zazwyczaj w sposób autosomalny dominujący, recesywny lub sprzężony z chromosomem X. Do chwili obecnej zidentyfikowano już około 11 000 uwarunkowanych w ten sposób schorzeń, wśród których do najbardziej znanych należą mukowiscydoza, anemia sierpowata, choroba Huntingtona, dystrofia Duchenne’a i hemofilia. Do tych chorób należy również rodzinna postać choroby Alzheimera o wczesnym początku (<65rż). W wielu chorobach jednogenowych zmapowano i zsekwencjonowano gen odpowiedzialny za wystąpienie zaburzeń, co umożliwiło zarówno wprowadzenie diagnostyki genetycznej, jak również rozszerzyło wiedzę na temat patofizjologii schorzenia.

1.1.2. Choroby wielogenowe

Choroby te, zwane również zaburzeniami wieloczynnikowymi lub złożonymi (ang. complex diseases), spowodowane są przez jednoczesny wpływ wielu przyczyn

genetycznych i środowiskowych. Do tej grupy należą zarówno wady wrodzone ujawniające się w okresie noworodkowym (np. rozszczep wargi i/lub podniebienia) jak i najpowszechniejsze choroby występujące w wieku dorosłym i dotykające miliony osób na całym świecie: choroby serca, cukrzyca typu II, otyłość, reumatoidalne zapalenie stawów, nowotwory i choroba Alzheimera o późnym początku (>65rż). Geny warunkujące wystąpienie tych zaburzeń nazywane są genami cech ilościowych (ang. quantitative trait loci, QTL), a ich mutacje nie są konieczne ani wystarczające do wystąpienia choroby. Odpowiadają one raczej za genetyczną skłonność do wystąpienia danego schorzenia, która ujawnia się, gdy dodatkowo zadziałają jeszcze określone czynniki środowiskowe i przekroczony zostanie próg podatności. Ryzyko wystąpienia choroby wieloczynnikowej wzrasta, gdy więcej członków danej rodziny jest chorych i im bliższe jest pokrewieństwo probanta i osób chorych. Jednak często ryzyko to jest trudne do określenia i nie poddaje się prawom stosowanym w genetyce mendlowskiej. Ogólnie przyjmuje się, iż ryzyko wystąpienia choroby u rodzeństwa i potomstwa chorego jest mniej więcej równe pierwiastkowi częstości występowania zaburzenia w populacji (przeciwnie niż w przypadku chorób jednogenowych, gdzie ryzyko ponownego wystąpienia choroby nie zależy od chorobowości w danej populacji, ale od typu dziedziczenia genu). Badania nad procentowym udziałem czynników genetycznych i środowiskowych w patogenezie chorób złożonych prowadzone są zwykle w oparciu o obserwację mono- i dwuzygotycznych bliźniąt oraz dzieci adoptowanych.

1.2. Zmienność genetyczna

Człowiek wykazuje znaczną zmienność genetyczną. Jest ona odpowiedzialna zarówno za widoczne różnice w wyglądzie poszczególnych osób, ale również za skłonność do rozwoju niektórych chorób czy wrażliwość na leczenie. U podłoża zmienności genetycznej

leżą mutacje czyli zmiana sekwencji DNA. Tylko część mutacji powoduje choroby, reszta to „milczące” substytucje par zasad.

1.2.1. Polimorfizm pojedynczych nukleotydów

Najczęściej występującą przyczyną zmienności genetycznej są mutacje punktowe (ponad 90% wszystkich mutacji). Gdy substytucja pary zasad występuje w populacji z częstością większą niż 1% nazywana jest polimorfizmem pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism, SNP). Szacuje się, że podstawienia takie występują z częstością 1/300 do 1/500 par zasad (ang. base pair, bp), co przy liczbie około 3 miliardów par zasad tworzących ludzki genom, daje około 10 milionów miejsc polimorficznych, mających najczęściej dwa warianty alleliczne w populacji. Znajomość polimorfizmów genetycznych ma duże znaczenie w badaniach molekularnych. Pełnią one bowiem rolę znanych markerów genetycznych używanych w mapowaniu genomu. Ponieważ obecność wariantu polimorficznego często warunkuje zmianę aktywności kodowanego przez gen białka (polimorfizmy funkcjonalne), można podejrzewać iż są one czynnikami ryzyka genetycznego powszechnie występujących chorób złożonych, a co za tym idzie - są potencjalnie istotne w diagnostyce medycznej.

1.3. Metody poszukiwania nowych genów warunkujących rozwój choroby

Ustalenie defektu genetycznego w poszczególnych chorobach nabiera coraz większego znaczenia, gdyż umożliwia zrozumienie patofizjologii schorzenia i stwarza nadzieję na odkrycie skutecznego leczenia w oparciu o techniki biologii molekularnej. Jest ono stosunkowo łatwe (choć również nie zawsze możliwe) w tych jednostkach, gdzie znany jest białkowy produkt genu odpowiedzialnego za rozwój choroby. Stosuje się w tym przypadku metodę tzw. klonowania funkcjonalnego. Jeśli produkt genu nie jest znany,

a choroba należy do rzadkich chorób jednogenowych można poszukiwać odpowiedniego regionu na chromosomie przy użyciu analizy sprzężeń. Ta metoda nazywana jest klonowaniem pozycyjnym. Sytuacja jest trudniejsza, gdy mamy do czynienia z chorobami złożonymi, wielogenowymi. Charakteryzują się one dużą heterogennością genetyczną oraz nakładaniem czynników genetycznych i środowiskowych. W badaniach nad tymi powszechnie występującymi chorobami również stosuje się dwie wymienione wyżej metody, choć ich skuteczność jest w tym przypadku znacznie niższa.

1.3.1. Analiza sprzężeń

Metoda ta wykorzystuje fakt, iż geny leżące blisko siebie na jednym chromosomie nie dziedziczą się niezależnie, lecz są sprzężone. Dzięki temu, iż znana jest ogromna liczba markerów genetycznych równomiernie rozmieszczonych w całym genomie (SNP, polimorfizmy zmiennej liczby powtórzeń tandemowych, polimorfizmy mikrosatelitarne), możliwe jest obserwowanie sprzężonego dziedziczenia między poszukiwanym genem powodującym chorobę, a znanym markerem. W badaniach tych niezwykle istotna jest analiza statystyczna, która ma odpowiedzieć na pytanie, jakie jest prawdopodobieństwo, że dwa badane loci są sprzężone (ocena tzw. LOD score). Analiza sprzężeń jest metodą najbardziej skuteczną, gdy poszukuje się genu dziedziczonego autosomalnie dominująco w dużych rodzinach, gdzie część osób dotknięta jest danym schorzeniem. Gdy łącznie analizuje się wiele takich rodzin, wysoce prawdopodobne staje się wykrycie regionu zawierającego poszukiwany gen. Metoda ta jest mniej skuteczna w przypadku chorób złożonych. Zwłaszcza w przypadku chorób ujawniających się w późnym wieku niemożliwe jest zgromadzenie materiału genetycznego od chorych członków rodziny z kilku pokoleń. Przeprowadza się wtedy badania u chorych rodzeństw, które ze względu

na dziedziczenie w 50 % jednakowego materiału genetycznego dają największą szansę na wykrycie rzeczywistego genu kandydata.

1.3.2. Badania asocjacji

W chorobach wielogenowych bardziej przydatna okazuje się często technika badania asocjacji pomiędzy polimorfizmem pojedynczych nukleotydów (SNP), a ryzykiem rozwoju choroby. Badania te przeprowadza się na populacjach niespokrewnionych chorych. Ich wynikiem jest wykrycie odmiany polimorficznej genu (allelu), która w badanej populacji wiąże się z większą częstością występowania choroby. Przyjęte są tu dwie strategie badań. Jeśli istnieją hipotezy na temat mechanizmu rozwoju choroby można wybrać kilka genów „kandydatów” na podstawie ich biologicznej funkcji, a następnie poszukiwać w obrębie tych genów funkcjonalnych polimorfizmów, których częstość jest większa w grupie osób chorych niż w grupie kontrolnej. Jeśli natomiast nie jest znany gen kandydat, można analizować geny znajdujące się w rejonie wskazanym przez wcześniejsze badania sprzężeń, poszukiwać w nich polimorfizmów zwiększających ryzyko wystąpienia choroby, a następnie analizować związek białkowego produktu wytypowanego w ten sposób genu z patogenezą choroby.

1.4. Choroba Alzheimera

Choroba Alzheimera jest najczęstszą przyczyną otępienia w społeczeństwach zachodnich (w krajach Dalekiego Wschodu drugą po otępieniu naczyniopochodnym), a prognozy epidemiologiczne przewidują stały wzrost zachorowań w związku ze starzeniem się społeczeństw. Szacuje się, iż choroba ta dotyka nawet 5-10% osób powyżej 65 roku życia i połowę populacji powyżej 85rż (Evans i wsp, 1989; Bachman i wsp, 1992). Ponieważ pierwszym opisanym przez Aloisa Alzheimera przypadkiem klinicznym była

51-letnia Augusta D. cierpiąca na postać choroby o wczesnym początku (Alzheimer 1907), przez wiele lat termin określający tę chorobę zarezerwowany był dla przypadków ujawniających się przed 65rż. (tzw. otępienie przedstarcze). Przypadki późne (rozpoczynające się po 65rż) nazywano otępieniem starczym typu Alzheimer. Jednak w obu tych jednostkach obserwuje się identyczne zmiany neuropatologiczne: płytki (blaszki) starcze i zwyrodnienie włóknkowe neuronów. Te same są też objawy kliniczne, choć w przypadkach o wczesnym początku charakteryzują się one zwykle większą dynamiką. Ze względu na różnorodność zidentyfikowanych czynników ryzyka (wiek, mutacje genetyczne, poziom wykształcenia, urazy OUN, niedotlenienie), złożoną patogenezę i podobny obraz kliniczny, niektórzy autorzy traktują chA raczej jako zespół niż jednostkę chorobową.

1.4.1. Objawy

Główną cechą obrazu klinicznego chA jest narastający zespół otępienny. Dominują powoli nasilające się zaburzenia pamięci i innych funkcji poznawczych (praksji, gnozji, funkcji językowych, funkcji wykonawczych), którym mogą towarzyszyć zaburzenia nastroju i zachowania oraz objawy psychotyczne. Objawy te początkowo utrudniają aktywność zawodową i społeczną, w późniejszych fazach choroby uniemożliwiają samodzielne funkcjonowanie i czynią chorego zależnym od opiekunów.

Ponieważ nie wykryto jak dotąd wystarczająco czułego i swoistego markera biologicznego pozwalającego przyżyciowo postawić rozpoznanie choroby Alzheimer, wprowadzone zostały kryteria kliniczne, mające ułatwić diagnozę i różnicowanie z innymi zespołami otępiennymi.

1.4.1.1. Kryteria rozpoznawania i różnicowanie

W praktyce klinicznej najczęściej stosuje się trzy kryteria rozpoznawania choroby Alzheimera:

- 1) Międzynarodowej Klasyfikacji Chorób – ICD-10 (The ICD-10 Classification, WHO 1993)
- 2) Amerykańskiej Klasyfikacji Diagnostycznej i Statystycznej - DSM-IV (American Psychiatric Association, DSM-IV, 1994)
- 3) Narodowego Instytutu Chorób Neurologicznych i Udarów dla Choroby Alzheimera i Chorób Pokrewnych - NINCDS/ADRDA (McKhann i wsp, 1984).

Wszystkie wymienione wyżej kryteria wymagają obecności zaburzeń pamięci i innych funkcji poznawczych, pogorszenia funkcjonowania w stosunku do stanu przedchorobowego, braku danych klinicznych i laboratoryjnych wskazujących na inną przyczynę otępienia oraz braku zaburzeń świadomości.

Ad 1) Kryteria kliniczne otępienia Alzheimerowskiego wg ICD-10

Otępienie definiowane jest jako zaburzenia pamięci oraz innych funkcji poznawczych (myślenia, oceniania, planowania) w stopniu upośledzającym codzienne aktywności życiowe. Istotne jest obniżenie funkcjonowania poznawczego w porównaniu do sprawności przedchorobowej. Kryteria te uwzględniają powolny początek i postęp choroby oraz wymagają wykluczenia innych typów otępienia w oparciu o badanie kliniczne, laboratoryjne i obrazowe (w tym należy wykluczyć nagły, udarowy początek oraz objawy ogniskowego uszkodzenia centralnego układu nerwowego). Deficyty funkcji poznawczych muszą występować niezależnie od zaburzeń świadomości i powinny być obecne od co najmniej 6-ciu miesięcy. Wiek zachorowania może być wczesny (przed 65 rż) lub późny

(po 65 rż). Według tej klasyfikacji wyróżnić możemy także postać mieszaną w razie współistnienia chA z otępieniem naczyniopochodnym.

Ad 2) Kryteria diagnostyczne otępienia typu Alzheimerowskiego DSM – IV

Kryteria te określają otępienie jako zespół charakteryzujący się oprócz zaburzeń pamięci wystąpieniem co najmniej jednego z wymienionych objawów: afazji, apraksji, agnozji, zaburzeń funkcji wykonawczych. Nasilenie występujących deficytów poznawczych powinno istotnie zaburzać funkcjonowanie społeczne lub zawodowe i znacząco obniżyć poprzedni (sprzed choroby) poziom funkcjonowania. Początek choroby powinien być powolny, a objawy stopniowo narastające. Zaburzenia muszą występować przy zachowanej świadomości. Należy wykluczyć inne przyczyny otępienia (otępienie naczyniopochodne, wodogłowie normotensyjne, guz), choroby układowe, wpływ substancji toksycznych i choroby psychiczne (depresja endogenna, schizofrenia).

Ad 3) Kryteria kliniczne rozpoznawania choroby Alzheimerera NINCDS/ADRDA

Kryteria te zostały wprowadzone w 1984 r. i należą do najbardziej rozpowszechnionych. Wyróżniają one możliwą, prawdopodobną i pewną chorobę Alzheimerera, spośród których tylko dwa pierwsze rozpoznania mogą być postawione przyżyciowo. Rozpoznanie pewnej chA wymaga weryfikacji neuropatologicznej.

Aby rozpoznać prawdopodobną chA muszą być spełnione następujące warunki: otępienie ocenione na podstawie badania klinicznego przy użyciu odpowiednich standaryzowanych testów (np. MMSE lub Skala otępienia Blessed'a) oraz potwierdzone badaniem neuropsychologicznym; deficyt poznawczy obejmujący przynajmniej dwie funkcje, w tym pamięć; postępujące pogarszanie funkcji poznawczych; nieobecne zaburzenia

świadomości, początek między 40 a 90 rokiem życia, najczęściej powyżej 65 rż; brak innych chorób mózgu lub układowych, mogących powodować zaburzenia pamięci.

Diagnozę możliwej chA stawia się, gdy początek objawów i przebieg jest atypowy lub gdy istnieje stopniowo narastający deficyt tylko jednej funkcji poznawczej, bez ewidentnej innej przyczyny. Może być również przyjęte w obecności innych chorób mogących powodować otępienie, ale w danym wypadku uważanych za wtórne.

Jako objawy nasuwające duże wątpliwości co do rozpoznania chA wymienia się w tych kryteriach nagły udarowy początek; obecność ogniskowych objawów neurologicznych, napadów padaczkowych i zaburzeń chodu we wczesnym stadium choroby.

Kryteria NINCDS/ADRDA mają duże znaczenie w codziennej praktyce klinicznej. Charakteryzują się wysoką czułością i swoistością, potwierdzoną wielokrotnie w badaniach neuropatologicznych (Gearing i wsp, 1995; Becker i wsp, 1994).

Różnicowanie

W diagnostyce różnicowej chA należy brać pod uwagę zwłaszcza otępienie naczyniopochodne, jak również otępienie mieszane alzheimerowsko-naczyniopochodne. Rzadziej występującą przyczyną otępienia są inne choroby zwyrodnieniowe OUN, w tym między innymi: Otępienie z ciałami Lewy'ego, Otępienie czołowo-skroniowe, czy choroba Parkinsona przebiegająca z otępieniem. Zawsze należy wykluczyć choroby z grupy tzw. otępień potencjalnie odwracalnych. Mogą one wynikać z zaburzeń metabolicznych (choroby nerek, wątroby, stany hipoglikemiczne), hormonalnych (niedoczynność tarczycy), niedoborowych (witamina B12), elektrolitowych (hiponatremia lub hiperkalcemia). Należy także wykluczyć ogniskowe zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym (guz mózgu, przewlekły krwiak podtwardówkowy) oraz wodogłowie normotensyjne. Diagnostyka chA prowadzona jest na podstawie: wywiadu, oceny stanu

psychicznego, badania neuropsychologicznego, badania neurologicznego (ocena objawów deliberacyjnych, zaburzeń chodu, objawów pozapiramidowych) oraz badań laboratoryjnych i obrazowych.

1.4.1.2. Ocena zaawansowania choroby i tempa progresji

Ocena ta przeprowadzana jest przy użyciu kilku standaryzowanych skal oceniających aktualne stadium zaawansowania procesu otępiennego, funkcjonowanie chorego w codziennych sytuacjach życiowych, jak również zaburzenia pozapoznawcze (zaburzenia zachowania, objawy psychotyczne). Gdy badania takie powtarza się w określonych odstępach czasu, można ocenić tempo narastania procesu otępiennego lub ewentualnie zweryfikować rozpoznanie.

Najbardziej powszechną w praktyce klinicznej, szybką i przesiewową skalą oceny głębokości procesu otępiennego jest skala MMSE (ang. Mini-Mental State Examination, Krótka skala oceny stanu psychicznego) (Folstein i wsp, 1975). Ocenia ona orientację, koncentrację, pamięć bezpośrednią i odroczoną, zaburzenia językowe i praxję. Czułość skali MMSE zależy od wielu czynników takich jak np: wiek, wykształcenie, miejsce przeprowadzania testu (dom, szpital) (Uhlmann i wsp, 1991; Cummings i wsp, 1993).

Do skal oceniających stadium zaawansowania otępienia należy między innymi Ogólna skala deterioracji (ang. Global Deterioration Scale, GDS) (Reisberg 1982). Opisuje ona siedem głównych faz choroby od stanu prawidłowego (1 i 2 faza) do najbardziej zaawansowanego (faza 7). Faza 3. jest obecnie określana jako Łagodne zaburzenia poznawcze (ang. Mild Cognitive Impairment, MCI), kiedy są już zauważalne deficyty funkcji poznawczych i obniżenie sprawności zawodowej. Chory może mieć kłopoty z zapamiętaniem nazwisk nowo poznanych osób, treści przeczytanych artykułów lub książek, z przypominaniem sobie nazw i nazwisk, miejsca położonych przedmiotów, może

się zgubić w czasie podróży do nieznanych miejsc. Obiektywne stwierdzenie zaburzeń pamięci możliwe jest tylko w szczegółowym badaniu neuropsychologicznym. Od fazy 4. w skali GDS rozpoznaje się już otępienie. Występują wyraźne deficyty dotyczące pamięci wydarzeń z własnego życiorysu, zubożenie wiedzy na temat aktualnych wydarzeń, trudności w prowadzeniu spraw finansowych i wykonywaniu złożonych zadań. Wypieranie staje się dominującym mechanizmem obronnym. Faza 5. to średnio nasilone otępienie, chory wymaga już pomocy osób drugih. W czasie badania nie potrafi przypomnieć sobie większości istotnych danych dotyczących swego życia np. adresu i numeru telefonu, nazwisk nauczycieli ze szkoły średniej. Występują zaburzenia orientacji w czasie i w miejscu. Chory nie potrzebuje pomocy przy toalecie i jedzeniu, ale może mieć kłopoty z doбором ubioru właściwego dla pory roku czy okoliczności. W fazie 6. – głębokiego otępienia - chory jest w dużym stopniu nieświadomy wydarzeń i doświadczeń swojego życia. Pacjent może zapomnieć imię najbliższego opiekuna od którego jest całkowicie zależny. Ma trudności z budowaniem zdań. Wymaga pomocy w czynnościach codziennych (jedzenie, mycie, ubieranie, podróżowanie). Zaczynają się zaburzenia kontroli zwieraczy. Pojawiają się różnego typu zaburzenia zachowania, choć mogą one także występować już wcześniej. W fazie 7. otępienie jest bardzo głębokie - chory traci zdolność chodzenia, potem siedzenia, pozostaje w łóżku, nie mówi, wymaga całkowitej opieki.

Kolejną skalą służącą do oceny zaawansowania otępienia jest Skala klinicznej oceny otępienia (ang. Clinical Dementia Rating, CDR (Morris 1993), w której chory otrzymuje od 0 do 3 punktów. W skali tej oceniana jest pamięć, orientacja, rozwiązywanie problemów oraz kontakty społeczne. CDR=0 oznacza, iż stwierdza się brak lub tylko dyskretne zaburzenia pamięci. Punktacja CDR=0.5 zarezerwowana jest dla łagodnych zaburzeń poznawczych, natomiast ocena wynosząca 1, 2 i 3 punkty oznacza odpowiednio: łagodne; umiarkowane i głębokie otępienie.

Bardzo ważnym elementem diagnostyki zaburzeń pamięci jest badanie neuropsychologiczne. Może ono bowiem ujawnić deficyty poznawcze nawet na kilka lat przed klinicznym rozpoznaniem demencji (Linn i wsp, 1995; Petersen i wsp, 1999), co będzie miało szczególne znaczenie w momencie wprowadzenia leczenia przyczynowego w chA (szczepionka przeciw białku β -amyloidu, przeciwciała monoklonalne, inhibitory β -i γ -sekreazy). Pozwala ono także na zobiektywizowanie skarg na kłopoty z pamięcią, które nie muszą iść w parze z rzeczywistymi jej zaburzeniami. Tak więc ocena neuropsychologiczna jest niezwykle istotna przy różnicowaniu wczesnej fazy chA z łagodnymi zaburzeniami pamięci związanymi z wiekiem, czy z depresją. Badanie to, dzięki możliwości odrębnego badania różnych funkcji poznawczych (pamięci, myślenia i abstrahowania, funkcji wzrokowo-przestrzennych, funkcji językowych czy wykonawczych) ułatwia różnicowanie chA z innymi typami otępień zwyrodnieniowych (Otępienie czołowo-skroniowe, Otępienie z ciałami Lewy'ego) czy z otępieniem naczyniopochodnym, gdyż każda z tych chorób charakteryzuje się odrębnym profilem zaburzeń poznawczych.

We wczesnej fazie chA istotne zarówno w rozpoznawaniu jak i różnicowaniu są czynnościowe metody obrazowania OUN: pozytronowa tomografia emisyjna (ang. Positron Emission Tomography – PET), badająca metabolizm mózgu przy użyciu glukozy (bardzo kosztowna i dostępna w Polsce tylko w jednym ośrodku) i oceniająca przepływ krwi w poszczególnych okolicach mózgu komputerowa tomografia emisyjna pojedynczego fotonu (ang. Single Photon Emission Computed Tomography – SPECT), czuła zwłaszcza przy różnicowaniu chA z otępieniem czołowo-skroniowym. W chA obniżenie perfuzji stwierdzone jest typowo w tylnych częściach płatów skroniowych i w płatach ciemieniowych, podczas gdy w otępieniu czołowo-skroniowym w przednich częściach płatów skroniowych i w płatach czołowych (Read i wsp, 1995, Talbot i wsp, 1998). Ze

względu na małą dostępność wymienionych wyżej badań, w praktyce klinicznej wykorzystuje się najczęściej badania tomografii komputerowej (ang. Computed Tomography, CT) oraz rezonansu magnetycznego (ang. Magnetic Resonance Imaging, MRI), które pozwalają wykluczyć rozpoznanie guza, przewlekłego krwaka, mogą sugerować istnienie wodogłowa normotensyjnego (do jego rozpoznania niezbędne jest wykonanie testu infuzyjnego) i uwidaczniają ewentualne zmiany naczyniopochodne. Stwierdzenie korowego czy podkorowego zaniku przy braku danych klinicznych, nie jest wystarczające do rozpoznania chA, ale jego topografia ma istotne znaczenie w diagnostyce. W chA atrofia najwcześniej obejmuje struktury hipokampa, co daje możliwość różnicowania wczesnej fazy tej choroby (De Leon i wsp, 1989; Jack i wsp, 1998a). Ocena zaników jest bardziej precyzyjna w badaniu MRI, a redukcja objętości przysiódkowej części płatów skroniowych wykazuje czułość i swoistość dla chA rzędu 85-90%. Osobną metodą jest wodorowa spektroskopia rezonansu magnetycznego (ang. Magnetic Resonance Spectroscopy, MRS), która z dużą swoistością dla chA wykrywa zmiany stężenia podstawowych metabolitów: N-acetyloasparaginy, choliny, kreatyny, mioinozytolu (Stoppe i wsp, 2000).

Coraz częściej na świecie wykonuje się, zarówno w celu diagnostyki, jak i monitorowania progresji choroby, oznaczenia β -amyloidu i białka tau w płynie mózgowo-rdzeniowym. Obliczenie stosunku fosforylowanego białka tau do A β 1-42 ma w diagnostyce chA czułość rzędu 86% i swoistość 97% (Maddalena i wsp, 2003; Blennow i wsp, 2003). Niedogodnością tej metody jest jednak konieczność wykonania punkcji lędźwiowej, co przy powszechności choroby Alzheimera i dużej liczbie chorych diagnozowanych w warunkach ambulatoryjnych jest istotnym ograniczeniem. Prowadzone są badania nad korelacją osoczowego poziomu A β 1-42 z zaawansowaniem procesu chorobowego, jednak wydaje się, że stężenie β -amyloidu we krwi w większym stopniu

zależy od wieku, niż od toczącego się procesu chorobowego (Fukumoto i wsp, 2003; Mayeux i wsp, 2003).

1.4.1.3. Choroba Alzheimera a Łagodne zaburzenia poznawcze

Ponieważ zmiany patologiczne w OUN pod postacią odkładania złogów β -amyloidu o wiele lat poprzedzają wystąpienie zaburzeń pamięci, istotne jest wczesne wykrywanie przedklinicznych postaci choroby. Biorąc pod uwagę coraz bliższą perspektywę wprowadzenia leczenia przyczynowego, osoby w tej fazie choroby stałyby się idealnymi kandydatami do zastosowania terapii zanim rozwinie się pełnoobjawowy zespół otępienny. Dlatego w ostatnich latach wielu badaczy zainteresowało się zagadnieniem Łagodnych zaburzeń poznawczych (ang. Mild Cognitive Impairment, MCI). Są one definiowane jako izolowane zaburzenia pamięci, przy nieobecności deficytów w innych sferach poznawczych i prawidłowym funkcjonowaniu codziennym. W skalach oceny odpowiada to fazie 3. w skali GDS i ocenie 0.5 w skali CDR (Petersen i wsp, 1997). Grupa pacjentów z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi jest bardzo heterogenna, ale charakteryzuje ją jedna wspólna cecha – podwyższone ryzyko rozwoju zespołu otępiennego w przyszłości. Szczegółowe badanie neuropsychologiczne i obrazowe (zwłaszcza badania funkcjonalne i spektroskopia rezonansu magnetycznego) pozwalają na wyodrębnienie osób należących do tzw. grupy amnestycznego MCI, w której ryzyko konwersji w chA jest najwyższe (Busse i wsp, 2003).

1.4.2. Neuropatologia

Podstawowe zmiany neuropatologiczne stwierdzane w chA to blaszki starcze i zwyrodnienie włókienkowe neuronów (ang. neurofibrillary tangles, NFT). Zostały one opisane i po raz pierwszy powiązane z obrazem klinicznym choroby przez Alzheimera

w 1907 roku. Inne typowe cechy neuropatologiczne chA to dystroficzne neuryty, nitki neuropilowe, zwyrodnienie ziarnisto-wodniczkowe i ciała Hirano. Jednak sama obecność wyżej wymienionych zmian nie wystarczy, aby potwierdzić kliniczne rozpoznanie chA. Istotna jest ich liczba i topografia.

Błaszki starcze występują głównie w korze nowej oraz w strukturach limbicznych. Do ich ilościowej i półilościowej oceny służą stosowane powszechnie skale (Khachaturian 1985; Mirra i wsp, 1991). Klasyczna blaszka starcza zbudowana jest z położonego pozakomórkowo peptydu β -amyloidu ($A\beta$) tworzącego rdzeń oraz otaczających go dystroficznych neurytów, komórek astrogleju i mikrogleju. Charakterystyczną cechą β -amyloidu są jego właściwości histochemiczne i ultrastrukturalne: β -fałdowa struktura, polegająca na antyrównoległym ułożeniu łańcuchów aminokwasowych, dwułomność w świetle spolaryzowanym po barwieniu czerwienią Kongo i typowa fluorescencja po zabarwieniu tioflawiną S. Drugim typem depozytów amyloidowych są blaszki prymitywne, zbudowane z siateczki delikatnych włókien i pozbawione rdzenia. Blaszki prymitywne nie posiadają wymienionych wyżej cech histochemicznych, dlatego można je uwidocznć jedynie przy użyciu specyficznych przeciwciał. $A\beta$, stanowiący główny komponent blaszek starcznych, odkładany jest również w ścianach naczyń powodując tzw. kongofilną angiopatię (Glennner i wsp, 1984; Masters i wsp, 1985a).

Zwyrodnienie włókienkowe neuronów (NFT) jest drugą typową zmianą neuropatologiczną stwierdzaną w mózgach chorych z chA. Charakteryzuje się ono obecnością położonych wewnątrzneuralnie nierozpuszczalnych złogów, zbudowanych z podwójnie sparowanych filamentów (ang. paired helical filaments, PHF). Powstają one na skutek nieprawidłowej fosforylacji białka tau (Grundke-Iqbal i wsp, 1986). Białko to w warunkach fizjologicznych jest składnikiem szkieletu komórkowego i działa jako czynnik wspomagający tworzenie i stabilizację mikrotubul (Goedert i wsp, 1993). Gdy

w warunkach patologicznych nadmiernie ufosforylowane białko tau nie jest skutecznie rozkładane (a podobnie jak β -amyloid ma wtedy strukturę β -wałdową), gromadzi się w cytoplazmie w postaci PHF, co zapoczątkowuje włókiennkową degenerację, a następnie powoduje śmierć neuronu. Najwcześniejsze zmiany dotyczą kory śródwęchowej (entorinalnej) i układu limbicznego, później patologia obejmuje korę nową.

Przez wiele lat trwały dyskusje badaczy, która z opisywanych wyżej kluczowych zmian w chA jest rzeczywiście związana z patogenezą choroby – blaszki starcze, czy NFT. Wykazano, że obecność blaszek starczych przy braku NFT nie powoduje wystąpienia otępienia, ale część autorów uważa taki stan za stadium przedkliniczne chA. Wiadomo natomiast, że rozprzestrzenianie się zwyrodnienia włókiennkowego w mózgu przebiega w sposób dość stały i dobrze koreluje z klinicznym zaawansowaniem demencji. Dlatego też powstały neuropatologiczne kryteria oceny chA oparte wyłącznie na ocenie lokalizacji i nasilenia zmian włókiennkowych (Braak i Braak, 1991). Jednakże mimo dobrej korelacji z objawami klinicznymi w chA, obecność NFT nie jest cechą patognomoniczną dla tej choroby. Identyczne NFT stwierdza się bowiem w wielu innych chorobach neurodegeneracyjnych, jak np. podoстрыm stwardniającym zapaleniu mózgu czy otępieniu bokserów (*dementia pugilistica*).

Obecnie większość badaczy skłania się ku powiązaniu obu obserwowanych zmian uważając, iż obecność $A\beta$ przyczynia się do rozwoju zwyrodnienia włókiennkowego (poprzez aktywację kinaz Cdk5 i GSK-3 β ; patrz: podrozdział „Aktualne teorie na temat patogenezы”). Takiemu podejściu dają wyraz również powszechnie stosowane obecnie kryteria neuropatologiczne rozpoznawania chA opracowane przez ekspertów *National Institute of Aging* i Instytut Reagana, które zalecają jednoczesną ocenę nasilenia patologii amyloidowej jak i NFT (Hyman i Trojanowski, 1997).

Do charakterystycznych zmian w chA należy również znaczne zmniejszenie liczby połączeń synaptycznych. Wiadomo, że gęstość zakończeń presynaptycznych w przebiegu choroby zredukowana jest średnio o 30-40% (Masliah i wsp, 1992). Niektórzy badacze uważają, że ubytek synaps lepiej koreluje z zaawansowaniem zaburzeń poznawczych niż liczba blaszek starczych i NFT (Terry i wsp, 1991).

W latach siedemdziesiątych ubiegłego stulecia ukazały się pierwsze prace na temat zaburzeń neuroprzekątnictwa cholinergicznego w chA (Bowen i wsp, 1976; Davies i wsp, 1976; Perry i wsp, 1977). Głównym źródłem acetylocholin w OUN jest jądro Meynerta, w którym z powodu obecności złogów amyloidu i NFT dochodzi do selektywnej utraty neuronów i spadku stężenia enzymu biorącego udział w syntezie acetylocholin - acetylotransferazy cholinowej. Dane te posłużyły do sformułowania tzw. „hipotezy cholinergiczej” rozwoju chA (Bartus i wsp, 1982; Samuel i wsp, 1994), która została później rozszerzona przez innych badaczy. Wiadomo już, że zaburzenia nie dotyczą wyłącznie syntezy acetylocholin, ale także jej wychwytu i wiązania z receptorami (Francis i wsp, 1999).

1.4.3. Aktualne teorie na temat patogenezy

Najpowszechniej uznawaną teorią dotyczącą etiopatogenezy chA jest hipoteza amyloidowa, zakładająca iż odkładanie się A β w mózgu jest przyczyną zmian prowadzących w efekcie do zaburzeń przekątnictwa nerwowego a następnie śmierci neuronów. To z kolei równoznacznie jest z wystąpieniem klinicznych cech otępienia. A β jest niewielkim peptydem, złożonym z 39-43 aminokwasów, a jego masa wynosi ok. 4,2 kDa. Jest on fragmentem znacznie dłuższego białka błonowego zwanego białkiem prekursorowym amyloidu (ang. Amyloid Precursor Protein, APP). Przełomowe znaczenie w badaniach nad rolą APP miało wykrycie podobieństwa złogów A β w chorobie

Alzheimera i zespole Downa, ich identyczności w blaszkach starczych i złogach naczyniowych oraz poznanie sekwencji aminokwasowej A β (Gajdusek, 1986). APP występuje w OUN kilku izoformach różniących się długością łańcucha aminokwasów (695, 751, 770), spośród których w mózgu najczęściej występuje APP 695. Fizjologiczna funkcja APP nie jest jak dotąd znana, jest ono prawdopodobnie białkiem receptorowym komórki. APP jest białkiem błonowym, złożonym z długiego łańcucha zewnątrzkomórkowego (N-końca), odcinka śródbłonowego i wewnątrzkomórkowego C-końca (Kang i wsp, 1987). Posttranslacyjny metabolizm APP może przebiegać dwutorowo. Zasadnicza, tzw. nieamyloidogenna droga proteolizy APP polega na cięciu przez niesklonowany dotąd enzym – α -sekretazę i rozszczepieniu cząsteczki w obrębie peptydu A β w zewnątrzbłonowym fragmencie APP (Sisodia i wsp, 1990), dzięki czemu powstaje rozpuszczalny fragment zwany sAPP α i C-końcowy fragment o długości 83 aminokwasów, podlegający dalszej proteolizie przez γ -sekretazę (tzw. C83). Nie jest dotąd pewne, czy α -sekreতা is jest jednym, czy grupą enzymów. Istnieje kilku „kandydatów” o odpowiadającej jej aktywności i charakterystyce. Są to błonowe dezintegryny i metaloproteazy o nazwach: ADAM 17 (określana również jako TACE), ADAM 10, ADAM 9 (Buxbaum i wsp, 1998; Lammich i wsp, 1999; Koike i wsp, 1999).

Alternatywnym szlakiem proteolizy APP, zwanym też amyloidogennym, jest cięcie przez enzymy β - i γ -sekreতা is. Kluczową rolę odgrywa w tym procesie β -sekreতা is, która odcina fragment APP od N-końca, pozostawiając zakotwiczony w błonie komórkowej fragment C-końcowy o długości 99 aminokwasów (C99), określany też jako β CTF (od ang. C-terminal fragment). Jest on z kolei substratem dla γ -sekreতা is, która powoduje uwolnienie na zewnątrz komórki nierozpuszczalnego peptydu A β , oraz dokomórkowo fragmentu C-końcowego o długości 57-59 aminokwasów (tzw. γ CTF).

Enzym β -sekretaza, należący do grupy proteinaz aspartylowych, został zidentyfikowany w 1999 roku i nazwany BACE1 (od angielskiej nazwy **beta-site APP-cleaving enzyme**) (Vassar i wsp, 1999; Yan i wsp, 1999; Sinha i wsp, 1999). Istnieje też homologiczny enzym BACE2, który jednak nie odgrywa istotnej roli metabolicznej w OUN (Bennet i wsp, 2000). Natomiast rolę γ -sekretazy spełnia najprawdopodobniej grupa enzymów, które nie są jeszcze całkowicie scharakteryzowane. Wiadomo, iż w skład centrum katalitycznego γ -sekretazy wchodzi presenilina 1 i presenilina 2 (Li i wsp, 2000; Kopan i Goate, 2000). Inne białka wchodzące w skład γ -sekretazy to nikastryna, APO-1 i PEN-2 (Kimberly i Wolfe, 2003).

Teoria „kaskady amyloidowej” sformułowana po raz pierwszy w 1997 roku na 5th *International Conference On Alzheimer's Disease* przez Dennisa Selkoe jest wciąż unowocześniana (Selkoe, 1999; Selkoe, 2000). Początkowo zakładała ona, iż podstawowym procesem prowadzącym do rozwoju choroby jest odkładanie złogów $A\beta$, obecnie mówi się raczej o nieprawidłowej ekspresji i metabolizmie APP, które mogą doprowadzić do zaburzenia równowagi pomiędzy syntezą i degradacją $A\beta$. Rozróżnia się tu przypadki wywołane mutacjami w genach *APP*, *PSEN1*, *PSEN2*, w których dochodzi do zwiększonej syntezy $A\beta$ oraz przypadki sporadyczne, gdzie zwykle stwierdza się upośledzoną degradację $A\beta$ (prawdopodobnie związaną z zaburzeniami aktywności różnych enzymów: neprylizyny, enzymu rozkładającego insulinę [IDE], α 2makroglobuliny, apolipoproteinyE, α 1antychymotrypsyny i plazminy). Istotną zmianą, jaka nastąpiła w ostatnich latach w teorii amyloidowej jest podkreślenie znaczenia obecności oligomerów $A\beta$ i blaszek rozproszonych (ang. diffuse plaques) w powstawaniu wczesnych zaburzeń synaptycznych, aktywacji mikro- i astrogleju i zaburzeniu homeostazy jonowej neuronów (Hardy i Selkoe, 2002). Już w 1998 roku zaobserwowano, iż oligomery $A\beta$ w stężeniach nanomolarnych są neurotoksyczne dla hodowli komórek

hipokampa (Lambert i wsp, 1998). Stwierdzono też, iż ich obecność hamuje długotrwałe wzmocnienie synaptyczne w hipokampie (tzw. LTP, ang. long-term potentiation), uważane za elektrofizjologiczny odpowiednik procesów uczenia się i pamięci (Grant i wsp, 1992; Walsh i wsp, 2002). Oligomery A β dziesięciokrotnie silniej hamują żywotność neuronów w hodowli niż postać włókienkowa amyloidu (Dahlgren i wsp, 2002), a ich stężenie w mózgach osób z AD lepiej koreluje z nasileniem procesu otępiennego niż ilość blaszek starczych (Kayed i wsp, 2003).

Coraz częściej dyskutowana jest też rola wewnątrzkomórkowych fragmentów APP powstających w wyniku proteolizy przez β - i γ -sekretazę (β CTF i γ CTF). Według niektórych autorów β CTF i γ CTF mają właściwości toksyczne, zaburzają transdukcję sygnału komórkowego w neuronach, wpływając na homeostazę wapniową i regulację transkrypcji białek, przez co mogą odgrywać kluczową rolę w patogenezie AD (Lahiri i wsp, 2002).

Wymienione wyżej wczesne zmiany synaptyczne i zaburzenia gospodarki jonowej neuronów prowadzą do zmiany aktywności kinaz/ fosfataz i przyczyniają się do powstawania NFT, a co za tym idzie sprzyjają dalszym zaburzeniom synaptycznym i śmierci komórek nerwowych. Teoria amyloidowa w sposób spójny tłumaczy zależności pomiędzy A β i NFT, które przez wiele lat traktowane były jako efekt zupełnie odrębnych procesów patologicznych i dzieliły naukowców na dwie grupy - żartobliwie nazywane „baptystami” (od β -amyloidu) i „tauistami” (od białka tau). W 2001 roku ukazały się w czasopiśmie *Science* wyniki badań, które wydają się ostatecznie rozstrzygać te wątpliwości (zostały nawet poprzedzone artykułem redakcyjnym zatytułowanym „Tauists and baptists United - Well Almost!” autorstwa Virginii Lee) (Lee, 2001). Wykazano bowiem, iż u transgenicznych myszy będących nosicielami mutacji w genie kodującym białko tau (gen *MAP- τ*), dodatkowa obecność mutacji w białku APP lub podanie A β 1-42

znacznie przyspiesza tworzenie się NFT (Lewis i wsp, 2001; Gotz i wsp, 2001). Równolegle prowadzone są badania mające wyjaśnić tę zależność. Wydaje się, iż kluczową rolę odgrywają w tym procesie kinazy białkowe: Cdk5 (ang. cyclin-dependent kinase 5 - kinaza cyklinozależna 5) i GSK 3 β (ang. glycogen synthase kinase 3 β - kinaza syntezy glikogenu 3 β), które biorą udział w fosforylacji białka tau. Obecność A β zwiększa aktywność tych kinaz przyczyniając się do hiperfosforylacji tau (Otth i wsp, 2002). Działanie to zostało potwierdzone w badaniach prowadzonych na hodowlach komórkowych (komórki hipokampa) jak i na modelach zwierzęcych (Patrick i wsp; 1999; Planel i wsp; 2001; Noble i wsp, 2003). Intensywnie badane są też inhibitory Cdk5 i GSK3 β jako potencjalne środki terapeutyczne w chA. Wykazano na przykład, iż inhibitorem wyżej wymienionych kinaz są związki litu i kwas walproinowy (Alvarez i wsp, 1999).

1.4.3. Genetyka choroby Alzheimera

Jak wspomniano już wcześniej, dotychczas nie udało się wykryć jednego genu odpowiedzialnego za wystąpienie większości przypadków choroby Alzheimera. Wyróżnia się dwie podstawowe postacie choroby. Pierwsza z nich to postać rodzinna o autosomalnie dominującym sposobie dziedziczenia i wczesnym początku (<65rż), stanowiącą około 5% wszystkich przypadków. Pozostałe 95%, nazywane umownie postacią sporadyczną, ujawniającą się zwykle po 65 rż, mimo braku wyraźnego sposobu dziedziczenia, uważane jest za chorobę złożoną.

1.4.3.1. Choroba Alzheimera o wczesnym początku

Obserwacja, iż u osób z zespołem Downa otępienie rozwija się już w drugiej dekadzie życia, a obraz neuropatologiczny mózgu wykazuje zmiany typowe dla choroby

Alzheimera stało się powodem poszukiwania genu sprawczego na chromosomie 21. Mimo iż od 1987 roku znane było locus dla genu kodującego białko APP (chromosom 21q21), a wcześniejsze badania wykazywały jego związek z patogenezą choroby (Goldgaber i wsp, 1987; Masters i wsp, 1985b), prowadzone przez kilka następnych lat badania sprzężeń genetycznych w rodzinnej, wczesnej postaci chA nie dały jednoznacznych wyników wskazujących na ten gen (St. George-Hyslop i wsp, 1987; Pericak-Vance i wsp, 1988). Dopiero sklonowanie w 1991 roku genu *APP* i wykazanie związku znajdujących się w jego obrębie mutacji z wystąpieniem rodzinnej chA potwierdziło wcześniejsze przypuszczenia (Goate i wsp, 1991). Do chwili obecnej znanych jest 16 patogennych mutacji *APP*, skupionych głównie w eksonach 16 i 17 kodujących peptyd A β (patrz: AD Mutation Database, <http://molgen-www.uia.ac.be/ADMutations>). Odkrycie tych mutacji stało się również niezmiernie ważne dla zrozumienia patogenezы chA. Okazało się, że nie każda z nich powoduje modelowe zwiększenie syntezy A β . Działanie takie wywiera mutacja kodonu 670 (tzw. „szwedzka”), przyczyniająca się do 3-6 krotnego wzrostu wydzielania A β (Mullan i wsp, 1992). Inne mutacje powodują zwiększony udział peptydów o dłuższym łańcuchu (A β 1-42), co przyczynia się do przyspieszonej ich agregacji (Ancolio i wsp 1999) lub zwiększenie tempa i ilości tworzonych protofibrilli A β , co obserwowane jest w przypadku mutacji „arktycznej” w kodonie 693 *APP* (Nilsberth i wsp, 2001). Siedem mutacji *APP* powoduje rozwinięcie innego niż chA zespołu chorobowego – np. mutacja E693Q została zidentyfikowana u osób z nawracającymi krwotokami mózgowymi i amyloidozą typu holenderskiego (Van Broeckhoven i wsp, 1990).

Gdy stało się jasne, iż mutacje genu *APP* są bardzo rzadką przyczyną chA, związaną z niewielkim odsetkiem rodzinnych zachorowań, zaczęto intensywnie poszukiwać innych genów. Wyniki analizy sprzężeń wskazywały na region na

chromosomie 14 (Schellenberg i wsp, 1992). W 1995 roku zmapowano gen kodujący presenilinę 1 (*PSEN1*) w pozycji 14q24.3 (Sherrington i wsp, 1995), a następnie sklonowano go (The Alzheimer's Disease Collaborative Group, 1995). W tym samym roku zmapowano gen kodujący białko w 67% homologiczne z preseniliną 1, nazwane z tego powodu preseniliną 2 (Levy-Lahad i wsp, 1995; Rogaev i wsp, 1995). Mutacje w genie *PSEN2* zlokalizowanym na chromosomie 1q31-q42 okazały się być przyczyną chA między innymi w populacji Niemców Nadwołżańskich.

Preseniliny są białkami z grupy serpentyn i posiadają od 6 do 9 hydrofobowych odcinków przenikających przez błonę oraz łączące je pozabłonowe odcinki hydrofilne (Doan i wsp; 1996, Lehmann i wsp, 1997). Biorą one udział, jak powiedziano wcześniej, w proteolizie białka APP, a ich mutacje prowadzą do nadmiernej produkcji najbardziej amyloidogennego peptydu A β 1-42 (Scheuner i wsp, 1996; Citron i wsp, 1997). Znanych jest już 135 mutacji w genie *PSEN1*, z których duża część to mutacje „prywatne” występujące tylko w jednej rodzinie. Większość tych mutacji to punktowe substytucje zlokalizowane w dwóch największych skupiskach – w drugiej domenie przezbłonowej (ekson 5) i w hydrofilnej pętli (ekson 8). Mutacje w obrębie *PSEN 1* charakteryzują się pełną penetracją. Odpowiadają one za 18-50% przypadków chA o wczesnym początku (Cruts i wsp, 1998). W przypadkach tych obserwuje się najwcześniejszy wiek zachorowania (od 28 do 64 lat, średnio 45 lat) i najkrótszy przebieg (od 5.8 do 6.8 lat). We krwi osób z mutacjami *PSEN1* stwierdza się znacznie podwyższone stężenie A β 1-42, również badanie neuropatologiczne pokazuje wybitnie nasiloną amyloidozę. U części chorych obserwuje się też nietypowe objawy neurologiczne, takie jak spastyczna parapareza kończyn dolnych, ruchy dystoniczne kończyn, mioklonie, napady padaczki we wczesnej fazie choroby, nie stwierdzono jednak związku ich występowania z konkretną mutacją bądź rejonem genu *PSEN1* (Rogaeva, 2002).

Znacznie rzadziej stwierdza się mutacje w *PSEN2*. Do chwili obecnej zidentyfikowano 10 mutacji w tym genie, przy czym nie charakteryzują się one pełną penetracją jak w przypadku *PSEN1* czy *APP* (Bird i wsp, 1996; Finckh i wsp, 2000). Wiek zachorowania jest też nieco wyższy i wynosi 40 do 90 lat (średnio 52 lata).

Ogółem mutacje wymienionych trzech genów (*APP*, *PSEN1*, *PSEN2*) dotyczą małej liczby chorych, bo około 50% przypadków chA o wczesnym początku. Częstość wykrywanych mutacji zależy też od przyjętej strategii doboru chorych. W specjalnie wyselekcjonowanych przypadkach o ewidentnej rodzinności (dwóch lub więcej chorych członków rodziny w co najmniej dwóch pokoleniach) może ona wynosić nawet 68% rodzin (Janssen i wsp, 2003). Jeśli jednak jako kryterium przyjmie się wczesne zachorowanie i wystąpienie chA u co najmniej jednego członka rodziny, częstość identyfikowanych mutacji może obniżyć się nawet do 17% (Żekanowski i wsp, 2003). Dane te uświadamiają, w jak wielu przypadkach chA o wczesnym początku defekt genetyczny jest wciąż nieznany. Nadal trwają poszukiwania innych genów, a jednym z kandydatów jest gen kodujący nikastrynę, będącej podobnie jak preseniliny składnikiem kompleksu γ -sekreazy (Dermaut i wsp, 2002). Niestety nie potwierdzono na razie istnienia patogennych mutacji ani funkcjonalnych polimorfizmów w genie nikastryny wpływających na ryzyko chA (Cousin i wsp, 2003).

1.4.4.2. Choroba Alzheimera o późnym początku

Podłoże genetyczne chA o późnym początku jest znacznie słabiej poznane. Ponieważ ta postać choroby zaliczana jest do chorób złożonych, można spodziewać się dużej heterogenności zaangażowanych w patogenezę czynników genetycznych i ich wzajemnych oddziaływań. Przeprowadzone na początku lat dziewięćdziesiątych XX wieku badania sprzężeń wskazywały na związek chA z locus na chromosomie 19 (Pericak-Vance

i wsp, 1991). Równolegle prowadzone były badania nad różnymi białkami wyizolowanymi z blaszek starczych, wśród których intensywnie analizowano właściwości apolipoproteiny E (APOE), mającej wpływ na agregację A β (Wiśniewski i wsp, 1993). Szybko powiązano fakt, iż gen dla APOE zlokalizowany jest w pozycji 19q13.2 z wynikami sprzężeń wskazujących na ten sam region i rozpoczęto badania nad wpływem wariantów polimorficznych *APOE* na rozwój chA. Doprowadziły one do stwierdzenia, iż jedna z trzech izoform genu *APOE* – allel $\epsilon 4$ zwiększa ryzyko zachorowania na chA o późnym początku (Saunders i wsp, 1993a; Corder i wsp, 1993). Dalsze badania na dużych populacjach potwierdziły, iż allel *APOE* $\epsilon 4$ jest nadreprezentowany w grupie osób z chA, jednak trzeba pamiętać iż jest on tylko czynnikiem ryzyka a nie mutacją sprawczą. Choć niektórzy autorzy uważają, że odpowiada on za około 50% genetycznego uwarunkowania chA o późnym początku (Pericak-Vance i wsp, 2000), inni oceniają wpływ ten na 10-30% (Warwick Daw i wsp, 2000; Slooter i wsp, 1998). Dlatego też kontynuowane są poszukiwania kolejnych genów „kandydatów” modulujących ryzyko rozwoju chA. W ciągu ostatnich dziesięciu lat przebadano kilkadziesiąt polimorfizmów genetycznych, jednak w większości przypadków okazywało się, iż ich wpływ jest niewielki i zależny od badanej populacji, co tłumaczy fakt, że pierwotne doniesienia nie były potwierdzane przez innych autorów.

Idealnym kandydatem wydawał się w 1998 roku gen kodujący $\alpha 2$ -makroglobulinę ($\alpha 2M$). Spełniał on jednocześnie dwa wymagania: kodowane przez niego białko stwierdzane było w blaszkach starczych i miało wpływ na agregację A β , a jednocześnie na jego locus na chromosomie 12 (chr. 12p13.3-p12.3) wskazywały badania sprzężeń (Pericak-Vance i wsp, 1997; Rogaeva i wsp, 1998). Badania grupy kierowanej przez Rudolpha Tanzi’ego wskazywały, iż efekt tego genu może być porównywalny z wpływem APOE (Blacker i wsp, 1998). W 1999 roku zaproponowano kolejne trzy geny, które mimo

braku potwierdzających znaczenia ich locus badań sprzężeń, miały teoretyczne uzasadnienie ze względu na udział w procesach degeneracyjnych OUN. Były to geny kodujące katepsynę D (Papassotiropoulos i wsp, 1999), syntazę tlenku azotu (Dahiyat i wsp, 1999) i mieloperoksydazę (Reynolds i wsp, 1999). Późniejsze wyniki analizy SNP w obrębie tych genów nie były jednoznaczne i w większości wykazywały, iż ich efekt jest słaby i zależny od badanej populacji.

Brak zadowalających wyników asocjacji z badanymi polimorfizmami genetycznymi spowodował ponowne zainteresowanie badaniami sprzężeń. W 2000 roku trzy zespoły ogłosiły równocześnie wyraźne sprzężenie chA z markerami na chromosomie 10q (Bertram i wsp, 2000; Myers i wsp, 2000; Ertekin-Taner i wsp, 2000) i choć wskazywany region jest duży, zawiera kilka interesujących genów kandydatów, które są intensywnie analizowane (IDE, aktywator plazminogenu-typ urokinazowy).

1.5. Charakterystyka wybranych genetycznych czynników ryzyka

W przedstawianej pracy do analizy wybrałam pięć omówionych poniżej polimorfizmów genetycznych. Kryterium doboru stanowiły zarówno znane z piśmiennictwa światowego pozytywne wyniki badań sprzężeń lub asocjacji, jak i przesłanki patogenetyczne: wpływ apolipoproteiny E i katepsyny D na odkładanie amyloidu, rola $\alpha 2$ -makroglobuliny w procesach zapalnych oraz proteolizie złogów, udział tlenku azotu w procesach naczyniowych i stresie oksydacyjnym, czy rola mieloperoksydazy w podkreślanych ostatnio procesach uszkodzenia mieliny w chA (Bartzokis, 2004).

Polimorfizmy te były dotąd badane oddzielnie, mimo iż w przypadku choroby wielogenowej należałoby spodziewać się jednoczesnego wpływu kilku genów modulujących ryzyko jej wystąpienia (Styczyńska i wsp, 2003). Dlatego też postanowiłam

przeprowadzić jednoczesną analizę czynników wpływających na różne „szlaki patogenetyczne”.

1.5.1 Apolipoproteina E

Gen dla apolipoproteiny E zlokalizowany jest na chromosomie 19q13.2. APOE należy do grupy białek (apolipoprotein) wchodzących obok lipidów w skład lipoprotein. Biorą one udział w transporcie i redystrybucji lipidów, stabilizują cząsteczki lipoprotein oraz działają jako kofaktor enzymów biorących udział w ich metabolizmie. Początkowo zainteresowanie APOE skupiało się na jej roli w przemianach lipidowych. Zauważono bowiem, że poszczególne izoformy różnią się szybkością wiązania z receptorami VLDL i LRP (Weisgraber i wsp, 1990), jak również mogą warunkować wyższy poziom cholesterolu całkowitego i zwiększone ryzyko choroby wieńcowej (Wilson i wsp, 1994).

Wyróżnia się trzy formy polimorficzne genu *APOE* : ϵ 2, ϵ 3 i ϵ 4 , których obecność uwarunkowana jest podstawieniami argininy i cysteiny w pozycjach 112 i 158. Częstość występowania poszczególnych alleli różni się nieznacznie pomiędzy populacjami, a dla populacji kaukaskiej wynosi w przybliżeniu: *APOE* ϵ 2 ~8%, ϵ 3 ~77% i ϵ 4 ~15%(Utermann i wsp, 1980).

Zainteresowanie rolą APOE w patogenezie chA rozpoczęło się, gdy stwierdzono jej obecność w blaszkach starczych i naczyniach z kongofilną angiopatią (Wiśniewski i wsp, 1992; Namba i wsp, 1992; Rebeck i wsp, 1993). Decydujące znaczenie miało też doświadczenie Strittmatera i wsp, (1993), którzy badając wiązanie się A β z oczyszczonymi izoformami APOE ϵ 3 i APOE ϵ 4, wykazali różnice w szybkości wiązania pomiędzy tymi dwiema izoformami. Wiązanie A β z APOE ϵ 4 trwało kilka minut, zaś z APOE ϵ 3 wymagało godzin. Późniejsze badania wykazały, że inkubacja A β z APOE powoduje wytrącanie się kompleksów A β /APOE, ułatwiających tworzenie włóknkowego,

nierozpuszczalnego amyloidu (Ma i wsp, 1994; Sanan i wsp, 1994). Proces ten najłatwiej przebiegał w obecności izoformy APOE $\epsilon 4$. Wykazano również zwiększenie gęstości złogów amyloidowych w blaszkach starczych i naczyniach z kongofilną angiopatią u nosicieli allelu APOE $\epsilon 4$ w stopniu wprost proporcjonalnym do ilości posiadanych alleli, w porównaniu do osób nie posiadających tego allelu (Schmechel i wsp, 1993). Na podstawie tych danych wysunięto hipotezę, iż rola APOE $\epsilon 4$ w patogenezie chA polega na wiązaniu z A β , przekształcaniu go w formę nierozpuszczalną i przyspieszaniu jego odkładania w blaszkach starczych i naczyniach.

Sugestie te zostały wkrótce potwierdzone w badaniach populacyjnych nad występowaniem poszczególnych alleli w populacji zdrowej i wśród pacjentów z chA, u których stwierdzono istotnie częstsze występowanie wariantu APOE $\epsilon 4$ (35-40% vs 15% w grupie kontrolnej) (Saunders i wsp, 1993b). Dalsze badania wykazały, iż ryzyko rozwoju choroby jest większe w przypadku homozygotycznej formy APOE $\epsilon 4$, wcześniejszy jest również wiek zachorowania w takich przypadkach (Corder i wsp, 1993; Blacker i wsp, 1997). Obecność allelu APOE $\epsilon 2$ uważana jest natomiast za czynnik ochronny (Corder i wsp, 1994), choć efekt ten jest niestały i zależny od badanej populacji (van Duijn i wsp, 1995). Podsumowując, mimo ewidentnego wpływu genotypu APOE na rozwój chA należy pamiętać, iż jest on tylko czynnikiem ryzyka a nie genem sprawczym, dlatego jego obecność nie jest konieczna ani wystarczająca by rozwinęła się choroba Alzheimera.

1.5.2. $\alpha 2$ makroglobulina

Gen dla $\alpha 2M$ zlokalizowany jest na chromosomie 12p13.3-p12.3. $\alpha 2$ makroglobulina jest powszechnie występującym w organizmie białkiem należącym do grupy inhibitorów proteinaz osoczowych (Sottrup-Jensen i wsp, 1989). Funkcja $\alpha 2M$

polega na inaktywacji licznych proteinaz (cysteinowych, asparaginowych, metaloproteinaz, kolagenaz, kalikreiny) poprzez zmianę ich konformacji (Qiu i wsp, 1996). Obecność $\alpha 2M$ w złogach β -amyloidu stwierdzono przy użyciu metod immunohistochemicznych. Przeprowadzone przez kilka zespołów badania *in vitro* wykazały, że $\alpha 2$ makroglobulina wiąże się z dużym powinowactwem z β -amyloidem, a utworzony kompleks transportowany jest za pośrednictwem receptora LRP do wnętrza komórki, gdzie ulega endocytozie (Narita i wsp, 1997). Badania *in vitro* dowiodły również, że obecność $\alpha 2$ makroglobuliny zapobiega tworzeniu się struktury włóknkowej β -amyloidu, tym samym zwiększając jego rozpuszczalność i chroniąc przed tworzeniem patogennych złogów (Du i wsp, 1998; Hughes i wsp, 1998). Ponieważ wiadomo, że patogenny $A\beta$ jest produktem nieprawidłowej proteolizy białka prekursorowego, istnieje także teoria zakładająca, że $\alpha 2M$ może hamować tę reakcję, zmniejszając tym samym ilość nierozpuszczalnego β -amyloidu w przestrzeni pozakomorkowej. $\alpha 2$ makroglobulina bierze także udział w procesach zapalnych, co może mieć również znaczenie w patogenezie choroby Alzheimera, gdyż jak wiadomo złogom amyloidu towarzyszy odczyn gleju o charakterze zapalnym.

Opisane wyżej wyniki badań *in vitro* na temat funkcji $\alpha 2$ makroglobuliny i wyniki badań sprzężeń przyczyniły się do dużego zainteresowania genem kodującym to białko. Wykryto dwa powszechnie występujące polimorfizmy w obrębie genu $\alpha 2M$ składającego się z 36 eksonów. U części populacji w pobliżu końca 5' eksonu 18 występuje mutacja polegająca na delecji 5 par zasad. Istnieją doniesienia sugerujące, że posiadanie allelu zawierającego tę delecję (allel $\alpha 2M^*2$) zwiększa ryzyko rozwoju choroby Alzheimera (Blacker i wsp, 1998). Drugi częsty polimorfizm dotyczy eksonu 24 i polega na występowaniu punktowej mutacji w kodonie 1000 ($\alpha 2M^*Ile1000Val$). Mutacja ta

powoduje zmianę odczytu kodu genetycznego i zastąpienie izoleucyny -ATC przez walinę -GTC. Przypuszcza się, że obecność tej mutacji może zmieniać strukturę $\alpha 2$ makroglobuliny i obniżać jej zdolność do inaktywowania proteinaz. Częstość występowania dwóch wymienionych form polimorficznych w populacji jest różna, na podstawie badań amerykańskich szacuje się, że niezmutowana forma $\alpha 2M^*Ile$ występuje z częstością ok. 0.7, natomiast zmutowana forma $\alpha 2M^*Val$ z częstością 0.3. W badaniach amerykańskich wykazano, że istnieje istotna statystycznie zależność pomiędzy obecnością zmutowanej formy genu $\alpha 2$ makroglobuliny, a ryzykiem rozwoju choroby Alzheimera (Liao i wsp, 1998). Do chwili obecnej ukazało się wiele badań populacyjnych poświęconych rozpowszechnieniu poszczególnych genotypów $\alpha 2$ makroglobuliny, których wyniki są niejednoznaczne. Choć w roku 2000 Koster i wsp, podsumowali je w metaanalizie i nie wykazali związku polimorfizmów tego genu z ryzykiem rozwoju chA (Koster i wsp, 2000), nadal ukazują się prace potwierdzające tę zależność (Saunders i wsp, 2003).

1.5.3. Katepsyna D

Katepsyna D kodowana na chromosomie 11p15.5 jest powszechnie występującą proteazą wewnątrzkomórkową. W 1997 roku, zanim odkryty został enzym BACE uważano, że to właśnie katepsyna D odpowiada cechom poszukiwanego enzymu β -sekreazy. Badania in vitro pokazały, iż ma ona zdolność do odcinania amyloidogenego fragmentu od APP (Chevallier i wsp, 1997; Sadik i wsp, 1999). Wykazano również, że aktywność tego enzymu nie ogranicza się do proteolizy APP, lecz bierze on także udział w degradacji białka tau, co ma istotne znaczenie w patogenezie powstawania NFT (Kenessey i wsp, 1997). Udowodniono też, że inhibitory katepsyny D hamują powstawanie złożeń hiperfosforylowanego tau w hipokampie szczura (Bi i wsp, 2000).

Informacje te skłoniły genetyków do poszukiwania funkcjonalnych SNP w genie katepsyny D. W 1999 roku Papassotiropoulos i wsp, ogłosili, że polimorfizm C/T w eksonie 2 prowadzący do podstawienia alaniny przez walinę w pozycji 224 powoduje zwiększenie aktywności enzymu i tym samym nasilenie produkcji peptydu A β . Autorzy zaobserwowali zwiększoną częstość występowania allelu T wśród pacjentów z chorobą Alzheimera w porównaniu do grupy kontrolnej. Wykazali również, że efekt ten jest niezależny od genotypu *APOE* (Papassotiropoulos i wsp, 1999; Papassotiropoulos i wsp, 2000).

1.5.4. Syntaza tlenku azotu

Kolejnym genem kandydatem jest gen *NOS3* (chromosom 7q35) kodujący śródbłonkową syntazę tlenku azotu (ang. endothelial nitric oxide synthase, eNOS). Zainteresowanie tym genem wynika z sugerowanego przez niektórych autorów udziału stresu oksydacyjnego w patogenezie chorób zwyrodnieniowych OUN (de la Torre i wsp, 2000; Law i wsp, 2001). Wykazano zwiększoną ekspresję eNOS w komórkach mikrogleju i astrocytach chorych na chA osób, czego skutkiem była nasilona produkcja tlenku azotu (de la Monte i wsp, 1997). Wiadomo też, że obecność A β stymuluje produkcję NO (Akama i wsp, 1998). Funkcjonalny polimorfizm tego genu w pozycji G894T (glu298asp) jest znanym od 1999 roku czynnikiem ryzyka choroby wieńcowej (Hingorani i wsp, 1999). Dahiyat i wsp (1999) badali związek tego polimorfizmu z występowaniem choroby Alzheimera. Autorzy zaobserwowali istotne statystycznie zwiększenie częstości wariantu zawierającego glutaminę (formy „dzikiej”) u pacjentów z chA.

1.5.5. Mieloperoksydaza

Mieloperoksydaza, kodowana na chromosomie 17q23.1, jest enzymem występującym w neutrofilach i biorącym udział w katalizowaniu reakcji powstawania kwasu podchlorawego i wolnych rodników tlenowych (Klebanoff i wsp, 1999). Podobnie jak w przypadku poprzedniego genu, jej rola w patogenezie chA wiązana jest z nasileniem stresu oksydacyjnego i modulującym wpływem na tlenek azotu (Eiserich i wsp, 2002). Białko to jest stwierdzane w aktywowanych komórkach mikrogleju oraz w blaszkach starczych (Reynolds i wsp, 1999). W 2000 roku zaczęto analizować wpływ polimorfizmu w obrębie promotora genu kodującego mieloperoksydazę. Stwierdzono, że obecność wariantu G w polimorficznym kodonie G-463A prowadzi do zwiększonej ekspresji genu i tym samym nasilenia produkcji wolnych rodników, co jest czynnikiem przyspieszającym amyloidogenezę. Zaobserwowano większą częstość występowania genotypu GG u chorych na chA oraz synergistyczne działanie na ryzyko rozwoju choroby z polimorfizmem *APOE* (Reynolds i wsp, 2000).

1.5.6 Inne geny kandydujące

Poniżej wymieniono najczęściej badane w przeszłości i najbardziej obiecujące w chwili obecnej geny.

Nazwa genu	Pierwsza referencja	Efekt
<i>LRP</i>	Kang i wsp, 1997	brak
<i>ACE</i> (enzym konwertujący angiotensynę I)	Amouyel i wsp, 1996	brak
α 1 antychymotrypsyna (<i>ACT</i>)	Kamboh i wsp, 1995	brak
<i>Hydrolaza bleomycyny</i>	Farrer i wsp, 1998	brak
<i>MTHFR</i>	Frosst i wsp, 1995	brak
<i>IDE</i>	Abraham i wsp, 2001	możliwy
<i>BACE</i>	Gold i wsp, 2003	możliwy
<i>CYP46</i>	Papassotiropoulos i wsp, 2003	możliwy

Lista wszystkich testowanych SNP w chorobie Alzheimera jest bardzo długa i jak dotąd nie udało się jednoznacznie potwierdzić znaczenia żadnego z nich oprócz polimorfizmu apolipoproteiny E.

2. CEL PRACY

Celem pracy były:

1. Ocena znaczenia polimorfizmu genów: *apolipoproteiny E*, $\alpha 2$ *makroglobuliny*, *katapsyny D*, *mieloperoksydazy* i *syntazy tlenku azotu* w patogenezie choroby Alzheimera – badanie oddziaływania pojedynczych genów i analiza jednoczesna.
2. Metaanaliza dotychczasowych badań nad polimorfizmem *apolipoproteiny E* w Polsce.
3. Szacunkowa ocena przydatności oznaczania genotypów badanych genów w diagnostyce klinicznej choroby Alzheimera oraz w poradnictwie genetycznym.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Charakterystyka badanej grupy

Badaniem objętych zostało 100 osób z chorobą Alzheimera o późnym początku (>65 rż) i 100 osób z dobranej pod względem płci i wieku grupy kontrolnej. Pacjenci z chorobą Alzheimera biorący udział w badaniu pozostają pod stałą opieką Poradni Alzheimerowskiej Zakładu Badawczo-Leczniczego Chorób Zwyródnieniowych CUN, CMDiK PAN/MSWiA. U wszystkich tych osób rozpoznanie choroby zgodne jest z kryteriami NINCDS-ADRDA dla prawdopodobnej choroby Alzheimera oraz DSM –IV i ICD-10 dla choroby Alzheimera. Grupa chorych składała się z 66 kobiet i 34 mężczyzn, średni wiek 76.4 ± 4.7 , średni wiek zachorowania 71.0 ± 4.6 . Grupa kontrolna liczyła 58 kobiet i 42 mężczyzn, średni wiek $74,24 \pm 6.6$. U osób z grupy kontrolnej nie było w wywiadzie skarg na zaburzenia pamięci, nie stwierdzano odchyłeń od normy w badaniu neurologicznym, a wynik badania w skali MMSE wynosił ≥ 27 pkt. W skład grupy tej weszli słuchacze Uniwersytetu Trzeciego Wieku, pacjenci klinik internistycznych i chirurgicznych oraz uczestnicy badań żywieniowych osób w wieku 75 lat prowadzonych w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (kierownik projektu prof. W. Roszkowski) spełniający powyższe kryteria.

3.2 Metody oceny klinicznej

Rozpoznanie choroby Alzheimera stawiane było według międzynarodowego standardu na podstawie wywiadu, badania przy użyciu skal oceniających nasilenie zespołu otępiennego, badania neurologicznego, badania neuropsychologicznego, psychiatrycznego i badań dodatkowych. Dane z wywiadu zbierano od najbliższych opiekunów pacjentów i dotyczyły one: czasu trwania choroby, rodzaju i kolejności pojawiania się objawów, obecności zaburzeń zachowania (w tym objawów psychotycznych), współistniejących

chorób naczyniowych (chorób serca, nadciśnienia tętniczego, cukrzycy, przebytego udaru mózgu), innych chorób występujących aktualnie lub w przeszłości w tym chorób: tarczycy, psychicznych, przewlekłego alkoholizmu, a także przebytego ciężkiego urazu głowy oraz rodzinności otępienia.

Ocena zaawansowania oraz tempa progresji otępienia przeprowadzane były przy użyciu skal MMSE i GDS. W badaniu neurologicznym oceniano: obecność objawów deliberacyjnych (obj. dłoniowo-bródkowy; chwytny; ssania; ryjkowy; z gładzizny), piramidowych (symetria odruchów głębokich, obecność niedowładów kończyn, obj. Babińskiego), ruchomość gałek ocznych; objawy mózdkowe (obj. Romberga, oczopłás, zbornosć ruchów kończyn, diadochokineza) i objawy pozapiramidowe (bradykineza, sztywnosć, drzenie, mimika twarzy, odruchy postawne, chód). Do tego etapu procesu diagnostycznego wszyscy pacjenci byli badani przeze mnie samodzielnie.

Następnie każdy z pacjentów poddawany był badaniu neuropsychologicznemu przy użyciu standardowej baterii testów. Obejmowała ona ocenę pamięci krótko- i długoterminowej, uwagi, myślenia abstrakcyjnego, zdolności językowych, gnozji, prakcji oraz funkcji wykonawczych. Badania dodatkowe to podstawowe badania biochemiczne krwi (morfologia, stężenie glukozy, mocznika, kreatyniny, elektrolitów, transaminaz) oraz hormony tarczycy, poziom wit. B12, homocysteiny, badanie EKG (w wybranych przypadkach również USG tętnic szyjnych lub EEG). Wszyscy pacjenci mieli wykonaną tomografię komputerową mózgu. Badanie to przeprowadzano zgodnie z metodą opisaną przez Mory de Leon (de Leon i wsp, 1989), która pozwala na pośrednią ocenę stopnia zaniku mózgu w rejonie hipokampów.

3.3. Metody analizy genetycznej

Wszystkie oznaczenia genotypów przeprowadzono stosując technikę amplifikacji DNA metodą PCR (ang. polymerase chain reaction - polimerazowa reakcja łańcuchowa) przy użyciu termocyklera Biometra UNO II, a następnie produkt reakcji PCR trawiono odpowiednim enzymem restrykcyjnym z firmy New England Biolabs (metoda RFLP –ang. Restriction Fragments Length Polymorphism; zmienność długości fragmentów restrykcyjnych). Specyficzne startery zostały wykonane przez TIB MOLBIOL w Poznaniu. Dobór pacjentów do obu badanych grup, izolacja DNA oraz badania genetyczne zostały przeze mnie przeprowadzone samodzielnie.

3.3.1. Izolacja DNA z krwi obwodowej

Materiał genetyczny do badań uzyskiwano z leukocytów krwi obwodowej. Standardowo pobierano 10 ml krwi na 0,5 M EDTA o pH=8.0. Izolację DNA przeprowadzano przy użyciu metody wysalania nasyconym roztworem chlorku sodu (6M NaCl) wg metody Millera (Miller i wsp, 1988). DNA zawieszano na co najmniej 24 h w 96% alkoholu etylowym, a następnie w buforze TE (bufor TE: 10 mM Tris HCl, i 1 mM EDTA, pH=8). DNA przechowywano w temperaturze -20°C .

3.3.2. Oznaczanie genotypu *apolipoproteiny E*

Amplifikacja DNA metodą PCR przy użyciu starterów:

I: 5'- TCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCA-3'

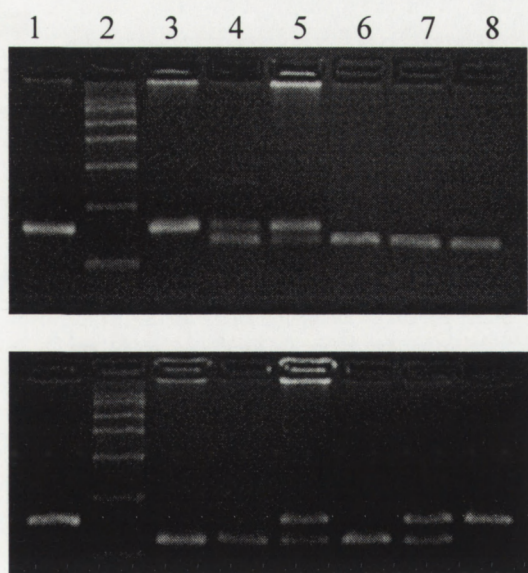
II: 5'- ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACACTGCCA-3'

Skład mieszaniny reakcyjnej: 10 mM Tris-HCl, pH=8.3; 50 mM KCl; 2,5 mM MgCl_2 ; 1,5 μl DMSO (dimethylsulfoxide), 10 pmol każdego ze starterów, 5 mM dNTP (Perkin Elmer), 1,5 U Taq Polimerase (Sigma), 100 ng genomowego DNA.

Reakcję PCR prowadzono w objętości 30 μ l wg następującego schematu:

1. Wstępna denaturacja w temperaturze 94⁰ C przez 5 min
2. Powielanie fragmentu DNA (30 cykli)
 - 2a. Denaturacja w temp. 94⁰ C przez 30 s
 - 2b. Przyłączanie starterów w temp. 65⁰ C przez 30 s
 - 2c. Synteza w temp. 70⁰ C przez 1 min
3. Synteza uzupełniająca w temp. 70⁰ C przez 10 min.

Produkty PCR trawiono następnie dwoma enzymami restrykcyjnymi Afl III i Hae II w dwóch oddzielnych mieszaninach reakcyjnych (Chapman i wsp, 1996) przez 3 godziny w temperaturze 37⁰C. Produkty obu reakcji trawienia rozdzielano elektroforetycznie w dwóch 3% żelach agarozowych barwionych bromkiem etydyny. Wyniki rozdziału elektroforetycznego produktów trawienia analizowano łącznie, uzyskując genotyp badanej osoby (Rycina 1).



Rycina 1. Wynik rozdziału elektroforetycznego produktu amplifikacji fragmentu genu *apolipoproteiny E* trawionego enzymami restrykcyjnymi HaeII (górna część zdjęcia) i AflIII (dolna część zdjęcia). Jednoczesna analiza wyniku trawienia dwoma enzymami pozwala na identyfikację genotypu *APOE*. Ścieżka 1-produkt PCR (227 bp); ścieżka 2-marker wielkości (Sigma, Nr. kat. 9577- wielkości produktów 150, 300, 500, 750, 1000, 1500 i 2000 bp); ścieżka 3 – genotyp $\epsilon 2/\epsilon 2$; ścieżka 4 - genotyp $\epsilon 2/\epsilon 3$; ścieżka 5 - genotyp $\epsilon 2/\epsilon 4$; ścieżka 6 - genotyp $\epsilon 3/\epsilon 3$; ścieżka 7 - genotyp $\epsilon 3/\epsilon 4$; ścieżka 8 - genotyp $\epsilon 4/\epsilon 4$.

3.3.3. Oznaczanie genotypu $\alpha 2$ makroglobuliny

Amplifikacja DNA metodą PCR przy użyciu starterów:

I: 5'- ACTCCTGAAACTGCCACCAA -3'

II: 5'- GTAACCTGAAACCTACTGGAA -3'

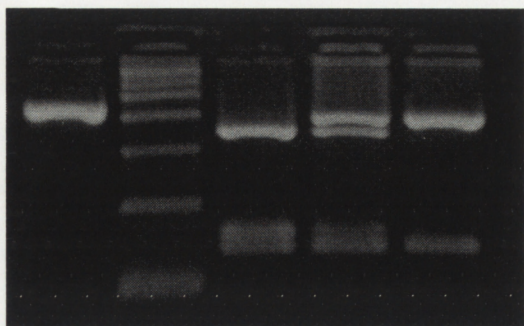
Skład mieszaniny reakcyjnej: 10 mM Tris-HCl, pH=8.3; 50 mM KCl; 2,5 mM MgCl₂; 10 pmol każdego ze starterów, 5 mM dNTP (Perkin Elmer), 1,5 U Taq Polimerase (Sigma), 100 ng genomowego DNA.

Reakcję PCR prowadzono w objętości 30 μ l wg następującego schematu:

1. Wstępna denaturacja w temperaturze 94⁰ C przez 5 min
2. Powielanie fragmentu DNA (40 cykli)
 - 2a. Denaturacja w temp. 94⁰ C przez 1 min
 - 2b. Przyłączanie starterów w temp. 51⁰ C przez 1 min
 - 2c. Synteza w temp. 72⁰ C przez 1 min
3. Synteza uzupełniająca w temp. 72⁰ C przez 10 min.

Produkty PCR trawiono następnie enzymem restrykcyjnym MboI (Liao i wsp, 1998) przez 3 godziny w temperaturze 37⁰C. Produkty reakcji trawienia rozdzielano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny (Rycina 2).

1 2 3 4 5



Rycina 2. Wynik rozdziału elektroforetycznego produktu amplifikacji fragmentu genu *α2makroglobuliny* trawionego enzymem restrykcyjnym MboI. Ścieżka 1-produkt PCR (615 bp); ścieżka 2- marker wielkości (Sigma, Nr. kat. 9577- wielkości produktów 50, 150, 300, 500, 750, 1000, 1500 i 2000 bp); ścieżka 3 – genotyp A/A; ścieżka 4 - genotyp A/G; ścieżka 5 - genotyp G/G.

3.3.4. Oznaczanie genotypu *katapsyny D*

Amplifikacja DNA metodą PCR przy użyciu starterów:

I: 5'-GGGCTAAGACCTCATACTCAC -3'

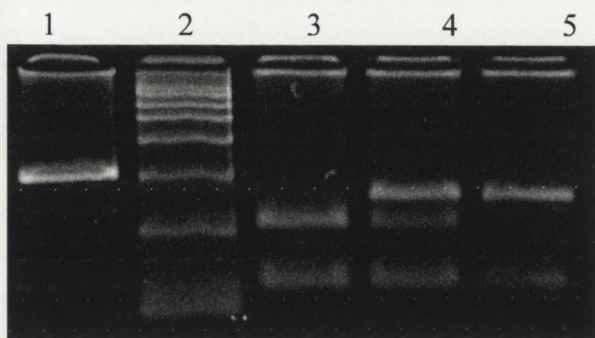
II: 5'-GTGACAGGCAGGAGTTTGGT -3'

Skład mieszaniny reakcyjnej: 10 mM Tris-HCl, pH=8.3; 50 mM KCl; 2,5 mM MgCl₂; 10 pmol każdego ze starterów, 5 mM dNTP (Perkin Elmer), 1,5 U Taq Polimerase (Sigma), 100 ng genomowego DNA.

Reakcję PCR prowadzono w objętości 30 µl wg następującego schematu:

1. Wstępna denaturacja w temperaturze 94⁰ C przez 5 min
2. Powielanie fragmentu DNA (35 cykli)
 - 2a. Denaturacja w temp. 94⁰ C przez 30s
 - 2b. Przyłączanie starterów w temp. 56⁰ C przez 30s
 - 2c. Synteza w temp. 72⁰ C przez 1 min
3. Synteza uzupełniająca w temp. 72⁰ C przez 7 min.

Produkty PCR trawiono następnie enzymem restrykcyjnym MwoI (Papassotiropoulos i wsp, 1999) przez 3 godziny w temperaturze 57⁰ C. Produkty reakcji trawienia rozdzielano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny (Rycina 3).



Rycina 3. Wynik rozdziału elektroforetycznego produktu amplifikacji fragmentu genu *katepsyny D* trawionego enzymem restrykcyjnym MwoI. Ścieżka 1-produkt PCR (343 bp); ścieżka 2- marker wielkości (Sigma, Nr. kat. 9577- wielkości produktów 50, 150, 300, 500, 750, 1000, 1500 i 2000 bp); ścieżka 3 – genotyp C/C; ścieżka 4 - genotyp C/T; ścieżka 5 - genotyp T/T.

3.3.5. Oznaczanie genotypu syntazy tlenku azotu

Amplifikacja DNA metodą PCR przy użyciu starterów :

I: 5'-CATGAGGCTCAGCCCCAGAAC -3'

II: 5'-AGTCAATCCCTT TGGTGCTCAC-3'

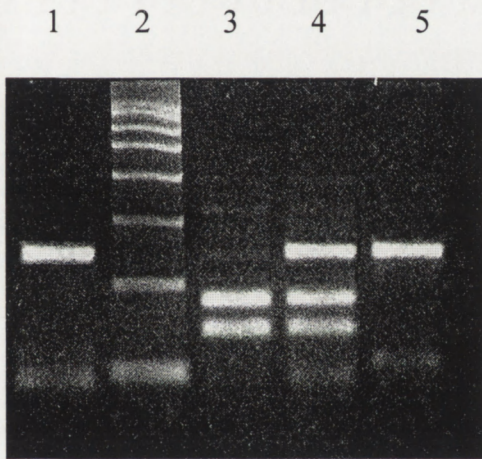
Skład mieszaniny reakcyjnej: 10 mM Tris-HCl, pH=8.3; 50 mM KCl; 2,5 mM MgCl₂; 10 pmol każdego ze starterów, 5 mM dNTP (Perkin Elmer), 1,5 U Taq Polimerase (Sigma), 100 ng genomowego DNA.

Reakcję PCR prowadzono w objętości 30 µl wg następującego schematu:

1. Wstępna denaturacja w temperaturze 94⁰ C przez 5 min
2. Powielanie fragmentu DNA (35 cykli)
 - 2a. Denaturacja w temp. 94⁰ C przez 30s

- 2b. Przyłączanie starterów w temp. 58⁰ C przez 30s
- 2c. Synteza w temp. 72⁰ C przez 1 min
3. Synteza uzupełniająca w temp. 72⁰ C przez 10 min.

Produkty PCR trawiono następnie enzymem restrykcyjnym MboI (Dahiyat i wsp, 1999) przez 3 godziny w temperaturze 37⁰C. Produkty reakcji trawienia rozdzielano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydy (Rycina 4).



Rycina 4. Wynik rozdziału elektroforetycznego produktu amplifikacji fragmentu genu *syntazy tlenku azotu* trawionego enzymem restrykcyjnym MboI. Ścieżka 1-produkt PCR (206 bp); ścieżka 2- marker wielkości (Sigma, Nr. kat. 9577- wielkości produktów 50, 150, 300, 500, 750, 1000, 1500 i 2000 bp); ścieżka 3 – genotyp T/T; ścieżka 4 - genotyp G/T; ścieżka 5 - genotyp G/G.

3.3.6. Badanie genotypu *mieloperoksydazy*

Amplifikacja DNA metodą PCR przy użyciu starterów :

I: 5'-CGGTATAGGCACACAATGGTGA -3'

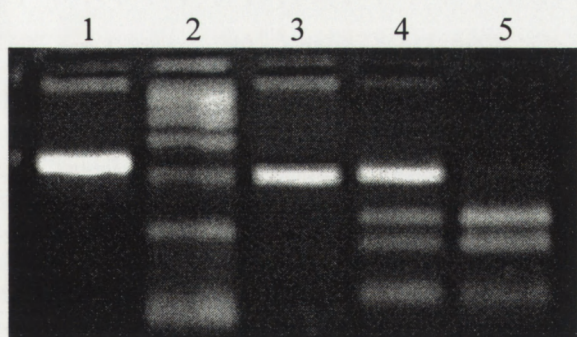
II: 5'-GCAATGGTTCAAGCGATTCTTC-3'

Skład mieszaniny reakcyjnej: 10mM Tris-HCL, pH=8.3; 50 mM KCL; 2,5 mM MgCl₂, 10 pmol każdego ze starterów, 5 mM dNTP (Perkin Elmer), 1,5 U Taq Polimerase (Sigma), 100 ng genomowego DNA.

Reakcję PCR prowadzono w objętości 30 µl wg następującego schematu:

1. Wstępna denaturacja w temperaturze 95⁰ C przez 5 min
2. Powielanie fragmentu DNA (35 cykli)
 - 2a. Denaturacja w temp. 95⁰ C przez 30s
 - 2b. Przyłączanie starterów w temp. 59⁰ C przez 45s
 - 2c. Synteza w temp. 72⁰ C przez 1 min
3. Synteza uzupełniająca w temp. 72⁰ C przez 10 min.

Produkty PCR trawiono następnie enzymem restrykcyjnym AciI (Reynolds i wsp, 1999) przez 3 godziny w temperaturze 57⁰C. Produkty reakcji trawienia rozdzielano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyyny (Rycina 5).



Rycina 5. Wynik rozdziału elektroforetycznego produktu amplifikacji fragmentu genu *mieloperoksydazy* trawionego enzymem restrykcyjnym AciI. Ścieżka 1-produkt PCR (350 bp); ścieżka 2- marker wielkości (Sigma, Nr. kat. 9577- wielkości produktów 50, 150, 300, 500, 750, 1000, 1500 i 2000 bp); ścieżka 3 – genotyp A/A; ścieżka 4 - genotyp A/G; ścieżka 5 - genotyp G/G.

3.4. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną rozkładu częstości poszczególnych alleli i genotypów w grupie osób z chorobą Alzheimera i w grupie kontrolnej przeprowadzono przy użyciu testu CHI-kwadrat. Jednoczesną analizę pięciu badanych genotypów oraz analizę wpływu poszczególnych genów parami przeprowadzono przy użyciu wieloczynnikowej analizy regresji. Do oceny zależności pomiędzy ilością posiadanych alleli APOE $\epsilon 4$ a wiekiem zachorowania zastosowano test ANOVA z analizą post-hoc Newmana-Keulsa. Za poziom istotności przyjęto $p < 0.05$. Do wszystkich obliczeń statystycznych zastosowano program STATISTICA 6.0.

4. WYNIKI

4.1. Częstość występowania form polimorficznych badanych genów

Apolipoproteina E

U wszystkich osób włączonych do badania (100 pacjentów z chorobą Alzheimera oraz 100 osób z grupy kontrolnej) przeprowadzono planowane badania genetyczne. Częstość poszczególnych alleli genu *apolipoproteiny E* w obu badanych grupach różniła się i wynosiła: w grupie pacjentów z chorobą Alzheimera *APOE* $\epsilon 4$, $\epsilon 3$ i $\epsilon 2$ odpowiednio 0,325; 0,645; 0,030 natomiast w grupie kontrolnej było to odpowiednio 0,11; 0,845; 0,045. Występowanie allelu *APOE* $\epsilon 4$ w grupie chorych było istotnie statystycznie częstsze niż w grupie kontrolnej (0,325 vs 0,11; test X^2 , $p < 0,005$). Rozkład genotypów apolipoproteiny E również różnił się pomiędzy grupami. W grupie osób z chorobą Alzheimera istotnie częściej stwierdzono obecność genotypu $\epsilon 3/4$ (48% vs 19%, $p < 0,05$), natomiast w grupie kontrolnej częściej występował genotyp $\epsilon 3/3$ (71% vs 39%, $p < 0,005$). Obserwowano również częstsze występowanie genotypu $\epsilon 2/3$ w grupie kontrolnej (8% vs 3%, NS) oraz genotypu $\epsilon 4/4$ u osób z chorobą Alzheimera (7% vs 1%, NS), jednak ze względu na małą liczebność grup osób z tymi genotypami, nie udało się wykazać istotności statystycznej przedstawianych wyników. Pełne wyniki oznaczania genotypu *apolipoproteiny E* przedstawia tabela 1.

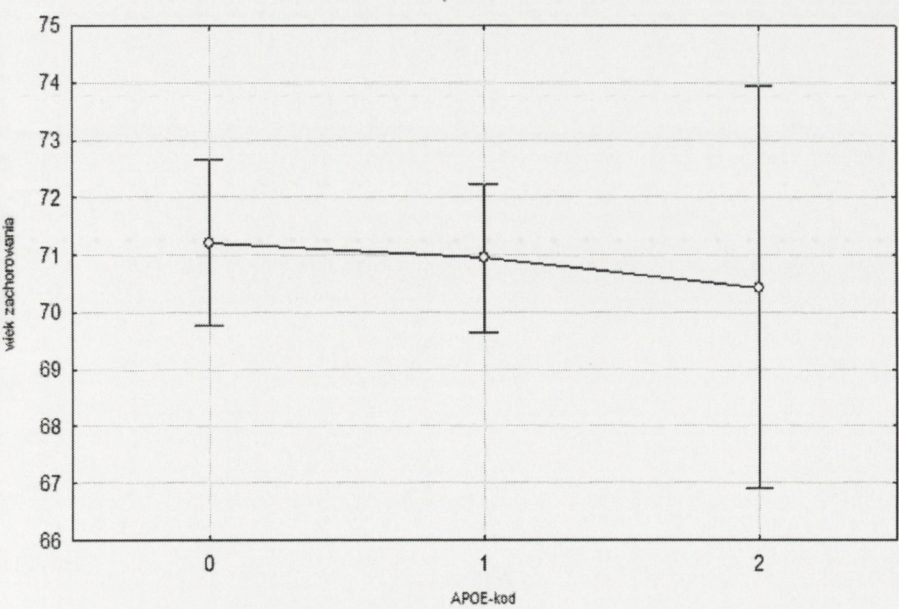
Tabela 1. Rozkład częstości alleli i genotypów *apolipoproteiny E*

<i>APOE</i>	<i>n</i>	Częstość allelu			Rozkład genotypów, <i>n</i> (%)					
		ε 2	ε 3	ε 4	ε2/2	ε 2/3	ε 2/4	ε 3/3	ε 3/4	ε 4/4
chA	100	0,030	0,645	0,325*	0 (0%)	3 (3%)	3 (3%)	39 (39%)	48 (48%)*	7 (7%)
Kontrole	100	0,045	0,845	0,11	0 (0%)	8 (8%)	1 (1%)	71(71%)**	19 (19%)	1 (1%)

chA= choroba Alzheimera; **p*.<0,005;***p*.<0,05

W związku z uzyskaniem istotnej różnicy częstości występowania allelu *APOE* ε 4 w chA i grupie kontrolnej, przeprowadzono analizę zależności pomiędzy ilością posiadanych alleli *APOE* ε 4, a wiekiem zachorowania na chA. Zastosowano podział pacjentów na trzy grupy: -nie posiadających tego allelu (kod-0), posiadających jeden allel ε 4 (kod-1) i posiadających dwa allele ε 4 (kod-2). Analiza ta nie wykazała istotnych statystycznie różnic (*p*>0.05), jednakże obserwowano tendencję do wcześniejszego ujawniania się choroby wraz ze wzrostem ilości posiadanych alleli *APOE* ε 4. Zależność tę pokazuje wykres 1.

Wykres 1. Zależność wieku zachorowania na chA od ilości posiadanych alleli *APOE*ε4.



Dodatkowo przeprowadziłam metaanalizę dotychczasowych wyników oznaczania polimorfizmu *APOE* w Polsce. Do metaanalizy częstości występowania poszczególnych alleli *APOE* w zdrowej populacji zakwalifikowałam wyniki opublikowane w sześciu publikacjach, co umożliwiło ocenę ich rozkładu łącznie u 676 osób. Uzyskałam następujący rozkład alleli: *APOE* $\epsilon 4$ – 0.088; $\epsilon 3$ – 0.839 i $\epsilon 2$ – 0.073. Rozkład ten był zgodny z uzyskanym w mojej pracy. Pełną informację o badaniach uwzględnionych w metaanalizie przedstawia tabela 2.

Tabela 2. Częstość alleli *APOE* $\epsilon 4$, $\epsilon 3$ i $\epsilon 2$ w populacji polskiej – metaanaliza

Liczba badanych	<i>APOE</i> $\epsilon 4$	<i>APOE</i> $\epsilon 3$	<i>APOE</i> $\epsilon 2$	Referencja
N=137	0,106	0,839	0,055	Kowalska i wsp, 1998b
N=182	0,05	0,85	0,1	Pająk i wsp, 1998
N=48	0.041	0.886	0,073	Paradowski i wsp, 2000
N=39	0,115	0,769	0,115	Wehr i wsp, 2000
N=170	0,106	0,818	0,076	Bednarska-Makaruk i wsp, 2001
N=100	0,11	0,845	0,045	Styczyńska i wsp, 2003
Łącznie				
N=676	0,088	0,839	0,073	

Do metaanalizy dotychczasowych badań nad polimorfizmem *APOE* przeprowadzonych w Polsce u pacjentów z chA włączyłam wyniki z sześciu publikacji, obejmujące łącznie 352 chorych. W wyniku tego podsumowania uzyskałam następujące częstości alleli *APOE* w chA: $\epsilon 4$ – 0.345; $\epsilon 3$ – 0.629; *APOE* $\epsilon 2$ – 0.026. Rozkład ten nie różni się istotnie od uzyskanego w mojej pracy, jest też zgodny z rozkładem opisywanym

wśród chorych z Europy Zachodniej i Środkowej. Pełna charakterystyka badań włączonych do metaanalizy została zamieszczona w tabeli 3.

Tabela 3. Częstość alleli *APOE* ϵ 4, ϵ 3 i ϵ 2 wśród polskich pacjentów z chorobą Alzheimera o późnym początku – metaanaliza

Liczba badanych	<i>APOE</i> ϵ 4	<i>APOE</i> ϵ 3	<i>APOE</i> ϵ 2	Referencja
N=26	0,327	0,654	0,019	Łałowski i wsp, 1998
N=39	0,372	0,58	0,038	Kowalska i wsp, 1998a
N=116	0,34	0,630	0,030	Kieszek i wsp, 1999
N=45	0,366	0,622	0,011	Paradowski i wsp, 2000
N=26	0,365	0,615	0,019	Wehr i wsp, 2000
N=100	0,325	0,645	0,030	Styczyńska i wsp, 2003
Łącznie N= 352	0,345	0,629	0,026	

α 2makroglobulina

Częstość alleli genu *α 2makroglobuliny* wynosiła w grupie pacjentów z chorobą Alzheimera: allel *α 2M-Ile*: 0.675, allel *α 2M-Val*: 0.325 . Natomiast w grupie kontrolnej częstości te wynosiły odpowiednio 0.605 i 0.395 i nie różniły się statystycznie od wyników z grupy badanej. Rozkład genotypów Ile/Ile, Ile/Val, Val/Val również nie wykazywał istotnych różnic pomiędzy grupami i wynosił dla pacjentów z chA odpowiednio: 0.49; 0.37; 0.14, natomiast w grupie kontrolnej: 0.40; 0.41; 0.19.

Katepsyna D

Formy polimorficzne genu *katepsyny D* występowały w grupie chorych z częstością: CatD-C: 0.935 , CatD-T: 0.065. W grupie kontrolnej częstości te wynosiły odpowiednio 0.955 i 0.045. Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w częstości występowania wymienionych alleli pomiędzy badanymi grupami. Również rozkład genotypów C/C, C/T i T/T był zgodny w obu grupach i wynosił dla grupy chA odpowiednio: 0.88; 0.11; 0.01 a w grupie kontrolnej: 0.91; 0.09; 0.00.

Mieloperoksydaza

Częstość alleli genu *mieloperoksydazy* wynosiła w grupie badanej MPO-G : 0.76, MPO-A: 0.24. W grupie kontrolnej częstości te wynosiły odpowiednio 0.805 i 0.195. Rozkład częstości obu form polimorficznych, podobnie jak rozkład poszczególnych genotypów był zgodny w obu grupach. Rozkład genotypów G/G; G/A i A/A w grupie pacjentów z chA przedstawiał się następująco: 0.71; 0.10; 0.19, natomiast w grupie kontrolnej odpowiednio: 0.72; 0.17; 0.11.

Syntaza tlenku azotu

Allele genu *syntazy tlenku azotu*: NOS3-G i NOS3-T w grupie osób z chorobą Alzheimera miały częstość odpowiednio 0.79 i 0.21, natomiast w grupie kontrolnej było to odpowiednio 0.765 i 0.235. Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w częstości występowania wymienionych alleli. Również rozkład genotypów G/G, G/T, T/T był zgodny w obu grupach i wynosił w grupie chA odpowiednio: 0.65; 0.28; 0.07 a w grupie kontrolnej: 0.57; 0.39 i 0.04.

Pełne wyniki rozkładu alleli i genotypów genów $\alpha 2$ makroglobuliny, *katepsyny D*, *mieloperoksydazy* i *syntazy tlenku azotu* zostały zawarte w tabeli 4. Ze względu na brak danych w piśmiennictwie polskim na temat częstości występowania form polimorficznych wymienionych czterech genów, niemożliwe było przeprowadzenie podsumowania analogicznego do metaanalizy wyników dla *apolipoproteiny E*.

Tabela 4. Rozkład alleli i genotypów $\alpha 2$ makroglobuliny ($\alpha 2M$), katepsyny D (CatD), mieloperoksydazy (MPO) i syntazy tlenku azotu (NOS3).

$\alpha 2M$	<i>n</i>	Częstość allelu		Rozkład genotypów, <i>n</i> (%)		
		Ile	Val	Ile/Ile	Ile/Val	Val/Val
chA	100	0.675	0.325	49 (49%)	37 (37%)	14 (14%)
Kontrole	100	0.605	0.395	40 (40%)	41 (41%)	19 (19%)
CatD		C	T	C/C	C/T	T/T
chA	100	0.935	0.065	88 (88%)	11 (11%)	1 (1%)
Kontrole	100	0.955	0.045	91 (91%)	9 (9%)	0 (0%)
MPO		G	A	G/G	G/A	A/A
chA	100	0.760	0.240	71 (71%)	10 (10%)	19 (19%)
Kontrole	100	0.805	0.195	72 (72%)	17 (17%)	11 (11%)
NOS3		G	T	G/G	G/T	T/T
chA	100	0.790	0.210	65 (65%)	28 (28%)	7 (7%)
Kontrole	100	0.765	0.235	57 (57%)	39 (39%)	4 (4%)

4.2. Wyniki jednoczesnej analizy badanych genów

Przy użyciu wieloczynnikowej analizy regresji badano czy jednoczesna obecność kilku form polimorficznych uważanych za zwiększające ryzyko choroby Alzheimera (allele: *APOE* ϵ 4, α 2M-Val, *CatD*-T, *MPO*-G, *NOS3*-T) w badanej grupie wiązała się z większym prawdopodobieństwem rozwoju choroby. Wśród badanych łącznie 200 osób (100 osób z chA i 100 kontroli) nie było ani jednej osoby posiadającej wszystkie pięć „niekorzystnych” alleli. Analizę przeprowadzono łącząc geny w pary (każdy z każdym) oraz analizowano polimorfizm wszystkich pięciu genów jednocześnie. Nie wykazano, by którekolwiek z połączeń par genów powodowało zwiększenie ryzyka wystąpienia choroby, w porównaniu do oddziaływania pojedynczego genu. Nie stwierdzono również, by któryś spośród genów: α 2makroglobuliny, katepsyny D, mieloperoksydazy i syntazy tlenku azotu działał synergistycznie z genem *apolipoproteiny E* zwiększając ryzyko rozwoju choroby Alzheimera. W każdym przypadku istotny statystycznie wpływ na ryzyko zachorowania był identyczny z oddziaływaniem samego genu *apolipoproteiny E*. Przeprowadzono również stratyfikację ze względu na wiek zachorowania i płeć osób badanych, w żadnej z tych analiz nie uzyskano jednak istotnych statystycznie wyników.

5. DYSKUSJA

Ocena znaczenia polimorfizmu *apolipoproteiny E* w patogenezie choroby Alzheimera

Obecność co najmniej jednej kopii allelu *apolipoproteiny E* $\epsilon 4$ jest od 1993 roku uznanym genetycznym czynnikiem zwiększającym ryzyko rozwoju choroby Alzheimera. Opisywane są jednak duże różnice etniczne w rozkładzie alleli i genotypów *APOE*, jak również w ich udziale w patogenezie chA. Szacuje się, że dziedziczenie allelu *APOE* $\epsilon 4$ odpowiada za około 50% przypadków chA. Na podstawie danych literaturowych częstość występowania tego allelu w zdrowej populacji rasy kaukaskiej wynosi 0,10-0,17 (Corbo i wsp, 1995), natomiast wśród pacjentów z chA wynosi ona średnio 0,32 - 0,42 (Saunders i wsp, 1993b). Wyniki uzyskane w mojej pracy są zgodne z tym rozkładem; w grupie kontrolnej częstość allelu *APOE* $\epsilon 4$ wynosiła 0,11 natomiast w grupie osób z chA – 0,325.

Obecnie przyjmuje się, iż w ewolucji allel $\epsilon 4$ był pierwotną formą genu, natomiast odmiany polimorficzne pojawiły się w wyniku mutacji znacznie później – allel $\epsilon 3$ około 300 000 lat temu, natomiast allel $\epsilon 2$ około 200 000 lat temu (Fullerton i wsp, 2000). Do chwili obecnej w niektórych populacjach wariant *APOE* $\epsilon 4$ pojawia się znacznie częściej niż w innych - u Pigmejów jego częstość wynosi nawet 0.407 (Zekraoui i wsp, 1997), u borygenów z Australii - 0.26 (Kamboh i wsp, 1991), u rdzennych mieszkańców Ameryki - 0.28 (Scacchi i wsp, 1997). Znacznie rzadziej allel ten stwierdza się w krajach śródziemnomorskich o wielowiekowej tradycji rolniczej. U mieszkańców Sardynii częstość tego allelu jest najniższa w Europie i wynosi 0.052 (Corbo i wsp, 1999b), podobnie w Grecji - 0,068 (Cariolou i wsp, 1995). Obserwacje te skłoniły niektórych badaczy do wysunięcia hipotezy, iż allel $\epsilon 4$ spełniał w ewolucji rolę wariantu „ochronnego”, być może ułatwiającego przeżycie w trudnych warunkach (Corbo i Scacchi,

1999a). Wraz z wydłużeniem średniego przeżycia ludzi ujawniło się niekorzystne działanie tego allelu – który przyczynia się zarówno do nasilenia zmian miażdżycowych (m.in. wzrost ryzyka choroby wieńcowej) jak i choroby Alzheimera. W Europie Zachodniej i Środkowej częstość allelu $\epsilon 4$ wynosi od 0.10 do 0.17, wyższa jest natomiast na północy kontynentu (Szwecja – 0.206; Finlandia – 0.208) (Corbo i wsp, 1995).

Różnice etniczne utrudniają ocenę wpływu obecności allelu $\epsilon 4$, gdyż w niektórych populacjach pozornie znacznie większa grupa osób znajduje się w grupie „ryzyka”. Jednak okazuje się, że w populacjach tych wpływ dziedziczonego allelu nie musi być tak samo wyrażony, jak w innych grupach, gdzie występuje on rzadziej. Taka sytuacja ma miejsce w przypadku czarnoskórych mieszkańców Ameryki, u których allel *APOE* $\epsilon 4$ jest znacznie słabszym (o ile w ogóle) czynnikiem ryzyka rozwoju chA (Maestre i wsp, 1995).

Kolejną trudnością w ocenie wpływu genotypu *apolipoproteiny E* na ryzyko zachorowania na chA jest fakt, iż choroba ta rozwija się w wieku podeszłym, zwykle później niż np. choroby układu krążenia, mogące w konsekwencji eliminować z populacji część osób o danym genotypie. Taką możliwość należy brać pod uwagę interpretując wyniki badań populacyjnych nad *apolipoproteiną E*. W zależności od wieku badanych rozkład genotypów w populacji może się zmienić, gdyż część nosicieli *APOE* $\epsilon 4$ może np. przedwcześnie umrzeć na zawał serca (Kumar i wsp, 2003). Dlatego w badaniach nad zależnością między genotypem *E* i ryzykiem rozwoju choroby Alzheimera, grupę kontrolną powinny stanowić osoby w porównywalnym wieku.

W dotychczasowej literaturze niewiele jest danych na temat częstości alleli *apolipoproteiny E* w Polsce opartych o badania dużych, reprezentatywnych grup. Z tego powodu przeprowadziłam metaanalizę dotychczasowych wyników obejmującą łącznie ponad 650 osób.

W 1998 roku przeprowadzono badania fenotypu *APOE* u 137 dawców krwi, uzyskując rozkład izoform *APOE* $\epsilon 4$, $\epsilon 3$ i $\epsilon 2$ odpowiednio 0.106, 0.839 i 0.055 (Kowalska i wsp, 1998b). Wyniki te okazały się zgodne z uzyskanym przeze mnie rozkładem w grupie zdrowych osób o średnim wieku 74.2 ± 6.6 , choć nie mogły być *a priori* przyjęte jako grupa kontrolna dla pacjentów z chorobą Alzheimera, z wymienionych wyżej powodów (wiek większości dawców krwi nie przekracza 40 roku życia). Rozkład genotypów *apolipoproteiny E* badany był również w 2001 roku w ramach projektu dotyczącego rozpowszechnienia czynników ryzyka choroby niedokrwiennej serca POL-MONICA (Bednarska-Makaruk i wsp, 2001). Mimo, iż wiek badanych osób (41-69 lat) również był niższy od oczekiwanego w moim badaniu, rozkład genotypów *apolipoproteiny E* był zgodny zarówno z moimi wynikami jak i rezultatami Kowalskiej (1998b), i wynosił *APOE* $\epsilon 4$ – 0,106; *APOE* $\epsilon 3$ – 0,81 i *APOE* $\epsilon 2$ – 0,076. Może to świadczyć o tym, że do wieku późnego rozkład genotypów *apolipoproteiny E* w populacji polskiej nie zmienia się. Wskazywałoby to na fakt, iż różnice etniczne dotyczą również jej wpływu na ryzyko choroby wieńcowej i że jest on w naszej populacji słabszy niż np. u mieszkańców Azji (patrz cytowana wcześniej praca Kumar i wsp, 2003). Potwierdzeniem tej obserwacji byłyby wyniki Bednarskiej-Makaruk i wsp (2001), które nie wykazały związku pomiędzy obecnością allelu *APOE* $\epsilon 4$, a ryzykiem rozwoju niedokrwiennej choroby serca wśród przebadanej grupy 170 Polaków. Jednak w badaniu CASCADE przeprowadzonym w 1998 roku u 182 mieszkańców województwa tarnobrzeskiego w wieku 65-78 lat stwierdzono, że izoformy *APOE* $\epsilon 4$, $\epsilon 3$ i $\epsilon 2$ występują w badanej populacji z częstością odpowiednio: 0,05; 0,84 i 0,10, a niski odsetek allelu *APOE* $\epsilon 4$ autorzy tłumaczyli właśnie wyższą umieralnością na choroby serca u nosicieli tego allelu (Pająk i wsp, 1998). Do przedstawianej metaanalizy włączono również dwie prace, w których analizowano znacznie mniejsze grupy osób, po około 40-50 przypadków (Paradowski i wsp, 2000;

Wehr i wsp, 2000). W pozostałych dwóch publikacjach opartych na badaniu polskiej populacji grupy kontrolne były również nieliczne, a uzyskane wyniki dyskusyjne. W badaniu rozkładu genotypu *apolipoproteiny E* w centralnej Polsce wzięto pod uwagę 116 pacjentów z chorobą Alzheimera i 46 osób z grupy kontrolnej (małżonkowie i opiekunowie chorych), których dokładny wiek nie został podany w publikacji (Kieszek i wsp, 1999). Rozkład genotypów i alleli *APOE* w grupie chA był zgodny z rozkładem uzyskiwanym u chorych rasy kaukaskiej w innych krajach (*APOE* $\epsilon 4$ - 0.34), natomiast częstość *APOE* $\epsilon 4$ w grupie kontrolnej wyraźnie od niej odbiegała (*APOE* $\epsilon 4$ - 0.28). Tak wysoka częstość allelu *APOE* $\epsilon 4$ (przewyższająca nawet częstość obserwowaną w krajach skandynawskich) nie została dotąd stwierdzona u osób zdrowych w żadnym kraju europejskim, co nasuwa przypuszczenie, iż do grupy tej zakwalifikowano prawdopodobnie przedkliniczne przypadki chA, być może część z nich stanowili krewni pierwszego stopnia pacjentów z tą chorobą. W kolejnej publikacji swoistą grupę kontrolną stanowiło 11 nieotępiących krewnych pierwszego stopnia badanych chorych i w tym przypadku również otrzymano wyższą częstość allelu *APOE* $\epsilon 4$ (0.18) niż w moim badaniu oraz w pracach Kowalskiej i Bednarskiej-Makaruk (Łałowski i wsp, 1998). W tym jednak przypadku mała liczebność grupy oraz pokrewieństwo z chorymi mogło mieć znaczący wpływ na wartość statystyczną uzyskanych wyników. Powyższych dwóch prac nie włączono do metaanalizy wyników.

Dobór grupy kontrolnej w większości badań nad chA jest najtrudniejszym etapem realizacji projektu. Zazwyczaj do grupy tej kwalifikowani są wolontariusze dobrani pod względem płci i wieku lub pacjenci szpitalni (metoda wygodna jest dla lekarzy ze względu na dużą dostępność osób starszych na oddziałach internistycznych), spełniający te same kryteria i oczywiście nie wykazujący zaburzeń funkcji poznawczych. Jednak okazuje się, że obie metody naboru do grupy kontrolnej mogą być obarczone istotnym błędem.

W Stanach Zjednoczonych zauważono, że na apel o zgłoszenie się wolontariuszy do badań nad chorobą Alzheimera zgłaszają się głównie osoby tą chorobą z jakiś względów zainteresowane lub obawiające się jej wystąpienia, czyli np. dzieci zmarłych na chA pacjentów (Lopez i wsp, 1998). Natomiast wśród pacjentów kwalifikowanych do badań w szpitalach częściej niż w populacji ogólnej stwierdzano występowanie chorób układu krążenia (choroba wieńcowa, nadciśnienie tętnicze), co z jednej strony mogło zwiększać ryzyko rozwoju otępienia w przyszłości, jak również rzutować na rozkład niektórych genotypów w badanej grupie (tzw. geny „naczyniowe”: apolipoproteina E, syntaza tlenu azotu, enzym konwertujący angiotensynę).

Aby uniknąć podobnego błędu do grupy kontrolnej używanej w moich badaniach zakwalifikowałam 30 osób uczestniczących w badaniu żywieniowym 75-latków polskich (reprezentatywna grupa mieszkańców dużej aglomeracji miejskiej, małego miasta oraz wsi) – dzięki uprzejmości profesora Wojciecha Roszkowskiego ze Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie; 30 osób będących pacjentami oddziału internistycznego, hospitalizowanych z innych powodów niż choroby naczyniowo-sercowe (w większości przypadków choroby płuc i wątroby), 20 pacjentów z oddziału chirurgii ogólnej oraz 20 słuchaczy Uniwersytetu Trzeciego Wieku.

Zgodność rozkładu alleli i genotypów apolipoproteiny E w moim badaniu z wynikami uzyskanymi przez innych autorów pozwala na stwierdzenie, iż grupa ta została dobrana prawidłowo. Wynik metaanalizy dotychczasowych badań przedstawia tabela 2 (rozdział: Wyniki).

Ciekawym zagadnieniem jest też częstość występowania allelu *APOE* ε2 w różnych populacjach. W przeciwieństwie do allelu ε4, rola tej formy polimorficznej nie jest całkowicie wyjaśniona. Część autorów uważa, iż pełni ona funkcję ochronną przed rozwojem chA (Talbot i wsp, 1994), co potwierdzałoby częstsze występowanie tego

wariantu u osób zdrowych w porównaniu do chA. Jednak istnieją prace dowodzące, iż obecność tego allelu może być czynnikiem niekorzystnym, zwłaszcza dla postaci choroby Alzheimera o wczesnym początku (Van Duijn i wsp, 1995; Sorbi i wsp, 1994). Stwierdzono również częstsze występowanie tego wariantu u osób z chA w porównaniu do grupy kontrolnej wśród Amerykanów rasy czarnej (0,12 vs 0,02) i pochodzenia hiszpańskiego (Maestre i wsp, 1995). Częstość występowania tego allelu w Polsce należy do najniższych w Europie i jest porównywalna z obserwowaną w krajach śródziemnomorskich. Nie stwierdziłam istotnej statystycznie różnicy w częstości tego allelu pomiędzy grupą pacjentów z chA i grupą kontrolną, choć w tej pierwszej była ona nieznacznie niższa (0,030 vs 0,045). Wśród badanych łącznie 200 osób nikt nie posiadał genotypu *APOE* $\epsilon 2/\epsilon 2$. We wcześniejszym badaniu obejmującym również przypadki choroby Alzheimera o wczesnym początku potwierdziłam obecność tego genotypu u dwóch pacjentów pozostających pod opieką Poradni Alzheimerowskiej MSWiA/CMDIK PAN (Styczyńska i wsp, 2001) u których początek choroby przypadał na 52 i 60 lat. U pacjentów tych nie stwierdzono mutacji w genach *preseniliny 1*, *preseniliny 2* i *APP*, co mogłoby wskazywać na istotny udział genotypu *APOE* $\epsilon 2/\epsilon 2$ w patogenezie choroby w tych przypadkach.

Częstość wszystkich trzech alleli *apolipoproteiny E* w badanej przeze mnie grupie pacjentów z chorobą Alzheimera była zgodna z częstością stwierdzaną wśród chorych z Europy Zachodniej i Środkowej, jak również z wynikami wcześniejszych badań przeprowadzonych w Polsce. Można zatem przyjąć, że grupa pacjentów z chA została dobrana właściwie, a wpływ genotypu *apolipoproteiny E* w polskiej populacji jest porównywalny z opisywanym oddziaływaniem tego genu dla rasy kaukaskiej. Tabela 3. (rozdział: Wyniki) przedstawia podsumowanie dotychczasowych badań nad genotypem *apolipoproteiny E* u pacjentów z chorobą Alzheimera w polskiej populacji.

Kolejnym zagadnieniem dyskutowanym w związku z *apolipoproteina E* jest to, czy istotną rolę w patogenezie odgrywa dziedziczony genotyp czy raczej ekspresja tego genu w OUN. Wykazano bowiem, że polimorfizm promotora genu *APOE* w pozycji –491A/T wywiera wpływ na poziom *apolipoproteiny E* w osoczu i w mózgu niezależnie od genotypu *APOE* $\epsilon 4/\epsilon 3/\epsilon 2$, a genotyp –491AA wiąże się z większym ryzykiem rozwoju chA (Bullido i wsp, 1998). W mózgach osób z tym genotypem stwierdzono również wyższy poziom A β 40 i A β 42 (Lambert i wsp, 2001). Do chwili obecnej przeprowadzono wiele badań typu „case-control study” nad polimorfizmem promotora genu *APOE* i uzyskano niejednoznaczne wyniki, w większości negatywne (Song i wsp, 1998; Helisalmi i wsp, 1999; Chen i wsp, 1999). Większość autorów przychyliła się do hipotezy, iż polimorfizm ten nie wywiera istotnego wpływu, natomiast pozostaje w nierównowadze sprzężeń z allelem *APOE* $\epsilon 4$, czym można tłumaczyć częstsze występowanie jednej z form polimorficznych w chorobie Alzheimera. W związku z powyższymi wątpliwościami zrezygnowałam w mojej pracy z oceny rozkładu genotypów –491A/T *apolipoproteiny E*.

Wpływ genotypu *apolipoproteiny E* na przebieg kliniczny choroby Alzheimera

Ze względu na to, iż polimorfizm *apolipoproteiny E* okazał się jedynym (spośród genów badanych w przedstawianej pracy) czynnikiem zwiększającym ryzyko zachorowania na chA, postanowiłam rozszerzyć analizę o ocenę wpływu dziedzicznego genotypu *APOE* na inne parametry oceny przebiegu klinicznego choroby, takie jak: wiek zachorowania, tempo progresji choroby, towarzyszące objawy psychopatologiczne czy współwystępowanie pozagenetycznych czynników ryzyka, do jakich w tej chwili zalicza się m.in. podwyższony poziom homocysteiny. Badania te prowadziłam wspólnie z pozostałymi pracownikami Zakładu Badawczo-Leczniczego Chorób Zwyrodnieniowych CUN IMDiK PAN.

Obecnie przyjmuje się, iż posiadanie allelu *APOE* $\epsilon 4$ zwiększa ryzyko rozwoju chA tylko w określonym przedziale wiekowym – około 60-70 rż, natomiast w późniejszych latach efekt ten jest znacznie słabszy (Juva i wsp, 2000). W badanej przeze mnie grupie średni wiek zachorowania wynosił 71.0 ± 4.6 lat, a ujawniony efekt dziedzicznego genotypu *APOE* na ryzyko rozwoju choroby był bardzo wyraźny ($p < 0,005$). Nie udało się natomiast wykazać istotnego wpływu „dawki” genu (ilości dziedziczonych alleli *APOE* $\epsilon 4$) na wiek zachorowania w badanej grupie, choć widoczna była tendencja w tym kierunku (Wykres 1, rozdział: Wyniki). Wy tłumaczeniem dla tych rezultatów może być duża jednorodność badanej grupy pod względem wieku zachorowania.

Wyniki te wydają się niezwykle ciekawe w świetle niedawno uzyskanego rozkładu genotypów *apolipoproteiny E* u polskich stulatków (Styczyńska i wsp, wyniki nieopublikowane –uzyskane w trakcie realizacji grantu PBZ-KBN-022/PO5/1999 „Genetyczne i środowiskowe czynniki długowieczności polskich stulatków”). Rozkład alleli *APOE* oznaczony u 90 stulatków przedstawia się następująco: *APOE* $\epsilon 4$ – 0,05, $\epsilon 3$ – 0,865 i $\epsilon 2$ – 0,085. Niską częstość występowania allelu *APOE* $\epsilon 4$ można wytłumaczyć nadumieralnością nosicieli tego wariantu (chA, choroby układu krążenia) we wcześniejszym okresie. Co ciekawe jednak, spośród badanych stulatków aż 70% (niezależnie od dziedzicznego genotypu) miało zaburzenia funkcji poznawczych o nasileniu odpowiadającym co najmniej łagodnej fazie procesu otępiennego. Można by poddać dyskusji etiologię otępienia u tych osób, gdyż niemożliwe jest tu pełne zastosowanie kryteriów rozpoznania chA takich jak NINCDS-ADRDA czy DSM-IV (głównie ze względów „technicznych” – trudności z transportem badanych stulatków na badania obrazowe mózgu i ocenę ewentualnych ognisk naczyniowych w OUN). Tak więc można by podejrzewać, że część z tych osób ma np. otępienie naczyniopochodne. Jednak u badanych stulatków bardzo rzadko stwierdzano obecność „naczyniowych” czynników

ryzyka (nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, zaburzenia rytmu serca) czy przebyty udar mózgu. Wszystkie te argumenty przemawiają za zwyrodnieniową (alzheimerowską) etiologią otępienia u najstarszych osób, którego głównym czynnikiem ryzyka jest wiek, a nie dziedziczony genotyp *APOE*.

Kolejnym interesującym zagadnieniem związanym z wiekiem zachorowania, jest wpływ genotypu *APOE* na ryzyko choroby Alzheimera o wczesnym początku (EOAD, <65rż). Obecność allelu *APOE* ϵ 4 nie jest uznanym czynnikiem ryzyka dla tej postaci chA (patrz: rozdział 1.4.4.1). Jednak w badanej przez nas grupie 41 pacjentów z rodzinną chorobą Alzheimera o wczesnym początku tylko u 7 pacjentów zidentyfikowano mutacje w genach *preseniliny 1*, *preseniliny2* lub *APP* (Żekanowski i wsp, 2003) i co ciekawe, żaden z nosicieli mutacji nie posiadał jednocześnie allelu *APOE* ϵ 4 (wszyscy mieli genotyp *APOE* ϵ 3/ ϵ 3). Natomiast u pozostałych 34 osób bez mutacji w wymienionych wyżej genach, allel *APOE* ϵ 4 pojawił się częściej niż w badanej przez nas grupie kontrolnej (0,19 vs 0,10; $p=0,2$; NS). Nawet jeżeli różnica nie była istotna statystycznie ze względu na małą liczebność grupy EOAD, prawie dwukrotnie większa częstość tego allelu w porównaniu do ogólnej populacji może sugerować, iż w części przypadków EOAD (nie posiadających sprawczych mutacji w genach *PSEN1*, *PSEN2*, *APP*) genotyp *APOE* może być czynnikiem ryzyka wpływającym na obniżenie wieku rozwoju chA. Zagadnienie to było zresztą badane odkąd w ogóle powiązano chorobą Alzheimera z genotypem *apolipoproteiny E*, jednak uzyskiwane wyniki były niejednoznaczne i zależne od wielkości grupy i częstości innych zidentyfikowanych mutacji (Van Broeckhoven i wsp, 1994; St Clair i wsp, 1995; Okuizumi i wsp, 1994). Podobnie w pracy polskiej, obejmującej 25 pacjentów z EOAD nie udało się potwierdzić wpływu genotypu *APOE* na ryzyko rozwoju chA o wczesnym początku (Kowalska i wsp, 1998b).

Również sprzeczne są doniesienia na temat tempa progresji chA u nosicieli allelu *APOE* $\epsilon 4$. Można by przypuszczać iż większe nasilenie procesu patologicznego u tych osób będzie się wiązać z szybszym postępem otępienia. W kilku prospektywnych badaniach, obejmujących osoby zdrowe, lub z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi (będących być może w przedklinicznej fazie choroby), stwierdzano bardziej nasilone zaburzenia badanych funkcji poznawczych u nosicieli jednego lub dwu alleli *APOE* $\epsilon 4$ (Petersen i wsp, 1995; Evans i wsp, 1997; Jonker i wsp, 1998). Zaskakujące jest jednak, że niewielu autorom udało się tę hipotezę potwierdzić u osób z objawową chorobą Alzheimera (Koivisto i wsp, 1995; Craft i wsp, 1998). W większości badań nie stwierdzono istotnego związku pomiędzy genotypem *APOE*, a tempem narastania otępienia (Gomez-Isla i wsp, 1996; Growdon i wsp, 1996), lub przeciwnie, okazało się iż obecność allelu *APOE* $\epsilon 4$ wiąże się z wolniejszym przebiegiem choroby (Frisoni i wsp, 1995; Stern i wsp, 1997). W naszej pracy analizowaliśmy podgrupę 86 chorych z oznaczonym genotypem *apolipoproteiny E*, u których tempo progresji choroby wyrażone było zmianą punktacji w skalach MMSE i GDS na początku badania oraz po 12 i 24 miesiącach obserwacji (Pfeffer i wsp, 2001). Gdy pacjenci zostali podzieleni pod względem obecności co najmniej jednego allelu *APOE* $\epsilon 4$ (tj: $\epsilon 4+$ i $\epsilon 4-$) okazało się, iż po 24 miesiącach choroba rozwijała się wolniej u nosicieli tego allelu, a efekt ten był widoczny u kobiet już po roku obserwacji (różnice istotne statystycznie stwierdzono dla oceny w skali MMSE).

Obserwacje te stały się podstawą wysunięcia hipotezy (Corder i wsp, 1995), że w chA istnieją dwa różne mechanizmy patofizjologiczne: prowadzący do wystąpienia choroby oraz determinujący jej przebieg kliniczny. Wydaje się, iż genotyp *APOE* wpływa tylko na pierwszy z nich i może mieć związek ze skróceniem okresu przedklinicznego

chA. Nie wywiera on natomiast istotnego wpływu na szybkość narastania zaburzeń poznawczych od momentu wystąpienia otępienia.

Kolejnych argumentów potwierdzających tę tezę dostarczyły prowadzone przez nas badania zależności nasilenia zaniku przyśrodkowych części płatów skroniowych (a zwłaszcza formacji hipokampa) w zależności od obecności allelu *APOE* ϵ 4 (Gołębiowski i wsp, 2001). Stopień atrofii tych struktur uważany jest za jeden z markerów zaawansowania procesu otępiennego. Badaniem objęto podgrupę 60 pacjentów o podobnym czasie trwania choroby i wieku zachorowania (w tym 30 osób posiadających co najmniej jeden allel *APOE* ϵ 4 i 30 osób nie posiadających tego allelu). Stopień zaniku hipokampa oceniany był pośrednio za pomocą oceny szerokości bocznej części szczeliny poprzecznej i minimalnej szerokości przyśrodkowej części płata skroniowego. Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w nasileniu zaniku mózgu w zależności od obecności *APOE* ϵ 4. Wyniki te były zgodne z rezultatami uzyskanymi przez dwóch innych autorów (Jack i wsp, 1998b; Yamaguchi i wsp, 1996) i mogą sugerować, iż tempo zaniku OUN w chA nie jest zależne od genotypu *APOE*.

Również występowanie zaburzeń nastroju i objawów psychotycznych w przebiegu choroby Alzheimera wydaje się być niezależne od obecności allelu *APOE* ϵ 4 (Levy i wsp, 1999; Mauricio i wsp, 2000; Forsell i wsp, 1998). Pojedyncze badania wskazywały na związek wymienionych objawów z genotypem *APOE*, a ich wyniki były niejednoznaczne: wykazywały zwiększone ryzyko objawów psychotycznych u osób posiadających genotyp *APOE* ϵ 3/ ϵ 3 (Cacabelos i wsp, 1998) lub przeciwnie u nosicieli allelu *APOE* ϵ 4 (Zubenko i wsp, 1996). Natomiast badanie Holmes'a (1998) wykazało istotny związek pomiędzy wystąpieniem depresji w przebiegu chA z obecnością allelu *APOE* ϵ 2. W badaniu przeprowadzonym na przedstawianej grupie pacjentów z chA nie stwierdzono zależności pomiędzy genotypem *APOE* a występowaniem depresji, omamów,

urojeń, agresji i niepokoju (Gabryelewicz i wsp, 2002). Wystąpienie tych objawów korelowało natomiast z zaawansowaniem otępienia lub poziomem wykształcenia.

Interesującym zagadnieniem jest też współdział czynników genetycznych i środowiskowych w patogenezie chA. W 2002 roku przeanalizowano zależność stężenia homocysteiny w osoczu i ryzyka rozwoju choroby Alzheimera u 1092 uczestników trwającego od 25 lat badania *The Framingham Study* (Seshadri i wsp, 2002). Okazało się wówczas, iż hiperhomocysteinemia jest silnym, niezależnym czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia otępienia, w tym chA. Postulowane mechanizmy działania homocysteiny to zarówno miażdżycogeny wpływ na naczynia, jak i działanie neurotoksyczne. W naszym badaniu analizowaliśmy wpływ stężenia homocysteiny w osoczu i genotypu *APOE* na ryzyko rozwoju chA, by ocenić czy łączne działanie dwóch niekorzystnych czynników (genetycznego i dietetycznego) ma działanie synergistyczne większe od prostej sumy dwóch składowych (Religa i wsp, 2003). Analiza ta wykazała, iż oba te czynniki silnie, ale w sposób niezależny korelowały z ryzykiem chA. Nie udało się więc potwierdzić roboczej hipotezy, że nosiciele allelu *APOE* $\epsilon 4$ są bardziej wrażliwi na neurotoksyczne działanie hiperhomocysteinemii.

Ocena znaczenia polimorfizmu $\alpha 2$ makroglobuliny, katepsyny D, mieloperoksydazy i syntazy tlenku azotu w patogenezie choroby Alzheimera

W piśmiennictwie zamieszczonym w bazie MEDLINE nie znalazłam żadnej polskiej publikacji dotyczącej genotypowania wymienionych powyżej polimorfizmów czterech genów w chorobie Alzheimera, dlatego w dalszym fragmencie dyskusji opieram się wyłącznie na danych z literatury światowej (w tym dla populacji europejskich).

α 2makroglobulina

Uzyskane przeze mnie wyniki genotypowania *α 2makroglobuliny* nie wykazały istotnej statystycznie różnicy częstości występowania zmutowanego allelu *α 2M -Val* ani genotypu *α 2M -Val/Val* u osób ze sporadyczną postacią choroby Alzheimera o późnym początku. Wskazuje to na brak wpływu polimorfizmu *α 2M*Ile1000Val* na ryzyko zachorowania na tę chorobę w badanej populacji. Wyniki te są sprzeczne z rezultatami wcześniejszych badań przeprowadzonych przez Liao, który wykazał istotnie częstsze występowanie allelu *α 2M- Val* w chA (Liao i wsp, 1998). Potwierdzeniem roli tego polimorfizmu było także (wg Liao) nasilone odkładanie złogów β -amyloidu w mózgach pacjentów posiadających zmutowany allel.

Związku pomiędzy tym polimorfizmem genu *α 2M*, a chorobą Alzheimera nie stwierdziły również inne grupy badaczy (Crawford i wsp, 1999; Gibson i wsp, 2000). Można by przypuszczać, iż przyczyną niepowodzenia była zbyt mała liczebność badanych grup, gdyż zgodnie z sugestią Liao, dla wykazania wpływu tego polimorfizmu analiza powinna objąć co najmniej 500 osób. Jednakże badanie oparte na badaniu ponad 1200 chorych i 1400 -osobowej grupy kontrolnej także nie potwierdziło pierwotnej hipotezy (Wavrant-De Vrieze i wsp, 1999). W 2000 roku opublikowano wyniki metaanalizy obejmującej 2457 chorych z której wynika, że polimorfizm *α 2M*Ile1000Val* nie wpływa na ryzyko zachorowania na chorobę Alzheimera o późnym początku, może natomiast odgrywać niewielką rolę w przypadkach choroby o wczesnym początku (<65 rż) (Koster i wsp, 2000). Dopiero w 2002 roku ukazała się pierwsza praca potwierdzająca wpływ polimorfizmu *α 2M*Ile1000Val* w populacji włoskiej (Zappia i wsp, 2002). Obecność genotypu *α 2M-Val/Val* wiązała się z ponad trzykrotnym wzrostem ryzyka rozwoju chA. Tak dużą różnicę pomiędzy wcześniejszymi badaniami a wynikami Zappia i wsp, należy tłumaczyć istotnymi różnicami etnicznymi (także rozkład genotypów *APOE* w krajach

śródziemnomorskich różni się od rozkładu w krajach Europy Zachodniej czy Północnej). Również w 2002 roku opublikowano wyniki badania prowadzonego na populacji chińskiej (Tang i wsp, 2002), które także potwierdziły istotny wpływ polimorfizmu $\alpha 2M^*Ile1000Val$, choć był on silniej wyrażony w grupie pacjentów o wczesnym początku choroby.

Drugim badaniem przez wiele grup polimorfizmem $\alpha 2$ makroglobuliny jest pięcionukleotydowa delecja w eksonie 18 ($\alpha 2-M^*1/2$). Jej wpływ na ryzyko chA został opisany pierwotnie przez Blacker, w oparciu o badanie rodzeństw pacjentów (Blacker i wsp, 1998). W żadnym z późniejszych badań typu „case-control study” nie udało się potwierdzić wpływu tego polimorfizmu. Wyniki takie uzyskiwano niezależnie od rasy do której należała badana grupa (Chen i wsp, 1999; Dow i wsp, 1999; Rogaeva i wsp, 1999). Jedynie w badaniach opartych o analizę rodzin pacjentów potwierdzono zależność pomiędzy genotypem $\alpha 2M^*2/2$ a chorobą Alzheimera, choć była ona słabsza niż pierwotnie stwierdzona przez Blacker i wsp, (Rudrasingham i wsp, 1999; Romas i wsp, 2000). Ponieważ wpływ polimorfizmu eksonu 18 (o ile istnieje) ogranicza się najprawdopodobniej do przypadków rodzinnych, a nie ujawnił się dotychczas w badaniach populacyjnych, zrezygnowałam z oznaczania genotypu $\alpha 2M^*1/2$ w mojej pracy (z założenia dotyczyła ona przypadków sporadycznych). Dodatkowych argumentów przeciwko temu polimorfizmowi dostarczają wyniki korelacji genotypowo-fenotypowej (Birkenmeier i wsp, 2003; Blennow i wsp, 2000). Sugerują one, iż polimorfizm eksonu 18 nie jest polimorfizmem funkcjonalnym i nie wpływa na stężenie $\alpha 2$ -makroglobuliny w osoczu i ekspresję tego białka mózgu.

Biorąc pod uwagę przytoczone powyżej dane można by przyjąć, iż polimorfizmy te nie wywierają istotnego wpływu i zaprzestać dalszych badań. A jednak tak się nie stało. Naukowcy nadal próbują wyjaśnić znaczenie $\alpha 2$ makroglobuliny w patogenezie chA.

Skloniły ich do tego przede wszystkim wyniki kolejnych badań sprzężeń wskazujące na region chromosomu 12 zawierający gen $\alpha 2M$ oraz biologiczna funkcja białka kodowanego przez ten gen. Jednocześnie trwają więc badania nad nowymi polimorfizmami w obrębie genu $\alpha 2$ makroglobuliny (Saunders i wsp, 2003) jak i nad ekspresją tego genu.

Katepsyna D

Przeprowadzone przeze mnie badania nad rozkładem genotypów i alleli *katepsyny D* nie wykazały różnic pomiędzy badanymi grupami, co świadczy o braku oddziaływania tego genu na ryzyko choroby Alzheimera w naszej populacji. Odkąd w 1999 roku Papassotiropoulos wykazał w badaniu pilotażowym silny związek pomiędzy genotypem *katepsyny D* i ryzykiem rozwoju chA, a następnie potwierdził te wyniki w kolejnym badaniu prowadzonym na niemieckiej populacji (Papassotiropoulos i wsp, 2000), ukazało się kilkanaście publikacji przedstawiających wyniki badań na różnych populacjach (Bhojak i wsp, 2000; Bertram i wsp, 2001; Mateo i wsp, 2002; Bagnoli i wsp, 2002). Żadne z nich, podobnie jak moje badania, nie wykazało istotnej różnicy pomiędzy częstościami alleli *catD* C/T. Jedynie w badaniu Crawford odnotowano niewielką nadreprezentację allelu T u pacjentów należących do rasy kaukaskiej, natomiast u chorych pochodzenia hiszpańskiego allel C wiązał się ze zwiększonym ryzykiem chA (Crawford i wsp, 2000b). W ostatnim okresie (2004 rok) ukazała się metaanaliza dotychczasowych badań nad polimorfizmem *katepsyny D* przeprowadzonych na różnych populacjach (uwzględniająca również przedstawiane wyniki polskie) obejmująca łącznie 3174 przypadków chA i 3298 osób z grupy kontrolnej (Ntais i wsp, 2004). W podsumowaniu wyników autorzy stwierdzili, iż polimorfizm *katepsyny D* nie jest istotnym samodzielnym czynnikiem ryzyka chA, natomiast prawdopodobnie wzmacnia nieznacznie efekt działania allelu *APOE* $\epsilon 4$, zwiększając szansę zachorowania u nosicieli tego allelu z OR=4.09

na $OR=6,07$ (OR , ang. odds ratio).

Mieloperoksydaza

Analiza częstości form polimorficznych -463 G/A w obrębie promotora genu *mieloperoksydazy* (*MPO*) również nie przyniosła potwierdzenia pierwotnej hipotezy o roli tego polimorfizmu w patogenezie chA w badanej polskiej populacji. Niejednoznaczne wyniki analogicznych badań z piśmiennictwa światowego sugerują, iż w przypadku tego genu wyraźne znaczenie odgrywają różnice etniczne, jak również płeć badanych osób. Pierwsze doniesienie na temat tego polimorfizmu wskazywało na istotną nadreprezentację genotypu G/G u kobiet z chA (Reynolds i wsp, 1999). Badanie to zostało przeprowadzone wśród mieszkańców Kaliforni, USA. Gdy ten sam autor analizował częstość alleli w populacji fińskiej, okazało się, iż w tym przypadku istotniejszą rolę odgrywa allel A, dodatkowo wpływ ten widoczny był tylko u mężczyzn (Reynolds i wsp, 2000). Badanie to wykazało także istnienie synergistycznego oddziaływania allelu *APOE* $\epsilon 4$ i allelu *MPO* A, które zwiększało ryzyko rozwoju choroby z $OR=3.0$ (działanie *APOE* $\epsilon 4$) do $OR = 11.4$ (jednoczesny wpływ obu alleli). Crawford potwierdziła natomiast istotny wpływ genotypu *MPO* G/G na ryzyko rozwoju chA u mieszkańców Florydy należących do rasy kaukaskiej, jednak wpływu tego nie obserwowała u osób pochodzenia hiszpańskiego (Crawford i wsp, 2001). Również w innym badaniu przeprowadzonym w Hiszpanii nie potwierdzono związku chA z polimorfizmem genu *mieloperoksydazy* (Combarros i wsp, 2002). Istotny wpływ tego polimorfizmu oraz jego interakcję z genem $\alpha 2$ makroglobuliny wykazał natomiast Zappia badając populację włoską (Zappia i wsp, 2004). Powyższe dane wyraźnie pokazują, jak duży wpływ na związek czynnika genetycznego i ryzyka rozwoju choroby wywierają różnice etniczne, co mogło być również przyczyną braku dodatniej asocjacji w badanych przeze mnie grupach.

Syntaza tlenku azotu

Ostatnim z badanych polimorfizmów był polimorfizm genu *syntazy tlenku azotu* (gen *NOS3*). Mimo mocnych podstaw teoretycznych uzasadniających udział tego genu w patogenezie chA (wpływ na stres oksydacyjny) i wcześniejszych pozytywnych wyników asocjacji z tą chorobą (Dahiyat i wsp, 1999) nie udało mi się wykazać jego istotnego wpływu w badanej populacji. Jak dotąd żadna z grup badających ten polimorfizm nie potwierdziła jego znaczenia w chA (Crawford i wsp, 2000a; Tedde i wsp, 2001; Sanchez-Guera i wsp, 2001), co pozwala przypuszczać, iż nie odgrywa on istotnej roli w tym schorzeniu.

Porównanie istotności wpływu polimorfizmu apolipoproteiny E z siłą oddziaływania pozostałych czterech genów

Przedstawione wyniki badań upoważniają do stwierdzenia, iż polimorfizm *apolipoproteiny E* jest znacznie silniejszym czynnikiem genetycznym zwiększającym ryzyko chA w porównaniu do pozostałych badanych polimorfizmów. Jedynie dla tego genu udało się wykazać istotność statystyczną ($p < 0.005$). Żaden spośród pozostałych badanych genów: $\alpha 2$ makroglobuliny, *katepsyny D*, *mieloperoksydazy* i *syntazy tlenku azotu* nie ujawnił w analizowanej przeze mnie grupie istotnego statystycznie oddziaływania, natomiast w literaturze światowej niejednoznaczne wyniki uzyskano tylko dla genów $\alpha 2$ makroglobuliny i *mieloperoksydazy*. Wyniki analiz polimorfizmu *katepsyny D* i *syntazy tlenku azotu* można uznać za jednoznacznie negatywne. Ponieważ w moim badaniu nie potwierdziłam pierwotnie opisywanych dla tych genów dodatnich asocjacji z ryzykiem chA, można by poddać w wątpliwość, czy badane grupy były odpowiednio dobrane. Jednak zgodność rozkładu genotypów *apolipoproteiny E* dla grupy chorych na chA i grupy kontrolnej w moim badaniu z wynikami uzyskanymi w wielu krajach

europejskich wskazuje, iż grupy te zostały dobrane prawidłowo. Fakt ten dodatkowo działa na „korzyść” polimorfizmu *apolipoproteiny E* jako najsilniejszego czynnika ryzyka w późnych, sporadycznych przypadkach chA. Również metoda statystyczna zastosowana do porównania rozkładu genotypów i alleli w obu grupach (test CHI-kwadrat) nie mogła być przyczyną błędnej interpretacji wyników, gdyż dla grup liczących 100 osób charakteryzuje się ona zadowalającą mocą statystyczną i jest standardową metodą analizy w tego typu badaniach.

Łączna ocena wpływu genotypu *apolipoproteiny E* z polimorfizmem pozostałych badanych genów (analiza par genów) oraz jednoczesna analiza wpływu pięciu badanych polimorfizmów genetycznych

Analiza oddziaływania par genów, ze szczególnym uwzględnieniem ewentualnego wzmacniającego efektu genów $\alpha 2$ makroglobuliny, *katepsyny D*, *mieloperoksydazy* i *syntazy tlenku azotu* na ryzyko chA związane z obecnością allelu *APOE* $\epsilon 4$ nie wykazała jakiegokolwiek działania synergistycznego wymienionych polimorfizmów genetycznych. W każdym przypadku ryzyko chA było takie, jak przy oddziaływaniu samego allelu *APOE* $\epsilon 4$. Wynik ten nie jest zgodny z oczekiwaniami, gdyż w przypadku chA (zaliczanej do chorób złożonych) należałoby się spodziewać jednoczesnego wpływu kilku czynników genetycznych. Oczywiście można podejrzewać, iż wybór badanych polimorfizmów genetycznych był błędny. Jednak dokonano go w oparciu zarówno o wyniki badań sprzężeń genetycznych ($\alpha 2$ makroglobulina) jak i przesłanek dotyczących patogenezy choroby (*katepsyna D*, *mieloperoksydaza* i *syntaza tlenku azotu*), wybierając polimorfizmy uzyskujące w piśmiennictwie najlepsze wyniki statystyczne. Dodatkowo w literaturze opisywane jest synergistyczne działanie wariantów polimorficznych $\alpha 2$ makroglobuliny,

katepsyny D i mieloperoksydazy z apolipoproteiną E (Ntais i wsp, 2004; Reynolds i wsp, 2000; Zappia i wsp, 2004).

Jednoczesna analiza wszystkich pięciu polimorfizmów również nie wykazała różnic większych niż przy analizie samego genu *APOE*. Jednak w tym przypadku można podejrzewać, iż bardzo niewielki wpływ genów mógł zostać przeoczony ze względu na liczebność grupy i cechy zastosowanej metody statystycznej, czyli wieloczynnikowej analizy regresji. Przy liczebności obu grup po 100 osób nie uzyskano wszystkich możliwych kombinacji genotypów pięciu genów, w związku z czym w analizie pojawiły się „puste pola” mogące wpłynąć na ostateczny wynik. Jednak aby uniknąć obecności „pustych pól” i uzyskać wysoką moc statystyczną analizy regresji, wielkość próby musiałaby wynosić około 400-500 osób w każdej grupie. Takie rozszerzenie badania wiązałoby się ze znacznym wzrostem jego kosztów (łącznie 5000 oznaczeń genetycznych przy badanych pięciu genach). A można z dużym prawdopodobieństwem założyć, że jeśli w teście CHI-kwadrat nie ma żadnych różnic w rozkładzie genotypów w obu badanych grupach, to wpływ jednoczesnego działania takich genów będzie co najwyżej bardzo słaby, co i tak nie miałoby żadnych implikacji w praktyce klinicznej.

Szacunkowa ocena przydatności oznaczania genotypów badanych genów w diagnostyce klinicznej choroby Alzheimera oraz w poradnictwie genetycznym

Częstość występowania poszczególnych alleli *apolipoproteiny E* zarówno w grupie pacjentów z chA jak i w grupie kontrolnej jest zgodna z rozkładem obserwowanym w populacji kaukaskiej. W związku z tym można założyć, iż przyjęte powszechnie wytyczne postępowania jak i ocena przydatności genotypowania *APOE* odnoszą się również do polskiej populacji. Ponieważ obecność allelu $\epsilon 4$ nie jest czynnikiem koniecznym ani wystarczającym, by rozwinęła się chA, w 1996 roku z inicjatywy *National*

Institute of Aging opracowano oficjalne stanowisko dotyczące tego zagadnienia (National Institute of Aging/ Alzheimers Association Working Group, 1996) Mówi ono, iż nie należy wykonywać oznaczenia genotypu *APOE* u osób bezobjawowych; test ten jest tylko badaniem pomocniczym w diagnostyce chA i nie może być traktowany jako główne narzędzie diagnostyczne.

Czułość i swoistość tego testu wynosi odpowiednio 65% i 68% i jest znacznie niższa od czułości diagnostyki klinicznej opartej o uznane kryteria (Mayeux i wsp, 1998). Z tego względu genotypowanie *APOE* nie powinno być stosowane w poradnictwie genetycznym.

Podobnie stanowisko przedstawione zostało w monografii „Evidence-based dementia practice” (pod redakcją: Quizilbash N, Blackwell Science, 2001). W rozdziale poświęconym poradnictwu genetycznemu autorka pisze, iż 95% pacjentów z chA nie wymaga takiej porady, gdyż jak dotąd nieznany jest genetyczny czynnik sprawczy leżący u podłoża tych zachorowań (Sadovnick, 2001). Nie zaleca się też wykonywania oznaczenia genotypu *APOE* u osób bezobjawowych. W przypadkach chA o późnym początku i niewątpliwym dziedziczeniu autosomalnym dominującym (określanym jako wystąpienie chA u co najmniej 3 członków rodziny w co najmniej dwóch pokoleniach), mimo iż nieznany jest gen sprawczy, zalecane jest zgromadzenie dostępnej dokumentacji (rodowód rodziny, karty informacyjne z przebiegu leczenia członków rodziny dotkniętych chorobą, wyniki sekcji mózgu) oraz bankowanie DNA od żyjących członków rodziny.

Na podstawie uzyskanych w przedstawianej pracy wyników można przyjąć, iż oznaczanie form polimorficznych genów $\alpha 2$ makroglobuliny, katepsyny D, mieloperoksydazy i syntazy tlenku azotu również nie ma zastosowania w diagnostyce klinicznej.

6. WNIOSKI

Przedstawione w pracy wyniki pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

1. Częstość występowania allelu *APOE* ε4 jest istotnie wyższa w grupie pacjentów z chorobą Alzheimera w porównaniu do grupy kontrolnej, co uzasadnia traktowanie tego allelu jako genetycznego czynnika ryzyka rozwoju choroby Alzheimera. Polimorfizmy genów *α2makroglobuliny*, *katepsyny D*, *mieloperoksydazy* i *syntazy tlenku azotu* nie są czynnikami ryzyka rozwoju choroby Alzheimera w badanej grupie. Jednoczesna analiza oddziaływania pięciu polimorfizmów genetycznych wykazała, iż wpływ ten jest tożsamy z wpływem samego genotypu *apolipoproteiny E*.
2. Rozkład częstości występowania alleli genu *apolipoproteiny E* w populacji polskiej jest zgodny z opisywanym w literaturze rozkładem dla populacji kaukaskiej.
3. Badanie potwierdziło ograniczoną przydatność oznaczania genotypu *apolipoproteiny E* w diagnostyce klinicznej (dziedziczenie allelu *APOE* ε4 nie jest warunkiem koniecznym ani wystarczającym, by rozwinęła się choroba), jak również brak znaczenia tego badania w poradnictwie genetycznym. Badanie polimorfizmów *α2makroglobuliny*, *katepsyny D*, *mieloperoksydazy* i *syntazy tlenku azotu* nie jest uzasadnione w praktyce klinicznej.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Abraham R, Myers A, Wavrant-DeVrieze F, Hamshire ML, Thomas HV, Marshall H, Compton D, Spurlock G, Turic D, Hoogendoorn B, Kwon JM, Petersen RC, Tangalos E, Norton J, Morris JC, Bullock R, Liolitsa D, Lovestone S, Hardy J, Goate A, O'Donovan M, Williams J, Owen MJ, Jones L. Substantial linkage disequilibrium across the insulin-degrading enzyme locus but no association with late-onset Alzheimer's disease. *Hum Genet.* 2001; 109: 646-52.
2. Akama KT, Albanese C, Pestell RG, Van Eldik LJ. Akama KT, Albanese C, Pestell RG, Van Eldik LJ. Amyloid beta-peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NFkappaB-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 5795-800.
3. Alvarez G, Munoz-Montano JR, Satrustegui J, Avila J, Bogonez E, Diaz-Nido J. Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett.* 1999; 453: 260-4.
4. Alzheimer A. Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiat. Med.* 1907; 64: 146-148.
5. American Psychiatric Association, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, wyd.IV, 1994
6. Amouyel P, Richard F, Cottel D, Amant C, Codron V, Helbecque N. The deletion allele of the angiotensin I converting enzyme gene as a genetic susceptibility factor for cognitive impairment. *Neurosci Lett.* 1996; 217: 203-5.
7. Ancolio K, Dumanchin C, Barelli H, Warter JM, Brice A, Campion D, Frebourg T, Checler F. Unusual phenotypic alteration of beta amyloid precursor protein (betaAPP) maturation by a new Val-715 --> Met betaAPP-770 mutation responsible for probable early-onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 4119-24.
8. Ashford JW, Mortimer JA. Non-familial Alzheimer's disease is mainly due to genetic factors. *J Alzheimers Dis.* 2002; 4: 169-77.
9. Bachman DL, Wolf PA, Linn R, Knoefel JE, Cobb J, Belanger A, D'Agostino RB, White LR. Prevalence of dementia and probable senile dementia of the Alzheimer type in the Framingham Study. *Neurology.* 1992; 42: 115-9.
10. Bagnoli S, Nacmias B, Tedde A, Guarnieri BM, Cellini E, Ciantelli M, Petruzzini C, Bartoli A, Ortenzi L, Serio A, Sorbi S. Cathepsin D polymorphism in Italian

- sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2002; 328: 273-6.
11. Bartus RT, Dean RL 3rd, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*. 1982; 217: 408-14.
 12. Bartzokis G. Age-related myelin breakdown: a developmental model of cognitive decline and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2004; 25: 5-18.
 13. Becker JT, Boller F, Lopez OL, Saxton J, McGonigle KL. The natural history of Alzheimer's disease. Description of study cohort and accuracy of diagnosis. *Arch Neurol*. 1994; 51: 585-94.
 14. Bednarska-Makaruk M, Broda G, Kurjata P, Rodo M, Roszczyńko M, Rywik S, Wehr H. Apolipoprotein E genotype, lipid levels and coronary heart disease in a Polish population group. *Eur J Epidemiol*. 2001; 17: 789-92.
 15. Bennett BD, Babu-Khan S, Loeloff R, Louis JC, Curran E, Citron M, Vassar R. Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J Biol Chem*. 2000; 275: 20647-51.
 16. Bergem AL, Engedal K, Kringlen E. The role of heredity in late-onset Alzheimer disease and vascular dementia. A twin study. *Arch Gen Psychiatry*. 1997; 54: 264-70.
 17. Bertram L, Blacker D, Mullin K, Keeney D, Jones J, Basu S, Yhu S, McInnis MG, Go RC, Vekrellis K, Selkoe DJ, Saunders AJ, Tanzi RE. Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science*. 2000; 290: 2302-3.
 18. Bertram L, Guenette S, Jones J. i wsp, No Evidence for Genetic Association or Linkage of Cathepsin D (CTSD) Exon 2 Polymorphism and Alzheimer's Disease. *Ann Neurol*. 2001; 49: 114-116.
 19. Bhojak T, Dekosky S, Ganguli M, I wsp, Genetic polymorphisms in the cathepsin D and interleukin -6 genes and the risk of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2000; 288: 21-24.
 20. Bi X, Haque TS, Zhou J, Skillman AG, Lin B, Lee CE, Kuntz ID, Ellman JA, Lynch G. Novel cathepsin D inhibitors block the formation of hyperphosphorylated tau fragments in hippocampus. *J Neurochem*. 2000; 74: 1469-77.
 21. Bird TD, Levy-Lahad E, Poorkaj P, Sharma V, Nemens E, Lahad A, Lampe TH, Schellenberg GD. Wide range in age of onset for chromosome 1-related familial Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1996; 40: 932-6.
 22. Birkenmeier G, Muller R, Huse K, Forberg J, Glaser C, Hedrich H, Nicklisch S, Reichenbach A. Human alpha2-macroglobulin: genotype-phenotype relation. *Exp*

- Neurol. 2003; 184: 153-61.
23. Blacker D, Haines JL, Rodes L, Terwedow H, Go RC, Harrell LE, Perry RT, Bassett SS, Chase G, Meyers D, Albert MS, Tanzi R. ApoE-4 and age at onset of Alzheimer's disease: the NIMH genetics initiative. *Neurology*. 1997; 48: 139-47.
 24. Blacker D, Wilcox MA, Laird NM, Rodes L, Horvath SM, Go RC, Perry R, Watson B Jr, Bassett SS, McInnis MG, Albert MS, Hyman BT, Tanzi RE. Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet*. 1998; 19: 357-60.
 25. Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2003; 2: 605-13.
 26. Blennow K, Ricksten A, Prince JA, Brookes AJ, Emahazion T, Wasslavik C, Bogdanovic N, Andreasen N, Batsman S, Marcusson J, Nagga K, Wallin A, Regland B, Olofsson H, Hesse C, Davidsson P, Minthon L, Jansson A, Palmqvist L, Rymo L. No association between the alpha2-macroglobulin (A2M) deletion and Alzheimer's disease, and no change in A2M mRNA, protein, or protein expression. *J Neural Transm*. 2000; 107: 1065-79.
 27. Borroni B, Colciaghi F, Lenzi GL, Caimi L, Cattabeni F, Di Luca M, Padovani A. High cholesterol affects platelet APP processing in controls and in AD patients. *Neurobiol Aging*. 2003; 24: 631-6.
 28. Bowen DM, Smith CB, White P, Davison AN. Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain*. 1976; 99: 459-96.
 29. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1991; 82: 239-59.
 30. Bullido MJ, Artiga MJ, Recuero M, Sastre I, Garcia MA, Aldudo J, Lendon C, Han SW, Morris JC, Frank A, Vazquez J, Goate A, Valdivieso F. A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nat Genet*. 1998; 18: 69-71.
 31. Busse A, Bischkopf J, Riedel-Heller SG, Angermeyer MC. Subclassifications for mild cognitive impairment: prevalence and predictive validity. *Psychol Med*. 2003; 33: 1029-38.
 32. Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, Castner BJ, Cerretti DP, Black RA. Evidence that tumor necrosis factor alpha

- converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem.* 1998; 273: 27765-7.
33. Cacabelos R, Rodriguez B, Carrera C, Beyer K, Lao JI, Sellers MA. Behavioral changes associated with different apolipoprotein E genotypes in dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1997; 11, Suppl 4: S 27-34.
 34. Cariolou MA, Kokkofitou A, Manoli P, Christou S, Karagrigoriou A, Middleton L. Underexpression of the apolipoprotein E2 and E4 alleles in the Greek Cypriot population of Cyprus. *Genet Epidemiol.* 1995; 12: 489-97.
 35. Chapman J, Estupinan J, Asherow A, i wsp, A simple and efficient method for apolipoprotein E genotype determination. *Neurology* 1996; 46: 1484-1485.
 36. Chen L, Baum L, Ng HK, Chan LY, Sastre I, Artiga MJ, Valdivieso F, Bullido MJ, Chiu HF, Pang CP. Apolipoprotein E promoter and alpha2-macroglobulin polymorphisms are not genetically associated with Chinese late onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 1999; 269: 173-7.
 37. Chevallier N, Vizzavona J, Marambaud P, Baur CP, Spillantini M, Fulcrand P, Martinez J, Goedert M, Vincent JP, Checler F. Cathepsin D displays in vitro beta-secretase-like specificity. *Brain Res.* 1997; 750: 11-9.
 38. Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, Johnson-Wood K, Lee M, Seubert P, Davis A, Kholodenko D, Motter R, Sherrington R, Perry B, Yao H, Strome R, Lieberburg I, Rommens J, Kim S, Schenk D, Fraser P, St George Hyslop P, Selkoe DJ. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med.* 1997; 3: 67-72.
 39. Combarros O, Infante J, Llorca J, i wsp, J. The myeloperoxidase gene in Alzheimer's disease: a case-control study and meta-analysis. *Neurosci Lett.* 2002; 326: 33-36.
 40. Corbo RM, Scacchi R, Mureddu L, Mulas G, Alfano G. Apolipoprotein E polymorphism in Italy investigated in native plasma by a simple polyacrylamide gel isoelectric focusing technique. Comparison with frequency data of other European populations. *Ann Hum Genet.* 1995; 59: 197-209.
 41. Corbo RM, Scacchi R. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a 'thrifty' allele? *Ann Hum Genet.* 1999; 63: 301-10. (a)
 42. Corbo RM, Scacchi R, Mureddu L, Mulas G, Castrechini S, Rivasi AP.; Apolipoprotein B, apolipoprotein E, and angiotensin-converting enzyme

- polymorphisms in 2 Italian populations at different risk for coronary artery disease and comparison of allele frequencies among European populations. *Hum Biol.* 1999; 71: 933-45. (b)
43. Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC Jr, Rimmeler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmader KE I wsp, Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet.* 1994; 7: 180-4.
 44. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ et al. The apolipoprotein E E4 allele and sex-specific risk of Alzheimer's disease. *JAMA* 1995, 273: 373-374.
 45. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 1993; 261: 921-3.
 46. Cousin E, Hannequin D, Mace S, Dubois B, Ricard S, Genin E, Brun C, Chansac C, Pradier L, Frebourg T, Brice A, Campion D, Deleuze JF. No replication of the association between the Nicastrin gene and familial early-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2003; 353: 153-5.
 47. Craft S, Teri L, Edland SD, Kukull WA, Schellenberg G, McCormick WC, Bowen JD, Larson EB. Accelerated decline in apolipoprotein E-epsilon4 homozygotes with Alzheimer's disease. *Neurology.* 1998; 51: 149-53.
 48. Crawford F, Freeman M, Abdullah L, i wsp, No association between the NOS3 codon 298 polymorphism and Alzheimer's disease in a sample from the United States. *Ann Neurol.* 2000; 47: 687. (a)
 49. Crawford F, Freeman MJ, Schinka J, i wsp, The genetic association between cathepsin D and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2000; 289: 61-65. (b)
 50. Crawford F, Town T, Freeman MJ, I wsp, The alpha-2 macroglobulin gene is not associated with Alzheimer's disease in case-control sample. *Neurosci Lett.* 1999; 270: 133-136.
 51. Crawford FC, Freeman MJ, Schinka JA, Morris MD, Abdullah LI, Richards D, Sevush S, Duara R, Mullan MJ. Association between Alzheimer's disease and a functional polymorphism in the Myeloperoxidase gene. *Exp Neurol.* 2001; 167: 456-9.
 52. 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; 7: 43-51.
53. Cummings JL. Mini-Mental State Examination. Norms, normals, and numbers. *JAMA.* 1993; 269: 2420-1.
54. Dahiyat M, Cumming A, Harrington C, Wischik C, Xuereb J, Corrigan F, Breen G, Shaw D, St Clair D. Association between Alzheimer's disease and the NOS3 gene. *Ann Neurol.* 1999 ; 46: 664-7.
55. Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB Jr, Baker LK, Krafft GA, LaDu MJ. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem.* 2002; 277: 32046-53.
56. Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet.* 1976; 2: 1403.
57. de la Monte SM, Bloch KD. Aberrant expression of the constitutive endothelial nitric oxide synthase gene in Alzheimer disease. *Mol Chem Neuropathol.* 1997; 30: 139-59.
58. de la Torre JC, Stefano GB. Evidence that Alzheimer's disease is a microvascular disorder: the role of constitutive nitric oxide. *Brain Res Rev.* 2000; 34: 119-36.
59. de Leon MJ, George AE, Stylopoulos LA, Smith G, Miller DC. Early marker for Alzheimer's disease: the atrophic hippocampus. *Lancet.* 1989; 2: 672-3.
60. Dermaut B, Theuns J, Sleegers K, Hasegawa H, Van den Broeck M, Vennekens K, Corsmit E, St George-Hyslop P, Cruts M, van Duijn CM, Van Broeckhoven C. The gene encoding nicastrin, a major gamma-secretase component, modifies risk for familial early-onset Alzheimer disease in a Dutch population-based sample. *Am J Hum Genet.* 2002; 70: 1568-74.
61. Doan A, Thinakaran G, Borchelt DR, Slunt HH, Ratovitsky T, Podlisny M, Selkoe DJ, Seeger M, Gandy SE, Price DL, Sisodia SS. Protein topology of presenilin 1. *Neuron.* 1996; 17: 1023-30.
62. Dow DJ, Lindsey N, Cairns NJ, Brayne C, Robinson D, Huppert FA, Paykel ES, Xuereb J, Wilcock G, Whittaker JL, Rubinsztein DC. Alpha-2 macroglobulin polymorphism and Alzheimer disease risk in the UK. *Nat Genet.* 1999; 22: 16-7.
63. Du Y, Bales KR, Dodel RC, Liu X, Glinn MA, Horn JW, Little SP, Paul SM. Alpha2-macroglobulin attenuates beta-amyloid peptide 1-40 fibril formation and

- associated neurotoxicity of cultured fetal rat cortical neurons. *J Neurochem.* 1998; 70: 1182-8.
64. Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML, Ma W, Zhang C, Tousson A, Castro L, Lusis AJ, Nauseef WM, White CR, Freeman BA. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science.* 2002; 296: 2391-4.
65. Ertekin-Taner N, Graff-Radford N, Younkin LH, Eckman C, Baker M, Adamson J, Ronald J, Blangero J, Hutton M, Younkin SG. Linkage of plasma Abeta42 to a quantitative locus on chromosome 10 in late-onset Alzheimer's disease pedigrees. *Science.* 2000; 290: 2303-4.
66. 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; 262: 2551-6.
67. Evans DE, Beckett LA, Field TS, et al. Apolipoprotein E ϵ 4 and incidence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. *JAMA.* 1997; 277: 822-824.
68. Farrer LA, Abraham CR, Haines JL, Rogaeva EA, Song Y, McGraw WT, Brindle N, Premkumar S, Scott WK, Yamaoka LH, Saunders AM, Roses AD, Auerbach SA, Sorbi S, Duara R, Pericak-Vance MA, St George-Hyslop PH. Association between bleomycin hydrolase and Alzheimer's disease in caucasians. *Ann Neurol.* 1998; 44: 808-11.
69. Finckh U, Alberici A, Antoniazzi M, Benussi L, Fedi V, Giannini C, Gal A, Nitsch RM, Binetti G. Variable expression of familial Alzheimer disease associated with presenilin 2 mutation M239I. *Neurology.* 2000; 54: 2006-8.
70. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 1975; 12: 189-98.
71. Forsell Y, Basun H, Corder EH, Lannfelt L, Winblad B. Psychotic symptoms and apolipoprotein E genotypes in an elderly population. *Biol Psychiatry.* 1998; 4: 139-40.
72. Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1999; 66: 137-47.

73. Frisoni GB, Govoni S, Geroldi C. Gene dose of the $\epsilon 4$ allele of apolipoprotein E and disease progression in sporadic late onset Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1995; 37: 596-604.
74. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP i wsp. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*. 1995; 10: 111-3.
75. Fukumoto H, Tennis M, Locascio JJ, Hyman BT, Growdon JH, Irizarry MC. Age but not diagnosis is the main predictor of plasma amyloid beta-protein levels. *Arch Neurol*. 2003; 60: 958-64.
76. Fullerton SM, Clark AG, Weiss KM, Nickerson DA, Taylor SL, Stengard JH, Salomaa V, Vartiainen E, Perola M, Boerwinkle E, Sing CF. Apolipoprotein E variation at the sequence haplotype level: implications for the origin and maintenance of a major human polymorphism. *Am J Hum Genet*. 2000; 67: 881-900.
77. Gabryelewicz T, Religa D, Styczyńska M, Pepłońska B, Pfeffer A, Wasiak B, Łuczywek E, Gołębiowski M, Androsiuk W, Czyżewski K, Przekop I, Barcikowska M. Behavioural Pathology in Alzheimer's Disease with Special Reference to Apolipoprotein E Genotype. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2002; 14: 208-12.
78. Gajdusek, D.C. On the uniform source of amyloid in plaques, tangles and vascular deposits. *Neurobiol. Aging*. 1986; 7: 453-454.
79. Gatz M, Pedersen NL, Berg S, Johansson B, Johansson K, Mortimer JA, Posner SF, Viitanen M, Winblad B, Ahlbom A. Heritability for Alzheimer's disease: the study of dementia in Swedish twins. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1997; 52: M 117-25.
80. Gearing M, Mirra SS, Hedreen JC, Sumi SM, Hansen LA, Heyman A. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part X. Neuropathology confirmation of the clinical diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1995; 45: 461-6.
81. Gibson A, Singleton A, Smith G, i wsp, Lack of association of the $\alpha 2$ macroglobulin locus on chromosome 12 in AD. *Neurology*. 2000;54:433-438.
82. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984; 120: 885-90.

83. 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; 349: 704-6.
84. Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Six J, Lubke U, Vandermeeren M, Cras P, Trojanowski JQ, Lee VM. The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser-202 in Alzheimer disease recapitulates phosphorylation during development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90: 5066-70.
85. Gold G, Blouin JL, Herrmann FR, Michon A, Mulligan R, Duriaux Sail G, Bouras C, Giannakopoulos P, Antonarakis SE. Specific BACE1 genotypes provide additional risk for late-onset Alzheimer disease in APOE epsilon 4 carriers. *Am J Med Genet*. 2003;119B: 44-7.
86. Goldgaber D, Lerman M I, McBride O W, Saffiotti U, Gajdusek D C. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* 1987; 235: 877-880.
87. Gołębiowski M, Styczyńska M, Pfeffer A, Barcikowska M, Cieszanowski A. Evaluation of the interaction between APOE4 alleles and the occurrence of temporal lobe atrophy. *Alzheimer's Reports*. 2001; 4: 173-176.
88. Gomez-Isla T, West HL, Rebeck GW, Harr SD i wsp, Clinical and pathological correlates of apolipoprotein E ε4 in Alzheimer's disease *Ann Neurol*. 1996, 39: 62-70.
89. Gotz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM. Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science*. 2001; 293: 1491-5.
90. Grant SG, O'Dell TJ, Karl KA, Stein PL, Soriano P, Kandel ER. Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice. *Science*. 1992; 258: 1903-10.
91. Growdon JH, Locascio JJ, Corkin S, Gomez-Isla T, Hyman BT Apolipoprotein E genotypedoes not influence rates of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neurology*. 1996; 47: 444-448.
92. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986; 83: 4913-7.

93. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002; 297: 353-6.
94. Helisalmi S, Hiltunen M, Valonen P, Mannermaa A, Koivisto AM, Lehtovirta M, Ryyanen M, Soininen H. Promoter polymorphism (-491A/T) in the APOE gene of Finnish Alzheimer's disease patients and control individuals. *J Neurol*. 1999 ; 246: 821-4.
95. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM, Brown MJ. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation*. 1999; 100: 1515-20.
96. Holmes C, Russ C, Kirov G, Aitchison KJ, Powell JF, Collier DA, Lovestone S. Apolipoprotein E: depressive illness, depressive symptoms, and Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 1998; 43: 159-64.
97. Hughes SR, Khorkova O, Goyal S, Knaeblein J, Heroux J, Riedel NG, Sahasrabudhe S. Alpha2-macroglobulin associates with beta-amyloid peptide and prevents fibril formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 3275-80.
98. Hyman BT, Trojanowski JQ. Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer disease from the National Institute on Aging and the Reagan Institute Working Group on diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997; 56: 1095-7.
99. Jack CR Jr, Petersen RC, Xu Y, O'Brien PC, Smith GE, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Rate of medial temporal lobe atrophy in typical aging and Alzheimer's disease. *Neurology*. 1998; 51: 993-9. (a)
100. Jack CR Jr, Petersen RC, Xu YC, O'Brien PC, Waring SC, Tangalos EG, Smith GE, Ivnik RJ, Thibodeau SN, Kokmen E. Hippocampal atrophy and apolipoprotein E genotype are independently associated with Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1998; 43, 303-10. (b)
101. Janssen JC, Beck JA, Campbell TA, Dickinson A, Fox NC, Harvey RJ, Houlden H, Rossor MN, Collinge J. Early onset familial Alzheimer's disease: Mutation frequency in 31 families. *Neurology*. 2003; 60: 235-9.
102. Jonker C, Schmand B, Lindeboom J, et al. Association between apolipoprotein E ε4 and the rate of cognitive decline in community-dwelling elderly individuals with and without dementia. *Arch Neurol*. 1998; 55: 1065-169.

103. Juva K, Verkkoniemi A, Viramo P, Polvikoski T, Kainulainen K, Kontula K, Sulkava R. APOE epsilon4 does not predict mortality, cognitive decline, or dementia in the oldest old. *Neurology*. 2000; 54: 412-5.
104. Kamboh MI, Sanghera DK, Ferrell RE, DeKosky ST. APOE*4-associated Alzheimer's disease risk is modified by alpha 1-antichymotrypsin polymorphism. *Nat Genet*. 1995; 10: 486-8.
105. Kamboh MI, Serjeantson SW, Ferrell RE. Genetic studies of human apolipoproteins. XVIII. Apolipoprotein polymorphisms in Australian Aborigines. *Hum Biol*. 1991; 63: 179-86.
106. Kang DE, Saitoh T, Chen X, Xia Y, Masliah E, Hansen LA, Thomas RG, Thal LJ, Katzman R. Genetic association of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene (LRP), an apolipoprotein E receptor, with late-onset Alzheimer's disease. *Neurology*. 1997; 49: 56-61.
107. Kang J, Lemaire H-G, Unterbeck A, Salbaum J M, Masters C L, Grzeschik K-H, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. 1987; 325: 733-736.
108. Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*. 2003; 300: 486-9.
109. Kenessey A, Nacharaju P, Ko LW, Yen SH. Degradation of tau by lysosomal enzyme cathepsin D: implication for Alzheimer neurofibrillary degeneration. *J Neurochem*. 1997; 69: 2026-38.
110. Khachaturian ZS. Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Neurol*. 1985; 42: 1097-105.
111. Kieszek S, Lalowski M, Bratosiewicz J, Czyzewski K, Pfeffer A, Sobow T, Kloszewska I, Liberski PP, Barcikowska M. ApoE genotypes in Alzheimer's disease in central Poland. *Alz Rep*. 1999; 2: 155-158.
112. Kimberly WT, Wolfe MS. Identity and function of gamma-secretase. *J Neurosci Res*. 2003; 74: 353-360.
113. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians*. 1999; 111: 383-9.
114. Koike H, Tomioka S, Sorimachi H, Saido TC, Maruyama K, Okuyama A, Fujisawa-Sehara A, Ohno S, Suzuki K, Ishiura S. Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J*. 1999; 343: 371-5.

115. Koivisto K, Helkala EL, Haninen T i wsp. The effect of apolipoprotein e4 allele on clinical progression of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1995; 45: A 373. Abstract 766 S
116. Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W, Fahrenholz F. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 5815-20.
117. Kopan R, Goate A. A common enzyme connects notch signaling and Alzheimer's disease. *Genes Dev*. 2000; 14: 2799-806.
118. Koster, M.N., Dermaut, B., Cruts, M., Houwing-Duistermaat, J., Roks, G. , Tol, J., Ott, A., Hofman, A., Munteanu, G., Breteler, M., Van Duijn, C., Van Broeckhoven, C., The α 2 macroglobulin gene in AD. A population based study and meta-analysis. *Neurology*. 2000; 55: 678-684.
119. Kowalska A, Florczak J, Pruchnik-Wolinska D, Kraszewski A, Wender M. Apolipoprotein E genotypes in sporadic early and late-onset Alzheimer's disease. *Arch Immunol Ther Exp*. 1998; 46: 177-81. (a)
120. Kowalska, A., Wiechmann, I., Walter, H., Genetic variability of apolipoprotein E in a Polish population. *Hum. Biol*. 1998; 70: 93-1099. (b)
121. Kumar P, Luthra K, Dwivedi M, Behl VK, Pandey RM, Misra A. Apolipoprotein E gene polymorphisms in patients with premature myocardial infarction: a case-controlled study in Asian Indians in North India. *Ann Clin Biochem*. 2003; 40: 382-7.
122. Lahiri DK, Kotwal GJ, Farlow MR, Sima A, Kupsky W, Sarkar FH, Sambamurti K. The role of the carboxyl-terminal fragments of amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 973: 334-9.
123. Lambert JC, Mann D, Goumidi L, Harris J, Amouyel P, Iwatsubo T, Lendon C, Chartier-Harlin MC. Effect of the APOE promoter polymorphisms on cerebral amyloid peptide deposition in Alzheimer's disease. *Lancet*. 2001; 357: 608-9.
124. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 6448-53.
125. Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's

- amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 3922-7.
126. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C i wsp. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001; 409: 860-921.
 127. Law A, Gauthier S, Quirion R. Say NO to Alzheimer's disease: the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type. *Brain Res Brain Res Rev*. 2001; 35: 73-96.
 128. Lee VM. Biomedicine. Tauists and beta-apists united-well almost! *Science*. 2001; 293: 1446-7.
 129. Lehmann S, Chiesa R, Harris DA. Evidence for a six-transmembrane domain structure of presenilin 1. *J Biol Chem*. 1997; 272: 12047-51.
 130. Levy ML, Cummings JL, Fairbanks LA, Sultzer DL, Small GW. Apolipoprotein E genotype and noncognitive symptoms in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 1999; 45: 422-5.
 131. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K I wsp, Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 1995; 269: 973-7.
 132. Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science*. 2001; 293: 1487-91.
 133. Li YM, Lai MT, Xu M, Huang Q, DiMuzio-Mower J, Sardana MK, Shi XP, Yin KC, Shafer JA, Gardell SJ. Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 6138-43.
 134. Liao A, Nitsch RM, Greenberg SM, Finckh U, Blacker D, Albert M, Rebeck GW, Gomez-Isla T, Clatworthy A, Binetti G, Hock C, Mueller-Thomsen T, Mann U, Zuchowski K, Beisiegel U, Staehelin H, Growdon JH, Tanzi RE, Hyman BT. Genetic association of an alpha2-macroglobulin (Val1000Ile) polymorphism and Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 1998; 7: 1953-6.
 135. Linn RT, Wolf PA, Bachman DL, Knoefel JE, Cobb JL, Belanger AJ, Kaplan EF, D'Agostino RB. The 'preclinical phase' of probable Alzheimer's disease. A 13-year prospective study of the Framingham cohort. *Arch Neurol*. 1995; 52: 485-90.
 136. Lopez OL, Lopez-Pousa S, Kamboh MI, Adroer R, Oliva R, Lozano-Gallego M, Becker JT, DeKosky ST. Apolipoprotein E polymorphism in Alzheimer's disease: a

- comparative study of two research populations from Spain and the United States. *Eur Neurol.* 1998; 39: 229-33. Łałowski M, Czyżewski K, Pfeffer A, Barcikowska M, Kwieciński H. ApoE polymorphism in Polish patients with Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp.* 1998; 58: 65-68.
137. Łałowski M, Czyżewski K, Pfeffer A, Barcikowska M, Kwieciński H. ApoE polymorphism in Polish patients with Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp.* 1998; 58: 65-68.
138. Ma J, Yee A, Brewer HB Jr, Das S, Potter H. Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments. *Nature.* 1994; 372: 92-4.
139. Maddalena A, Papassotiropoulos A, Muller-Tillmanns B, Jung HH, Hegi T, Nitsch RM, Hock C. Biochemical diagnosis of Alzheimer disease by measuring the cerebrospinal fluid ratio of phosphorylated tau protein to beta-amyloid peptide42. *Arch Neurol.* 2003; 60: 1202-6.
140. Maestre, G., Ottman, R., Stern, Y., Gurland, B., Chun, M., Tang, M.-X., Shelanski, M., Tycko, B., Mayeux, R., Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease: Ethnic Variation in Genotypic Risks. *Ann. Neurol.* 1995; 37: 254-259.
141. Masliah E, Ellisman M, Carragher B, Mallory M, Young S, Hansen L, DeTeresa R, Terry RD. Three-dimensional analysis of the relationship between synaptic pathology and neuropil threads in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1992; 51: 404-14.
142. Masters CL, Multhaup G, Simms G, Pottgiesser J, Martins RN, Beyreuther Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J.* 1985; 4: 2757-63. (a)
143. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82: 4245-9. (b)
144. Mateo I, Sanchez-Guerra M, Combarros O, Llorca J, Infante J, Gonzalez-Garcia J, del Molino JP, Berciano J. Lack of association between cathepsin D genetic polymorphism and Alzheimer disease in a Spanish sample. *Am J Med Genet.* 2002; 114: 31-3.
145. Mauricio M, O'Hara R, Yesavage JA, Friedman L, Kraemer HC, Van De Water M, Murphy GM Jr. A longitudinal study of apolipoprotein-E genotype and

- depressive symptoms in community-dwelling older adults. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2000; 8: 196-200.
146. Mayeux R, Honig LS, Tang MX, Manly J, Stern Y, Schupf N, Mehta PD. Plasma A[beta]40 and A[beta]42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk. *Neurology*. 2003; 61: 1185-90.
 147. Mayeux R, Saunders AM, Shea S, Mirra S, Evans D, Roses AD, Hyman BT, Crain B, Tang MX, Phelps CH. Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease Centers Consortium on Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. 1998; 338: 506-11.
 148. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1984; 34: 939-44.
 149. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16: 1215.
 150. Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Vogel FS, Hughes JP, van Belle G, Berg L. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1991; 41: 479-86.
 151. Morris JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology*. 1993; 43: 2412-4.
 152. Mortimer JA, Fortier I, Rajaram L, Gauvreau D. Higher education and socioeconomic status in childhood protect individuals at genetic risk of AD from expressing symptoms in late life: the Saguenay-Lac-Saint-Jean Health and Aging Study. *Neurobiol Aging*. 1998; 19: S 215.
 153. 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; 1: 345-7.
 154. Myers A, Holmans P, Marshall H, Kwon J, Meyer D, Ramic D, Shears S, Booth J, DeVrieze FW, Crook R, Hamshire M, Abraham R, Tunstall N, Rice F, Carty S, Lillystone S, Kehoe P, Rudrasingham V, Jones L, Lovestone S, Perez-Tur J, Williams J, Owen MJ, Hardy J, Goate AM. Susceptibility locus for Alzheimer's disease on chromosome 10. *Science*. 2000; 290: 2304-5.

155. Namba Y, Tsuchiya H, Ikeda K. Apolipoprotein B immunoreactivity in senile plaque and vascular amyloids and neurofibrillary tangles in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 1992; 134: 264-6.
156. Narita M, Holtzman DM, Schwartz AL, Bu G. Alpha2-macroglobulin complexes with and mediates the endocytosis of beta-amyloid peptide via cell surface low-density lipoprotein receptor-related protein. *J Neurochem*. 1997; 69: 1904-11.
157. National Institute of Aging/ Alzheimer's Association Working Group, *Lancet*, 1996, 347, 1091-1095.
158. Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condron MM, Axelman K, Forsell C, Stenh C, Luthman J, Teplow DB, Younkin SG, Naslund J, Lannfelt L. The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat Neurosci*. 2001; 4: 887-93.
159. Noble W, Olm V, Takata K, Casey E, Mary O, Meyerson J, Gaynor K, LaFrancois J, Wang L, Kondo T, Davies P, Burns M, Veeranna, Nixon R, Dickson D, Matsuoka Y, Ahljianian M, Lau LF, Duff K. Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron*. 2003; 38: 555-65.
160. Ntais C, Polycarpou A, Ioannidis JP. Meta-analysis of the association of the cathepsin D Ala224Val gene polymorphism with the risk of Alzheimer's disease: a HuGE gene-disease association review. *Am J Epidemiol*. 2004; 159: 527-36.
161. Okuizumi K, Onodera O, Tanaka H, Kobayashi H, Tsuji S, Takahashi H, Oyanagi K, Seki K, Tanaka M, Naruse S, et al. ApoE-epsilon 4 and early-onset Alzheimer's. *Nat Genet*. 1994; 7: 10-1.
162. Otth C, Concha II, Arendt T, Stieler J, Schliebs R, Gonzalez-Billault C, Maccioni RB. AbetaPP induces cdk5-dependent tau hyperphosphorylation in transgenic mice Tg2576. *J Alzheimers Dis*. 2002; 4: 417-30.
163. Pająk A, Guevara I, Kwaśniak M, Dembinska-Kiec A, Grabarczyk E, Słowik A, Szczudlik A Cognitive impairment and cardiovascular disease risk factors. Project CASCADE Kradow. VII: Prevalence of apoprotein E isoforms in women and men at age 65-78 years of age. *Przegl Lek*. 1998; 55: 720-3.
164. Papassotiropoulos A, Bagli M, Feder O, Jessen F, Maier W, Rao ML, Ludwig M, Schwab SG, Heun R. Genetic polymorphism of cathepsin D is strongly associated with the risk for developing sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 1999; 262: 171-4.
165. Papassotiropoulos A, Bagli M, Kurz A, Kornhuber J, Forstl H, Maier W, Pauls J,

- Lautenschlager N, Heun R. A genetic variation of cathepsin D is a major risk factor for Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2000; 47: 399-403.
166. Papassotiropoulos A, Streffer JR, Tsolaki M, Schmid S, Thal D, Nicosia F, Iakovidou V, Maddalena A, Lutjohann D, Ghebremedhin E, Hegi T, Pasch T, Traxler M, Bruhl A, Benussi L, Binetti G, Braak H, Nitsch RM, Hock C. Increased brain beta-amyloid load, phosphorylated tau, and risk of Alzheimer disease associated with an intronic CYP46 polymorphism. *Arch Neurol.* 2003; 60: 29-35.
 167. Pappolla MA, Bryant-Thomas TK, Herbert D, Pacheco J, Fabra Garcia M, Manjon M, Girones X, Henry TL, Matsubara E, Zambon D, Wolozin B, Sano M, Cruz-Sanchez FF, Thal LJ, Petanceska SS, Refolo LM. Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology.* 2003; 61: 199-205.
 168. Paradowski B, Szczepaniak M, Dobosz T, Sasiadek M. Apolipoprotein E (ApoE) and tau protein in Alzheimer type dementia. *Pol Merkuriusz Lek.* 2000; 9: 758-9.
 169. Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature.* 1999; 402: 615-22.
 170. Pericak-Vance MA, Bass MP, Yamaoka LH, Gaskell PC, Scott WK, Terwedow HA, Menold MM, Conneally PM, Small GW, Vance JM, Saunders AM, Roses AD, Haines JL. Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer disease. Evidence for a new locus on chromosome 12. *JAMA.* 1997; 278: 1237-41.
 171. Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC Jr, Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MJ, Walker AP, Bartlett RJ, Haynes CA, Welsh KA, et al. Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet.* 1991; 48: 1034-50.
 172. Pericak-Vance MA, Grubber J, Bailey LR, Hedges D, West S, Santoro L, Kemmerer B, Hall JL, Saunders AM, Roses AD, Small GW, Scott WK, Conneally PM, Vance JM, Haines JL. Identification of novel genes in late-onset Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.* 2000; 35: 1343-52.
 173. Pericak-Vance MA, Yamaoka LH, Haynes CS, Speer MC, Haines JL, Gaskell PC, Hung WY, Clark CM, Heyman AL, Trofatter JA, et al. Genetic linkage studies in Alzheimer's disease families. *Exp Neurol.* 1988; 102: 271-9.

174. Perry EK, Gibson PH, Blessed G, Perry RH, Tomlinson BE. Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *J Neurol Sci.* 1977; 34: 247-65.
175. Petersen RC, Smith GE, Ivnik RJ, et al. Apolipoprotein status as a predictor of the development of Alzheimer's disease in memory-impaired individuals. *JAMA.* 1995; 273: 1274-1278.
176. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Kokmen E, Tangalos EG. Aging, memory, and mild cognitive impairment. *Int Psychogeriatr.* 1997; 9, Suppl 1: 65-9.
177. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol.* 1999; 56: 303-8.
178. Pfeffer A, Styczyńska M, Czyżewski K, Łuczywek E, Gołębiowski M, Nowicka M, Barcikowska M. Apolipoprotein E genotype and the rate of decline in Alzheimer's disease: the gender effect. *Alzheimer's Reports.* 2001; 4: 31-36.
179. Planel E, Yasutake K, Fujita SC, Ishiguro K. Inhibition of protein phosphatase 2A overrides tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 beta and cyclin-dependent kinase 5 inhibition and results in tau hyperphosphorylation in the hippocampus of starved mouse. *J Biol Chem.* 2001;276:34298-306.
180. Qiu WQ, Borth W, Ye Z, Haass C, Teplow DB, Selkoe DJ. Degradation of amyloid beta-protein by a serine protease-alpha2-macroglobulin complex. *J Biol Chem.* 1996; 271: 8443-51.
181. Read SL, Miller BL, Mena I, Kim R, Itabashi H, Darby A. SPECT in dementia: clinical and pathological correlation. *J Am Geriatr Soc.* 1995; 43: 1243-7.
182. Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron.* 1993 ; 11: 575-80.
183. Reisberg B, Ferris SH, de Leon MJ, Crook T. The Global Deterioration Scale for assessment of primary degenerative dementia. *Am J Psychiatry.* 1982 Sep; 139: 1136-9.
184. Religa D, Styczyńska M., Peplonska B, Gabryelewicz T, Pfeffer A., Chodakowska M, Łuczywek E., Wasiak B., Stepień K., Gołębiowski M., Winblad B., Barcikowska M. Homocysteine, apolipoproteine E and

- methylenetetrahydrofolate reductase in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2003; 16: 64-70.
185. Reynolds WF, Hiltunen M, Pirskanen M, Mannermaa A, Helisalmi S, Lehtovirta M, Alafuzoff I, Soininen H. MPO and APOEepsilon4 polymorphisms interact to increase risk for AD in Finnish males. *Neurology*. 2000; 55: 1284-90.
 186. Reynolds WF, Rhee J, Maciejewski D, Paladino T, Sieburg H, Maki RA, Masliah E. Myeloperoxidase polymorphism is associated with gender specific risk for Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 1999; 155: 31-41.
 187. Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T i wsp, Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*. 1995; 376: 775-8.
 188. Rogaeva E, Premkumar S, Song Y, Sorbi S, Brindle N, Paterson A, Duara R, Levesque G, Yu G, Nishimura M, Ikeda M, O'Toole C, Kawarai T, Jorge R, Vilarino D, Bruni AC, Farrer LA, St George-Hyslop PH. Evidence for an Alzheimer disease susceptibility locus on chromosome 12 and for further locus heterogeneity. *JAMA*. 1998; 280: 614-8.
 189. Rogaeva EA, Premkumar S, Grubber J, Serneels L, Scott WK, Kawarai T, Song Y, Hill DL, Abou-Donia SM, Martin ER, Vance JJ, Yu G, Orlacchio A, Pei Y, Nishimura M, Supala A, Roberge B, Saunders AM, Roses AD, Schmechel D, Crane-Gatherum A, Sorbi S, Bruni A, Small GW, Pericak-Vance MA, et al. An alpha-2-macroglobulin insertion-deletion polymorphism in Alzheimer disease. *Nat Genet*. 1999; 22: 19-22.
 190. Rogaeva EA. The solved and unsolved mysteries of the genetics of early-onset Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*. 2002; 2: 1-10.
 191. Romas SN, Mayeux R, Rabinowitz D, Tang MX, Zadroga HR, Lantigua R, Medrano M, Tycko B, Knowles JA. The deletion polymorphism and Val1000Ile in alpha-2-macroglobulin and Alzheimer disease in Caribbean Hispanics. *Neurosci Lett*. 2000; 279: 133-6.
 192. Rudrasingham V, Wavrant-De Vrieze F, Lambert JC, Chakraverty S, Kehoe P, Crook R, Amouyel P, Wu W, Rice F, Perez-Tur J, Frigard B, Morris JC, Carty S, Petersen R, Cottel D, Tunstall N, Holmans P, Lovestone S, Chartier-Harlin MC, Goate A, Hardy J, Owen MJ, Williams J. Alpha-2 macroglobulin gene and Alzheimer disease. *Nat Genet*. 1999; 22: 17-9.

193. Sadik G, Kaji H, Takeda K, Yamagata F, Kameoka Y, Hashimoto K, Miyanaga K, Shinoda T. In vitro processing of amyloid precursor protein by cathepsin D. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999; 31: 1327-37.
194. Sadovnick AD. Genetic Counseling, w: "Evidence-based dementia practice" Quizilbash N, Blackwell Science, 2001, 795-800.
195. Samuel W, Terry RD, DeTeresa R, Butters N, Masliah E. Clinical correlates of cortical and nucleus basalis pathology in Alzheimer dementia. *Arch Neurol.* 1994; 51: 772-8.
196. Sanan DA, Weisgraber KH, Russell SJ, Mahley RW, Huang D, Saunders A, Schmechel D, Wisniewski T, Frangione B, Roses AD Apolipoprotein E associates with beta amyloid peptide of Alzheimer's disease to form novel monofibrils. Isoform apoE4 associates more efficiently than apoE3. *J Clin Invest.* 1994; 94: 860-9.
197. Sanchez-Guerra M, Combarros O, Alvarez-Arcaya A, i wsp, The Glu298Asp polymorphism in the NOS3 gene is not associated with sporadic Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 70: 566-567.
198. Saunders AJ, Bertram L, Mullin K, Sampson AJ, Latifzai K, Basu S, Jones J, Kinney D, MacKenzie-Ingano L, Yu S, Albert MS, Moscarillo TJ, Go RC, Bassett SS, Daly MJ, Laird NM, Wang X, Velicelebi G, Wagner SL, Becker DK, Tanzi RE, Blacker D. Genetic association of Alzheimer's disease with multiple polymorphisms in alpha-2-macroglobulin. *Hum Mol Genet.* 2003; 12: 2765-76.
199. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ i wsp, Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology.* 1993; 43: 1467-72. (a)
200. Saunders AM, Schmechel D, Breitner JC, Benson MD, Brown WT, Goldfarb L, Goldgaber D, Manwaring MG, Szymanski MH, McCown N, et al. Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases. *Lancet.* 1993; 342: 710-1. (b)
201. Scacchi R, Corbo RM, Rickards O, Mantuano E, Guevara A, De Stefano GF. Apolipoprotein B and E genetic polymorphisms in the Cayapa Indians of Ecuador. *Hum Biol.* 1997; 69: 375-82.
202. Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME, et al. Genetic linkage evidence

- for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science*. 1992; 258: 668-71.
203. Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med*. 1996; 2: 864-70.
 204. Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90: 9649-53.
 205. Selkoe DJ. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 924: 17-25.
 206. Selkoe DJ. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature*. 1999; 399: A 23-31.
 207. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wilson PW, Wolf PA. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2002; 346: 476-83.
 208. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K i wsp, Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1995; 375: 754-60.
 209. Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak K, Jewett N, Keim P, Knops J, Lieberburg I, Power M, Tan H, Tatsuno G, Tung J, Schenk D, Seubert P, Suomensaaari SM, Wang S, Walker D, John V i wsp, Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature*. 1999; 402: 537-40.
 210. Sisodia SS, Koo EH, Beyreuther K, Unterbeck A, Price DL. Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science*. 1990; 248: 492-5.
 211. Slooter AJ, Cruts M, Kalmijn S, Hofman A, Breteler MM, Van Broeckhoven C, van Duijn CM. Risk estimates of dementia by apolipoprotein E genotypes from a

- population-based incidence study: the Rotterdam Study. *Arch Neurol*. 1998; 55: 964-8.
212. Snowdon DA, Kemper SJ, Mortimer JA, Greiner LH, Wekstein DR, Markesbery WR. Linguistic ability in early life and cognitive function and Alzheimer's disease in late life. Findings from the Nun Study. *JAMA*. 1996; 275: 528-32.
 213. Song YQ, Rogaeva E, Premkumar S, Brindle N, Kawarai T, Orlacchio A, Yu G, Levesque G, Nishimura M, Ikeda M, Pei Y, O'Toole C, Duara R, Barker W, Sorbi S, Freedman M, Farrer L, St George-Hyslop P. Absence of association between Alzheimer disease and the -491 regulatory region polymorphism of APOE. *Neurosci Lett*. 1998; 250: 189-92.
 214. Sorbi S, Nacmias B, Forleo P, Latorraca S, Gobbini I, Bracco L, Piacentini S, Amaducci L, ApoE allele frequencies in Italian sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 1994; 177: 100-102.
 215. Sottrup-Jensen L. Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *J Biol Chem*. 1989; 264: 11539-42.
 216. St Clair D, Rennie M, Slorach E, Norrman J, Yates C, Carothers A. Apolipoprotein E epsilon 4 allele is a risk factor for familial and sporadic presenile Alzheimer's disease in both homozygote and heterozygote carriers. *J Med Genet*. 1995; 32: 642-4.
 217. St George-Hyslop PH, Tanzi RE, Polinsky RJ, Neve RL, Pollen D, Drachman D, Growdon J, Cupples LA, Nee L, Myers RH i wsp, Absence of duplication of chromosome 21 genes in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Science*. 1987; 238: 664-6.
 218. Stern Y, Brandt J, Albert M, Jacobs DM, Liu X, Bell K, Marder K, Sano M, Albert S, Del-Castillo Castenada C, Bylsma F, Tycko B, Mayeux R. The absence of an apolipoprotein epsilon4 allele is associated with a more aggressive form of Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1997; 41: 615-20.
 219. Stoppe G, Bruhn H, Pouwels PJ, Hanicke W, Frahm J. Alzheimer disease: absolute quantification of cerebral metabolites in vivo using localized proton magnetic resonance spectroscopy. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2000; 14: 112-9.
 220. Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects

- and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90: 8098-102.
221. Styczyńska 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; 344: 99-102.
 222. Styczyńska M, Religa D, Pfeffer A, Luczywek E, Wasiak B, Gabryelewicz T, Czyżewski K, Gołębiowski M, Barcikowska M : Two patients with early -onset Alzheimer's disease and unique APOE e2/2 genotype. A case report. *Alzheimer's Reports*. 2001; 4: 151-153.
 223. Talbot C, Lendon C, Craddock N, Shears S, Morris JC, Goate A. Protection against Alzheimer's disease with apoE epsilon 2. *Lancet*. 1994; 343: 1432-3.
 224. Talbot PR, Lloyd JJ, Snowden JS, Neary D, Testa HJ. A clinical role for 99mTc-HMPAO SPECT in the investigation of dementia? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998; 64: 306-13.
 225. Tang G, Zhang M, Xie H, Jiang S, Wang Z, Xu L, Hao Y, Lin D, Lan H, Wang Y, Chen L, Ren D. Alpha-2 macroglobulin I1000 V polymorphism in Chinese sporadic Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2002; 328: 195-7.
 226. Tedde A, Nacmias B, Cellini E, Bagnoli S, Sorbi S. Lack of association between NOS3 polymorphism and Italian sporadic and familial Alzheimer's disease. *J Neurol*. 2002; 249: 110-1.
 227. 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: 572-80.
 228. The Alzheimer's Disease Collaborative Group. The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families *Nat Genet*. 1995; 11: 219-22.
 229. The ICD-10 Classification of Mental & Behavioural Disorders, World Health Organization, Geneva, 1993
 230. Uhlmann RF, Larson EB. Effect of education on the mini-mental state examination as a screening test for dementia. *J Am Geriatr Soc*. 1991; 39: 876-80.
 231. Utermann G, Langenbeck U, Beisiegel U, Weber W. Genetics of the apolipoprotein E system in man. *Am J Hum Genet*. 1980; 32: 339-47.

232. Van Broeckhoven C, Backhovens H, Cruts M, Martin JJ, Crook R, Houlden H, Hardy J. APOE genotype does not modulate age of onset in families with chromosome 14 encoded Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 1994 ; 169: 179-80.
233. Van Broeckhoven C, Haan J, Bakker E, Hardy JA, Van Hul W, Wehnert A, Vegter-Van der Vlis M, Roos RA. Amyloid beta protein precursor gene and hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch). *Science*. 1990; 248: 1120-1122.
234. van Duijn CM, de Knijff P, Wehnert A, De Voecht J, Bronzova JB, Havekes LM, Hofman A, Van Broeckhoven C. The apolipoprotein E epsilon 2 allele is associated with an increased risk of early-onset Alzheimer's disease and a reduced survival. *Ann Neurol*. 1995; 37: 605-10.
235. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. 1999; 286: 735-41.
236. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*. 2002; 416: 535-9.
237. Warwick Daw E, Payami H, Nemens EJ, Nochlin D, Bird TD, Schellenberg GD, Wijsman EM. The number of trait loci in late-onset Alzheimer disease. *Am J Hum Genet*. 2000; 66: 196-204.
238. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953; 171: 737-8.
239. Wavrant-De Vrieze F, Rudrasingham V, Lambert J, Chakraverty S, Kehoe P, Crook R, Amouyel P, Wu W, Holmans P, Rice F, Perez-Tur J, Frigard B, Morris J, Carty S, Cottle D, Tunstall N, Lovestone S, Petersen R, Chartier-Harlin M.-Ch, Goate A, Owen M, Williams J, Hardy J. No association between the alpha-2 macroglobulin I 1000 V polymorphism and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett*. 1999; 262: 137 -139.
240. Wehr H, Parnowski T, Puzynski S, Bednarska-Makaruk M, Bisko M, Kotapka-Minc S, Rodo M, Wolkowska M. Apolipoprotein E genotype and lipid and lipoprotein levels in dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2000; 11:70-3.

241. Weisgraber KH. Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv Protein Chem.* 1994; 45: 249-302.
242. Weisgraber KH, Mahley RW, Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Brown MS. Apolipoprotein C-I modulates the interaction of apolipoprotein E with beta-migrating very low density lipoproteins (beta-VLDL) and inhibits binding of beta-VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem.* 1990; 65: 22453-9.
243. Wilson PW, Myers RH, Larson MG, Ordovas JM, Wolf PA, Schaefer EJ. Apolipoprotein E alleles, dyslipidemia, and coronary heart disease. The Framingham Offspring Study. *JAMA.* 1994 ; 272: 1666-71.
244. Wisniewski T, Frangione B. Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci Lett.* 1992; 135: 235-8.
245. Wisniewski T, Golabek A, Matsubara E, Ghiso J, Frangione B. Apolipoprotein E: binding to soluble Alzheimer's beta-amyloid. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 192: 359-65.
246. Yamaguchi S, Nakagawa T, Arai H, Sasaki H, Higuchi S, Trojanowski JQ. Temporal progression of hippocampal atrophy and apolipoprotein E gene in Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc.* 1996; 44: 216-7.
247. Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashier JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, Carter DB, Tomasselli AG, Parodi LA, Heinrichson RL, Gurney ME. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature.* 1999; 402: 533-7.
248. Zappia M, Cittadella R, Manna I, Nicoletti G, Andreoli V, Bonavita S, Gambardella A, Quattrone A. Genetic association of alpha2-macroglobulin polymorphisms with AD in southern Italy. *Neurology.* 2002; 59: 756-8.
249. Zappia M, Manna I, Serra P, Cittadella R, Andreoli V, La Russa A, Annesi F, Spadafora P, Romeo N, Nicoletti G, Messina D, Gambardella A, Quattrone A. Increased risk for Alzheimer disease with the interaction of MPO and A2M polymorphisms. *Arch Neurol.* 2004; 61: 341-4.
250. Zekraoui L, Lagarde JP, Raisonnier A, Gerard N, Aouizerate A, Lucotte G. High frequency of the apolipoprotein E *4 allele in African pygmies and most of the African populations in sub-Saharan Africa. *Hum Biol.* 1997; 69: 575-81.

251. Zubenko GS, Henderson R, Stiffler JS, Stabler S, Rosen J, Kaplan BB. Association of the APOE epsilon 4 allele with clinical subtypes of late life depression. *Biol Psychiatry*. 1996; 40: 1008-16.
252. Żekanowski 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-Żebrowska M, Gustaw K, Łączkowski J, Sobów T, Kuźnicki J, Barcikowska M.: Mutations in presenilin 1, presenilin 2 and amyloid precursor protein genes in patients with early-onset Alzheimer disease in Poland. *Exp Neurol*, 2003; 184: 991-996.

8. STRESZCZENIE

Choroba Alzheimera (chA) jest najczęstszą przyczyną otępienia w społeczeństwach zachodnich, a prognozy epidemiologiczne przewidują stały wzrost zachorowań. Szacuje się, iż choroba ta dotyka nawet 5-10% osób powyżej 65 roku życia i prawie połowę populacji powyżej 85rż. Typowe zmiany neuropatologiczne chA to: płytki (blaszki) starcze i zwyrodnienie włóknkowe neuronów.

Najpowszechniej uznawaną teorią dotyczącą etiopatogenezy chA jest hipoteza amyloidowa, zakładająca iż odkładanie się w mózgu β -amyloidu ($A\beta$) jest przyczyną zmian prowadzących w efekcie do zaburzeń przekazywania nerwowego a następnie śmierci neuronów, co równoznacznie jest z wystąpieniem klinicznych cech otępienia. $A\beta$ jest fragmentem znacznie dłuższego białka błonowego zwanego białkiem prekursorowym amyloidu (ang. Amyloid Precursor Protein, APP). Posttranslacyjny metabolizm APP może przebiegać dwutorowo. Zasadnicza, tzw. nieamyloidogenna droga proteolizy APP polega na cięciu przez niesklonowany dotąd enzym- α sekretazę i rozszczepieniu cząsteczki w obrębie peptydu $A\beta$ w zewnątrz błonowym fragmencie APP, dzięki czemu powstaje rozpuszczalny fragment zwany sAPP α . Alternatywnym szlakiem proteolizy APP, zwanym też amyloidogennym, jest cięcie przez enzymy β i γ sekretazę.

Dotychczas nie udało się wykryć genu odpowiedzialnego za wystąpienie większości przypadków choroby Alzheimera. Na poziomie molekularnym choroba ta jest bardzo heterogenna. Wyróżnia się dwie podstawowe postacie choroby. Pierwsza z nich to postać rodzinna o autosomalnie dominującym sposobie dziedziczenia i wczesnym początku (<65rż), stanowiącą około 5% wszystkich przypadków. W części z tych przypadków nadmierne odkładanie złogów β -amyloidu w mózgu spowodowane jest mutacjami w jednym z trzech genów: *presenilinie 1*, *presenilinie 2* lub *APP*.

Pozostałe 95% przypadków nazywane umownie postacią sporadyczną, mimo braku wyraźnego sposobu dziedziczenia, uważane jest za chorobę złożoną, mającą istotny komponent genetyczny. Istnieje hipoteza, iż w tych przypadkach zaburzenie metabolizmu APP polega raczej na upośledzonej degradacji A β , na którą modulujący wpływ może wywierać wiele czynników genetycznych.

Badania przeprowadzone na początku lat dziewięćdziesiątych XX doprowadziły do stwierdzenia, iż jedna z trzech izoform genu kodującego apolipoproteinę E –allel $\epsilon 4$ zwiększa ryzyko zachorowania na chA o późnym początku. Szacuje się, że odpowiada on tylko za około 50% genetycznego uwarunkowania chA o późnym początku. Dlatego też kontynuowane są poszukiwania kolejnych genów „kandydatów” modulujących ryzyko rozwoju chA. W ciągu ostatnich dziesięciu lat przebadano kilkadziesiąt polimorfizmów genetycznych, jednak w większości przypadków okazywało się, iż ich wpływ jest niewielki i zależny od badanej populacji, co tłumaczy fakt, że pierwotne doniesienia nie były potwierdzane przez innych autorów. Polimorfizmy te były jednak badane oddzielnie, mimo iż w przypadku choroby wielogenowej należałoby spodziewać się jednoczesnego wpływu kilku genów modulujących ryzyko jej wystąpienia.

Do najczęściej wymienianych „kandydatów” należą geny: $\alpha 2$ makroglobuliny, katepsyny D, syntazy tlenku azotu, mieloperoksydazy, neprylizyny, enzymu rozkładającego insulinę [IDE], $\alpha 1$ antychymotrypsyny i plazminy.

Celem przedstawianej pracy były:

1. Ocena znaczenia polimorfizmu genów: apolipoproteiny E, $\alpha 2$ makroglobuliny, katepsyny D, mieloperoksydazy i syntazy tlenku azotu w patogenezie choroby Alzheimera – badanie oddziaływania pojedynczych genów i analiza jednoczesna.

2. Metaanaliza dotychczasowych badań nad polimorfizmem *apolipoproteiny E* w Polsce.
3. Szacunkowa ocena przydatności oznaczania genotypów badanych genów w diagnostyce klinicznej choroby Alzheimera oraz w poradnictwie genetycznym.

Badania przeprowadzono u 100 pacjentów z chorobą Alzheimera. Wszyscy badani pacjenci pozostają pod opieką Poradni Alzheimerowskiej MSWiA/IMDiK PAN w Warszawie. Rozpoznanie choroby jest stawiane w oparciu o badanie neuropsychologiczne, neurologiczne, psychiatryczne oraz CT mózgu i odpowiada prawdopodobnej chorobie Alzheimera wg. kryteriów NINCDS-ADRDA. Grupę kontrolną stanowiło 100 zdrowych osób dobranych pod względem płci i wieku. Osoby te nie zgłaszały zaburzeń pamięci, nie miały odchyłeń w badaniu neurologicznym a wynik testu Mini Mental State Examination wynosił co najmniej 27/ 30 pkt. Od wszystkich badanych osób pobrano 10 ml krwi obwodowej. DNA zostało wyizolowane z leukocytów krwi obwodowej przy użyciu metody solnej. Genotypowanie polimorfizmów genów *apolipoproteiny E*, $\alpha 2$ makroglobuliny, *katepsyny D*, *mieloperoksydazy* i *syntazy tlenu azotu* zostało wykonane przy zastosowaniu techniki PCR-RFLP, polegającej na amplifikacji wybranego fragmentu genu a następnie trawieniu odpowiednim enzymem restrykcyjnym.

W analizie statystycznej zastosowano test Chi-kwadrat do oceny zgodności rozkładu poszczególnych genotypów w grupie badanej i grupie kontrolnej. Jednoczesna analiza wpływu wszystkich badanych polimorfizmów jak również poszczególnych par genów została przeprowadzona przy użyciu wieloczynnikowej analizy regresji.

W przeprowadzonych badaniach wykazano istotną statystycznie różnicę pomiędzy grupami jedynie w zakresie genotypu *apolipoproteiny E*. Allel *APOE* $\epsilon 4$ występował

istotnie częściej w grupie pacjentów z chorobą Alzheimera w porównaniu do grupy kontrolnej (0.325 vs 0.11, $p < 0.005$). Analiza rozkładu genotypów $\alpha 2$ makroglobuliny, katepsyny D, mieloperoksydazy i syntazy tlenku azotu nie wykazała istotnych statystycznie różnic w teście Chi-kwadrat. Jednoczesna analiza par genów oraz wszystkich pięciu badanych polimorfizmów nie wykazała, by wpływ któregoś z genów był synergistyczny z oddziaływaniem apolipoproteiny E.

Przedstawione w pracy wyniki pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

1. Częstość występowania allelu *APOE* $\epsilon 4$ jest istotnie wyższa w grupie pacjentów z chorobą Alzheimera w porównaniu do grupy kontrolnej, co uzasadnia traktowanie tego allelu jako genetycznego czynnika ryzyka rozwoju choroby Alzheimera. Polimorfizmy genów $\alpha 2$ makroglobuliny, katepsyny D, mieloperoksydazy i syntazy tlenku azotu nie są czynnikami ryzyka rozwoju choroby Alzheimera w badanej grupie. Jednoczesna analiza oddziaływania pięciu polimorfizmów genetycznych wykazała, iż wpływ ten jest tożsamy z wpływem samego genotypu apolipoproteiny E.
2. Rozkład częstości występowania alleli genu apolipoproteiny E w populacji polskiej jest zgodny z opisywanym w literaturze rozkładem dla populacji kaukaskiej.
3. Badanie potwierdziło ograniczoną przydatność oznaczania genotypu apolipoproteiny E w diagnostyce klinicznej (dziedziczenie allelu *APOE* $\epsilon 4$ nie jest warunkiem koniecznym ani wystarczającym, by rozwinęła się choroba) jak również brak znaczenia tego badania w poradnictwie genetycznym. Badanie polimorfizmów $\alpha 2$ makroglobuliny, katepsyny D, mieloperoksydazy i syntazy tlenku azotu nie jest uzasadnione w praktyce klinicznej.

9. SPIS TABEL, RYCIN I WYKRESÓW ZAMIESZCZONYCH W TEKŚCIE

Tabela 1. Rozkład częstości alleli i genotypów <i>apolipoproteiny E</i> .	str. 56
Tabela 2. Częstość alleli <i>APOE</i> $\epsilon 4$, $\epsilon 3$ i $\epsilon 2$ w populacji polskiej – metaanaliza.	str. 57
Tabela 3. Częstość alleli <i>APOE</i> $\epsilon 4$, $\epsilon 3$ i $\epsilon 2$ wśród polskich pacjentów z chorobą Alzheimera o późnym początku – metaanaliza.	str. 58
Tabela 4. Rozkład alleli i genotypów $\alpha 2$ makroglobuliny, <i>katepsyny D</i> , <i>mieloperoksydazy</i> i syntazy tlenku azotu.	str. 61
Rycina 1. Wynik rozdziału elektroforetycznego trawionego produktu amplifikacji genu <i>apolipoproteiny E</i> .	str. 48
Rycina 2. Wynik rozdziału elektroforetycznego trawionego produktu amplifikacji genu $\alpha 2$ makroglobuliny.	str. 50
Rycina 3. Wynik rozdziału elektroforetycznego trawionego produktu amplifikacji genu <i>katepsyny D</i> .	str. 51
Rycina 4. Wynik rozdziału elektroforetycznego trawionego produktu amplifikacji genu <i>syntazy tlenku azotu</i> .	str. 52
Rycina 5. Wynik rozdziału elektroforetycznego trawionego produktu amplifikacji genu <i>mieloperoksydazy</i> .	str. 53
Wykres 1. Zależność wieku zachorowania na chA od ilości posiadanych alleli <i>APOE</i> $\epsilon 4$	str. 56