

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

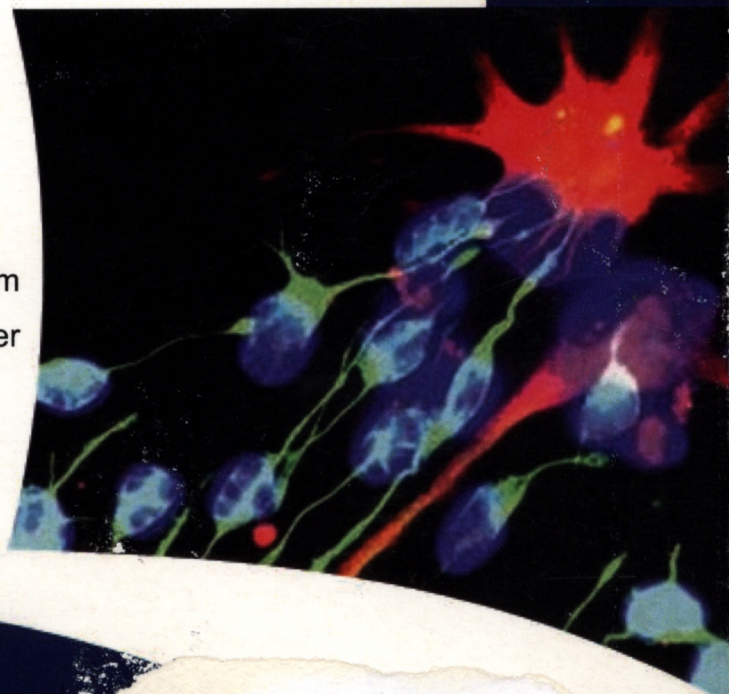
Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału



Znaczenie cyklooksygenaz i lipoksygenaz w neurotoksyczności peptydów amyloidu β z uwzględnieniem wpływu lipopolisacharydu

Magdalena Cąkała

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. Joanny B. Strosznajder



awa 2007

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego

Polska Akademia Nauk

Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału

Znaczenie cyklooksygenaz i lipoksygenaz w neurotoksyczności peptydów amyloidu β z uwzględnieniem wpływu lipopolisacharydu

Magdalena Cąkała



25 283

41 4145

**Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. Joanny B. Strosznajder**

Warszawa 2007

*Serdeczne podziękowania pragnę złożyć promotorowi
mojej pracy Pani Prof. dr hab. JOANNIE STROSZNAJDER
za ukierunkowanie mojego rozwoju naukowego
oraz stworzenie doskonałych warunków do pracy, cenne
wskazówki udzielone w trakcie wykonywania
i redagowania tej pracy oraz za życzliwość i pomoc.*

Bardzo dziękuję Pani Prof. dr hab. KRYSYTYNIE DOMAŃSKIEJ-JANIK za udostępnienie aparatu stereotaktycznego oraz dr MIROSŁAWOWI JANOWSKIEMU za naukę podawania stereotaktycznego.

Chciałabym ponadto gorąco podziękować wszystkim KOLEGOM i PRZYJACIOŁOM z Zakładu Komórkowej Transdukcji Sygnału za wspaniałą, przyjazną atmosferę, inspirujące dyskusje oraz wnikliwe uwagi i wszechstronną pomoc. Pani BEACIE dziękuję za ogromną pomoc w sprawach formalnych.

Najgorętsze podziękowania składam mojemu MĘŻOWI, który zawsze był przy mnie. Dziękuję za wsparcie, ogromną cierpliwość, wyrozumiałość i pomoc.

*Niniejszą pracę dedykuję moim wspaniałym RODZICOM,
którzy zawsze we mnie wierzyli i wspierali mnie.
To ich mądrości i miłości zawdzięczam to, kim jestem.*

Wyniki zamieszczone w niniejszej pracy zostały częściowo opublikowane w następujących pracach:

Cąkała M, Malik AR, Strosznajder JB (2007) Inhibitor of cyclooxygenase-2 protects against amyloid beta peptide-evoked memory impairment in mice. *Pharmacol Rep* 59: 164-172.

Chalimoniuk M, Stolecka A, **Cąkała M**, Hauptmann S, Schulz K, Lipka U, Leuner K, Eckert A, Müller WE, Strosznajder JB (2007) Elevated amyloid β generation enhances expression and activity of cytosolic phospholipase A₂ via the nitric oxide/cGMP pathway. *Acta Biochim Pol* (przyjęty do druku)

oraz zaprezentowane min. na następujących międzynarodowych zjazdach naukowych:

5th Forum of European Neuroscience in Vienna, Austria. Lipiec 8-12, 2006 "cPLA2 dependent signalling in amyloid beta precursor protein transfected cells. Role of nitric oxide" **Cąkała M**, Jęsko H, Strosznajder JB. Książka abstraktów 123, A048.3.

ICAD 2006, The 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders; Lipiec 15-20, 2006, Madryt, Hiszpania "The role of cyclooxygenases and lipoxygenases in mechanism of amyloid beta toxicity" **Cąkała M**, Jęsko H, Strosznajder JB. *Alzheimer's & Dementia* 2006, Suppl 1, S521, P4-028.

17th ESN Meeting – 3rd Conference on "Advances in Molecular Mechanisms of Neurological Disorders" Maj 19-22, 2007, Salamanca, Hiszpania "Inhibitor of cyclooxygenase-2 (COX-2) protects against A β (1-42) peptide evoked memory impairment in mice" **Cąkała M**, Malik AR, Strosznajder JB. *J Neurochem* 2007, 101 (Suppl. 1): 64.

Badania, których wyniki przedstawiono w tej pracy były częściowo finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach promotorskiego projektu badawczego nr 2 PO5A 058 30 oraz w ramach projektu badawczego nr PBZ-MIN-P001/PO5/16.

Spis treści

Spis ilustracji	15
Spis tabel.....	17
Wykaz skrótów stosowanych w pracy.....	19
1. Wstęp	23
1.1. Znaczenie peptydów amyloidu β i procesu zapalnego w chorobie Alzheimerera	23
1.1.1. Charakterystyka choroby Alzheimerera	23
1.1.2. Etiopatogeneza choroby Alzheimerera.....	24
1.1.3. Udział procesów zapalnych w patogenezie choroby Alzheimerera	29
1.2. Znaczenie enzymów uczestniczących w syntezie eikozanoidów w patogenezie choroby Alzheimerera i w procesach zapalnych w mózgu	32
1.2.1. Cyklooksygenazy	32
1.2.1.1. Występowanie i znaczenie COX w mózgu	35
1.2.1.2. Rola COX-2 w patogenezie choroby Alzheimerera.....	37
1.2.2. Lipoksygenazy	42
1.2.2.1. Występowanie i znaczenie lipoksygenaz w mózgu	46
1.2.2.2. Udział LOX w patogenezie choroby Alzheimerera	48
1.2.3. Inhibitory COX i LOX w chorobie Alzheimerera	49
2. Założenia i cel pracy.....	53
3. Materiały i Metody	55
3.1. Charakterystyka stosowanych inhibitorów COX i LOX.....	55
3.2. Badania <i>in vivo</i>	56
3.2.1. Materiał doświadczalny.....	56
3.2.2. Modele doświadczalne	57
3.2.2.1. Dokomorowe podanie $A\beta_{(1-42)}$ myszom	57
3.2.2.2. Indukcja uogólnionej odpowiedzi zapalnej po podaniu lipopolisacharydu	57
3.2.2.3. Farmakologiczna modyfikacja odpowiedzi mózgu na peptydy $A\beta$ i towarzyszące procesy zapalne	58
3.2.3. Testy behawioralne	58
3.2.3.1. Test otwartego pola	58
3.2.3.2. Test pamięci rozpoznawczej.....	59
3.2.4. Przygotowanie materiału do doświadczeń i analiz.....	59
3.2.4.1. Przygotowanie materiału do oznaczeń immunochemicznych	59
3.2.4.2. Przygotowanie frakcji cytozolowej do pomiaru aktywności COX i LOX.....	59
3.3. Badania <i>in vitro</i>	60
3.3.1. Materiał doświadczalny.....	60
3.3.2. Modele doświadczalne	60
3.3.2.1. Model stresu oksydacyjnego wywołanego nitroprusydkiem sodu w komórkach PC12.....	60

3.3.2.2. Farmakologiczna modyfikacja odpowiedzi komórek na peptydy A β i stres oksydacyjny	61
3.3.3. Przygotowanie materiału do doświadczeń i analiz	61
3.3.3.1. Przygotowanie materiału do oznaczeń immunochemicznych	61
3.3.3.2. Otrzymywanie frakcji podkomórkowych	61
3.3.3.3. Przygotowanie frakcji cytozolowej do pomiaru aktywności COX i LOX	62
3.4. Metody spektrofotometryczne	62
3.4.1. Oznaczanie zawartości białka	62
3.4.2. Analiza przeżywalności komórek za pomocą testu MTT	62
3.4.3. Pomiar aktywności cyklooksygenaz	63
3.4.4. Pomiar aktywności lipooksygenaz	63
3.5. Metody spektrofluorymetryczne	63
3.5.1. Analiza poziomu wolnych rodników w cytozolu komórek przy użyciu sondy fluorescencyjnej DCF	63
3.6. Metody immunochemiczne	64
3.6.1. Immunodetekcja białek metodą western blot	64
3.7. Metody radiochemiczne	65
3.7.1. Oznaczanie aktywności cytozolowej fosfolipazy A ₂	65
3.8. Analiza ekspresji genów	66
3.8.1. Izolacja RNA	66
3.8.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji	66
3.8.3. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)	67
3.9. Statystyczne opracowanie wyników	68
4. Wyniki	69
4.1. Badania <i>in vivo</i>	69
4.1.1. Ocena odpowiedzi myszy na lipopolisacharyd	69
4.1.2. Analiza immunoreaktywności cPLA ₂ , COX-2 i 12-LOX w hipokampie po równoczesnym podaniu A β ₍₁₋₄₂₎ i LPS	70
4.1.3. Badanie aktywności COX i LOX w hipokampie myszy po równoczesnym podaniu A β ₍₁₋₄₂₎ i LPS oraz inhibitora COX-2 lub 12-LOX	73
4.1.4. Wpływ A β ₍₁₋₄₂₎ na immunoreaktywność cPLA ₂ , COX-2 i 12-LOX w hipokampie myszy poddanych uprzednio działaniu LPS	74
4.1.5. Wpływ inhibitorów COX na immunoreaktywność cPLA ₂ w hipokampie myszy po równoczesnym podaniu A β ₍₁₋₄₂₎ i LPS	76
4.2. Testy behawioralne	77
4.2.1. Wpływ inhibitora COX-2 na zaburzenia aktywności lokomotorycznej i zaburzenia pamięci wywoływane przez A β i LPS	78
4.2.2. Działanie inhibitorów LOX	80
4.2.3. Ocena wpływu A β ₍₁₋₄₂₎ na aktywność lokomotoryczną i pamięć rozpoznawczą u zwierząt poddanych uprzednio działaniu LPS	81

4.3. Badania <i>in vitro</i>	83
4.3.1. Analiza immunoreaktywności i aktywności cPLA₂ w komórkach PC12 kontrolnych oraz transfekowanych APPwt i APPsw	83
4.3.2. Ocena immunoreaktywności COX-2 i aktywności COX w komórkach PC12 kontrolnych oraz transfekowanych APPwt i APPsw ⁸⁵	
4.3.3. Ocena immunoreaktywności i ekspresji mRNA 12-LOX oraz aktywności LOX w komórkach PC12 kontrolnych oraz transfekowanych APPwt i APPsw	87
4.3.4. Ocena poziomu wolnych rodników w komórkach PC12 kontrolnych oraz transfekowanych APPwt i APPsw	89
4.3.5. Analiza przeżywalności komórek poddanych działaniu nitroprusydku sodu oraz wpływ inhibitorów COX i LOX	89
4.3.6. Wpływ inhibitorów COX i LOX na poziom p65 we frakcji jądrowej komórek PC12 kontrolnych oraz transfekowanych genem dla białka APP	92
5. Dyskusja	95
6. Podsumowanie i wnioski	109
7. Streszczenie	111
Bibliografia	115

4.3. Badania in vivo	68
4.3.1. Analiza immunoreaktywności cPLA ₂ w komórkach PC12 kontrolnych oraz traktowanych Aβ ₁₋₄₂ i LPS	69
4.3.2. Ocena immunoreaktywności COX-2 i 12-LOX w komórkach PC12 kontrolnych oraz traktowanych Aβ ₁₋₄₂ i LPS	70
4.3.3. Ocena immunoreaktywności i ekspresji mRNA 12-LOX oraz aktywności LOX w komórkach PC12 kontrolnych oraz traktowanych Aβ ₁₋₄₂ i LPS	71
4.3.4. Ocena poziomu wolnych radikalów w komórkach PC12 kontrolnych oraz traktowanych Aβ ₁₋₄₂ i LPS	72
4.3.5. Analiza przesłaności komórek podległych poddaniu hipogrybku sodu oraz wolnych radikalów COX-2 i LOX	73
4.3.6. Wpływ inhibitorów COX-2 i LOX na poziom p65 we frakcji jądrowej komórek PC12 kontrolnych oraz traktowanych Aβ ₁₋₄₂ i LPS	74
5. Dyskusja	75
5.1. Ocena immunochemiczna	76
5.2. Podsumowanie i wnioski	77
5.3. Znaczenie	78
5.4. Znaczenia racjochemiczne	79
5.5. Bibliografia	80
5.6. Znaczenia ekologiczne	81
5.7. Znaczenia ekonomiczne	82
5.8. Znaczenia społeczne	83
5.9. Znaczenia polityczne	84
5.10. Znaczenia kulturalne	85
5.11. Znaczenia historyczne	86
5.12. Znaczenia filozoficzne	87
5.13. Znaczenia religijne	88
5.14. Znaczenia artystyczne	89
5.15. Znaczenia naukowe	90
5.16. Znaczenia techniczne	91
5.17. Znaczenia ekologiczne	92
5.18. Znaczenia ekonomiczne	93
5.19. Znaczenia społeczne	94
5.20. Znaczenia polityczne	95
5.21. Znaczenia kulturalne	96
5.22. Znaczenia historyczne	97
5.23. Znaczenia filozoficzne	98
5.24. Znaczenia religijne	99
5.25. Znaczenia artystyczne	100
5.26. Znaczenia naukowe	101
5.27. Znaczenia techniczne	102
5.28. Znaczenia ekologiczne	103
5.29. Znaczenia ekonomiczne	104
5.30. Znaczenia społeczne	105
5.31. Znaczenia polityczne	106
5.32. Znaczenia kulturalne	107
5.33. Znaczenia historyczne	108
5.34. Znaczenia filozoficzne	109
5.35. Znaczenia religijne	110
5.36. Znaczenia artystyczne	111
5.37. Znaczenia naukowe	112
5.38. Znaczenia techniczne	113
5.39. Znaczenia ekologiczne	114
5.40. Znaczenia ekonomiczne	115
5.41. Znaczenia społeczne	116
5.42. Znaczenia polityczne	117
5.43. Znaczenia kulturalne	118
5.44. Znaczenia historyczne	119
5.45. Znaczenia filozoficzne	120
5.46. Znaczenia religijne	121
5.47. Znaczenia artystyczne	122
5.48. Znaczenia naukowe	123
5.49. Znaczenia techniczne	124
5.50. Znaczenia ekologiczne	125
5.51. Znaczenia ekonomiczne	126
5.52. Znaczenia społeczne	127
5.53. Znaczenia polityczne	128
5.54. Znaczenia kulturalne	129
5.55. Znaczenia historyczne	130
5.56. Znaczenia filozoficzne	131
5.57. Znaczenia religijne	132
5.58. Znaczenia artystyczne	133
5.59. Znaczenia naukowe	134
5.60. Znaczenia techniczne	135
5.61. Znaczenia ekologiczne	136
5.62. Znaczenia ekonomiczne	137
5.63. Znaczenia społeczne	138
5.64. Znaczenia polityczne	139
5.65. Znaczenia kulturalne	140
5.66. Znaczenia historyczne	141
5.67. Znaczenia filozoficzne	142
5.68. Znaczenia religijne	143
5.69. Znaczenia artystyczne	144
5.70. Znaczenia naukowe	145
5.71. Znaczenia techniczne	146
5.72. Znaczenia ekologiczne	147
5.73. Znaczenia ekonomiczne	148
5.74. Znaczenia społeczne	149
5.75. Znaczenia polityczne	150
5.76. Znaczenia kulturalne	151
5.77. Znaczenia historyczne	152
5.78. Znaczenia filozoficzne	153
5.79. Znaczenia religijne	154
5.80. Znaczenia artystyczne	155
5.81. Znaczenia naukowe	156
5.82. Znaczenia techniczne	157
5.83. Znaczenia ekologiczne	158
5.84. Znaczenia ekonomiczne	159
5.85. Znaczenia społeczne	160
5.86. Znaczenia polityczne	161
5.87. Znaczenia kulturalne	162
5.88. Znaczenia historyczne	163
5.89. Znaczenia filozoficzne	164
5.90. Znaczenia religijne	165
5.91. Znaczenia artystyczne	166
5.92. Znaczenia naukowe	167
5.93. Znaczenia techniczne	168
5.94. Znaczenia ekologiczne	169
5.95. Znaczenia ekonomiczne	170
5.96. Znaczenia społeczne	171
5.97. Znaczenia polityczne	172
5.98. Znaczenia kulturalne	173
5.99. Znaczenia historyczne	174
5.100. Znaczenia filozoficzne	175

Spis ilustracji

Rycina 1. Amyloidowa hipoteza choroby Alzheimera z zaznaczonymi potencjalnymi miejscami uchwytu dla leków	25
Rycina 2. Wybrane mutacje białka prekursorowego amyloidu β (APP)	27
Rycina 3. Udział COX w przemianach kwasu arachidonowego	33
Rycina 4. Możliwe drogi indukcji ekspresji genu COX-2 w mózgu chorego na chorobę Alzheimera	38
Rycina 5. Udział COX-2 w patogenezie choroby Alzheimera	40
Rycina 6. Kolejność występowania zmian w mózgu w przebiegu choroby Alzheimera	42
Rycina 7. Drzewo filogenetyczne lipoksygenaz zwierzęcych	43
Rycina 8. Przebieg reakcji katalizowanej przez LOX	44
Rycina 9. Przemiany kwasu arachidonowego przy udziale lipoksygenaz	45
Rycina 10. Schemat przedstawiający możliwe punkty oddziaływania NLPZ	52
Rycina 11. Wzory chemiczne inhibitorów COX i LOX użytych w badaniach	55
Rycina 12. Dokomorowe podawanie $A\beta_{(1-42)}$ myszom.	57
Rycina 13. Analiza specyficzności reakcji PCR	68
Rycina 14. Zmiany poziomu białka COX-2 w mózgu po dootrzewnowym podaniu LPS myszom	70
Rycina 15. Wpływ $A\beta_{(1-42)}$ oraz $A\beta_{(1-42)}$ podanego równocześnie z LPS na immunoreaktywność cPLA ₂ , COX-2 i 12-LOX w hipokampie	72
Rycina 16. Wpływ $A\beta_{(1-42)}$ i LPS oraz inhibitora COX-2 lub 12-LOX na aktywność COX i LOX w hipokampie	74
Rycina 17. Wpływ $A\beta_{(1-42)}$ na immunoreaktywność cPLA ₂ , COX-2 i 12-LOX w hipokampie myszy poddanych uprzednio działaniu LPS	76
Rycina 18. Wpływ inhibitorów COX na immunoreaktywność cPLA ₂ w hipokampie myszy 8 dni po równoczesnym podaniu $A\beta_{(1-42)}$ i LPS	77
Rycina 19. Wpływ inhibitora COX-2 na aktywność lokomotoryczną i pamięć rozpoznawczą u myszy 7 dni po podaniu $A\beta_{(1-42)}$ i LPS	79
Rycina 20. Wpływ inhibitora 12-LOX na aktywność lokomotoryczną i pamięć rozpoznawczą 12-miesięcznych myszy 7 dni po podaniu $A\beta_{(1-42)}$	81
Rycina 21. Immunoreaktywność i aktywność cPLA ₂ w komórkach PC12 kontrolnych oraz transfekowanych APPwt i APPsw	84
Rycina 22. Aktywność COX i immunoreaktywność COX-2 w komórkach PC12 kontrolnych oraz transfekowanych APPwt i APPsw	86
Rycina 23. Immunoreaktywność i ekspresja mRNA 12-LOX oraz aktywność LOX w komórkach PC12 kontrolnych oraz transfekowanych APPwt i APPsw	88
Rycina 24. Poziom wolnych rodników w komórkach transfekowanych APP	89
Rycina 25. Przeżywalność komórek poddanych działaniu SNP	90

Rycina 26. Wpływ inhibitorów COX i LOX na obumieranie komórek pod wpływem SNP	92
Rycina 27. Poziom białka p65 we frakcji jądrowej komórek PC12 kontrolnych oraz transfekowanych APPwt i APPsw.....	93
Rycina 28. Wpływ inhibitorów COX i LOX na poziom białka p65 we frakcji jądrowej komórek APPsw	94

Spis tabel

Tabela 1.	Czynniki wpływające na poziom ekspresji genu COX-2	34
Tabela 2.	Wpływ inhibitorów COX i LOX na zawartość związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w homogenacie kory mózgowej szczura inkubowanej z FeCl ₂ i askorbinianem	56
Tabela 3.	Warunki reakcji immunochemicznej dla poszczególnych oznaczeń	65
Tabela 4.	Warunki reakcji PCR dla poszczególnych starterów	67
Tabela 5.	Wpływ A β ₍₁₋₄₂₎ na aktywność lokomotoryczną i pamięć u zwierząt poddanych uprzednio działaniu LPS	82
Tabela 6.	Wpływ dokomorowego podania A β na pamięć i zachowanie zwierząt oraz poziom cytokin i inne parametry	96

92

Table 1. Comparison of the results of the two methods.

Table 2. Comparison of the results of the two methods.

94

Table 3. Comparison of the results of the two methods.

Table 4. Comparison of the results of the two methods.

Table 5. Comparison of the results of the two methods.

Table 6. Comparison of the results of the two methods.

Wykaz skrótów stosowanych w pracy

13-HODE	kwask 13-hydroksyoktadekadienowy
AICD	wewnątrzkomórkową domena APP (ang. <i>APP intracellular domain</i> ,)
AMPA	kwask alfa-amino-3 hydroksy-5-metylo-4-izoksalopropionowy
APP	białko prekursorowe amyloidu β (ang. <i>β-amyloid precursor protein</i>)
APP ^{sw}	komórki transfekowane genem dla APP z mutacją typu szwedzkiego
APP ^{wt}	komórki transfekowane genem dla APP dzikiego typu
A β	amyloid β
bFGF	zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. <i>basic fibroblast growth factor</i>)
BSA	albumina z surowicy bydłowej
CDK	kinaza zależna od cyklin (ang. <i>cyclin dependent kinaze</i>)
COX	cyklooksygenaza,
CREB	białko wiążące się z elementem odpowiadającym na cAMP (ang. <i>c-AMP response element binding protein</i>)
DCF	2',7-dichlorofluoresceina
DCFH	2',7-dichlorofluorescyna
di-HETE	dihydroksykwask eikozatetraenowy
DMEM	pożywka Dulbecco zmodyfikowana przez Eagle'a (ang. <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>)
DMSO	dimetylosulfotlenek
DTT	ditiotreitrol
EGTA	kwask etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N' tetraoctowy
EP1, EP2, EP3, EP4	receptory prostaglandyn
ERK1/2	kinaza regulowana czynnikami zewnątrzkomórkowymi (ang. <i>extracellular signal regulated kinase</i>)
FAD	rodzinna postać choroby Alzheimera (ang. <i>Familiar Alzheimer's Disease</i>)

FCS	surowica cielęca
FLAP	białko aktywujące 5-LOX (ang. <i>5-LOX-activating protein</i>),
GABA	kwas gamma-aminomasłowy
GSK-3	kinaza 3 syntazy glikogenu
H ₂ DCF-DA	2',7-dichlorofluoresceina
HEPES	Kwas 2-[4-(2-hydroksetylo)-1-piperazyno]etanosulfonowy
HETE	hydroksykwas eikozatetraenowy
HPETE	kwas hydroperoksyeikozatetraenowy
HS	surowica końska
IDE	enzym degradujący insulinę (ang. <i>insulin degrading enzyme</i>)
IL	interleukina
LOX	lipoksygenaza
LPS	lipopolisacharyd
LTA ₄ , LTB ₄ , LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄ , LTF ₄	leukotrieny A ₄ , B ₄ , C ₄ , D ₄ , E ₄ , F ₄
LTD	długotrwała depresja synaptyczna (ang. <i>long-term depression</i>)
LTP	długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. <i>long-term potentiation</i>)
MTT	bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H- tetrazoliowy
NDGA	kwas nordihydrogwaretowy, inhibitor nieselektywny LOX
NF-IL6	jądrowy czynnik interleukiny 6 (ang. <i>nuclear factor-IL6</i>)
NFT	zwyrodnienia włókienkowe (ang. <i>neurofibrillary tangles</i>)
NF-κB	czynnik jądrowy kappaB
NLPZ	niesteroidowe leki przeciwzapalne
NMDA	N-metylo-D-asparaginian
NS-398	inhibitor COX-2
ONOO ⁻	nadtlenoazotyn

p38 MAPK	aktywowana mitogenami kinaza białkowa (<i>p38-mitogen-activated protein kinase</i>)
PBS	bufor fosforanowy
PC12	komórki chromochłonne guza nadnerczy (ang. <i>pheochromocytoma</i>)
PGG ₂ , PGH ₂ , PGD ₂ , PGE ₂ , PGF _{2α}	prostaglandyny G ₂ , H ₂ , D ₂ , E ₂ , F _{2α}
PGI ₂	prostacykliny
PHF	filamenty helikalne (ang. <i>paired helical filaments</i> ,)
PKA	kinaza białkowa A
PKC	kinaza białkowa C
PLA ₂	fosfolipaza A ₂ ,
cPLA ₂	cytozolowa fosfolipaza A ₂
PPAR	receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów (ang. <i>peroxisome proliferator-activated receptors</i>)
PS1, PS2	presenilina 1, 2
PVDF	polifluorek winylidenu
RI	indeks rozróżnienia (ang. <i>recognition index</i>)
SC-560	inhibitor COX-1
SEM	błąd standardowy średniej
SNP	nitroprusydek sodu
NOS	syntaza tlenu azotu
TAE	bufor o składzie 40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH doprowadzone kwasem octowym do 8,0
TBARS	związki reagujące z kwasem tiobarbiturowym (ang. <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>)
TBS	bufor o składzie 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH doprowadzone kwasem solnym do 7,6
TNFα	czynnik martwicy nowotworów α
Tris	tris(hydroksymetylo)aminometan
TxA ₂	Tromboksan A ₂



PCB
P38 MARK
PBB
PCTE
PGE, POF, POF
PGE, POF
PGL
PHF
PKA
PKC
PLA
PLA
PPA
PST, PSE
PVD
RI
SC-500
SEM
SNP
NOS
TAE
TBAR
TBS
TFR
Tis
Tx

1. Wstęp

1.1. Znaczenie peptydów amyloidu β i procesu zapalnego w chorobie Alzheimera

1.1.1. Charakterystyka choroby Alzheimera

Choroba Alzheimera należy do schorzeń neurodegeneracyjnych i odpowiada za około 50% wszystkich przypadków otępienia. Jest to postępujące, nieodwracalne zwyrodnienie ośrodkowego układu nerwowego z narastającym zespołem otępiennym, zespołem zaburzeń poznawczych, pamięci, osądu, podejmowania decyzji, orientacji i mowy [1].

Choroba została po raz pierwszy opisana w 1906 roku przez niemieckiego neuropatologa Aloisa Alzheimera [2] i przez lata uważana była za mało istotne zagadnienie neurologiczno-psychiatryczne. Obecnie wiadomo, że jest to choroba szeroko rozpowszechniona wśród osób starszych. W większości badań częstość występowania choroby Alzheimera wśród osób powyżej 65 roku życia ocenia się na 1,9-5,8%. W wieku pomiędzy 65 a 85 lat następuje znaczący wzrost liczby osób chorych, przy czym uważa się, że do jej podwojenia dochodzi co kolejne 5 lat [3]. Według niektórych badań wśród 85-latków co najmniej 25-30% cierpi na to schorzenie [4]. Ze względu na starzenie się społeczeństw choroba ta staje się coraz większym problemem. Ocenia się, iż na świecie 15 – 21 mln, zaś w Polsce ok. 500 tysięcy osób dotkniętych jest otępieniem, z czego połowa przypadków spowodowana ma być chorobą Alzheimera.

Choroba Alzheimera zaczyna się w sposób niezauważalny i przebiega z różną szybkością, aktywniej u osób młodszych. Proces zwyrodnienia neuronów rozpoczyna się około 20 lat przed wystąpieniem pierwszych objawów klinicznych. Objawy rozwijającej się choroby można rozpoznać dopiero, gdy zanik neuronów przestaje być kompensowany przez możliwości plastyczne mózgu. Przyjmuje się, że następuje to po utracie 60 – 80% neuronów w obszarach mózgu istotnych dla procesów pamięci.

Przyczyna choroby Alzheimera nie jest dokładnie poznana. Zaobserwowano, że w niektórych rodzinach zachorowania występują znacznie częściej niż przeciętnie. Na tej podstawie określono dwie postacie tej choroby: sporadyczną (o nieustalonej etiologii) oraz rodzinną, uwarunkowaną genetycznie (ang. *Familial Alzheimer's*

Disease, FAD). Populacyjne badania genetyczne wykazały, iż 5-10% wszystkich przypadków choroby stanowią zachorowania o podłożu rodzinnym [5].

1.1.2. Etiopatogeneza choroby Alzheimerera

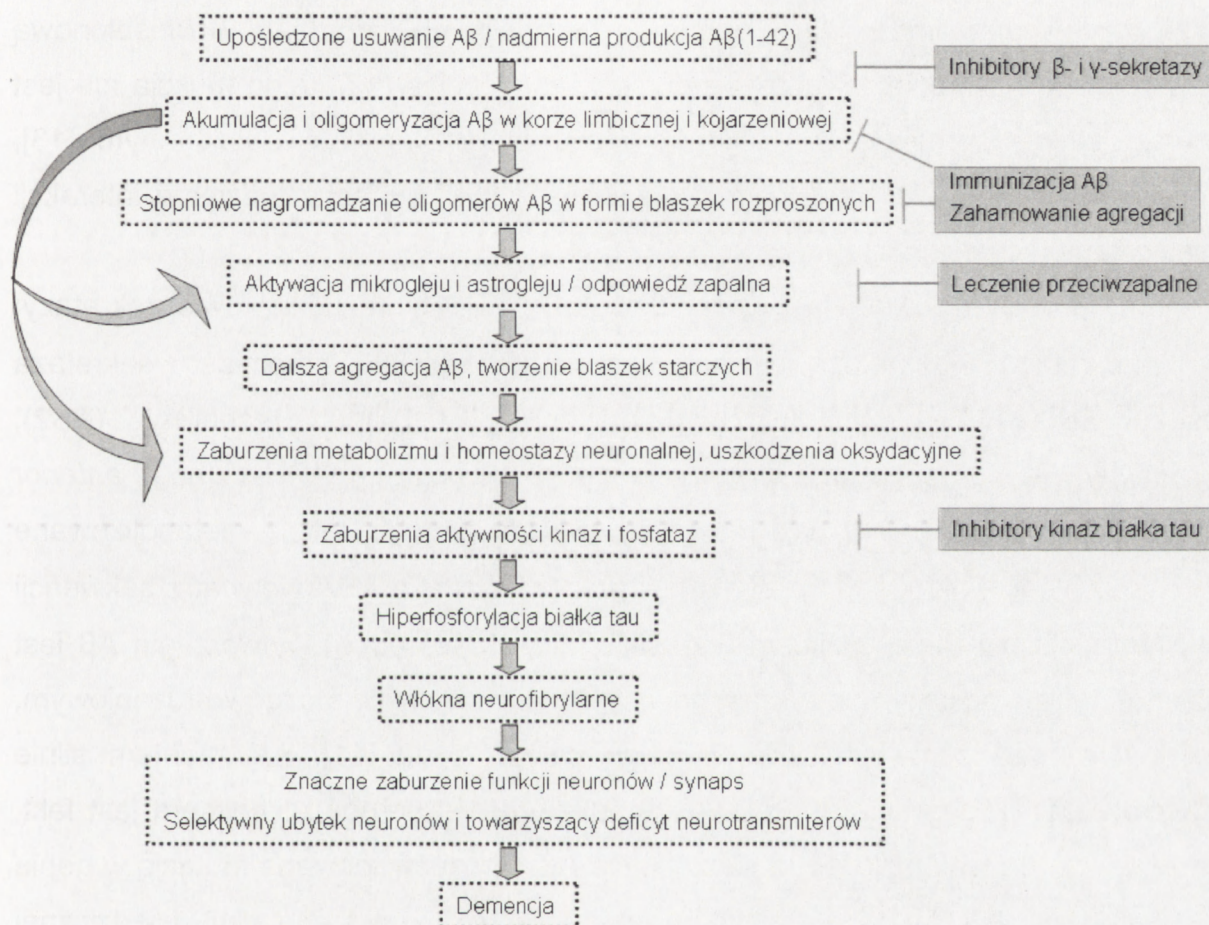
Etiologia choroby Alzheimerera do chwili obecnej pozostaje niewyjaśniona. Uważa się, że wiele czynników może wpływać na jej rozwój, a jak wspomniano, tylko w nielicznych przypadkach są za to odpowiedzialne czynniki genetyczne. Od wielu lat trwa spór pomiędzy zwolennikami hipotezy amyloidowej choroby Alzheimerera i hipotezy nadmiernej fosforylacji białka tau, który w ostatnim okresie zdaje się rozstrzygać na korzyść zwolenników hipotezy amyloidowej. Uważa się, że to A β odgrywa kluczową rolę w patogenezie choroby Alzheimerera [6], a procesy odpowiedzialne za jego nagromadzenie i kaskada zdarzeń prowadząca od uwalniania i oligomeryzacji A β do uszkodzenia zakończeń synaptycznych i obumierania neuronów mogą być punktem uchwytu dla skutecznej terapii tej choroby (Rycina 1).

Objawy neuropsychologiczne choroby Alzheimerera są skutkiem rozległego uszkodzenia tkanki nerwowej: zmniejszenia liczby neuronów i połączeń synaptycznych [7]. Zmiany neurodegeneracyjne dotyczą dość selektywnie pewnych rejonów mózgu: początkowo obejmują struktury allokortykalne, głównie korę entorinalną i warstwę CA1 hipokampa, a w dalszych etapach jądra międzymózgowia, prążkowie i jądro podstawne Meynerta oraz niektóre jądra pnia mózgu i twór siatkowaty, a niekiedy również mózdzek. W zaawansowanych stadiach choroby dochodzi do istotnego zmniejszenia masy mózgu, zwłaszcza struktur hipokampa (nawet o 45%) oraz płata skroniowego i ciała migdałowatego. Następuje zwężenie zakrętów i poszerzenie bruzd, głównie w płatach czołowych i skroniowych [1].

Ubytek neuronów powoduje obniżenie liczby połączeń synaptycznych, co ma odzwierciedlenie w zmniejszeniu poziomu neurotransmiterów i enzymów biorących udział w ich przemianach. W mózgu chorych na chorobę Alzheimerera dochodzi do zmniejszenia liczby neuronów cholinergicznym i aktywności acetylotransferazy, co zaburza przekaźnictwo cholinergiczne i jest przyczyną występujących zaburzeń poznawczych [8]. Obserwuje się także zaburzenia poziomu innych neuroprzekaźników: nadmiar glutaminianu oraz niedobór dopaminy, serotoniny, kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) a także innych związków biologicznie czynnych m.in. somatostatyny, neuropeptydu Y oraz substancji P. Obserwuje się także nadmierną aktywację receptorów NMDA, co może być przyczyną wzrostu

wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} i zaburzeń w wewnątrzkomórkowych szlakach przekazywania sygnału prowadzących do neurodegeneracji [9].

W mózgu chorych na chorobę Alzheimera występują charakterystyczne zmiany morfologiczne. Do zmian tych zalicza się przede wszystkim blaszki starcze i inne formy złogów peptydów amyloidu β ($A\beta$) oraz zwyrodnienia włókienkowe (ang. *neurofibrillary tangles*, NFT), zawierające hiperfosforylowane białka tau [10].



Rycina 1. Amyloidowa hipoteza choroby Alzheimera z zaznaczonymi potencjalnymi miejscami uchwytu dla leków

(zmodyfikowano na podstawie Hardy i Selkoe (2002) [6])

Oligomery $A\beta$ nagromadzają się wewnątrz- i zewnątrzkomórkowo powodując zaburzenia w funkcjonowaniu zakończeń nerwowych i neuronów. $A\beta$ ulega dalszej agregacji i aktywuje komórki mikrogleju i astrogleju. Odpowiedź zapalna nasila uszkodzenia neuronów. Zarówno sam $A\beta$, jak i odpowiedź zapalna są źródłem wolnych rodników i wywołują stres oksydacyjny oraz zaburzenia homeostazy. Uszkodzenie białek szkieletowych neuronów na skutek hiperfosforylacji białka tau prowadzi m.in. do znaczącego utrudnienia przewodzenia impulsów w neuronach i zaburzenia ich funkcji. Wszystkie te procesy prowadzą do neurodegeneracji.

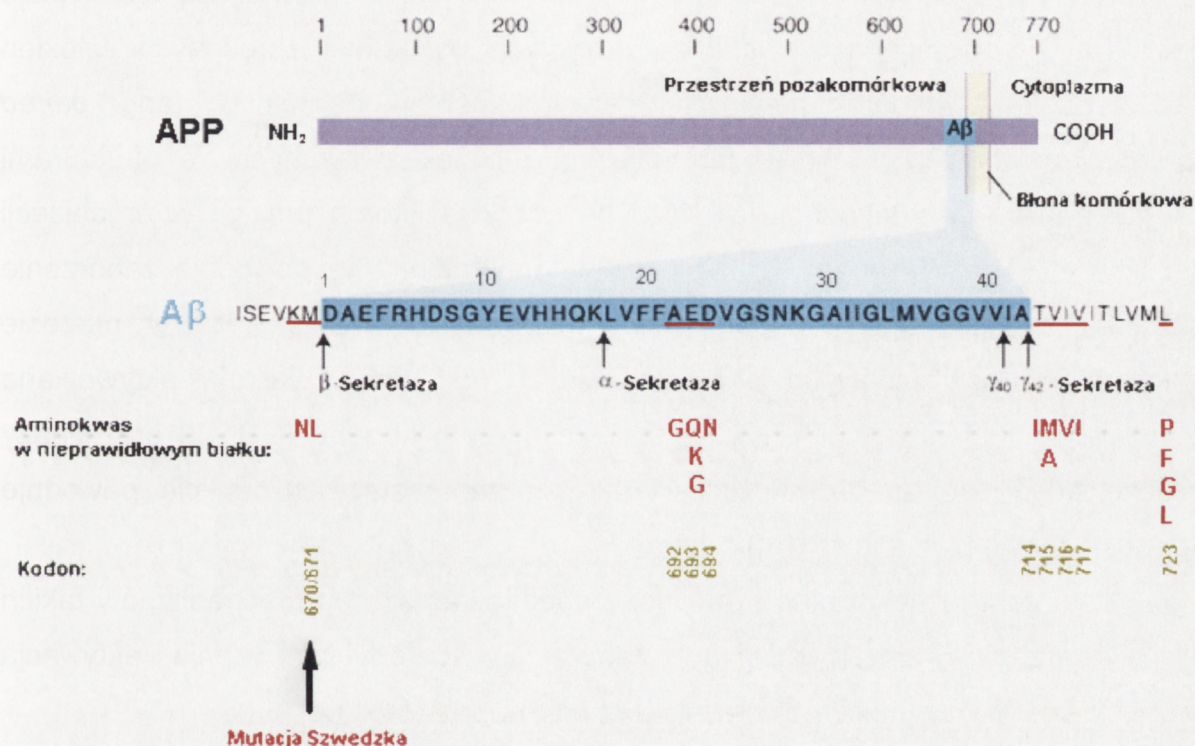
A β jest peptydem obecnym również w zdrowym mózgu [11]. Ma on długość od 39 do 43 aminokwasów i jest uwalniany w wyniku proteolizy białka prekursorowego amyloidu β (ang. *β -amyloid precursor protein*, APP). Gen kodujący APP zlokalizowany jest na dłuższym ramieniu chromosomu 21. APP jest białkiem błonowym, obecnym w licznych komórkach, również w nieneuronalnych, choć w neuronach jego zawartość jest stosunkowo wysoka. W mózgu występują 3 izoformy białka APP o długości 695, 751 oraz 770 aminokwasów, a główną izoformą neuronalną jest 695APP. W budowie APP można wyróżnić 3 domeny: dużą, zewnątrzkomórkową domenę sygnałową, domenę transbłonową oraz stosunkowo krótką, cytozolową domenę C-końcową [12]. Jego funkcja nie jest znana. Istnieją hipotezy, że białko to może być czynnikiem autokrynnym [13], troficznym, o właściwościach neuroprotekcyjnych [14], biorącym udział w interakcji międzykomórkowej [15].

W procesie powstawania peptydów A β z APP biorą udział dwie sekretazy: β - i γ -sekretaza. β -sekretaza jest proteazą aspartylową [16], natomiast γ -sekretaza jest kompleksem białkowym złożonym z preseniliny 1 (PS1) lub preseniliny 2 (PS2), nikastryny, PEN2 (ang. *presenilin enhancer 2 homolog*) i APH-1 (ang. *anterior pharynx defective 1 homolog A*) [17]. APP może być także metabolizowane w sposób nieamyloidogenny przez α -sekretazę, która tnie APP wewnątrz sekwencji A β . Metabolizm APP z udziałem wszystkich trzech sekretaz i wytwarzanie A β jest zjawiskiem fizjologicznym, a A β jest obecny zarówno w płynie mózgowo-rdzeniowym, jak i w osoczu zdrowych osób w ciągu całego życia [11]. Argumentem silnie przemawiającym za kluczową rolę A β w patogenezie choroby Alzheimera jest fakt, że zwiększone uwalnianie A β , a szczególnie A $\beta_{(1-42)}$, spowodowana mutacją w genie *APP* lub genie *PS1* i *PS2*, powoduje wystąpienie szybko postępującej, dziedzicznej choroby Alzheimera [18-20]. Dotychczas opisano około 25 mutacji tego genu, przy czym tylko część z nich odpowiada za rozwój rodzinnej formy tej choroby (Rycina 2). Tak zwana „mutacja szwedzka” w genie *APP* (KM670/671NL) powoduje nasilone cięcie APP przez β -sekretazę i prowadzi do zwiększonej syntezy A β [6].

W porównaniu z normalnie starzejącym się mózgiem, w mózgu osób chorych na chorobę Alzheimera obserwuje się wyższe stężenie rozpuszczalnego i nierozpuszczalnego A β o długości 42 aminokwasów. Stwierdzono, że zdolność do agregacji zależy od długości uwalnianego peptydu. Peptydy 1-42 są silniej hydrofobowe i łatwiej agregują, stąd ich większa neurotoksyczność [21].

A β przyjmuje strukturę β -harmonijki. Taka konformacja powoduje jego nierozpuszczalność i odporność na działanie proteaz.

Nierozpuszczalne włókna amyloidowe stanowią centra blaszek starczych, które zawierają także dystroficzne neuropyty i aktywowany mikroglej oraz są otoczone przez reaktywne astrocyty [22]. W blaszkach starczych wykryto także inne białka, m.in. apolipoproteinę E i J, białko tau, α_1 -antychymotrypsynę, α_2 -makroglobulinę, ubikwitynę, α -synukleinę, białka komplementu, klusteryny, witronektyny, gelsoliny i cystatyny oraz wielocukry.



Rycina 2. Wybrane mutacje białka prekursorowego amyloidu β (APP)
(zmodyfikowano na podstawie Selkoe, 2004 [5])

Pierwszym etapem tworzenia blaszek amyloidowych są tzw. blaszki amorficzne (dyfuzyjne) utworzone z peptydów A β , lecz pozbawione dystroficznych neuropytów. A β w tych blaszkach nie uzyskał jeszcze konformacji arkusza- β i występuje w postaci pojedynczych włókien, ponadto nie stwierdza się wokół nich reakcji astro-mikroglejowej.

Najnowsze badania wskazują, że główną neurotoksyczną formą A β nie są zewnątrzkomórkowe, nierozpuszczalne blaszki amyloidowe, lecz raczej rozpuszczalne oligomery A β zwane „profibrylami”, nagromadzające się wewnątrz-

i zewnątrzkomórkowo. Stwierdzono, że oligomery A β powodują zaburzenia pamięci poprzedzające wystąpienie zmian morfologicznych [23 - 25, 30], a poziom rozpuszczalnego A β koreluje ze stopniem zaburzeń poznawczych u chorych na chorobę Alzheimera [26]. Nasilone tworzenia blaszek amyloidowych z jednoczesnym obniżeniem ilości oligomerów u zwierząt transgenicznych wiąże się ze zmniejszeniem zaburzeń behawioralnych u tych zwierząt [27]. To właśnie oligomery, a nie monomery lub agregaty A β , zaburzą plastyczność synaptyczną mózgu [28] i powodują upośledzenie pamięci [25] oraz ubytek synaps [29], przy czym największą toksyczność przypisuje się trimerom A β [30].

Jednym z przejawów neurotoksyczności A β jest nieprawidłowa fosforylacja białka tau, powodująca powstanie parzystych, spiralnie skręconych włókien w cytoszkielecie komórek nerwowych, tzw. filamentów helikalnych (ang. *paired helical filaments*, PHF). Białko tau należy do białek związanych ze strukturami mikrotubuli, a w warunkach fizjologicznych odgrywa istotną funkcję w organizacji cytoszkieletu komórkowego. Powstałe sploty neurofibrylarne powodują zaburzenie transportu aksonalnego i degenerację neuronów. Uważa się, że w procesie fosforylacji białka tau biorą udział niektóre kinazy m.in. kinaza białkowa aktywowana czynnikiem mitogennym (MAPK), kinaza 3 syntazy glikogenu (GSK-3) oraz kinazy zależne od cykliny np. CDK5 lub CDK2. A β zaburzając ich funkcję powoduje hiperfosforylację białka tau [31, 32].

Neurotoksyczne działanie A β może obejmować szereg mechanizmów takich jak: wytwarzanie wolnych rodników, zaburzenia homeostazy wapnia, aktywacja pewnych szlaków sygnałowych oraz rozwój odpowiedzi zapalnej.

W mózgu osób chorych na chorobę Alzheimera obserwuje się wzrost poziomu uszkodzeń wolnorodnikowych [33]. Uważa się, że A β może powodować wytwarzanie wolnych rodników tlenowych, chociaż mechanizm nie jest do końca poznany. Wydaje się, że A β może wchodzić w interakcję z błonami komórkowymi powodując utlenianie lipidów [34] lub z jonami żelaza znajdującymi się w hemie różnych enzymów, m.in. kompleksu IV łańcucha oddechowego i w ten sposób zwiększać wytwarzanie wolnych rodników [35]. Wolnorodnikowe uszkodzenie lipidów błon komórkowych może powodować utratę integralności błon, zaburzenia homeostazy i uszkodzenie komórek. Obserwowane zaburzenia homeostazy jonów, szczególnie jonów wapnia w neuronach poddanych działaniu A β mogą być także związane z oddziaływaniem hydrofobowych agregatów A β z błonami, co może zmieniać nie tylko właściwości

fizykochemiczne błon, lecz także zaburzać funkcjonowanie receptorów i kanałów jonowych zlokalizowanych w tych błonach [36]. Zaburzenia homeostazy wapnia mogą być z kolei przyczyną obserwowanej w chorobie Alzheimera aktywacji licznych enzymów wrażliwych na poziom Ca^{2+} , takich jak: proteazy, fosfatazy, syntazy tlenku azotu (NOS) [37] i fosfolipazy [38], w tym cytozolowej fosfolipazy A_2 (cPLA₂) odpowiedzialnej w głównej mierze za uwalnianie nienasyconych kwasów tłuszczowych.

1.1.3. Udział procesów zapalnych w patogenezie choroby Alzheimera

Długo uważano, że mózg jest narządem „immunologicznie uprzywilejowanym”, w którym nie rozwija się proces zapalny. Obecnie wiadomo, że w mózgu osób chorych na chorobę Alzheimera i inne choroby neurodegeneracyjne występuje reakcja zapalna o charakterze chronicznym [39]. Wydaje się, że patologiczne, nierozpuszczalne złogi A β rozpoznawane są jako obcy materiał i powodują aktywację komórek odpowiedzi zapalnej [40]. W przebiegu zapalenia w ośrodkowym układzie nerwowym zaangażowane są głównie komórki mikrogleju i astrocyty, których nagromadzenie stwierdza się w okolicach złogów A β [41].

Komórki mikrogleju są głównymi komórkami układu immunologicznego mózgu i rdzenia kręgowego. Biorą udział w procesach dojrzewania i przebudowy mózgu oraz mają zdolność usuwania uszkodzonych nieodwracalnie komórek na drodze fagocytozy. W normalnym, dojrzałym mózgu mikroglej jest w stanie spoczynku, ale ulega aktywacji w przypadku infekcji, uszkodzeń lub akumulacji zmienionych strukturalnie białek. Stwierdzono, że złogi A β mogą przyciągać (chemotaksja) i aktywować komórki mikrogleju, które skupiają się wokół blaszek starczych [42] i stają się źródłem mediatorów prozapalnych, takich jak elementy układu dopełniacza, interleukiny (IL-1 β , IL-6, TNF α), chemokiny (IL-8, MIP-1 α , MCP-1) i wolne rodniki m.in. tlenek azotu [42, 43]. Ponadto wytwarzane przez mikroglej wolne rodniki mogą powodować uszkodzenia oksydacyjne neuronów, co może być nawet bardziej szkodliwe niż bezpośrednia toksyczność peptydów A β [44]. A β pobudza komórki mikrogleju do fagocytozy [45], a gromadzenie się mikrogleju wokół złogów może świadczyć o próbach usunięcia patologicznego białka i może mieć neuroprotektoryjne działanie [46]. Stwierdzono, że mikroglej w mózgu szczura może fagocytować A β , a następnie migrować do naczyń i komór, gdzie A β jest „składowany” [47]. Mikroglej może także degradować A β przy pomocy enzymu degradującego insulinę (ang. *insulin degrading enzyme*, IDE), który to enzym, poza

małymi białkami, takimi jak insulina i glukagon, degradowuje także A β i wewnątrzkomórkową domenę APP (ang. *APP intracellular domain*, AICD) [48]. Mutacja w genie tego enzymu występująca w cukrzycy typu 2 powoduje zwiększoną akumulację A β w mózgu oraz nasila jego wydzielanie [49]. Natomiast proces fagocytozy i degradacji A β przez mikroglej wydaje się być nie w pełni sprawny [50, 51]. Podanie przeciwciał przeciwko A β powoduje nasiloną fagocytozę i degradację A β przez mikroglej i oczyszcza mózg z jego złogów [52].

Astrocyty są kolejnymi komórkami układu nerwowego zaangażowanymi w odpowiedź na peptydy A β . Gromadzą się one w obszarze blaszek starczych [53]. Aktywowane astrocyty również mogą wydzielać szereg związków prozapalnych, takich jak interleukiny, prostaglandyny, leukotrieny, tromboksan, czynniki krzepnięcia, składniki dopełniacza, proteazy i inhibitory proteaz. Wydaje się, że astrocyty mogą brać udział w degradacji A β [54, 55], ale są one również źródłem wolnych rodników, w tym znacznej ilości tlenu azotu, które mogą uszkadzać neurony [56, 57].

Ostatnio zwrócono uwagę, że także neurony mogą być bezpośrednio zaangażowane w rozwój reakcji zapalnej. Wykazano między innymi, że mogą one produkować składniki dopełniacza, białko CRP, prostaglandyny i cytokiny (IL-1, IL-6, TNF α) [41, 58]. Uwalniane przez neurony czynniki prozapalne mogą inicjować dalsze procesy zapalne.

Hipoteza zapalna choroby Alzheimera uwzględnia następujące możliwości: 1) neurodegeneracja jest zjawiskiem wtórnym w stosunku do odpowiedzi zapalnej na blaszki starcze i NFT; 2) reakcja zapalna prowadzi do tworzenia blaszek starczych i NFT, co z kolei aktywuje odpowiedź immunologiczną nasilając autodestrukcyjny proces [59]. Liczne badania wskazują na istotną rolę zapalenia w rozwoju choroby Alzheimera. Stwierdzono, że osoby w mózgu których nie wykryto cech zapalenia, nie wykazują także objawów klinicznych choroby, mimo obecności patologicznych złogów A β [60]. Badania genetyczne wskazują, że polimorfizm niektórych genów prozapalnych może zwiększać ryzyko wystąpienia choroby Alzheimera [61]. W badaniach *in vitro* potwierdzono, że A β może aktywować mikroglej i astrocyty [62, 63]. Podawanie myszom inhibitora syntezy cytokin przez glej, MW01-5-188WH, zapobiegało uszkodzeniu synaps w hipokampie i znosiło zaburzenia behawioralne wywołane infuzją A β ₍₁₋₄₂₎, pozostając bez wpływu na ilość blaszek amyloidowych [64]. Obserwowana neuroprotekcja była więc związana

wyłącznie z hamowaniem aktywacji odpowiedzi zapalnej gleju. Najnowsze badania prowadzone na myszach transgenicznym z zmutowanym genem ludzkiego białka tau wykazały, że aktywacja mikrogleju i utrata połączeń synaptycznych występuje już u 3-miesięcznych zwierząt, podczas gdy patologiczne włókna tau obserwuje się dopiero w 6 miesiącu życia [65].

Poza odpowiedzią zapalną indukowaną w mózgu bezpośrednio przez złogi A β , istotny wpływ na rozwój i przebieg choroby Alzheimera mogą mieć procesy zapalne przebiegające w tkankach obwodowych. Od niedawna wiadomo, że mimo istnienia bariery krew-mózg, cytokiny syntetyzowane w trakcie odpowiedzi zapalnej w narządach obwodowych mogą wpływać na mózg [66]. Cytokiny mogą dostawać się do mózgu poprzez obszary okołokomorowe pozbawione bariery, mogą oddziaływać na mikroglej za pośrednictwem komórek śródbłonka naczyń, a także mogą być aktywnie transportowane przez barierę [67]. To z kolei może aktywować populację makrofagów w mózgu i indukować syntezę mediatorów zapalenia. Uogólniona odpowiedź zapalna może wywoływać stres oksydacyjny w mózgu, co może prowadzić do zaburzeń energetyki komórek [68] oraz translokacji czynnika indukującego apoptozę z mitochondriów do jąder, zjawiska charakterystycznego dla procesów apoptotycznych [69].

Obwodowe procesy zapalne mogą modulować procesy neuropatologiczne prowadzące do rozwoju choroby Alzheimera. Wydaje się, że odpowiedź mikrogleju na czynniki prozapalne jest zależna od tego, czy był on wcześniej aktywowany przez inny czynnik np. pochodzący z obwodu. Z drugiej strony mikroglej aktywowany w wyniku procesów neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera może być bardziej wrażliwy na wpływ prozapalnych czynników obwodowych. Perry [70] sugeruje, że profil cytokin w mózgu może być "przełączany" z przeciwwzapalnego na prozapalny przez obwodowe procesy zapalne. Szereg badań epidemiologicznych zdaje się potwierdzać tą hipotezę. W zwierzęcym modelu przewlekłej neurodegeneracji wywołanej za pomocą prionów ME7 zaobserwowano nasiloną odpowiedź na uogólnione zapalenie wywołane przez dootrzewnowe podanie LPS. U zwierząt tych obserwowano silniejszy wzrost temperatury, spadek aktywności i podwyższony poziom IL-1 β w mózgu w porównaniu ze zwierzętami bez choroby prionowej. Stwierdzono, że w przypadku, gdy mikroglej jest wstępnie aktywowany przez procesy neurodegeneracyjne, obwodowe stany zapalne mogą powodować rozwój przewlekłej odpowiedzi zapalnej w mózgu [71]. Zaobserwowano także,

że zdolności poznawcze osób chorych na chorobę Alzheimera mogą ulegać istotnemu pogorszeniu na skutek przebytego uogólnionego zapalenia [72], natomiast zwiększone wytwarzanie cytokin prozapalnych, a obniżone przeciwzapalnych, zwiększa ryzyko rozwoju tej choroby [73].

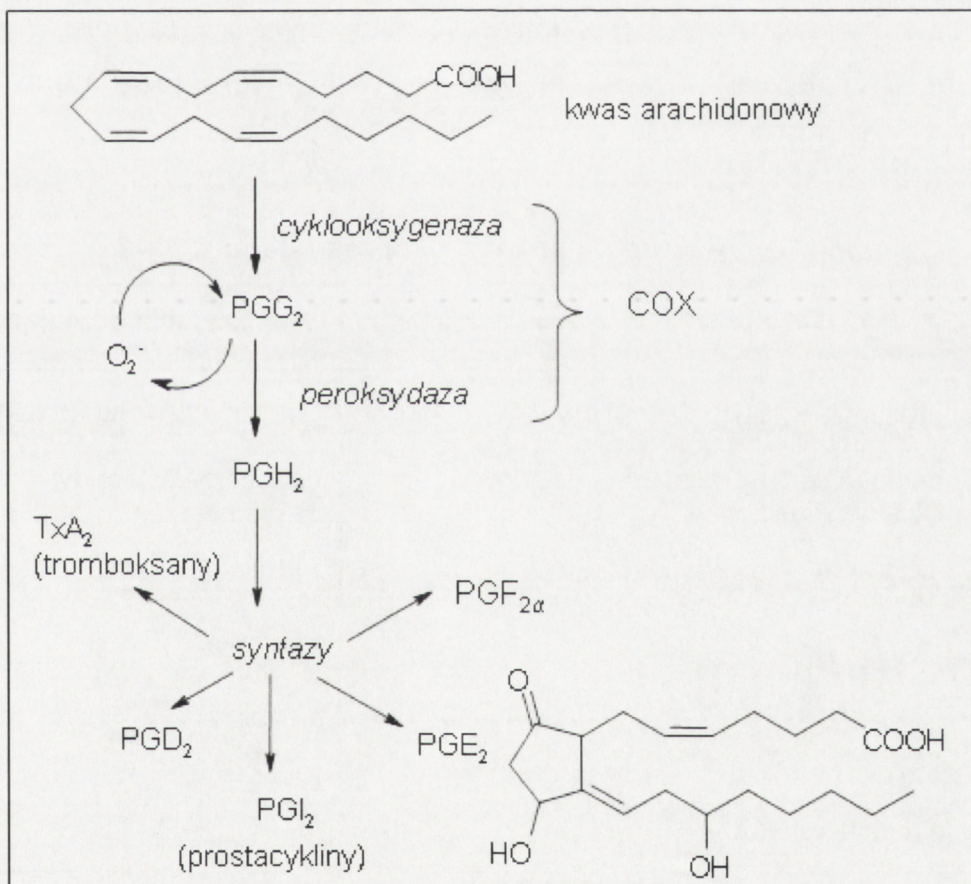
1.2. Znaczenie enzymów uczestniczących w syntezie eikozanoidów w patogenezie choroby Alzheimera i w procesach zapalnych w mózgu

Rolę zapalenia w patogenezie choroby Alzheimera potwierdza fakt, że długotrwałe stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) istotnie zmniejsza ryzyko zachorowania na tę chorobę [74 - 76]. NLPZ to grupa leków, których mechanizm działania polega na hamowaniu aktywności cyklooksygenaz, enzymów katalizujących pierwszy etap syntezy eikozanoidów z kwasu arachidonowego. Eikozanoidy to bardzo liczna grupa związków o różnorodnym działaniu, przy czym jedną z ich kluczowych funkcji jest regulacja przebiegu odpowiedzi zapalnej. Nazwą eikozanoidy określane są pochodne 20-węglowego kwasu arachidonowego. Kwas arachidonowy (wielonienasycony kwas tłuszczowy; 20:4, n-6) występuje w mózgu, zarówno w neuronach, jak i w innych komórkach, głównie w formie estrów glicerolu – fosfolipidów. Fosfolipidy są hydrolizowane przez PLA₂ w odpowiedzi na wiele czynników fizjologicznych i patologicznych, a uwolniony kwas arachidonowy ulega dalszym przemianom przy udziale cyklooksygenaz i lipoksygenaz [77].

1.2.1. Cyklooksygenazy

Cyklooksygenazy (COX) wykazują podwójną aktywność katalityczną: dioksygenazy (cyklooksygenazy), odpowiedzialną za syntezę prostaglandyny G₂ (PGG₂) z kwasu arachidonowego oraz peroksydazy, która odpowiada za redukcję PGG₂ do prostaglandyny H₂ (PGH₂) (Rycina 3). Z aktywnością peroksydazy wiąże się także wytwarzanie przez COX wolnych rodników, których część jest zużywana przez enzym w katalizowanych przez niego procesach [78]. PGH₂ jest następnie przekształcana przez specyficzne dla określonych tkanek syntazy lub izomerazy do kolejnych prostaglandyn (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}), prostacyklin (PGI₂) oraz tromboksanów (TxA₂). Wszystkie te produkty (prostanoidy) wykazują silne działanie autokryne i parakryne poprzez stymulację specyficznych receptorów. Dotychczas zidentyfikowano 4 klasy tych receptorów: EP1, EP2, EP3 i EP4. Są one białkami posiadającymi 7 hydrofobowych domen transbłonowych [79].

Produkty COX wywierają różnorodne, często przeciwstawne działania, specyficzne dla poszczególnych tkanek i narządów. Ponadto, jak wspomniano powyżej, są one silnymi mediatorami zapalenia [79]. Wiadomo jednak, że prostanoidy mogą działać zarówno pro- jak i przeciwzapalnie, w zależności od rodzaju czynnika wywołującego zapalenie oraz rodzaju syntetyzowanego prostanoidu, a także profilu receptorów prostanoidowych w danym typie komórek. PGE₂ posiada silne właściwości prozapalne, indukuje gorączkę oraz nasila ból, jednak posiada także właściwości przeciwzapalne, takie jak spowalnianie proliferacji limfocytów oraz hamowanie produkcji niektórych interleukin i interferonów. Prostanoidy mogą również modyfikować rozwój i dojrzewanie limfocytów T (PGE₂ hamuje, a TXA₂ nasila) i przez to regulować przebieg zapalenia [80].



Rycina 3. Udział COX w przemianach kwasu arachidonowego

Znane są 3 izoformy COX: COX-1, COX-2 i COX-3. W patogenezie choroby Alzheimera możliwy jest udział zarówno COX-1 jak i COX-2, jednak COX-2 wydaje się odgrywać ważniejszą rolę [81].

COX-1 charakteryzuje się konstytutywną ekspresją w tkankach i odpowiada za syntezę prostaglandyn zaangażowanych w utrzymanie homeostazy komórkowej [82]. COX-2 jest izoformą indukowaną, której podstawowa ekspresja w ludzkich tkankach jest niska, natomiast ulega indukcji w przebiegu odpowiedzi immunologicznej, w reakcji na bodźce zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe [83]. Gen kodujący COX-2 charakteryzuje się obecnością sekwencji TATA-box i miejscami wiążącymi dla czynników transkrypcyjnych (m.in.: NF- κ B, NF-IL6 (czynnik jądrowy interleukiny 6) i CREB (ang. *c-AMP response element binding protein*)) [84]. Aktywacja transkrypcji COX-2 zachodzi poprzez wiązanie czynników transkrypcyjnych do elementu *cis* w promotorze genu dla COX-2. To, jakie czynniki transkrypcyjne są zaangażowane w aktywację COX-2 zależy zarówno od typu komórki jak i działającego na nią bodźca [85 - 87]. Wzrost ekspresji genu COX-2 powodują m.in. cytokiny prozapalne, mitogeny i czynniki wzrostu. Z kolei glikokortykosteroidy i niektóre cytokiny hamują ekspresję genu COX-2 (Tabela 1) [78, 88, 89].

Tabela 1. Czynniki wpływające na poziom ekspresji genu COX-2

Czynniki aktywujące	Czynniki hamujące
Czynniki prozapalne: IL-1 β , IL-6, TNF α , LPS, PAF	Cytokiny: IL-4, IL-13, IL-10
Czynniki mitogenne: surowica, estry forbolu, transformacja wirusowa	Glikokortykosteroidy: deksametazon
Czynniki wzrostu: EGF, TGF- β , bFGF, PDGF	
Hormony: FSH, LH	
Interferon γ	
Aktywacja receptora NMDA	

W niektórych sytuacjach wzrost poziomu COX-2 związany jest z aktywacją jego transkrypcji, w innych natomiast zależy głównie od stabilizacji mRNA [90 - 93]. Odkryto, że nieulegający translacji koniec 3' mRNA COX-2 zawiera region bogaty w adeninę i uracyl, który odpowiada za post-transkrypcyjną kontrolę ekspresji COX-2, działając jako czynnik determinujący niestabilność mRNA lub czynnik hamujący translację [92].

Ponadto sugeruje się, że prostaglandyny uwalniane w przebiegu zapalenia aktywują ekspresję genu COX-2 w drodze pozytywnego sprzężenia zwrotnego. Wskazuje na to między innymi obniżenie poziomu tego enzymu przez indometacynę (nieselektywny inhibitor COX), jak również nasilanie ekspresji genu COX-2 przez PGE₂ w wielu typach komórek [88].

COX-3 jest niedawno odkrytą izoformą COX, powstałą z genu COX-1 w wyniku alternatywnego składania. Istnieją także 2 dodatkowe formy COX-1 zwane częściowymi (ang. *partial*): PCOX-1a i PCOX-1b, przy czym prawdopodobnie pozbawione są one aktywności katalitycznej. Znaczenie COX-3 nie jest dotąd poznane, niepewne jest także czy jest to w pełni funkcjonalny enzym [94].

1.2.1.1. Występowanie i znaczenie COX w mózgu

W niektórych tkankach i narządach COX-2 ulega konstytutywnej ekspresji. Należy do nich tkanka nerwowa [82, 95]. Ekspresja genu COX-2 w mózgu ludzi i gryzoni zachodzi przede wszystkim w neuronach, natomiast COX-1 syntetyzowana jest głównie w komórkach mikrogleju, ale także przez specyficzne populacje neuronów [96].

W mózgu szczura COX-2 jest obecna w neuronach hipokampa i kory mózgowej, natomiast COX-1 występuje w mniejszej ilości w hipokampie i korze mózgowej, a przeważa nad COX-2 w pozostałych regionach mózgu, takich jak śródmózgowie, most i rdzeń przedłużony. Neuronalna ekspresja COX-2 pełni ważną rolę w fizjologicznej funkcji neuronów, jak również może brać udział w procesach neurotoksyczności.

W hipokampie człowieka główną izoformą jest COX-2 [95]. Występuje on także w zakończeniach dendrytycznych neuronów korowych, stąd wniosek, że enzym ten bierze udział w sygnalizacji synaptycznej. Ponadto produkty COX, prostaglandyny, zlokalizowane są w pęcherzykach synaptycznych [97] i mogą być uwalniane do przestrzeni międzysynaptycznej [98]. Postuluje się rolę tego enzymu w procesach plastyczności, pamięci i uczenia [99]. Sugeruje się także, że PGE₂ wytwarzana przez COX, wpływa na plastyczność synaptyczną poprzez modulację przekazywania adrenergicznego, noradrenergicznego i glutaminergicznego lub/i remodelowanie aktywności cytoszkieletu oraz zmiany pobudliwości błony [81]. Stwierdzono, że COX-2 jest zaangażowany w inicjację długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (ang. *long-term potentiation*, LTP), które jest uważane za podstawę procesu uczenia się i pamięci na poziomie komórkowym [100]. Podwyższona aktywność synaptyczna,

związana z LTP, nasila ekspresję COX-2 [100]. W trakcie indukcji LTP, prostaglandyny (PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ i PGD_2) modulują aktywność synaptyczną wywierając działanie parakryne poprzez pre- i postsynaptyczne receptory oraz autokryne jako neuronalne i glejowe przekaźniki drugorzędowe [101]. Potwierdzeniem udziału COX-2 w procesach pamięci jest zaobserwowane hamujące działanie inhibitorów COX-2 na LTP w komórkach ziarnistych zakrętu zębatego hipokampa. Dodanie PGE_2 powodowało odwrócenie tego efektu [102]. Inhibitory COX-2 powodowały także obniżenie pobudliwości błon w neuronach piramidowych warstwy CA1 hipokampa, czemu także przeciwdziało podanie PGE_2 . Zwiększanie pobudliwości błon przez PGE_2 było związane z zahamowaniem prądu jonów K^+ , co z kolei zwiększało napływ Ca^{2+} . Zahamowanie PKA i PKC blokowało efekt PGE_2 na pobudliwość błon [103].

COX może także wpływać na transkrypcję genów. Stwierdzono, że w trakcie stymulacji komórek nerwowych, COX-2 ulega translokacji do otoczki jądrowej [104]. Powstała PGE_2 oddziałuje z jądrowymi receptorami EP1, a przez to wpływa na mobilizację wapnia i transkrypcję genów [105].

Komórki mikrogleju zawierają głównie COX-1, ale pod wpływem różnorodnych czynników, takich jak LPS, mogą syntezować także COX-2 [89]. Aktywność COX może mieć znaczenie dla procesu aktywacji komórek mikrogleju: wykazano, że indometacyna zmniejsza aktywację mikrogleju po domózgowej infuzji $\text{A}\beta$ u szczurów [106], a osoby leczone za pomocą NLPZ wykazują obniżony odsetek aktywowanego mikrogleju w mózgu [107].

W literaturze istnieją rozbieżne dane dotyczące ekspresji COX w astrocytach. Wg. Hoozemansa i wsp. [108] astrocyty nie syntezują COX-1 ani COX-2 zarówno w mózgu kontrolnym jak i u chorych na chorobę Alzheimera. Inni badacze obserwowali jednak ekspresję COX-2 w astrocytach mózgu ludzi zmarłych na skutek niedokrwienia [109], a także w mózgu szczura, przy czym obserwowano jego indukcję pod wpływem kainianu [110]. W badaniach *in vitro* wykazano pobudzenie ekspresji COX-2 w astrocytach pod wpływem LPS, $\text{TNF}\alpha$, estrów forbolu i bFGF [108, 111], a także pod wpływem peptydów $\text{A}\beta$ [112]. Stwierdzono także, że PGE_2 może pośredniczyć w uwalnianiu glutaminianu z astrocytów podczas stymulacji receptorów AMPA i kainianowych poprzez wpływ na poziom wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} [113].

Badania prowadzone na myszach knock-out (KO) pozbawionych genu dla COX-2 wykazały, że myszy te są mniej wrażliwe na uszkodzenia mózgu wywołane np. zamknięciem tętnicy środkowej mózgu. Jest to prawdopodobnie związane ze zmniejszonym toksycznym działaniem glutaminianu u tych zwierząt [114]. W przeciwieństwie do COX-2 KO, myszy pozbawione genu dla COX-1 są bardziej wrażliwe na niedokrwienie, co jest związane ze zmniejszonym przepływem krwi w obszarach objętych niedokrwieniem u zwierząt pozbawionych COX-1 [115].

Prostaglandyny odgrywają istotną rolę w regulacji krążenia mózgowego krwi. PGD₂ i PGI₂ działają rozkurczająco na naczynia, podczas gdy PGF_{2α} i TXA₂ powodują skurcz naczyń, przy czym efekt ten jest zależny od pobudzenia odpowiednich receptorów. Wiadomo, że istnieje wiele typów receptorów dla prostaglandyn, które mają różne szlaki przekazywania sygnału i mogą ulegać koekspresji [116].

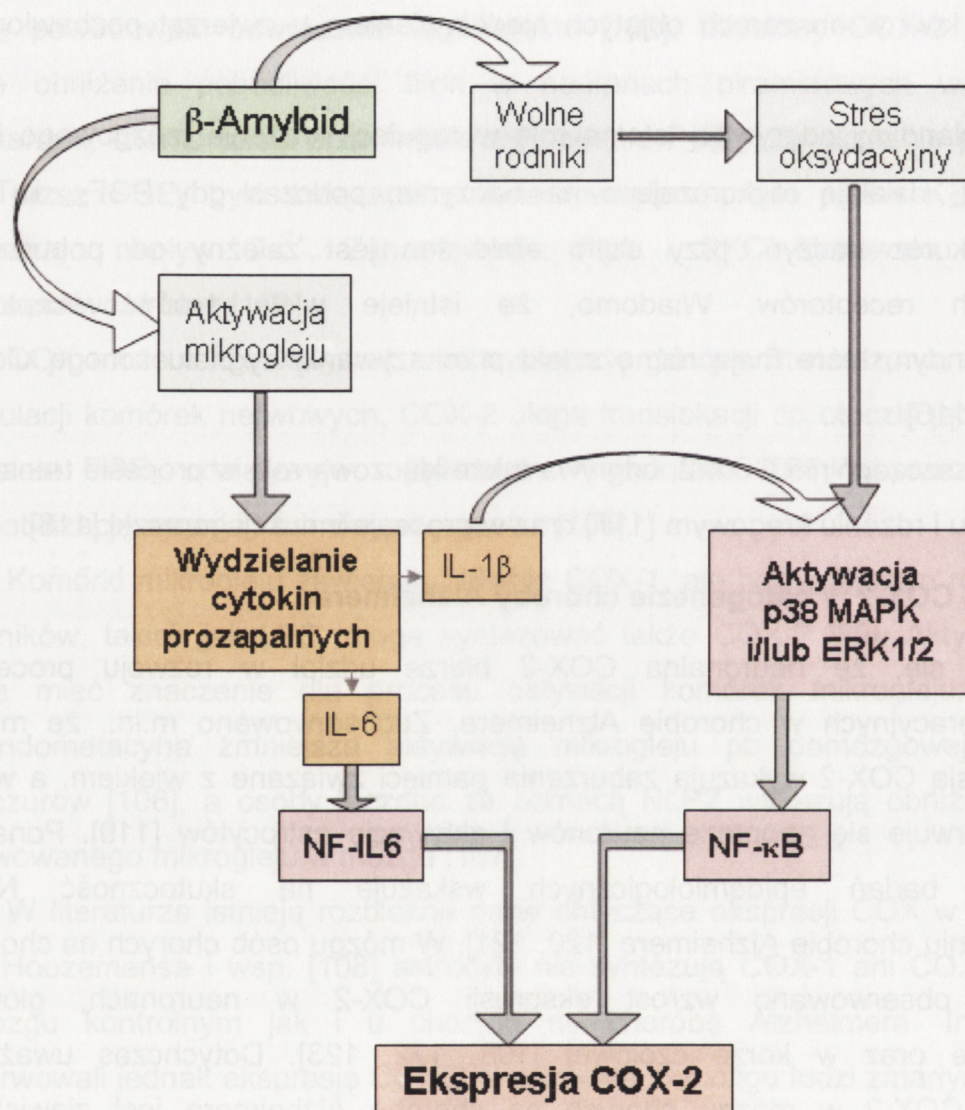
COX, a szczególnie COX-2, odgrywa także kluczową rolę w procesie transmisji bólu w mózgu i rdzeniu kręgowym [117] oraz w procesie indukcji gorączki [118].

1.2.1.2. Rola COX-2 w patogenezie choroby Alzheimera

Uważa się, że neuronalna COX-2 bierze udział w rozwoju procesów neurodegeneracyjnych w chorobie Alzheimera. Zaobserwowano m.in., że myszy z nadekspresją COX-2 wykazują zaburzenia pamięci związane z wiekiem, a w ich mózgu obserwuje się apoptozę neuronów i aktywację astrocytów [119]. Ponadto, ponad 20 badań epidemiologicznych wskazuje na skuteczność NLPZ w zapobieganiu chorobie Alzheimera [120, 121]. W mózgu osób chorych na chorobę Alzheimera obserwowano wzrost ekspresji COX-2 w neuronach, głównie w hipokampie oraz w korze czołowej [108, 122, 123]. Dotychczas uważano, że indukcja COX-2 w mózgu chorych na chorobę Alzheimera jest zjawiskiem wtórnym, związanym z rozwojem zapalenia wywołanego przez złogi peptydów Aβ i następuje pod wpływem uwalnianych przez mikroglej cytokin m.in. IL-1β. Indukcję COX-2 i wzrost syntezy PGE₂ pod wpływem IL-1β zaobserwowano *in vitro* w komórkach *neuroblastoma* i *neuroglioma* [108]. Stwierdzono udział p38 MAPK w przekazywaniu tego sygnału [124].

Najnowsze badania wskazują jednak, że ekspresja COX-2 w przebiegu choroby Alzheimera może być indukowana także bezpośrednio pod wpływem peptydów Aβ. Zjawiska prowadzące do ekspresji COX-2 obrazuje Rycina 4. Badania *in vitro*

prorowadzone na komórkach PC12 wykazały, że A β może indukować ekspresję COX-2 przy udziale p38 MAPK lub ERK1/2 oraz NF- κ B [125]. Aktywacja szlaku p38 MAPK i ERK1/2 jest prawdopodobnie odpowiedzią na stres oksydacyjny spowodowany działaniem A β . Najnowsze badania sugerują, że wzrost poziomu COX-2 w mózgu następuje w początkowych stadiach choroby, natomiast liczba neuronów wykazujących ekspresję COX-2 maleje wraz z jej postępem [126, 127].



Rycina 4. Możliwe drogi indukcji ekspresji genu COX-2 w mózgu chorego na chorobę Alzheimera

Obniżenie ekspresji genu COX-2 koreluje z aktywacją mikrogleju i astrocytów, co wskazuje, że indukcja COX-2 nie jest następstwem reakcji zapalnej, lecz raczej ją poprzedza [128]. Podobnie poziom PGE₂ w płynie mózgowo-rdzeniowym jest podwyższony u pacjentów z łagodnymi zaburzeniami pamięci i spada wraz z narastaniem demencji [129]. Stwierdzono, że PGD₂ i PGE₂ syntetyzowane przez

COX pod wpływem $A\beta_{(1-42)}$ powodują zmiany w neuronach, które prowadzą do aktywacji mikrogleju i niszczenia neuronów w kokulturach [130]. Wykazano ponadto, że myszy pozbawione receptora EP_2 dla PGE_2 są mniej podatne na uszkodzenia mózgu związane z aktywacją odpowiedzi immunologicznej, a mikroglej $EP_2(-/-)$ pod wpływem $A\beta_{(1-42)}$ nie nabywa właściwości neurotoksycznych, natomiast wzrasta jego zdolność fagocytozy peptydów $A\beta$ [131].

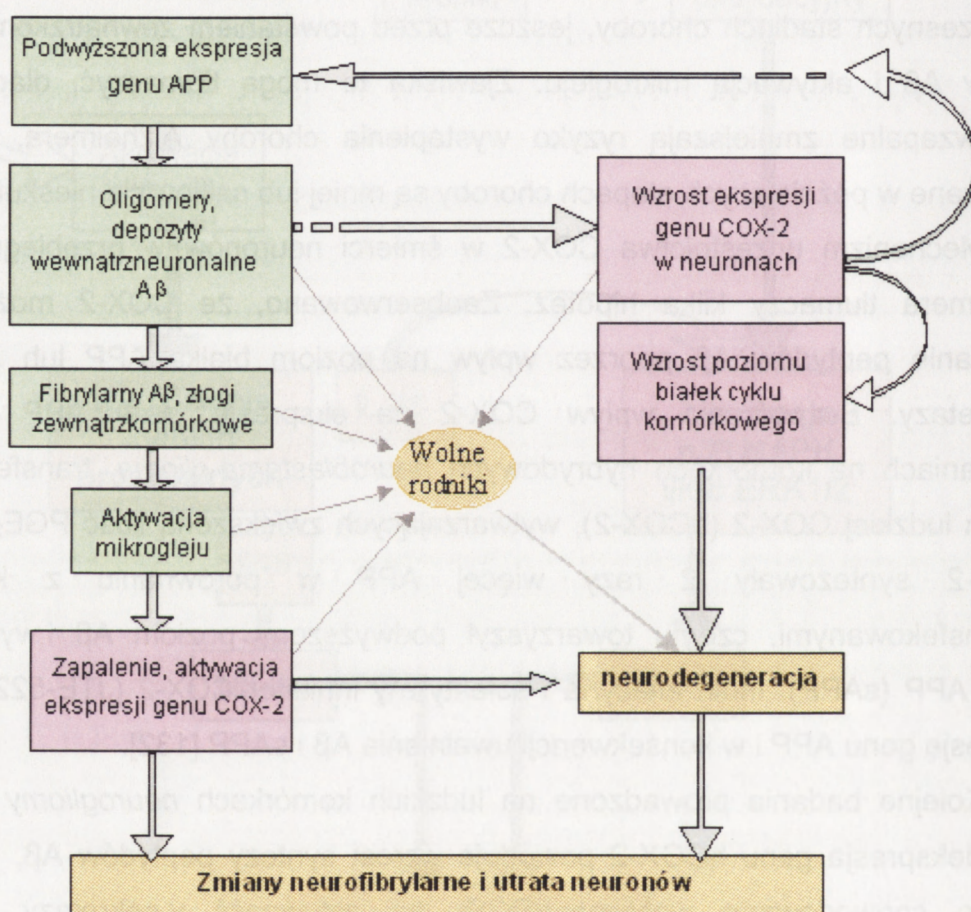
Tak więc, poza wtórną aktywacją COX-2 w przebiegu odpowiedzi zapalnej, postuluje się bezpośrednią rolę neuronalnej COX-2 w neurotoksyczności peptydów $A\beta$, oraz udział w aktywacji tejże odpowiedzi. Mogłoby to mieć znaczenie we wczesnych stadiach choroby, jeszcze przed powstaniem zewnątrzkomórkowych złogów $A\beta$ i aktywacją mikrogleju. Zjawiska te mogą tłumaczyć, dlaczego leki przeciwzapalne zmniejszają ryzyko wystąpienia choroby Alzheimera, natomiast stosowane w późniejszych etapach choroby są mniej lub całkowicie nieskuteczne.

Mechanizm uczestnictwa COX-2 w śmierci neuronów w przebiegu choroby Alzheimera tłumaczy kilka hipotez. Zaobserwowano, że COX-2 może nasilać uwalnianie peptydów $A\beta$ poprzez wpływ na poziom białka APP lub aktywność γ -sekreazy. Bezpośredni wpływ COX-2 na ekspresję genu APP wykazano w badaniach na komórkach hybrydowych *neuroblastoma-glioma*, transfekowanych genem ludzkiej COX-2 (hCOX-2), wytwarzających zwiększoną ilość PGE_2 . Komórki hCOX-2 syntezowały 2 razy więcej APP w porównaniu z komórkami nietransfekowanymi, czemu towarzyszył podwyższony poziom $A\beta$ i wydzielniczej formy APP (sAPP). Indometacyna i selektywny inhibitor COX-2 (JTE-522) obniżały ekspresję genu APP i w konsekwencji uwalnianie $A\beta$ i sAPP [132].

Kolejne badania prowadzone na ludzkich komórkach *neurogliomy* wykazały, że nadekspresja genu hCOX-2 powoduje wzrost syntezy peptydów $A\beta$, przy czym jest to spowodowane wpływem PGE_2 na aktywność γ -sekreazy. Ibuprofen (nieselektywny inhibitor COX) zapobiegał nadprodukcji $A\beta$ w tym modelu [133]. Badania *in vivo* na mysim modelu choroby Alzheimera potwierdziły, że neuronalna nadekspresja genu dla hCOX-2 może zwiększać uwalniania peptydów $A\beta$ oraz odkładanie blaszek starczych, bez jednoczesnej nadekspresji APP [134]. Dane te wskazują na wpływ aktywności COX-2 na metabolizm APP i uwalnianie $A\beta$ z białka prekursorowego. Należy jednak zauważyć, że zależność pomiędzy aktywnością COX, a akumulacją peptydów $A\beta$ i powstawaniem blaszek starczych nie została ostatecznie udowodniona. Badania przeprowadzone na mysim modelu

choroby Alzheimera nie wykazały wpływu nadekspresji genu COX-2 na akumulację peptydów A β , natomiast wykazały związek pomiędzy aktywnością COX, a zaburzeniem zdolności poznawczych tych zwierząt [135].

Oprócz sugerowanego wpływu COX-2 na ilość uwalnianego A β , postuluje się, że enzym ten może mieć udział w toksyczności zarówno zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkowych złogów A β (Rycina 5). Hipoteza ta znajduje potwierdzenie w wielu danych doświadczalnych, jednak mechanizm wpływu COX-2 na neurotoksyczność peptydów A β nie jest wyjaśniony.



Rycina 5. Udział COX-2 w patogenezie choroby Alzheimera

(zmodyfikowano na podstawie Hoozemans i wsp. 2006 [148])

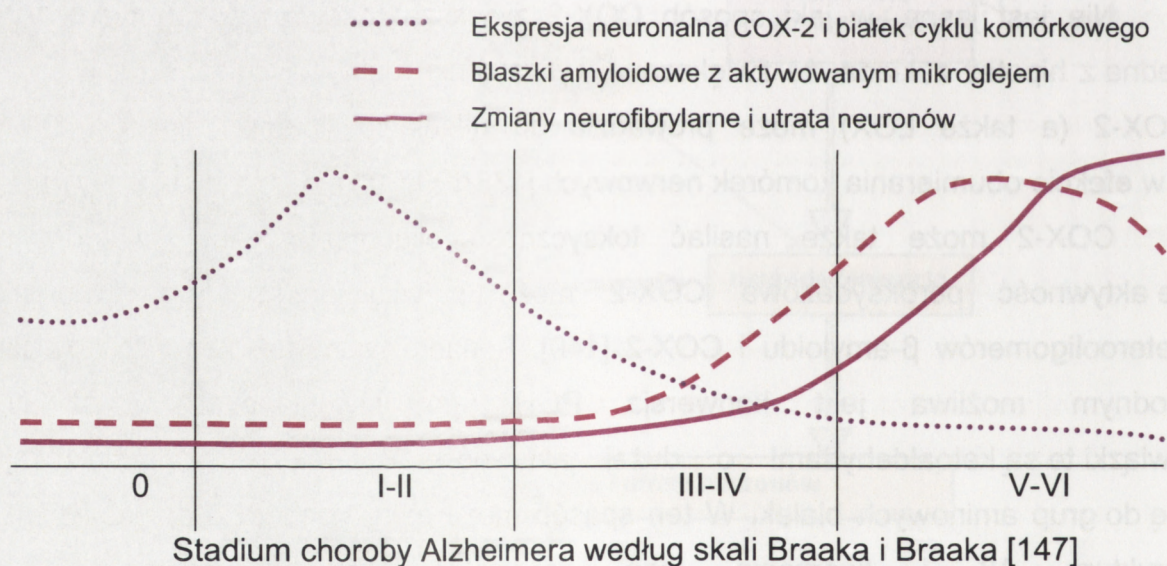
A β wytwarzany w zwiększonej ilości na skutek nadekspresji APP, ulega oligomeryzacji, a następnie dalszej agregacji prowadzącej do powstania depozytów i zewnątrzkomórkowych złogów A β . Złogi A β aktywują mikroglej i powodują rozwój zapalenia, w tym aktywację COX-2. Wewnątrzkomórkowe formy A β mogą również bezpośrednio powodować wzrost ekspresji COX-2 w neuronach oraz wzrost poziomu białek cyklu komórkowego. Aktywacja tych białek, jak również odpowiedź zapalna, prowadzą do neurodegeneracji i utraty neuronów. Zarówno A β , jak i komórki odpowiedzi zapalnej, w tym mikroglej oraz aktywowany COX-2, mogą być źródłem wolnych rodników, które mogą nasilać niekorzystne procesy. COX-2 może ponadto zwiększać ekspresję genu dla APP.

W badaniach *in vitro* przeprowadzonych na mysich neuronach transfekowanych genem hCOX-2 wykazano, że nadekspresja genu COX-2 zwiększa wrażliwość tych komórek na toksyczne działanie peptydów A β ₍₁₋₄₂₎ [136]. Z kolei działanie na komórki PC12 neurotoksycznym fragmentem A β , 25-35, powodowało wzrost ekspresji COX-2 i wzrost syntezy PGE₂ oraz aktywację śmierci na drodze apoptozy. Selektywne zahamowanie COX-2 zapobiegało śmierci komórek w tych warunkach doświadczalnych. Stwierdzono także, że PGE₂ nasila cytotoksyczne działanie peptydów A β na komórki PC12 [125]. Badania wykazały także ochronne działanie indometacyny w komórkach *neuroblastoma* na zaburzenia wywołane przez peptydy A β , kwas arachidonowy (substrat dla COX) oraz oba związki razem. Selektywne zahamowanie COX-2 (NS-398) zapobiegało śmierci komórek traktowanych kwasem arachidonowym oraz kombinacją kwasu arachidonowego i A β [137]. Świadczy to o udziale kwasu arachidonowego oraz jego metabolitów w toksyczności A β . W badaniach *in vivo* na mysim modelu choroby Alzheimera potwierdzono, iż nadekspresja genu dla COX-2 zwiększa neurotoksyczność A β czemu zapobiega zahamowanie COX-2 [135].

Nie jest jasne, w jaki sposób COX-2 zwiększa toksyczność peptydów A β . Jedną z hipotez zakłada, że zwiększone wytwarzanie reaktywnych form tlenu przez COX-2 (a także LOX) może prowadzić do utleniania lipidów, białek i DNA, a w efekcie obumierania komórek nerwowych [138,139].

COX-2 może także nasilać toksyczność oligomerów A β . Stwierdzono, że aktywność peroksydazowa COX-2 może przyczyniać się do tworzenia heterooligomerów β -amyloidu i COX-2 [140]. Ponadto wiadomo, że w środowisku wodnym możliwa jest konwersja PGH₂ do lewuglandyn E₂ i D₂. Związki te są ketoaldehydami o dużej aktywności chemicznej i przyłączają się do grup aminowych białek. W ten sposób może m.in. dochodzić do modyfikacji struktury A β i tworzenia jego neurotoksycznych oligomerów [141]. Lewuglandyny mogą reagować także z innymi białkami. Ilość zmodyfikowanych białek w hipokampie koreluje ze stopniem zaawansowania choroby [142]. Najnowsze dane wskazują, że wzrost poziomu COX-2 w neuronach może prowadzić do zmian ekspresji białek cyklu komórkowego. Neurony, jako komórki w pełni dojrzałe, nie mogą aktywować procesów mitotycznych. Uważa się, że w przypadku w pełni zróżnicowanych komórek ekspresja genów dla białek cyklu powoduje przekroczenie punktów kontrolnych cyklu i prowadzi do apoptozy [143].

Zaburzenia poziomu białek cyklu komórkowego w mózgu, m.in. obniżony poziom białka p18 (inhibitor cyklu komórkowego) zaobserwowano w badaniach *in vivo* [136]. Stwierdzono, że zahamowanie COX-2 zapobiega zaburzeniom poziomu tego białka [144]. Nieprawidłowości w poziomie białek kontrolujących przebieg cyklu obserwuje się także w mózgu osób chorych na chorobę Alzheimera [145]. W obszarach mózgu uszkodzonych w przebiegu choroby wykazano m.in. podwyższony poziom białek cyklu komórkowego: cyklin B, D, E oraz kinaz cyklinozależnych (CDK-4, CDK-5, CDK-2) [145]. Zaburzenia te korelują ze zmianami poziomu COX-2 [126, 144, 146]. Wyniki badań *in vitro* wskazują, że wzrost poziomu białek cyklu komórkowego towarzyszy apoptozie neuronów z nadekspresją COX-2, spowodowanej działaniem peptydów $A\beta_{(1-42)}$ [136]. Maksymalne zmiany w ekspresji COX-2 i w poziomie białka cyklu komórkowego, pRb, w neuronach stwierdzono we wczesnych stadiach choroby Alzheimera [112, 146] stąd przypuszczenie, że COX-2 i białka cyklu komórkowego są zaangażowane w odpowiedź na wewnątrzneuronalny $A\beta$, zanim powstaną złogi zewnątrzkomórkowe (Rycina 6).



Rycina 6. Kolejność występowania zmian w mózgu w przebiegu choroby Alzheimera 148

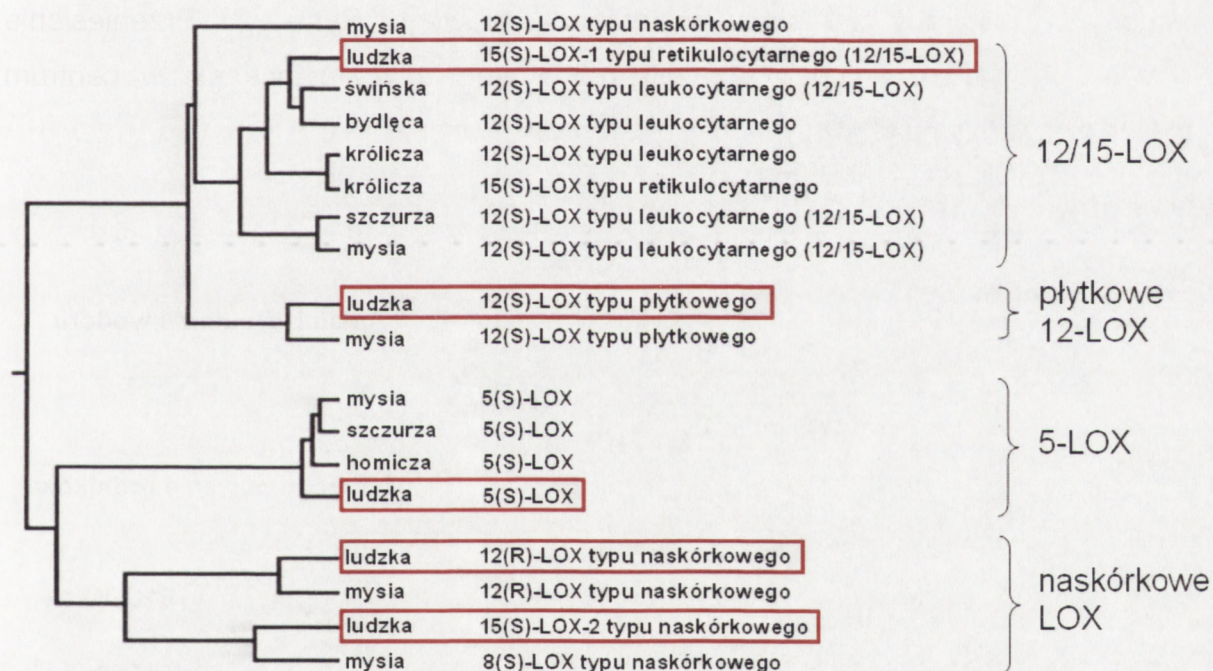
1.2.2. Lipoksygenazy

Lipoksygenazy (LOX) są dioksygenazami katalizującymi reakcję włączenia cząsteczki tlenu w specyficzną pozycję wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (reakcję peroksydacji), głównie kwasu arachidonowego. Produktem reakcji,

w przypadku peroksydacji kwasu arachidonowego, jest odpowiedni kwas hydroperoksyekoizatetraenowy (HPETE).

Nomenklatura lipoksygenaz pochodzi od pozycji atomu węgla, przy którym następuje utlenianie substratu, np. 12-LOX, 15-LOX oraz może wskazywać na stereospecyficzność enzymu, np. 12(S)-LOX lub 12(R)-LOX. Dodatkowo, dana lipoksygenaza może występować w kilku izoformach określanych w zależności od tkanki, w której została wykryta po raz pierwszy np. płytkowa, leukocytna, nabłonkowa. Niektóre LOX mogą katalizować kilka reakcji, np. retikulocytarna lipoksygenaza może utleniać kwas arachidonowy w pozycjach 12 i 15 w różnych proporcjach u różnych gatunków, przy czym u ludzi i królików przeważającym produktem jest 15-HPETE i enzym ten jest często określany jako 15-LOX [149].

Lipoksygenazy są szeroko rozpowszechnione zarówno w królestwie roślin jak i zwierząt i stanowią bardzo liczną grupę enzymów (Rycina 7).

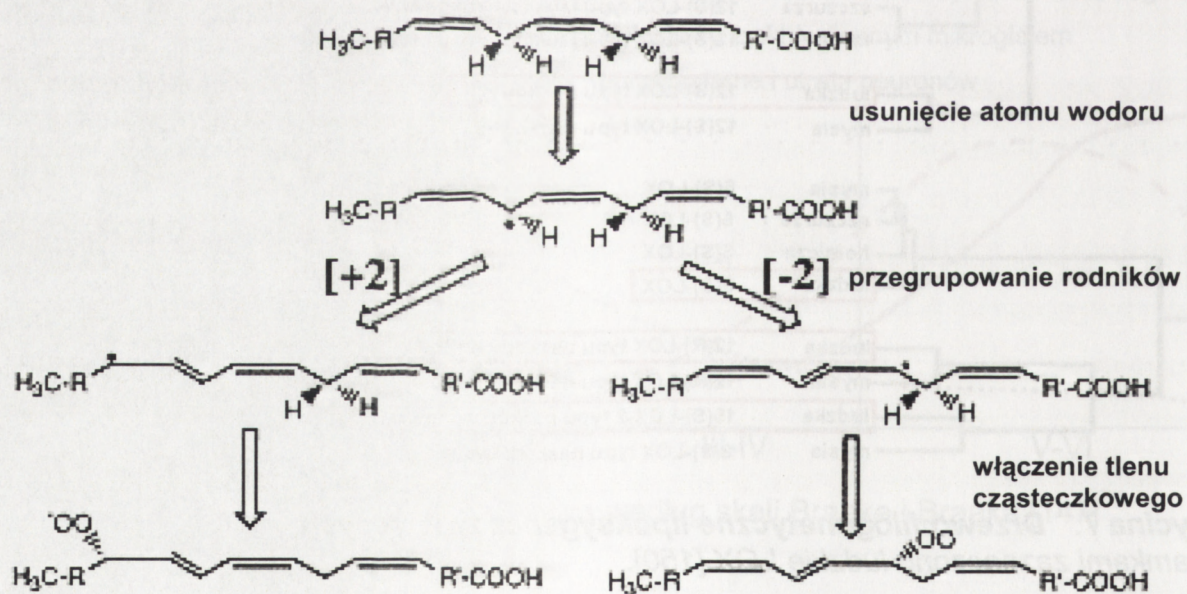


Rycina 7. Drzewo filogenetyczne lipoksygenaz zwierzęcych
Ramkami zaznaczono ludzkie LOX [150].

U ssaków wyróżniamy 5-, 8-, 12- i 15-LOX, oraz nowoodkrytą LOX-3, przy czym opisano 4 izoformy 12-LOX (płytkową 12(S)-LOX, leukocytarną 12(S)-LOX, oraz dwie naskórkowe: 12(S)-LOX i 12(R)-LOX) oraz 2 izoformy 15-LOX (15-LOX-1 zwaną też 12/15-LOX oraz 15-LOX-2)) [151]. W ludzkim genomie zidentyfikowano 7 genów kodujących LOX, wśród których 5 ulega ekspresji (*ALOX5*, *ALOX12*, *ALOX12B*, *ALOX15*, *ALOX15B* oraz *ALOX3*), a dwa to pseudogeny (*ALOX12P1*,

ALOX12P2). Produktem tych genów są odpowiednio: **5(S)-LOX**, płytkowa **12(S)-LOX**, naskórkowa **12(R)-LOX**, retikulocytna **15(S)-LOX-1**, naskórkowa **15(S)-LOX** [152] oraz naskórkowa **LOX-3** o właściwościach izomerazy wodoronadtlenkowej [153,154]. Pod względem powiązań filogenetycznych, u ssaków można wyróżnić 4 grupy LOX: 5-LOX, płytkowe 12-LOX, 15/12-LOX (do tej grupy będą należały zarówno mysia leukocytna 12-LOX jak i ludzka retikulocytna 15-LOX-1) oraz naskórkowe LOX (12(R)-LOX, ludzka 15-LOX-2 i jej mysia ortolog 8-LOX oraz LOX-3).

Reakcja katalizowana przez LOX obejmuje trzy etapy: 1) usunięcie bisallilowego atomu wodoru (specyficzne względem pozycji i stereoselektywne), powodujące powstanie wolnego rodnika, 2) reorganizację rodnika prowadzącą do powstania skoniugowanego wiązania cis-trans dienowego (sposób przegrupowania również zależy od specyficzności LOX), 3) stereospecyficzne włączenie tlenu cząsteczkowego i utworzenie rodnika nadtlenkowego, który jest następnie redukowany do anionu wodoronadtlenkowego (Rycina 8). Przeniesienie elektronu jest katalizowane przez żelazo niehemowe znajdujące się w centrum katalitycznym enzymu [151].

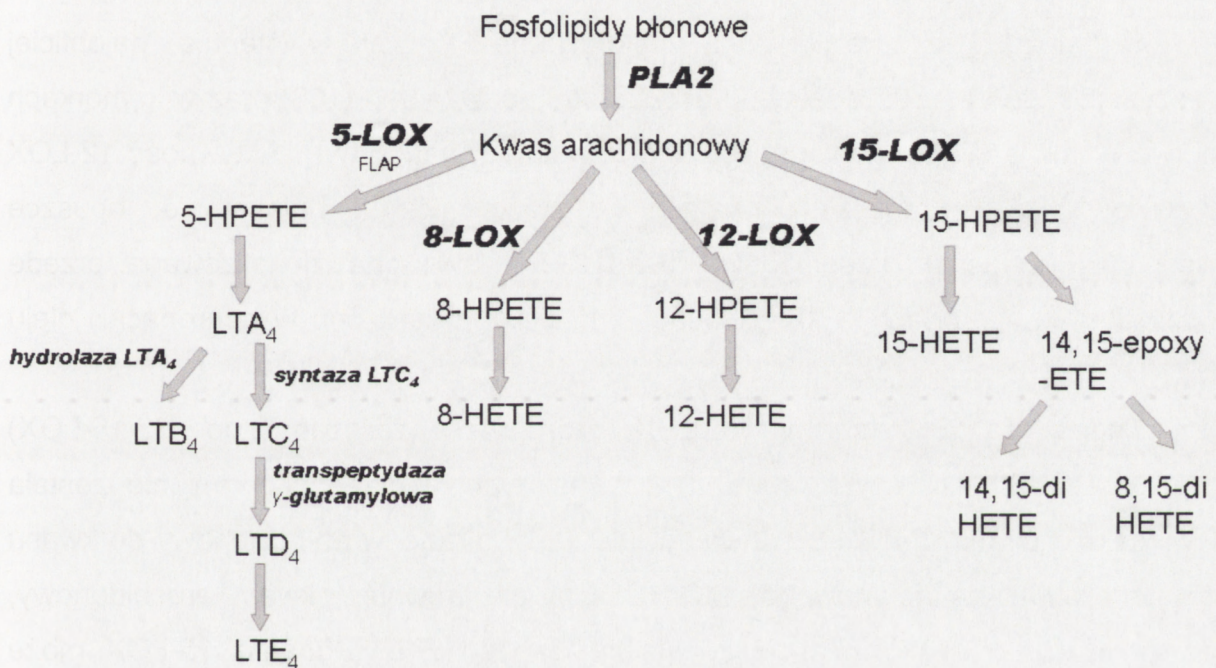


Rycina 8. Przebieg reakcji katalizowanej przez LOX 155

Głównym substratem dla LOX, podobnie jak dla COX, jest uwolniony przez PLA_2 kwas arachidonowy, z którego, w wyniku wstępnej oksigenacji, powstaje wodoronadtlenek eikozatetraenowy (HPETE). Jest on bardzo aktywnym chemicznie metabolitem pośrednim o krótkim czasie półtrwania. HPETE jest szybko redukowany

przez peroksydazę glutationową lub na drodze nieenzymatycznej do monohydroksykwasu eikozatetraenowego (HETE). Oprócz tych metabolitów, w wyniku dwóch kolejnych reakcji oksydacji katalizowanych przez dwie różne LOX, mogą powstawać również dihydroksykwasy eikozatetraenowe (di-HETE).

Produkty LOX wykazują dużą aktywność biologiczną (już w stężeniach nanomolowych) i mają właściwości molekuł sygnalizacyjnych. W zależności od enzymu mogą być one produktem pośrednim na szlaku syntezy innych cząstek sygnałowych: leukotrienów (np. 5-HETE) lub być produktem końcowym (np. 12-HETE) (Rycina 9).



Rycina 9. Przemiany kwasu arachidonowego przy udziale lipoksygenaz

Mechanizm działania produktów lipoksygenaz związany jest z wpływem na receptory powierzchniowe związane z białkami G (oddziaływanie autokrynne lub parakrynne) [156 - 158] oraz aktywację PKC [159]. Metabolity kwasu arachidonowego jak i linolowego, wytwarzane przez LOX, pełnią także funkcję naturalnych ligandów receptorów jądrowych PPAR (ang. *peroxisome proliferator-activated receptors*) [160 - 162].

Poza wytwarzaniem cząsteczek sygnalizacyjnych, lipoksygenazy odpowiadają także za peroksydację lipidów błonowych, która powoduje strukturalną modyfikację błon komórkowych. Retikulocytarna 15-LOX-1 jest w głównej mierze odpowiedzialna za peroksydację lipidów błonowych, podczas gdy inne enzymy, zaangażowane

są przede wszystkim w produkcję molekuł sygnalizacyjnych przy znacznie mniejszym działaniu peroksydacyjnym na błony [163].

1.2.2.1. Występowanie i znaczenie lipoksygenaz w mózgu

W mózgu w wyniku metabolizmu kwasu arachidonowego przez LOX powstają liczne produkty, a wśród nich 12-HETE, 15-HETE i 5-HETE oraz leukotrieny [164 - 166].

Za główną izoformę mózgową LOX uważa się 12/15-LOX, która u ludzi syntetyzuje głównie 15-HETE, a u gryzoni 12-HETE [149, 167 - 169]. 12-LOX sklonowano z mózgu szczura i stwierdzono, że wykazuje on ok. 75% homologii do wieprzowej leukocytarnej 12-LOX oraz ludzkiej retikulocytarnej 15-LOX-1 [165].

W mózgu szczura i świni leukocytarne 12-LOX występuje najobficiej w szyszynce [169, 170], a także w przysadce i podwzgórzu [168] oraz w komórkach nerwowych rdzenia kręgowego i górnego zwoju szyjnego [171]. Aktywność 12-LOX wykryto także w mózdzku, zwojach podstawy mózgu, hipokampie, opuszce węchowej i rdzeniu przedłużonym psa [172] i była ona zlokalizowana przede wszystkim w neuronach [173]. Obecność 12-LOX stwierdzono w neuronach i gleju [173, 174].

Znane są 2 izoformy 15-LOX, 15-LOX-1 (zaliczana do 12/15-LOX) oraz 15-LOX-2, przy czym druga z nich jest typowa dla naskórka i nie została wykryta w mózgu. 15-LOX-1 preferencyjnie metabolizuje kwas linolenowy do kwasu 13-hydroksyoktadekadienowego (13-HODE), ale również kwas arachidonowy, do 15-HETE, a także, w mniejszej ilości, do 12-HETE. Ponadto 15-LOX może przekształcać LTA_4 uwolniony przez komórki (np. makrofagi i leukocyty) do lipoksyn, które mają działanie przeciwzapalne [175]. 15-LOX, poza wytwarzaniem 15-HETE z kwasu arachidonowego, może także utleniać zestryfikowane wielonienasycone kwasy tłuszczowe, będące składnikami błon biologicznych, bez konieczności wcześniejszego ich uwalniania przez PLA_2 .

5-LOX w warunkach fizjologicznych występuje w neuronach i gleju, natomiast po urazach mózgu i niedokrwieniu obserwuje się wzrost poziomu 5-LOX w mikrogleju [176] i astrocytach [177]. Najobficiej 5-LOX występuje w hipokampie i mózdzku, a także w szyszynce [178, 179]

5-LOX katalizuje pierwszą reakcję na szlaku syntezy leukotrienów, w której z 5-HETE powstaje niestabilny leukotrien A_4 (LTA_4). Związek ten jest substratem dla dalszych enzymów, przekształcających go w LTB_4 lub LTC_4 . LTC_4 jest następnie

metabolizowany do leukotrienów cysteinylowych: LTD₄, LTE₄ i LTF₄ [150] (Rycina 9). Reakcja katalizowana przez 5-LOX może zajść jedynie przy udziale białka FLAP (ang. *5-LOX-activating protein*), które udostępnia substrat dla 5-LOX [180].

Leukotrieny są molekułami aktywnymi biologicznie, przekazującymi informację za pośrednictwem specyficznych błonowych receptorów leukotrienowych sprzężonych z białkami G [181]. Leukotrieny LTC₄, LTD₄ i LTE₄ powodują skurcz mięśni gładkich naczyń krwionośnych, przy czym ich wpływ na naczynia mózgowe jest słabszy niż w przypadku naczyń obwodowych [182]. Także 5-, 12- i 15-HETE wywierają silny efekt na naczynia krwionośne i biorą udział w zwiększaniu przepuszczalności naczyń [183].

W układzie nerwowym istotną rolę zdają się odgrywać metabolity 12-LOX, które mogą wpływać na aktywność synaptyczną. W neuronach mechanosensorycznych ślimaka morskiego *Aplysia californica* pełnią one funkcję przekaźników drugiego rzędu [184 - 186]. Stwierdzono, że mogą one regulować proces transmisji synaptycznej [187]. Zaobserwowano, że glutaminian i NMDA stymulują metabolizm kwasu arachidonowego przez 12-LOX i zwiększają syntezę 12-HETE [188, 189], który może wpływać na uwalnianie glutaminianu z zakończeń synaptycznych hipokampa [190] działając jako zwrotny przekaźnik. Dorman i wsp. [191] zaobserwowali, że kwas arachidonowy nasila uwalnianie glutaminianu w odpowiedzi na depolaryzację błony, podczas gdy produkty 12-LOX obniżają akumulację Ca²⁺ i glutaminianu w przestrzeni międzysynaptycznej wywołaną depolaryzacją, przeciwdziałając efektowi kwasu arachidonowego i ograniczając uwalnianie neurotransmitera. Zarówno neurony poddane działaniu inhibitora 12-LOX, jaki i myszy 12-LOX KO są odporne na toksyczność glutaminianu [192]. Stwierdzono także, że 12-HPETE zmniejsza wiązanie AMPA do synaptoneurosomów hipokampa szczura poprzez wpływ na powinowactwo receptora [193]. Wykazano, że metabolity 12-LOX są niezbędne dla wywołania długotrwałej depresji synaptycznego (ang. *long-term depression*, LTD) zależnej od metabotropowych receptorów glutaminergicznych, nie są natomiast potrzebne dla LTP [194]. Stwierdzono także, że mogą one zwiększać pobudliwość błon poprzez specyficzne hamowanie kanałów K⁺ typu M [186, 195, 196].

Szczególną rolę 12-LOX obserwuje się w warunkach niedoboru glutationu. Stwierdzono, że w takich warunkach nawet małe stężenia tlenu azotu, mające normalnie neuroprotektoryjne działanie, mogą stać się dla komórek toksyczne,

przy czym inhibitor 12-LOX zapobiega tej toksyczności. Również egzogeny kwas arachidonowy dodany do hodowli neuronów z obniżonym poziomem glutationu powoduje ich śmierć na drodze zależnej od 12-LOX, a produkt 12-LOX, 12-HETE, dodany do hodowli zabija neurony, przy czym efekt ten jest wzmacniany przez niedobór glutationu [197]. Zużycie glutationu w neuronach korowych powoduje indukcję i aktywację 12-LOX oraz jej translokację do błon i uwalnianie nadtlenu lipidowych. Powoduje to napływ Ca^{2+} do komórek i ich śmierć. Zahamowanie 12-LOX zapobiega obumieraniu neuronów w warunkach niedoboru glutationu [198]. Produkty lipoksygenaz odgrywają także istotną rolę w patogenezie wielu chorób, takich jak miażdżyca tętnic, choroba Alzheimera i nowotwory [199 - 201].

1.2.2.2. Udział LOX w patogenezie choroby Alzheimera

Rola LOX w rozwoju choroby Alzheimera jest znacznie słabiej zbadana w porównaniu do COX. Wiadomo, że ekspresja genu 5-LOX oraz poziom LTB_4 są podwyższone w hipokampie starych zwierząt, co sugeruje, że może ona odgrywać rolę w chorobach neurodegeneracyjnych związanych z wiekiem [202]. Stwierdzono także, że polimorfizm genów *ALOX5* oraz *ALOX5AP* (genu kodującego białko FLAP) jest istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju miażdżycy tętnic i patologii naczyń mózgowych [203]. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że kombinacja inhibitorów COX i 5-LOX zmniejsza toksyczność aktywowanego mikrogleju skuteczniej niż inhibitory zastosowane pojedynczo [204]. Ponadto najnowsze badania wskazują, że produkty LOX mogą być bardziej toksyczne dla komórek, niż produkty COX [205].

W mózgu osób chorych na chorobę Alzheimera, szczególnie w rejonach objętych silnymi uszkodzeniami, obserwowano zwiększony poziom 12/15-LOX oraz jej produktów 12/15-HETE, który korelował ze zwiększoną peroksydacją lipidów i poziomem białka tau [200, 206]. Stwierdzono, że zahamowanie lub zablokowanie ekspresji 12-LOX zapobiega apoptozie zależnej od c-Jun indukowanej przez peptydy A β w hodowlach neuronów kory mózgowej, natomiast apoptoza ta jest nasilana przez 12-HETE, produkt 12-LOX [207, 208]. Myszy ApoE KO, pozbawione dodatkowo genu dla 12/15-LOX oraz karmione dietą wysokotłuszczową wykazywały znacznie niższy poziom uszkodzeń oksydacyjnych niż zwierzęta posiadające prawidłowo funkcjonujący gen dla 12/15-LOX [209].

Sugerowany jest także związek pomiędzy 12-LOX i syntazami tlenu azotu (NOS), które odgrywają kluczową rolę w przebiegu zapalenia [210 - 212].

Podwyższoną aktywność NOS obserwuje się w neuronach i astrocytach chorych na chorobę Alzheimera. Na podstawie uzyskanych dotychczas wyników wydaje się możliwe, że 12-LOX uczestniczy w toksyczności nadtlenoazotynu (ONOO^-), toksycznego metabolitu NO w neuronach [213], jak również w komórkach wysp β trzustki [210]. Produkty 12- i 15-LOX pochodzące z astrocytów mogą także aktywować NOS w śródbłonku i w ten sposób regulować przepływ krwi w naczyniach mózgowych [214].

1.2.3. Inhibitory COX i LOX w chorobie Alzheimera

Na podstawie przeprowadzonych badań epidemiologicznych uważa się obecnie, że niesteroidowe leki przeciwzapalne, których główny mechanizm działania polega na hamowaniu COX, obniżają ryzyko zachorowania na chorobę Alzheimera [120, 215 - 220]. W badaniach tych porównywano częstość występowania choroby Alzheimera w całej populacji oraz w populacji osób przyjmujących przewlekle NLPZ (np. z powodu reumatoidalnego zapalenia stawów). W badaniu „Rotterdam” otrzymano odsetek 1,4% chorych na chorobę Alzheimera w grupie pacjentów stosujących NLPZ w porównaniu do 2,5% w całej badanej populacji [221]. Meta-analiza wyników 17 badań z różnych ośrodków potwierdziła skuteczność NLPZ w obniżaniu ryzyka zachorowania na chorobę Alzheimera [120, 121]. Badania postmortem wykazały, że NLPZ zmniejszają nasilenie procesów zapalnych w mózgu chorych na chorobę Alzheimera [222].

Mechanizm działania ochronnego NLPZ nie jest w pełni wyjaśniony. Podstawą stosowania tych leków w wielu schorzeniach jest hamowanie aktywności COX. Nie można jednak wykluczyć innego mechanizmu odpowiedzialnego za skuteczność niektórych NLPZ w obniżaniu ryzyka zachorowania na chorobę Alzheimera. Dotychczas stwierdzono, że niektóre leki z tej grupy mogą bezpośrednio wpływać na wytwarzanie $\text{A}\beta$. Przykładowo ibuprofen, flurbiprofen, indometacyna i sulindag obniżały nawet o 80% poziom $\text{A}\beta$ w hodowlach komórkowych, a także w mózgu zwierząt transgenicznych. W przypadku naproksenu, celekoksibu i aspiryny nie obserwowano takiego działania [223, 224]. Mechanizm tego zjawiska może być związany z hamowaniem γ -sekreazy [224, 225] lub β -sekreazy [226]. Stwierdzono także, że NLPZ mogą wpływać na proces formowania włókien amyloidowych [227]. Wiadomo również, że mogą one aktywować receptory PPAR. Jest to grupa receptorów jądrowych – czynników transkrypcyjnych, które hamują

transkrypcję genów prozapalnych [228]. Stwierdzono, że agoniści tych receptorów hamują ekspresję IL-6 i TNF α oraz COX-2 w hodowlach komórkowych [229].

Wyniki badań mających potwierdzić skuteczność NLPZ u pacjentów z już rozpoznaną chorobą Alzheimera nie są jednoznaczne. W badaniu „Baltimore” porównano 32 pacjentów stosujących NLPZ do 177 niestosujących tych leków. Po roku trwania badania stwierdzono wolniejszy rozwój choroby u osób leczonych za pomocą NLPZ [230]. Badania kliniczne mające potwierdzić korzystny wpływ konkretnych leków wykazały, iż różnią się one między sobą skutecznością. Korzystne efekty udało się udowodnić w przypadku podawania indometacyny. Badania przeprowadzone na 28 pacjentach z chorobą Alzheimera wykazały, że stosowanie indometacyny hamuje postęp choroby (podwójna ślepa próba z placebo przez 6 miesięcy) [231]. W innych badaniach dowiedziono, że także diklofenak spowalnia rozwój choroby [232]. Najnowsze badania 2-fazy R-flurbiprofenu potwierdziły skuteczność tego związku w leczeniu łagodnej choroby Alzheimera, lecz nie wykazały poprawy u pacjentów ze średniozaawansowaną chorobą [233]. W próbach klinicznych nie sprawdziły się natomiast: rofekoksib, naproksen [234], celekoksib [235], a także mający inny mechanizm działania przeciwzapalnego prednizon [236].

Powodem nieskuteczności wymienionych leków w badaniach klinicznych wg. autorów jest fakt, że uszkodzenia w mózgu osób wykazujących objawy kliniczne choroby mogą być zbyt zaawansowane, aby terapia przy pomocy tych leków mogła być skuteczna. Podczas gdy dane epidemiologiczne dotyczą populacji osób przyjmujących NLPZ przed pojawieniem się pierwszych objawów klinicznych choroby, badania terapeutyczne prowadzone są na chorych z jej zaawansowaną postacią. Wydaje się, że terapia przeciwzapalna mogłaby być skuteczna w przypadku profilaktycznego jej zastosowania u osób z wysokim ryzykiem rozwoju choroby Alzheimera. Dotychczas nie przeprowadzono badań, które potwierdziłyby tę hipotezę, ponieważ stwierdzono, że NLPZ posiadają wysoką kardiotoxycywność. Niemniej jednak obecnie trwa intensywna debata nad możliwością ich stosowania w tym celu [237, 238]. Najnowsze meta-analizy badań klinicznych z użyciem celekoksibu [239 - 241] lub nioselektywnych NLPZ [242] nie potwierdziły zwiększonego ryzyka uszkodzenia serca lub wystąpienia incydentów naczyniowo-mózgowych na skutek zażywania tych leków w porównaniu z placebo.

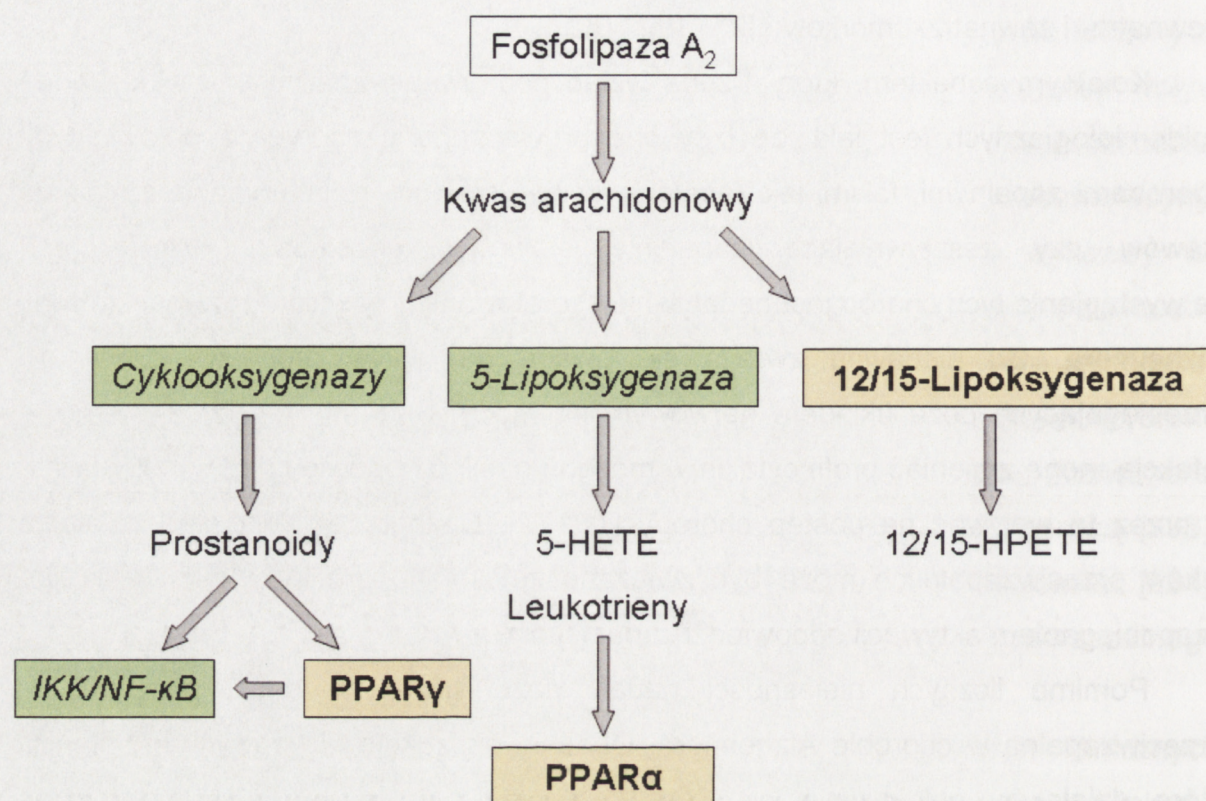
Najnowsze badania potwierdzają konieczność stosowania leków z grupy NLPZ we wczesnych etapach choroby, ponieważ wskazują one na udział COX-2 we wczesnych fazach rozwoju choroby Alzheimera, zanim w mózgu pojawią się zewnątrzkomórkowe złogi A β , a także przed wystąpieniem odpowiedzi zapalnej [126 - 128]. Istotne znaczenie mogą tu odgrywać oligomery A β nagromadzające się wewnątrz- i zewnątrzkomórkowo [23 - 25, 30].

Kolejnym aspektem, który trzeba wziąć pod uwagę analizując wyniki badań epidemiologicznych jest fakt, że były one prowadzone u chorych z przewlekłymi chorobami zapalnymi, takimi jak zapalenie kości i stawów, reumatoidalne zapalenie stawów czy zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa. Możliwe jest, że wystąpienie tych chorób jest negatywnie skorelowane z ryzykiem rozwoju choroby Alzheimera. Od niedawna zwraca się uwagę na wpływ procesów zapalnych przebiegających poza układem nerwowym na mózg. Sugeruje się, że systemowe infekcje mogą zmieniać profil cytokin w mózgu i nasilać odpowiedź immunologiczną, a przez to wpływać na postęp choroby [71, 72]. Dlatego też korzystne działanie leków przeciwzapalnych może być związane ze zmianą profilu cytokin w mózgu i zapobieganiem aktywacji odpowiedzi zapalnej przez A β .

Pomimo licznych niejasności nadal wiąże się duże nadzieje z terapią przeciwzapalną w chorobie Alzheimera. Obecnie poszukuje się nowych substancji, które działałyby selektywnie na COX-2, a przy tym byłyby lepiej tolerowane od obecnie dostępnych preparatów. Poszukuje się także innych punktów uchwytu dla tych leków takich jak PLA₂, receptory PPAR, NF- κ B i lipoksygenazy (Rycina 10). Najnowsze badania wskazują, że jednoczesne zahamowanie COX i LOX mogłoby dać lepsze efekty w terapii choroby Alzheimera niż monoterapia inhibitorami COX. Zahamowanie COX może nasilać przemianę kwasu arachidonowego przez LOX, natomiast produkty LOX są silnymi mediatorami zapalnymi, a także mają silne działanie prooksydacyjne [243].

Szczególną uwagę zwraca się na 5-LOX, a ostatnio także na 12-LOX. 5-LOX syntetyzuje leukotrieny o znanych właściwościach prozapalnych [244]. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że kombinacja inhibitorów COX i 5-LOX zmniejsza toksyczność aktywowanego mikrogleju skuteczniej niż poszczególne inhibitory zastosowane pojedynczo [204]. Jeden z podwójnych inhibitorów COX i 5-LOX, likofelon, jest już przedmiotem badań klinicznych. Pierwsze doniesienia dotyczące jego działania przeciwzapalnego oraz jego dobrej tolerancji są obiecujące [245].

Ponadto najnowsze badania wskazują, że produkty LOX mogą być bardziej toksyczne dla komórek, niż produkty COX [205]. Poza 5-LOX od niedawna zwraca się uwagę na produkty 12/15-LOX, które mogą brać udział w patomechanizmie choroby Alzheimera.



Rycina 10. Schemat przedstawiający możliwe punkty oddziaływania NLPZ
Elementy aktywowane przez NLPZ zaznaczono kolorem pomarańczowym, a hamowane – zielonym [246].

Niewątpliwie dotychczasowy stan wiedzy jest niewystarczający i wymaga dalszych badań dotyczących zarówno roli COX i LOX w warunkach fizjologicznych i patologicznych, znaczenia odpowiedzi zapalnej w patogenezie choroby Alzheimera, jak i szczegółowych mechanizmów działania NLPZ oraz syntezy bezpieczniejszych i lepiej tolerowanych leków przeciwzapalnych.

2. Założenia i cel pracy

Cyklooksygenazy i lipoksygenazy są enzymami kontrolującymi przebieg reakcji zapalnej, a także uczestniczącymi w procesach fizjologicznych w mózgu. Od dawna sugeruje się, że mogą one odgrywać istotną rolę w rozwoju choroby Alzheimera, przy czym założenie to opiera się w głównej mierze na obserwacji, że inhibitory COX, niesteroidowe leki przeciwzapalne, znamienne obniżają ryzyko rozwoju tej choroby. Dotychczas uważano, że rola COX i LOX w rozwoju choroby Alzheimera sprowadza się do udziału w procesach zapalnych wywołanych obecnością zewnątrzkomórkowych patologicznych złogów A β i jest zjawiskiem wtórnym. Najnowsze dane wskazują jednak, że szlak przemian kwasu arachidonowego, w tym aktywacja COX i LOX, może odgrywać zupełnie inną rolę w etiopatologii choroby Alzheimera, a jej poznanie mogłoby umożliwić poszukiwanie nowych leków, bardziej bezpiecznych niż obecnie znane inhibitory COX, skutecznych nie tylko w profilaktyce, ale także w terapii tej choroby. Potencjalnymi kandydatami wydają się być między innymi inhibitory LOX, enzymów, które podobnie jak COX, wytwarzają zarówno mediatory zapalenia jak i związki pełniące funkcję ważnych przekaźników w układzie nerwowym.

Dla opracowania efektywnej terapii przeciwzapalnej, która pomoże opóźnić lub zahamować postęp choroby, konieczne jest także lepsze poznanie udziału procesów zapalnych w rozwoju choroby Alzheimera, a także identyfikacja mechanizmów aktywacji oraz rozwoju odpowiedzi zapalnej na peptydy A β . Innym aspektem wymagającym wyjaśnienia jest udział obwodowych reakcji zapalnych w rozwoju choroby Alzheimera.

Dotychczasowy stan wiedzy jest niewystarczający, co skłania nas do podjęcia próby wyjaśnienia roli LOX i COX w neurotoksyczności peptydów A β w warunkach towarzyszącej odpowiedzi zapalnej.

Cel prowadzonych badań obejmuje poznanie wpływu peptydów A β na poziom i aktywność enzymów istotnych dla uwalniania i metabolizmu kwasu arachidonowego, cPLA₂ oraz COX-2 i 12-LOX w mózgu zwierząt, z uwzględnieniem wpływu obwodowych procesów zapalnych oraz znaczenia COX-2 i 12-LOX w zaburzeniach pamięci i funkcji lokomotorycznej wywołanej przez peptydy A β . Cel badań dotyczy ponadto poznania bezpośredniego wpływu A β na te enzymy w układzie *in vitro* zawierającym wyłącznie komórki PC12, bez udziału odpowiedzi zapalnej oraz ich roli w toksyczności peptydów A β .

Cele szczegółowe badań są następujące:

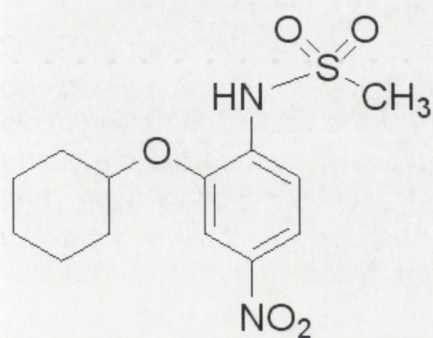
1. Określenie poziomu białek i aktywności cPLA₂, COX-2 i 12-LOX w hipokampie mózgu myszy po podaniu peptydów Aβ₍₁₋₄₂₎.
2. Zbadanie jak zmiany wywołane przez Aβ₍₁₋₄₂₎ są modyfikowane przez towarzyszące procesy zapalne wywołane dootrzewnowym podaniem LPS równocześnie z podaniem Aβ₍₁₋₄₂₎ lub poprzedzającym podanie Aβ₍₁₋₄₂₎.
3. Określenie znaczenia COX-2 i 12-LOX w zaburzeniach pamięci wywołanych przez peptydy Aβ₍₁₋₄₂₎ w przebiegu uogólnionej odpowiedzi zapalnej wywołanej podaniem LPS.
4. Określenie udziału COX-2 i 12-LOX w procesach wywołanych przez peptydy Aβ uwalniane w komórkach PC12, transfekowanych ludzkim genem białka prekursorowego Aβ (APP) typu dzikiego lub z podwójną mutacją szwedzką.

3. Materiały i Metody

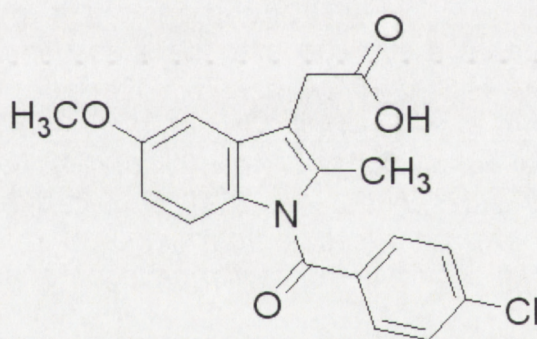
3.1. Charakterystyka stosowanych inhibitorów COX i LOX

W prowadzonych badaniach stosowano następujące inhibitory COX i LOX (Rycina 11):

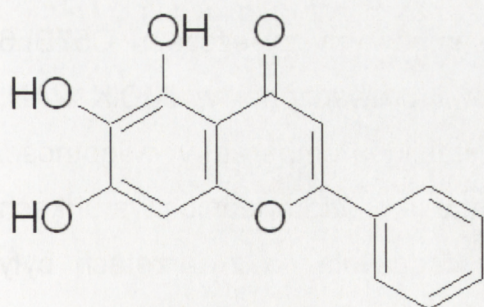
- N-(2-cykloheksyloksy-4-nitrofenylo)-metanesulfonamid (**NS-398**, Cayman Chemical) – sulfonamid, selektywny inhibitor COX-2, o wartości IC_{50} 26 μ M dla COX-1 oraz 0,1 - 3,8 μ M dla COX-2 [247, 248].
- Indometacyna** (Sigma) – nieselektywny inhibitor COX, o wartości IC_{50} 4,9-8,1 dla COX-1 oraz 130-160 μ M dla COX-2 [249], selektywny w stosunku do LOX (IC_{50} 100 μ M dla 5-, 12- i 15-LOX [250, 251]).
- 5,6,7-Trihydroksyflawon (**Baikaleina**, Cayman Chemical) – flawonoid, selektywny inhibitor 12-LOX o wartości IC_{50} 0,12 μ M [252].
- Kwas nordihydrogwajaretowy (**NDGA**, Sigma) – flawonoid, nieselektywny inhibitor LOX, o wartości IC_{50} 0,2, 30 i 30 μ M odpowiednio dla 5-, 12- i 15-LOX, selektywny w stosunku do COX (IC_{50} =100 μ M) [250, 253].



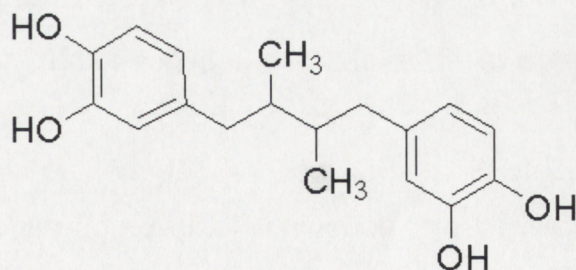
NS-398



Indometacyna



Baikaleina



NDGA

Rycina 11. Wzory chemiczne inhibitorów COX i LOX użytych w badaniach

Stosowane inhibitory przebadano pod kątem właściwości antyoksydacyjnych w układzie *in vitro* i stwierdzono, że inhibitory COX w używanych stężeniach nie posiadają właściwości antyoksydacyjnych, natomiast inhibitory LOX są silnymi antyoksydantami (Tabela 2)

Tabela 2. Wpływ inhibitorów COX i LOX na zawartość związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w homogenacie kory mózgowej szczura inkubowanej z $FeCl_2$ i askorbinianem

Zawartość TBARS [% grupy stymulowanej $FeCl_2$ i askorbinianem]				
Stężenie inhibitora	1 mM	10 mM	100 mM	1 M
Nazwa inhibitora				
NS-398	84,0 ± 0,6	84,6 ± 1,1	77,9 ± 0,9	76,2 ± 0,6
Indometacyna	105,9 ± 1,6	100,3 ± 0,8	107,3 ± 1,6	112,9 ± 0,9
Baikaleina	121,7 ± 1,7	41,4 ± 4,6***	9,8 ± 0,5***	7,0 ± 0,3***
NDGA	101,4 ± 1,8	17,1 ± 0,5***	11,0 ± 0,8***	6,3 ± 0,2***

Homogenat kory mózgowej szczura inkubowano przez 15 min. W temp. 37 °C z 25 μM $FeCl_2$ i 10 μM askorbinianem bez dodatku lub z dodatkiem odpowiedniego inhibitora w podanym stężeniu. Zawartość TBARS oznaczano spektrofotometrycznie metodą wg. Asakawy i Matsushity [254]. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z trzech doświadczeń. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-test Bonferroniego. *** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do układu kontrolnego, zawierającego $FeCl_2$ i askorbinian, bez inhibitorów, $p < 0,001$.

3.2. Badania *in vivo*

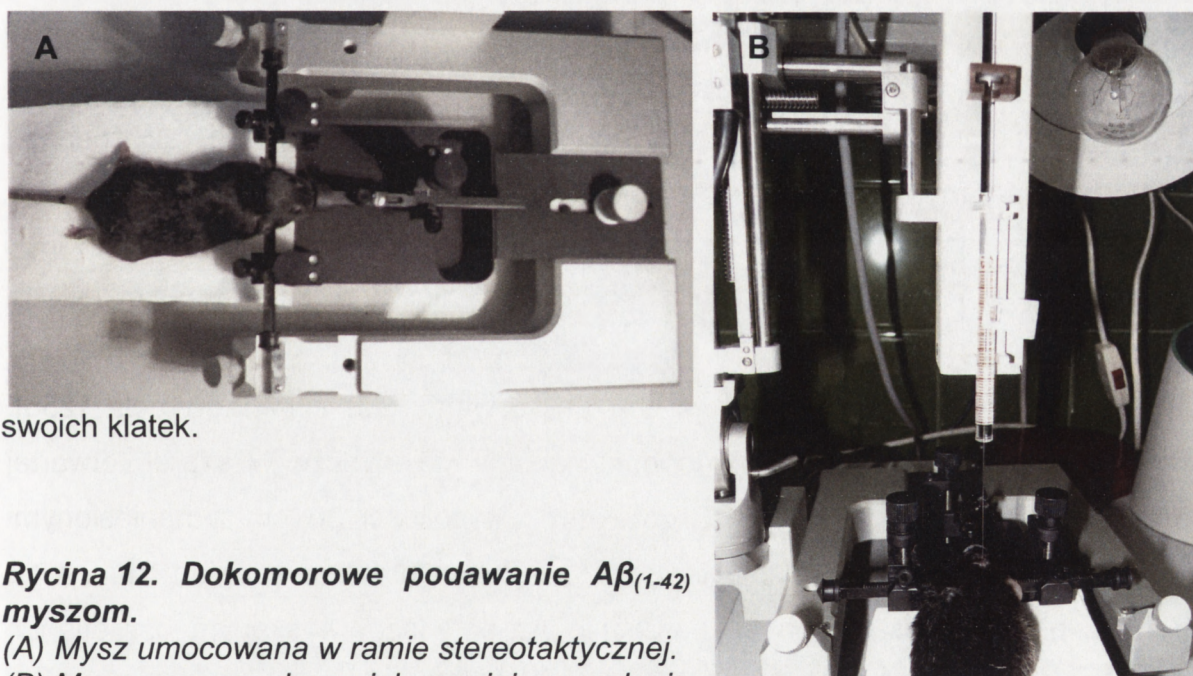
3.2.1. Materiał doświadczalny

W badaniach *in vivo* używano 12-miesięcznych samców myszy szczepu C57BL6 o masie ciała ok. 30-40 g pochodzących z hodowli prowadzonej w IMDiK PAN, w Warszawie. Zwierzęta hodowano w warunkach stabilnej temperatury, wilgotności i diety. Po rozpoczęciu eksperymentu przetrzymywano je w odpowiednich warunkach przez okres podany w opisie doświadczeń. Doświadczenia na zwierzętach były wykonywane zgodnie z zasadami prawa etycznego CMDiK PAN zgodnego z Konwencją Europejską. Zezwolenie na wykonanie doświadczeń wydała I Lokalna Komisja Etyczna do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie.

3.2.2. Modele doświadczalne

3.2.2.1. Dokomorowe podanie $A\beta_{(1-42)}$ myszom

W celu zbadania zmian zachodzących w mózgu pod wpływem $A\beta$, 12-miesięcznym myszom podawano do komory bocznej mózgu 1 nmol $A\beta_{(1-42)}$ (Sigma). Myszy były poddawane narkozie poprzez dootrzewnowe podanie pentobarbitalu sodu (Vetbutal, Biowet Puławy) w dawce 60 mg/kg m.c., a następnie mocowane w ramie stereotaktycznej (Stoeling Co.) (Rycina 12A). Skóra na czaszce była rozcinana i lekko rozsuwana w celu odstonięcia czaszki. Miejsce podania określano odmierzając 1 mm w tył i 1,3 mm w lewo od bregmy [255]. W czaszce robiono ok. jednomilimetrowy otwór i wprowadzano mikroigłę ze stali szlachetnej o średnicy 0,46 mm (Hamilton) na głębokość 2 mm od powierzchni czaszki (Rycina 12B). 5 μ l roztworu $A\beta_{(1-42)}$ w soli fizjologicznej lub samej soli fizjologicznej, w przypadku zwierząt kontrolnych, podawano w ciągu 5 min. Po zabiegu skórę zszywano i zwierzęta wracały do



swoich klatek.

Rycina 12. Dokomorowe podawanie $A\beta_{(1-42)}$ myszom.

(A) Mysz umocowana w ramie stereotaktycznej.
 (B) Mysz z wprowadzoną igłą w miejsce podania $A\beta_{(1-42)}$.

3.2.2.2. Indukcja uogólnionej odpowiedzi zapalnej po podaniu lipopolisacharydu

Uogólnioną reakcję zapalną wywoływano podając myszom dootrzewnowo lipopolisacharyd (LPS), składnik ściany komórkowej bakterii gram(-), otrzymany

z *E. coli*, serotyp 055:B5, o toksyczności 15×10^6 j./mg (Sigma). LPS rozpuszczony w soli fizjologicznej podawano dootrzewnowo w dawce 1 mg/kg m.c.

W celu zbadania wpływu procesów zapalnych na neurotoksyczność $A\beta$, LPS podawano tuż po podaniu $A\beta_{(1-42)}$. W przypadku badania odległych efektów zapalenia na neurotoksyczność $A\beta$, odpowiedź zapalną wywoływano dwukrotnie, 5 i 8 miesięcy przed podaniem $A\beta_{(1-42)}$, poprzez dootrzewnowe podanie LPS w każdym przypadku w dawce 1 mg/kg m.c.

3.2.2.3. Farmakologiczna modyfikacja odpowiedzi mózgu na peptydy $A\beta$ i towarzyszące procesy zapalne

W celu modulowania odpowiedzi myszy na $A\beta$ i LPS zastosowano inhibitory COX i LOX w następujących dawkach:

- a) **NS-398** 5 mg/kg m.c./dzień
- b) **Indometacyna** 5 mg/kg m.c./dzień
- c) **Baikaleina** 30 oraz 10 mg/kg m.c./dzień
- d) **NDGA** 30 oraz 10 mg/kg m.c./dzień

Inhibitory rozpuszczano w DMSO (Sigma) i mieszano z solą fizjologiczną w stosunku 1:1, a następnie podawano zwierzętom dootrzewnowo, 1 raz dziennie, przez 4 dni, zaczynając od dnia podania $A\beta_{(1-42)}$ i LPS.

3.2.3. Testy behawioralne

3.2.3.1. Test otwartego pola

Do badania zachowań eksploracyjnych zastosowano test otwartego pola [256]. W tym celu poszczególne zwierzęta umieszczano pojedynczo w szarej, otwartej od góry skrzynce o wymiarach 60 x 60 cm i wysokości 30 cm z naniesionymi na podłodze liniami dzielącymi powierzchnię na 25 kwadratów o wymiarach 12 x 12 cm. Skrzynka była ustawiona bezpośrednio na podłodze, w słabym oświetleniu, w spokojnym otoczeniu. Po zakończeniu testu z określonym zwierzęciem cały aparat przemywano detergentem z alkoholem w celu usunięcia śladów zapachowych. Obserwację prowadzono przez 5 min. Mierzono następujące parametry: (1) całkowita ilość przejść przez kwadraty (za przejście przez pojedynczy kwadrat przyjmowano sytuację, w której wszystkie cztery łapy zwierzęcia znajdowały się w danym kwadracie); (2) ilość przejść przez kwadraty zewnętrzne (3) ilość przejść przez kwadraty centralne; (4) ilość wspięć przy ścianach (5) ilość stójek (wspięcia bez opierania się o ścianki) oraz (6) ilość obrotów wokół własnej osi.

3.2.3.2. Test pamięci rozpoznawczej

Test pamięci rozpoznawczej wykorzystuje naturalną skłonność zwierząt do badania nieznanymi obiektów [257, 258]. Zdolność rozpoznawania znanego przedmiotu jest wyrażona jako indeks rozróżnienia (RI) wskazujący, ile czasu zwierzę spędziło na badaniu nowego obiektu w porównaniu do starego obiektu w trakcie drugiej sesji testowej. Test prowadzono w pleksiglasowym pudełku o wymiarach 40 x 30 cm umieszczonym w skąpym oświetleniu, w spokojnym otoczeniu. Obiektami rozpoznawanymi przez zwierzę były porcelanowa filiżanka oraz plastikowy lejek. Dobę przed rozpoczęciem testu myszy były poddawane sesji habituacyjnej, podczas której miały możliwość swobodnej eksploracji aparatu przez 60 min. Następnego dnia myszy poddawano 10 minutowej sesji poznawczej w trakcie której umieszczano je pojedynczo w aparacie zawierającym dwa obiekty A (filiżanek). Trzy godziny później przeprowadzano sesję sprawdzającą zdolność zapamiętywania. W tej sesji jeden obiekt A został zastąpiony obiektem A' (identyczny jak obiekt A, lecz nowy obiekt w celu eliminacji bodźców zapachowych), a drugi, obiektem B (lejek). Zwierzę umieszczano w aparacie na 5 min i mierzono czasy t_A' i t_B , czyli odpowiednio czas badania obiektu A' i obiektu B (pomiaru dokonywano, gdy nos zwierzęcia znajdował się w odległości min. 1 cm od obiektu). Indeks rozróżnienia (RI) zdefiniowano jako $(t_B/(t_A' + t_B)) \times 100$. Wartość $RI < 50$ oznacza, że mysz nie rozpoznaje obiektu A', natomiast $RI > 50$ oznacza, że mysz pamięta ten obiekt.

3.2.4. Przygotowanie materiału do doświadczeń i analiz

3.2.4.1. Przygotowanie materiału do oznaczeń immunochemicznych

Wyściowym materiałem do badań na zwierzętach był hipokamp oraz kora mózgu myszy. Zwierzęta dekapitowano, błyskawicznie schładzano głowę i w temperaturze 4 °C wydobywano mózg, usuwano naczynia krwionośne i substancję białą, izolowano hipokamp i korę mózgu, które następnie homogenizowano w 25 mM buforze Tris-HCl, pH 7,4 z dodatkiem mieszaniny inhibitorów proteaz Complete (Roche Diagnostics GmbH). Tak przygotowany materiał przechowywano w temp. -20 °C i używano do oznaczeń immunochemicznych (western blot).

3.2.4.2. Przygotowanie frakcji cytozolowej do pomiaru aktywności COX i LOX

Hipokamp lub korę mózgową homogenizowano w 10 objętościach 50 mM buforu Tris-HCl, pH 7,8 z 1 mM EDTA. Homogenat odwirowywano z prędkością 10000 g

przez 15 min. Uzyskany supernatant oraz część homogenatu przechowywano w temp. $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ i używano do oznaczeń aktywności odpowiednio COX i LOX.

3.3. Badania *in vitro*

3.3.1. Materiał doświadczalny

Badania *in vitro* prowadzono na hodowli szczurzych komórek pheochromocytooma (PC12) pochodzących z Zakładu Farmakologii Biocentrum Uniwersytetu we Frankfurcie w Niemczech. Komórki te były stabilnie transfekowane ludzkim genem białka prekursorowego A β (APP) dzikiego typu (APPwt) lub z mutacją typu szwedzkiego (APPsw, K670M/N671L) (Rycina 2), a w przypadku komórek kontrolnych, samym wektorem. Transfekcję wykonano przy użyciu techniki FUGENE (Roche Diagnostics GmbH) [259]. Gen kodujący APP znajdował się pod kontrolą promotora CMV. Wektor zawierał również geny oporności na gentamycynę. W przypadku komórek PC12, taka transfekcja powoduje wzrost uwalniania A β , ok. 3-krotny w przypadku komórek APPwt oraz 5-krotny w komórkach APPsw w porównaniu z komórkami kontrolnymi [260]. Komórki APPwt, APPsw i kontrolne hodowane były w standardowej pożywce DMEM (Eagle'a) (Sigma) z dodatkiem 10% płodowej surowicy cielęcej (FCS) i 5% surowicy końskiej (HS) inaktywowanych w temp. $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, zawierającej 2 mM glutaminę i antybiotyki (50 jednostek/ml penicyliny, 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycyny i 400 $\mu\text{g/ml}$ G418) w temp. $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, w atmosferze 5% CO $_2$ i dużej wilgotności. Badania prowadzone były na konfluentnych pasażach od 4 do 20. Komórkom używanym do eksperymentów zmieniano pożywkę na DMEM zawierające 2% FCS oraz 2 mM glutaminę i antybiotyki w stężeniach takich jak podano powyżej.

3.3.2. Modele doświadczalne

3.3.2.1. Model stresu oksydacyjnego wywołanego nitroprusydkiem sodu w komórkach PC12

W celu indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach PC12 do pożywki dodawano nitroprusydek sodu (SNP, Sigma). Komórki wysiewano na odpowiednie szalki, a po 24 h zmieniano pożywkę na DMEM zawierające 2% FCS oraz 2 mM glutaminę i antybiotyki. SNP rozpuszczano w wodzie i dodawano do medium w stężeniu 0,5 mM na 24 h.

3.3.2.2. Farmakologiczna modyfikacja odpowiedzi komórek na peptydy A β i stres oksydacyjny

W celu modulowania odpowiedzi komórek PC12 na peptydy A β i stres oksydacyjny zastosowano inhibitory COX i LOX w następujących stężeniach:

- a) **NS-398** 1 μ M
- b) **Indometacyna** 25 μ M
- c) **Baikaleina** 2,5 μ M
- d) **NDGA** 0,5 μ M

Komórki wysiewano na odpowiednie szalki, a po 24 h zmieniano pożywkę na DMEM zawierające 2% FCS oraz 2 mM glutaminę i antybiotyki. Inhibitory rozpuszczano w DMSO i dodawano do pożywki w stosunku 1:1000. W przypadku komórek poddawanych działaniu SNP, inhibitory dodawano równocześnie z SNP. Komórki hodowano w obecności inhibitorów przez 24 h

3.3.3. Przygotowanie materiału do doświadczeń i analiz

3.3.3.1. Przygotowanie materiału do oznaczeń immunochemicznych

Komórki PC12 na szalkach płukano dwukrotnie za pomocą PBS, zawieszano w buforze Tris-HCl o pH 7,4 zawierającym inhibitory proteaz Complete (Roche Diagnostics GmbH), zeskrobywano z szalek i sonifikowano. Tak przygotowany materiał przechowywano w temp. -20 °C i używano do oznaczeń immunochemicznych (western blot).

3.3.3.2. Otrzymywanie frakcji podkomórkowych

Komórki PC12 hodowane na szalkach o średnicy 10 cm płukano dwukrotnie buforem PBS, a następnie zawieszano w buforze hipotonicznym zawierającym 10 mM Tris-HCl o pH 7,4, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT i mieszaninę inhibitorów proteaz Complete (Roche Diagnostics GmbH). Komórki homogenizowano za pomocą strzykawki z igłą o średnicy 45 mm, przeciągając tłok strzykawki 25 razy, co ustalono kontrolując jakość homogenizacji pod mikroskopem. Homogenat (10% w/v) wirowano 10 min z przyspieszeniem 500 g w 4 °C. Osad zawierający frakcję jądrową zawieszano w buforze hipotonicznym i nawarstwiano w stosunku 1:1 na bufor zawierający 0,5 M sacharozę (pozostałe składniki jak poprzednio) i wirowano 10 min z przyspieszeniem 500 g. Osad zawieszano w buforze zawierającym 0,25 M sacharozę i ponownie wirowano

tak jak poprzednio. Osad zawieszano w buforze Tris-HCl z mieszaniną inhibitorów proteaz. Tak uzyskany materiał przechowywano w temp. $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i używano do oznaczania białka p65 metodą western blot.

3.3.3.3. Przygotowanie frakcji cytozolowej do pomiaru aktywności COX i LOX

Komórki PC12 hodowane na szalkach o średnicy 10 cm trzykrotnie płukano buforem PBS, zeszkrobywano, a następnie zawieszano w 3 objętościach 50 mM buforu Tris-HCl, pH 7,8 z 1 mM EDTA i sonifikowano w celu uzyskania homogenatu. Homogenat odwirowywano z prędkością 10000 g przez 15 min. Uzyskany supernatant oraz część homogenatu przechowywano w temp. $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ i używano do oznaczeń aktywności odpowiednio COX i LOX.

3.4. Metody spektrofotometryczne

3.4.1. Oznaczanie zawartości białka

Zawartość białka w preparacie oznaczano metodą Lowry'ego przy użyciu fenolowego odczynnika Folina [261].

3.4.2. Analiza przeżywalności komórek za pomocą testu MTT

Test MTT jest ilościowym, kolorymetrycznym testem, który opiera się na fakcie, że tylko żywe, aktywne metabolicznie komórki, mogą przekształcać w swoich mitochondriach sole tetrazoliowe (bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowego, MTT) o zabarwieniu żółtym do nierozpuszczalnego w wodzie formazanu o zabarwieniu fioletowym. Powstałe kryształy rozpuszczane są w DMSO. Intensywność zabarwienia tak otrzymanego roztworu jest wprost proporcjonalna do ilości żywych komórek w badanym materiale. Komórki PC12 wysiewano na szalki 24-dółkowe pokryte polietylenoiminą w ilości 2×10^5 komórek na dółek. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z niską zawartością surowicy (2% FCS) i dodawano SNP oraz odpowiednie inhibitory. Po 24 h pożywkę wymieniano ponownie na pożywkę pozbawioną surowicy, dodawano MTT (0,25 mg/ml) i inkubowano przez 2 h w temp. $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Następnie pożywkę usuwano, a komórki rozpuszczano w DMSO i mierzono absorbancję przy długości fali 595 nm.

3.4.3. Pomiar aktywności cyklooksygenaz

Aktywność COX oznaczano przy pomocy gotowego zestawu odczynników firmy Cayman (COX Activity Assay). Test ten opiera się na kolorymetrycznym pomiarze aktywności peroksydacyjnej COX, w wyniku której dochodzi do utlenienia N,N,N',N'-tetrametylo-p-fenylendiaminy i powstania barwnego produktu, którego zabarwienie mierzy się przy długości fali 590 nm. Aktywność COX mierzono we frakcji cytozolowej. Dla każdej próby przygotowano próbę ślepą. W tym celu cytozol ogrzewano w temp. 100 °C przez 5 min, a powstały osad odrzucano po odwirowaniu z prędkością 8000 g przez 1 min. W celu wyeliminowania aktywności COX-1 zastosowano selektywny inhibitor COX-1, SC-560 dołączony do zestawu. Test przeprowadzono zgodnie z instrukcją firmową. Aktywność COX obliczano na podstawie molowego współczynnika absorpcji $\epsilon=0.00626 \mu\text{M}^{-1}$.

3.4.4. Pomiar aktywności lipoksygenaz

Aktywność lipoksygenaz oznaczano przy pomocy metody kolorymetrycznej wg. Waslidgea i Hayesa. (1995) [262]. Metoda opiera się na zdolności do utleniania Fe^{2+} do Fe^{3+} przez wodoronadtlenki lipidowe w warunkach kwasowych. Powstałe Fe^{3+} utlenia następnie żółty oranż ksylenowy do niebieskiego produktu o maksymalnej absorpcji światła przy długości fali 620 nm. Aktywność LOX oznaczano w homogenacie, po 3 krotnym rozcieńczeniu lub w lizacie komórek. 50 μl homogenatu (40 μg białka) umieszczano na płytce 96-dołkowej i dodawano 50 μl kwasu arachidonowego (końcowe stężenie 70 μM w 50 mM Tris-HCl, pH 7,4). Po 10 min inkubacji w temperaturze temp. 37 °C reakcję zatrzymywano dodając 100 μl odczynnika FOX o składzie: 25 mM kwas siarkowy, 100 μM oranż ksylenowy, 100 μM FeSO_4 , metanol:woda (9:1). Dla każdej próby badanej przygotowywano próbę ślepą poprzez dodanie substratu po dodaniu odczynnika FOX. Absorbancję mierzono przy długości fali 650 nm za pomocą czytnika mikroplatek. Aktywność wyrażano jako przyrost absorbancji [A].

3.5. Metody spektrofluorymetryczne

3.5.1. Analiza poziomu wolnych rodników w cytozolu komórek przy użyciu sondy fluorescencyjnej DCF

Poziom wolnych rodników w komórkach PC12 badano w oparciu o reakcję przekształcenia dwuoctanu 2',7-dichlorofluoresceiny ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$), na skutek

wewnątrzkomórkowej deacetylacji, do 2',7-dichlorofluorescyny (DCFH), która następnie jest utleniana przez wolne rodniki do fluorescencyjnej 2',7-dichlorofluoresceiny (DCF). Test ten pozwala analizować wewnątrzkomórkowy poziom wolnych rodników tlenowych [263]. Komórki PC12 wysiewano na szalki 24-dołkowe pokryte polietylenoiminą w ilości 2×10^5 komórek na dołek. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z niską zawartością surowicy (2% FCS). Po 24 h do pożywki dodawano $10 \mu\text{M}$ H₂DCF-DA (Sigma) i inkubowano przez 50 min w temp. 37 °C. Następnie komórki płukano trzykrotnie buforem PBS. Fluorescencję mierzono przy użyciu spektrofluorymetru Perkin Elmer LS 50B przy długości fali pobudzenia 488 nm i emisji 525 nm. Wynik wyrażono jako intensywność fluorescencji na miligram białka.

3.6. Metody immunochemiczne

3.6.1. Immunodetekcja białek metodą western blot

Immunochemiczną metodą western blot oznaczano poziom cPLA₂, COX-2, 12-LOX, p65 oraz β-aktyny. Homogenat (40 μg białka) mieszano z buforem denaturującym obciążającym Laemli [264], o składzie 62,5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 100 mM DTT, 20% glicerol i 0,2% błękit bromofenolowy, pH 6,8. Próbkę następnie ogrzewano przez 5 min w temp. 95 °C. Białka rozdzielano na żelu poliakrylamidowym i przenoszono na błonę z polifluorku winylidenu (PVDF, Amersham Pharmacia Biotech). Po wykonaniu barwienia białek za pomocą roztworu PonceauS, membranę płukano w odpowiednim buforze, a następnie inkubowano w roztworze odtłuszczonego mleka lub BSA (Sigma) w temperaturze pokojowej przez 60 min w celu zablokowania niespecyficznego wiązania się przeciwciał (szczegółowe warunki reakcji dla poszczególnych białek podano w Tabela 3). Następnie błonę inkubowano przez noc w 4 °C w roztworze zawierającym odpowiednie przeciwciało pierwszorzędowe. Nadmiar przeciwciała odpłukiwano 3-krotnie przez 10 minut w odpowiednim buforze, a następnie błonę inkubowano 1 godz. w roztworze drugorzędowego przeciwciała sprzężonego z peroksydazą chrzanową. Niezwiązane specyficznie przeciwciała usuwano 3-krotnie płuczając błony przez 10 min w odpowiednim buforze. Następnie błonę poddawano reakcji chemiluminescencyjnej przy użyciu zestawu firmowego ECL (Amersham Pharmacia Biotech) i wizualizowano naświetlając światłoczuły film (Hyperfilm-Kodak, Sigma). Klisze poddawano analizie densytometrycznej przy pomocy oprogramowania TotalLab v1.11 (Non Linear Dynamics). Błony

wykorzystane uprzednio inkubowano 30 min. w roztworze 1% SDS i 50 mM glicyny-HCl o pH 2,0 w celu oderwania związanych przeciwciał i płukano 3 x 15 min w TBS-Tween, po czym używano do kolejnych oznaczeń immunochemicznych.

Tabela 3. Warunki reakcji immunochemicznej dla poszczególnych oznaczeń

Oznaczone białko	Gęstość żelu	Bufor	Blokowanie	Przeciwciało 1-rzędowe		Przeciwciało 2-rzędowe
cPLA ₂	10%	TBS-Tween	5% mleko odtłuszczone	Królicze, monoklonalne, przeciw cPLA ₂ (N-216), Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-438	1:200 w 2% mleku w TBS-Tween	Antykrólicze Sigma A-0545 1:4000
COX-2	10%	TBS-Tween	5% mleko odtłuszczone	Królicze, poliklonalne, przeciw COX-2, Cayman Chemical, 160126	1:1000 w TBS-Tween	Antykrólicze Sigma A-0545 1:4000
12-LOX	10%	TBS-Tween	5% mleko odtłuszczone	Królicze, poliklonalne, przeciw 12-LOX typu leukocytarnego, Cayman Chemical, 160304,	1:1000 w TBS-Tween	Antykrólicze Sigma A-0545 1:4000
p65	10%	PBS-Tween	5% mleko odtłuszczone	Królicze, poliklonalne, przeciw p65, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Sc-372	1:100 w 5% mleku w PBS-Tween	Antykrólicze Sigma, A-0545 1:4000
β-aktyna	7,5% lub 10%	TBS-Tween	5% mleko odtłuszczone	Mysie, monoklonalne (C4), MP Biomedicals, 69100	1:400 w 0,1% BSA w PBS-Tween	Antymysie Amersham Pharmacia Biotech NA931V 1:1000

TBS-Tween – bufor Tris o składzie 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH 7,6

PBS-Tween – bufor fosforanowy o składzie 140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, Tween-20 0,1%, pH 7,4

BSA - albumina z surowicy bydłej, wolna od kwasów tłuszczowych

3.7. Metody radiochemiczne

3.7.1. Oznaczanie aktywności cytozolowej fosfolipazy A₂

Aktywność cPLA₂ oznaczano poprzez pomiar uwalniania kwasu arachidonowego przez komórki PC12 wg zmodyfikowanej metody Samanta i wsp. (1998) oraz Xu i wsp. (2002) [265, 266]. 0,1 μCi [3H] AA (NEN, radioaktywność 55 Ci/mol), rozpuszczony w pożywce DMEM zawierającej 0,5% BSA, był dodawany do komórek

PC12 kontrolnych, APPwt i APPsw rosnących na szalkach o średnicy 3,5 cm. Niezwiązany kwas arachidonowy był usuwany przez trzykrotne płukanie buforem A zawierającym 145 mM NaCl, 5,5 mM KCl, 1,1 mM MgCl₂, 1,1 mM CaCl₂, 5,5 mM glukozę, 20 mM HEPES, pH 7,4, z dodatkiem BSA (0,5 mg/ml). Komórki były następnie inkubowane przez 60 min w buforze A w temperaturze pokojowej. Po inkubacji pożywki przenoszono do naczynek scyntylicyjnych i dokonywano pomiaru radioaktywności za pomocą licznika scyntylicyjnego LKB 1409 (Wallac Scintillation Products).

3.8. Analiza ekspresji genów

3.8.1. Izolacja RNA

Całkowite RNA izolowano z komórek w warunkach sterylnych, zmodyfikowaną metodą Chomczyńskiego i Sacchi (1987) [267], używając odczynnika TRI-reagent (Sigma). Komórki rosnące na szalkach o średnicy 6 cm płukano dwukrotnie buforem PBS, a następnie zawieszano w 1 ml odczynnika TRI-reagent. Komórki, które nie zostały zlizowane odwirowywano przy obrotach 12000 g przez 10 min w temp. 4 °C. Następnie, do 1 ml homogenatu dodawano 200 µl chloroformu, energicznie mieszano przez 15 sek., pozostawiano na 15 min w temperaturze pokojowej i wirowano przy obrotach 12000 g przez 10 min w temp. 4 °C. Górną fazę wodną zawierającą RNA przenoszono do nowej probówki, dodawano 40 µl zimnego izopropanolu, delikatnie mieszano, pozostawiano na 5 min w temperaturze pokojowej i wirowano przez 10 min przy obrotach 12000 g w temp. 4 °C. Nadsącz przenoszono do nowych probówek, dodawano 460 µl zimnego izopropanolu i delikatnie mieszano. Po 5 min wirowano przy obrotach 12000 g przez 15 min w temp. 4 °C. Osad przemywano 1 ml 75% etanolu. Po kilkuminutowym odparowaniu etanolu z próbek, osad RNA zawieszano w 30 µl wody pozbawionej RNAz (Promega Corporation). Następnie mierzono ilość otrzymanego RNA metodą spektrofotometryczną przy długości fali 260 nm, oraz zanieczyszczenie RNA białkami i DNA przy długości fali 280 nm. Stosunek OD₂₆₀/OD₂₈₀ wynosił od 1,6 do 1,9. Ilość RNA oznaczano przyjmując, że absorbancja równa 1 odpowiada 40 µg RNA w 1 ml roztworu.

3.8.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Całkowite wyizolowane RNA (5 µg) było matrycą dla działania odwrotnej transkryptazy. W reakcji odwrotnej transkrypcji otrzymywano DNA komplementarne

do mRNA (cDNA). Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano w temp. 42 °C przez 15 min przy użyciu zestawu odczynników firmy Promega Corporation, w końcowej objętości 20 μ l. W celu inaktywacji odwrotnej transkryptazy, po zakończeniu reakcji, mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 5 min w temp. 90 °C, a następnie schładzano przez 5 min w lodzie.

3.8.3. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Uzyskane cDNA (5 μ g) powielano metodą PCR używając starterów dla 12-LOX wykonanych przez TIB MOLBIOL Sp. z o.o. z Poznania według sekwencji komplementarnych do sekwencji uzyskanych z banku genów. Jednocześnie badano poziom ekspresji genu kodującego konstytutywne białko, β -aktynę, jako wewnętrzną kontrolę. Reakcję łańcuchową polimerazy przeprowadzano przy użyciu zestawu odczynników firmy Qiagen wg. zaleceń producenta.

Do badań użyto następujących starterów:

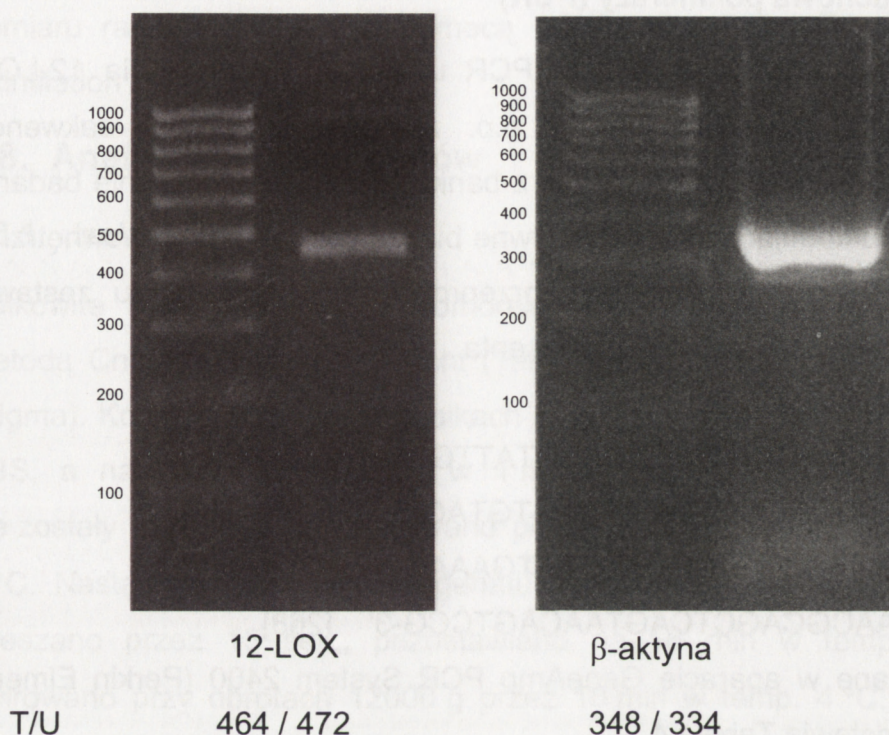
12-LOX	5'-AGCTGGAGCCTTTCTGACCTATTG-3'	
	5'-ACTGATTAGGGTTGGGCAGTGTAG-3'	[171]
β -aktyna	5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'	
	5'-TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'	[268]

Próbki były inkubowane w aparacie GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer). Warunki reakcji przedstawia Tabela 4.

Tabela 4. Warunki reakcji PCR dla poszczególnych starterów

		12-LOX	β -aktyna
Wstępna denaturacja		15min-95°C	15min-95°C
Liczba cykli		30 cykli:	28 cykli:
Przebieg jednego cyklu	Denaturacja	1 min-94°C	1min-94°C
	Asocjacja starterów	3 min-50°C	1min-62°C
	Wydłużanie łańcucha	3 min-72°C	2min-72°C
Końcowe wydłużanie łańcucha		7min-72°C	7min-72°C
Schłodzenie		4°C	4°C

Produkty PCR (10 μ l) poddawano elektroforezie w 2% żelu agarozowym z bromkiem etydyny w buforze TAE (45 mM Tris-octan, 0,1 mM EDTA) przy napięciu 55 V. Żel fotografowano w świetle UV, obraz analizowano densytometrycznie przy użyciu programu TotalLab v1.11 (Non Linear Dynamics), ilość produktu przeliczano na ilość genu kodującego β -aktynę. Specyficzność reakcji weryfikowano na podstawie wielkości otrzymanego produktu (Rycina 13).



Rycina 13. Analiza specyficzności reakcji PCR

Wielkość produktu reakcji PCR analizowano za pomocą programu TotalLab. Pokazane markery wielkości zawierają oligonukleotydy w zakresie 100-1000 par zasad, w odstępach co 100 par zasad. Tabela zawiera teoretyczne (T) i uzyskane (U) długości oligonukleotydów.

3.9. Statystyczne opracowanie wyników

Każde oznaczenie wykonywano w co najmniej trzech powtórzeniach, a testy behawioralne w co najmniej sześciu. Za ostateczny wynik przyjmowano wartość średnią \pm błąd standardowy średniej (SEM) obliczone z indywidualnych pomiarów (średnich z powtórzeń). W celu ustalenia wiarygodności zaistniałych różnic w badaniach porównawczych, wartości z poszczególnych eksperymentów weryfikowano wieloczynnikową analizą wariancji (ANOVA) z użyciem testu post-hoc Bonferroniego. Wyniki uznawano za znamienne statystycznie przy poziomie istotności p poniżej 0,05.

4. Wyniki

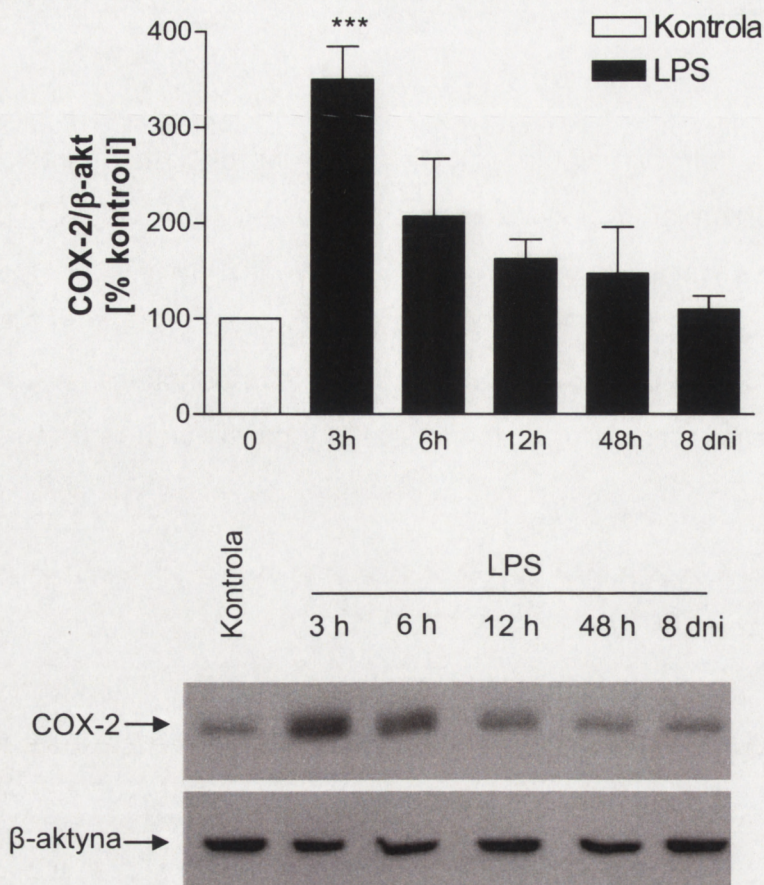
4.1. Badania *in vivo*

Prowadzone badania miały na celu określenie wpływu $A\beta_{(1-42)}$ na poziom wybranych białek uczestniczących w przemianach kwasu arachidonowego (cPLA₂, COX-2 i 12-LOX) oraz określenie, w jaki sposób zmiany te są modyfikowane przez uogólnioną, przejściową reakcję zapalną wywołaną dootrzewnowym podaniem LPS. Badano wpływ zapalenia wywołanego równocześnie z podaniem $A\beta_{(1-42)}$, w 12 miesiącu życia zwierząt oraz długofalowe efekty przebytych procesów zapalnych, które wywoływano 5 i 8 miesięcy przed podaniem $A\beta_{(1-42)}$.

4.1.1. Ocena odpowiedzi myszy na lipopolisacharyd

Do wywołania reakcji zapalnej u myszy użyto LPS w dawce 1 mg/kg m.c.. LPS w stosowanej dawce wywołuje rozwój objawów ogólnoustrojowego zapalenia, takich jak apatia, hipokinezja i brak łaknienia oraz obniżenie temperatury ciała. Objawy te ustępowały w ciągu kilkunastu godzin od iniekcji LPS. Po 48 h nie stwierdzano różnic w zachowaniu zwierząt, którym podano LPS w porównaniu z grupą kontrolną.

Podanie LPS w dawce 1 mg/kg powodowało szybką i przejściową indukcję COX-2 w mózgu. Poziom białka COX-2 był podwyższony 3,5-rotnie po 3 h od podania LPS i szybko powracał do poziomu kontrolnego (Rycina 14).



Rycina 14. Zmiany poziomu białka COX-2 w mózgu po dootrzewnym podaniu LPS myszom

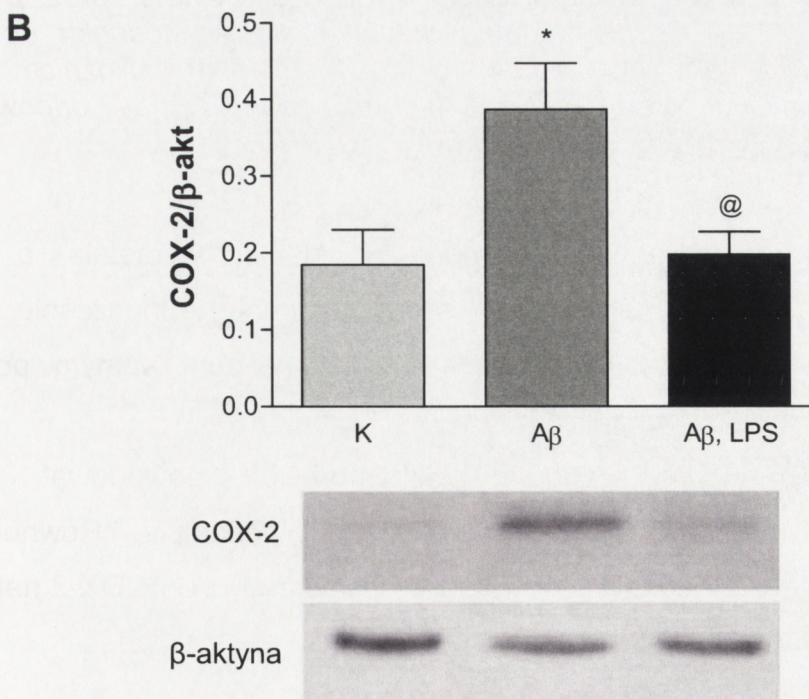
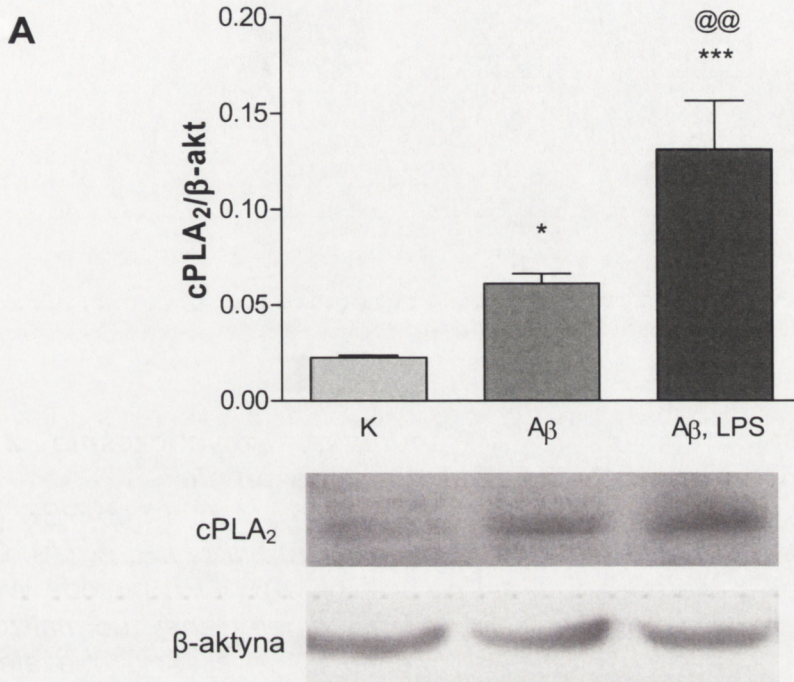
LPS podawano dootrzewowo w dawce 1 mg/kg m.c. Zwierzętom kontrolnym podawano PBS. Poziom białka COX-2 badano metodą Western blot. Wykres przedstawia wyniki analizy densytometrycznej normalizowane względem β-aktyny, które stanowią średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Pod wykresem zamieszczono przykładowy wynik Western blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-test Bonferroniego. *** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej, $p < 0,001$.

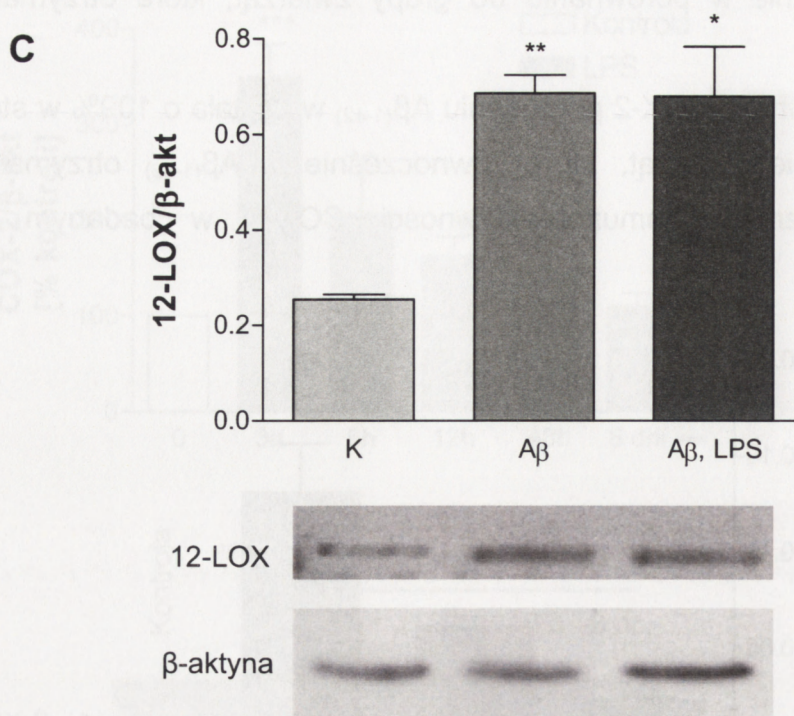
4.1.2. Analiza immunoreaktywności cPLA₂, COX-2 i 12-LOX w hipokampie po równoczesnym podaniu Aβ₍₁₋₄₂₎ i LPS

Badania prowadzone ósmego dnia po dokomorowym podaniu Aβ₍₁₋₄₂₎ 12-miesięcznym myszom wykazały wzrost immunoreaktywności cPLA₂ w hipokampie o 170% w stosunku do zwierząt kontrolnych. U zwierząt, którym równocześnie z Aβ podawano dootrzewowo LPS (1 mg/kg m.c.) obserwowano bardziej nasilony wzrost immunoreaktywności cPLA₂, o 480% w stosunku do kontroli. Wynik ten był także

znamienny statystycznie w porównaniu do grupy zwierząt, które otrzymały sam $A\beta_{(1-42)}$ (Rycina 15A).

Immunoreaktywność COX-2 po podaniu $A\beta_{(1-42)}$ wzrastała o 109% w stosunku do kontroli. W grupie zwierząt, które równocześnie z $A\beta_{(1-42)}$ otrzymały LPS nie obserwowano wzrostu immunoreaktywności COX-2 w badanym czasie (Rycina 15B).





Rycina 15. Wpływ $A\beta_{(1-42)}$ oraz $A\beta_{(1-42)}$ podanego równocześnie z LPS na immunoreaktywność cPLA₂, COX-2 i 12-LOX w hipokampie

12-miesięcznym myszom podawano dokomorowo $A\beta_{(1-42)}$ (1 nmol) lub PBS (grupa kontrolna) oraz dootrzewnowo LPS (1 mg/kg m.c.). Poziom białka cPLA₂ (A), COX-2 (B) i 12-LOX (C) w hipokampie badano 8 dni po podaniu $A\beta$ i LPS metodą Western blot. Wykresy przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej normalizowane względem β -aktyny i stanowią średnią arytmetyczną z sześciu niezależnych doświadczeń \pm SEM. Pod wykresami zamieszczono przykładowe wyniki Western blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-test Bonferroniego. *, **, *** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej, odpowiednio: $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$. @, @@ - Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy zwierząt, którym podano $A\beta_{(1-42)}$, odpowiednio: $p < 0,05$, $p < 0,01$.

Immunoreaktywność 12-LOX po podaniu $A\beta_{(1-42)}$ wzrastała o 169% w stosunku do kontroli. W grupie zwierząt, które otrzymały jednocześnie $A\beta_{(1-42)}$ i LPS immunoreaktywność 12-LOX utrzymywała się na tym samym poziomie co w grupie zwierząt, które otrzymały sam $A\beta_{(1-42)}$ (Rycina 15C).

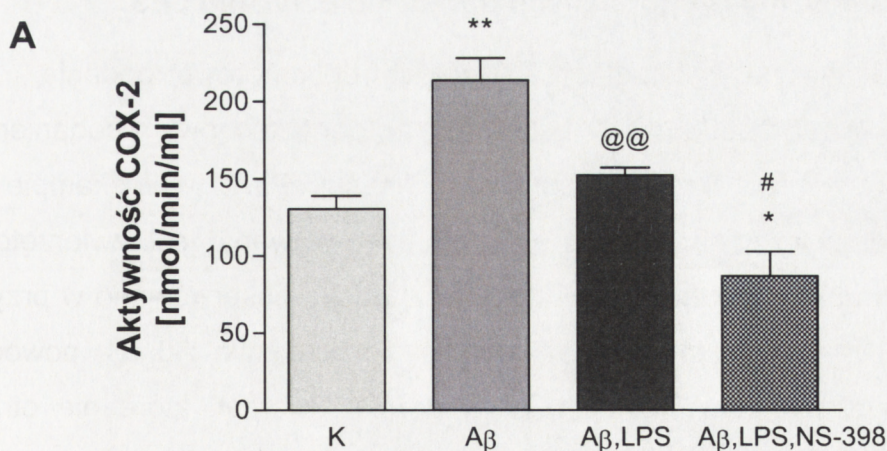
Podsumowując, $A\beta_{(1-42)}$ podany dokomorowo, powodował wzrost immunoreaktywności cPLA₂, COX-2 i 12-LOX w hipokampie. Równoczesne dootrzewnowe podanie LPS istotnie modyfikowało poziom cPLA₂ i COX-2 natomiast pozostawało bez wpływu na poziom 12-LOX.

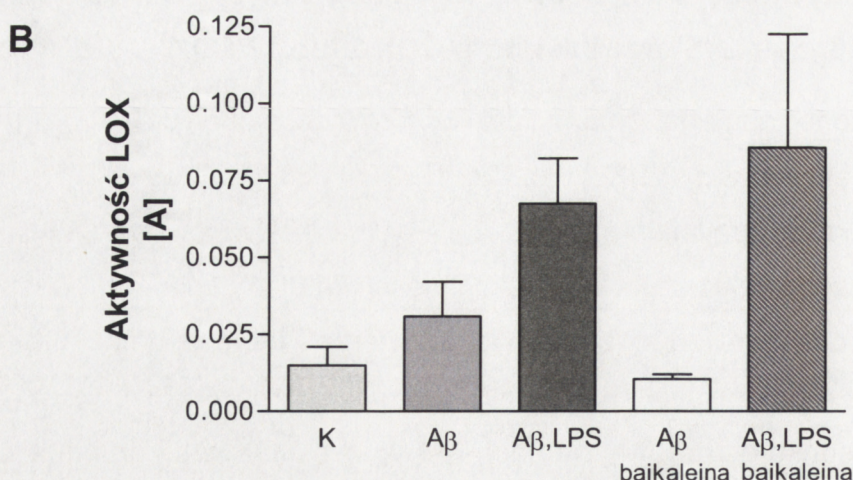
4.1.3. Badanie aktywności COX i LOX w hipokampie myszy po równoczesnym podaniu $A\beta_{(1-42)}$ i LPS oraz inhibitora COX-2 lub 12-LOX

Badania prowadzone ósmego dnia po dokomorowym podaniu $A\beta_{(1-42)}$ myszom wykazały wzrost aktywności COX w hipokampie o 63% w stosunku do kontroli jedynie w grupie, która otrzymała sam $A\beta_{(1-42)}$ (Rycina 19A). Równoczesne podanie $A\beta_{(1-42)}$ i LPS powodowało, że wzrost aktywności COX 8 dnia od podania obu związków nie był obserwowany. W przypadku zwierząt, które oprócz $A\beta_{(1-42)}$ i LPS otrzymywały przez 4 dni inhibitor COX-2, NS-398, stwierdzono obniżenie aktywności COX o 33% w stosunku do grupy kontrolnej. Aktywność COX w tej grupie była także niższa niż o 42% w stosunku do grupy zwierząt, które otrzymały $A\beta_{(1-42)}$ i LPS.

Aktywność LOX była podwyższona po podaniu $A\beta_{(1-42)}$ (o 88%) lub $A\beta_{(1-42)}$ i LPS (o ok. 300%) (Rycina 19B). Podawanie zwierzętom baikaleiny obniżało aktywność LOX w grupie zwierząt, które otrzymały $A\beta_{(1-42)}$, a nie wpływało na aktywność LOX w grupie, której podano $A\beta_{(1-42)}$ i LPS.

Podsumowując stwierdzono, że aktywność COX analizowana 8-go dnia od podania $A\beta_{(1-42)}$ myszom jest podwyższona w grupie, która otrzymała $A\beta_{(1-42)}$, a niezmienną, jeśli $A\beta_{(1-42)}$ podano równocześnie z LPS. Podawanie inhibitora COX-2 powoduje spadek aktywności COX w porównaniu z grupą kontrolną. Aktywność LOX ulega wzrostowi po podaniu $A\beta_{(1-42)}$ lub $A\beta_{(1-42)}$ i LPS. Baikaleina zapobiega wzrostowi aktywności LOX jedynie w grupie, która otrzymała $A\beta_{(1-42)}$.





Rycina 16. Wpływ A $\beta_{(1-42)}$ i LPS oraz inhibitora COX-2 lub 12-LOX na aktywność COX i LOX w hipokampie

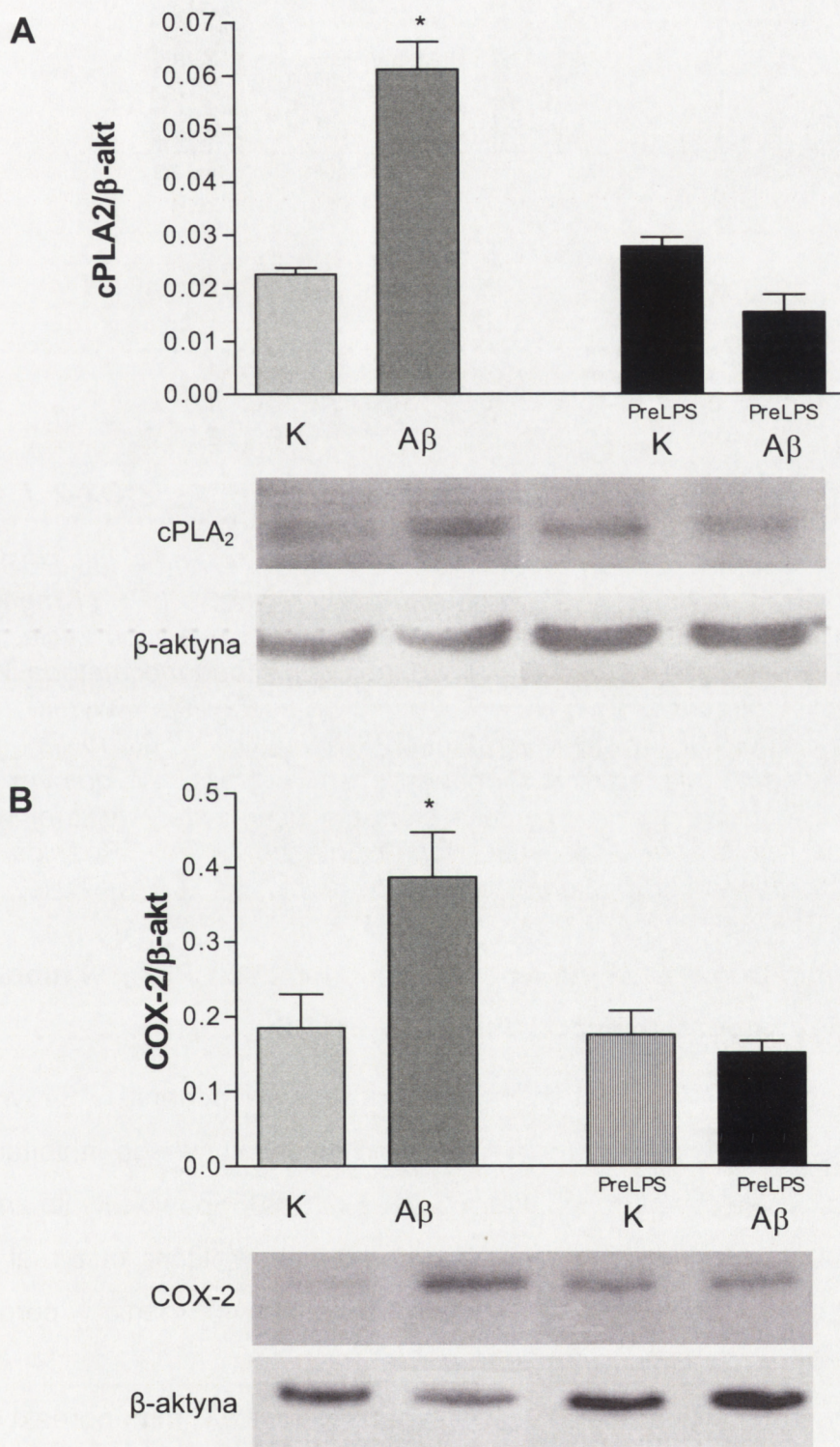
12-miesięcznym myszom podawano dokomorowo A $\beta_{(1-42)}$ (1 nmol) lub PBS (grupa kontrolna) oraz dootrzewnowo LPS (1 mg/kg m.c.). LPS podawano równocześnie z A β . NS-398 (5 mg/kg m.c.) lub baikalinę (10 mg/kg m.c.) podawano dootrzewnowo, 1 raz dziennie przez 4 dni, począwszy od dnia podania A β . Aktywność COX (A) i LOX (B) w hipokampie badano 8 dni po podaniu A β metodą kolorymetryczną. Wykresy stanowią średnią arytmetyczną z czterech (COX) lub dwóch (LOX) niezależnych doświadczeń w dwóch powtórzeniach \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-test Bonferroniego. *, ** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej, odpowiednio: $p < 0,05$, $p < 0,01$. @@ - Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy zwierząt, którym podano A $\beta_{(1-42)}$, $p < 0,01$, # - Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy zwierząt, którym podano A $\beta_{(1-42)}$ i LPS $p < 0,05$. W przypadku oznaczenia aktywności LOX nie przeprowadzono analizy statystycznej wyników z powodu zbyt małej liczebności grup.

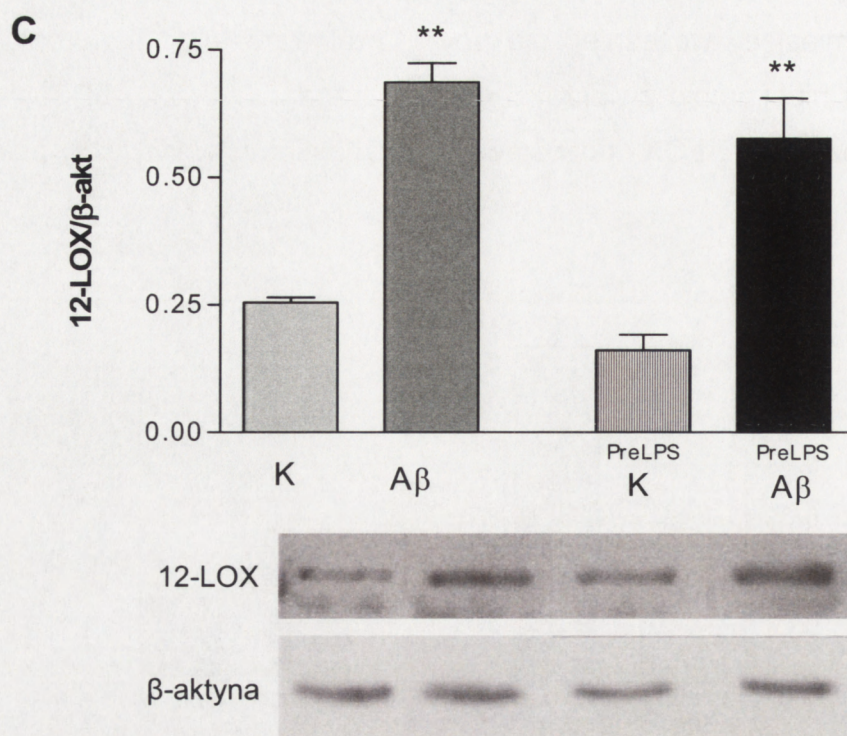
4.1.4. Wpływ A $\beta_{(1-42)}$ na immunoreaktywność cPLA $_2$, COX-2 i 12-LOX w hipokampie myszy poddanych uprzednio działaniu LPS

Badania prowadzono na zwierzętach, u których dokomorowe podanie A $\beta_{(1-42)}$ w 12 miesiącu życia poprzedzone było dwukrotnym dootrzewnowym podaniem LPS, 5 i 8 miesięcy wcześniej. Wzrost immunoreaktywności cPLA $_2$ w hipokampie myszy 8 dni po dokomorowym podaniu A $\beta_{(1-42)}$ nie był obserwowany, jeśli zwierzętom tym podano uprzednio LPS (Rycina 17A). Podobne zjawisko obserwowano w przypadku badania immunoreaktywności COX-2. Podanie dokomorowe A $\beta_{(1-42)}$ powodowało wzrost immunoreaktywności COX-2 tylko w grupie zwierząt, które nie otrzymały uprzednio LPS (Rycina 17B).

Analiza immunoreaktywności 12-LOX ósmego dnia po podaniu A $\beta_{(1-42)}$ wykazała jej wzrost o około 170% w hipokampie obydwu grup zwierząt, zarówno niepoddanych działaniu LPS, jak również po jego dwukrotnym podaniu (Rycina 17C).

Reasumując, $A\beta_{(1-42)}$ podany 12-miesięcznym zwierzętom, które przebyły zapalenie 5 i 8 miesięcy wcześniej, nie powodował wzrostu immunoreaktywności cPLA₂ i COX-2 w hipokampie zwierząt 8 dnia od podania $A\beta_{(1-42)}$ i LPS, natomiast podwyższony poziom 12-LOX pozostawał niezmienny w wyniku przebytego zapalenia.





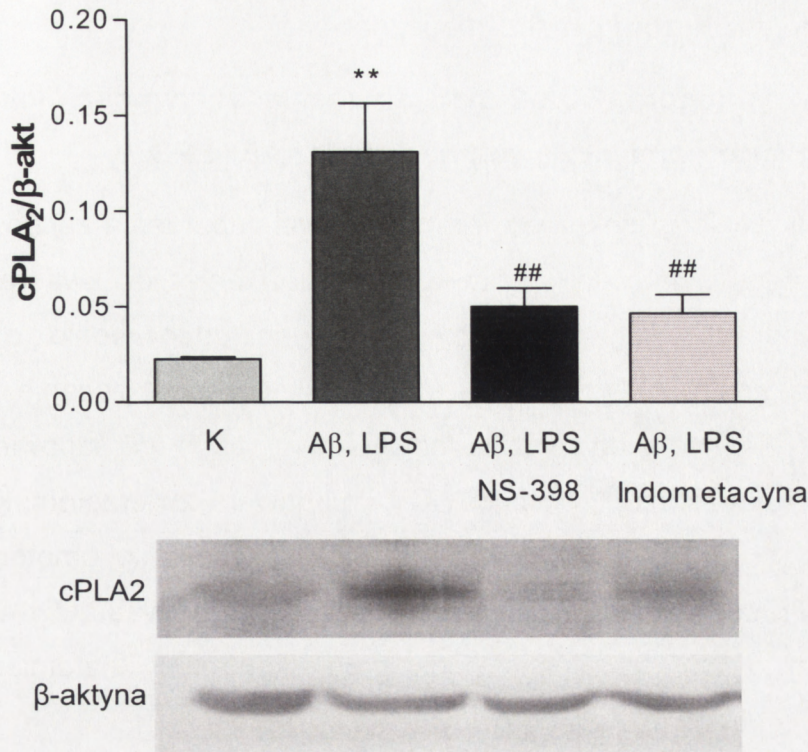
Rycina 17. Wpływ $A\beta_{(1-42)}$ na immunoreaktywność $cPLA_2$, COX-2 i 12-LOX w hipokampie myszy poddanych uprzednio działaniu LPS

12-miesięcznym myszom podawano dokomorowo $A\beta_{(1-42)}$ (1 nmol) lub PBS (grupa kontrolna). Kolejnym grupom zwierząt podawano dootrzewnowo LPS (1 mg/kg m.c.) w 4 i 7 miesiącu życia (PreLPS), a następnie $A\beta_{(1-42)}$ w 12 miesiącu życia. Poziom białka $cPLA_2$ (A), COX-2 (B) i 12-LOX (C) w hipokampie badano metodą Western blot 8 dni po podaniu $A\beta_{(1-42)}$. Wykresy przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej normalizowane względem β -aktyny i stanowią średnią arytmetyczną z sześciu niezależnych doświadczeń \pm SEM. W dolnym panelu zamieszczono przykładowe wyniki Western blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-test Bonferroniego. *, ** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej, odpowiednio: $p < 0,05$, $p < 0,01$.

4.1.5. Wpływ inhibitorów COX na immunoreaktywność $cPLA_2$ w hipokampie myszy po równoczesnym podaniu $A\beta_{(1-42)}$ i LPS

Immunoreaktywność $cPLA_2$ wzrastała po równoczesnym podaniu $A\beta_{(1-42)}$ i LPS o 80% w stosunku do kontroli. Podawanie zarówno nieselektywnego inhibitora COX (indometacyna) jak i selektywnego inhibitora COX-2 (NS-398) powodowało znaczące obniżenie poziomu $cPLA_2$ w porównaniu z grupą zwierząt, które otrzymał $A\beta_{(1-42)}$ i LPS. Wartości te nie wykazywały statystycznie znamiennych różnic w porównaniu do wartości kontrolnych (Rycina 18A).

Podsumowując, inhibitory COX zapobiegały wzrostowi immunoreaktywności $cPLA_2$ spowodowanej podaniem $A\beta_{(1-42)}$ i LPS.



Rycina 18. Wpływ inhibitorów COX na immunoreaktywność cPLA₂ w hipokampie myszy 8 dni po równoczesnym podaniu Aβ₍₁₋₄₂₎ i LPS

12-miesięcznym myszom podawano dokomorowo Aβ₍₁₋₄₂₎ (1 nmol) lub PBS (grupa kontrolna) oraz dootrzewnowo LPS (1 mg/kg m.c.). LPS podawano równocześnie z Aβ. Inhibitory COX, indometacynę lub NS-398 (5 mg/kg m.c.), podawano dootrzewnowo, 1 raz dziennie przez 4 dni, począwszy od dnia podania Aβ i LPS. Poziom białka cPLA₂ w hipokampie badano 8 dni po podaniu Aβ i LPS. Wykresy przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej normalizowane względem β-aktyny i stanowią średnią arytmetyczną z sześciu niezależnych doświadczeń ± SEM. W dolnym panelu zamieszczono przykładowy wynik Western blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-test Dunnetta. *, ** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej, odpowiednio: $p < 0,05$, $p < 0,01$. #, ## - Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy zwierząt, którym podano Aβ₍₁₋₄₂₎ i LPS, odpowiednio: $p < 0,05$, $p < 0,01$.

4.2. Testy behawioralne

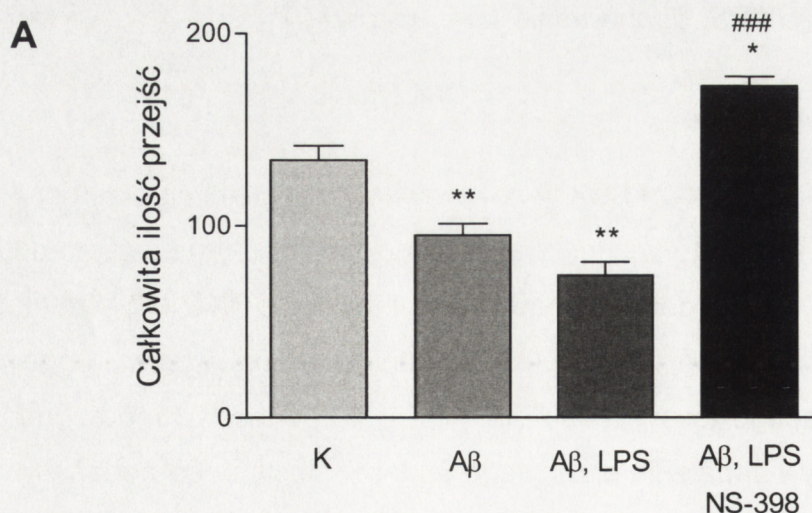
W celu zbadania udziału COX-2 i LOX w powstawaniu wywołanych przez peptydy Aβ zaburzeń aktywności lokomotorycznej i pamięci, 12-miesięcznym myszom podawano Aβ₍₁₋₄₂₎ (dokomorowo) i LPS (dootrzewnowo) oraz inhibitor COX-2 (NS-398) lub jeden z inhibitorów LOX (baikaleinę lub NDGA). W celu zbadania wpływu uogólnionego zapalenia towarzyszącego toksyczności Aβ, Aβ₍₁₋₄₂₎ i LPS podawano równocześnie. Ponadto badano wpływ zapalenia przebytego 5 i 8 miesięcy przed podaniem Aβ₍₁₋₄₂₎.

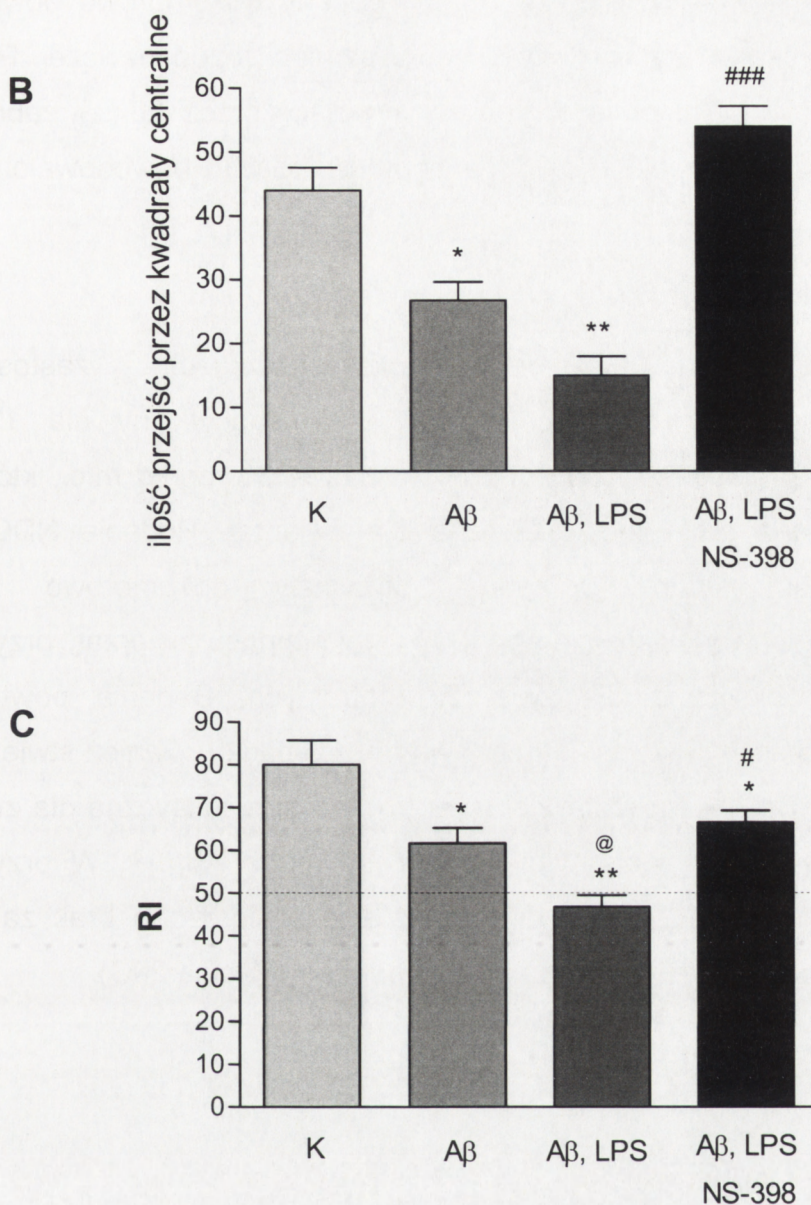
Po 8 dniach od podania $A\beta_{(1-42)}$ zwierzęta poddawano testom behawioralnym: testowi otwartego pola oraz testowi pamięci rozpoznawczej.

4.2.1. Wpływ inhibitora COX-2 na zaburzenia aktywności lokomotorycznej i zaburzenia pamięci wywoływane przez $A\beta$ i LPS

$A\beta_{(1-42)}$, podany myszom dokomorowo, powodował zaburzenia zachowania zwierząt w teście otwartego pola. Zarówno całkowita liczba wejść do kwadratów jak i ilość wejść do kwadratów centralnych była obniżona odpowiednio o 39% i 29% w stosunku do kontroli (Rycina 19A i B). Równoczesne podanie $A\beta_{(1-42)}$ i LPS powodowało nieistotne statystycznie pogłębienie zaburzeń odpowiednio do 66% i 45% w stosunku do kontroli. Inhibitor COX-2 podawany zwierzętom, które wcześniej otrzymały $A\beta_{(1-42)}$ i LPS, zapobiegał obniżeniu aktywności lokomotorycznej myszy. Zaobserwowano podwyższenie całkowitej ilości wejść do kwadratów w przypadku tej grupy zwierząt o 23% w stosunku do grupy kontrolnej, natomiast ilość wejść do kwadratów centralnych była porównywalna z kontrolą.

W teście pamięci rozpoznawczej zaobserwowano, że $A\beta_{(1-42)}$ powodował zaburzenia pamięci (spadek indeksu rozróżnienia RI do 61,6), które były nasilane w sposób istotny statystycznie przez LPS. Średnia wartość RI w grupie zwierząt, które otrzymały $A\beta_{(1-42)}$ oraz LPS wynosiła 46,8, co świadczy o tym, że zwierzęta te nie pamiętały prezentowanego przedmiotu po upływie 3 h od prezentacji (Rycina 19C). Zahamowanie COX-2 poprawiało pamięć zwierząt w sposób istotny statystycznie w stosunku do grupy, która otrzymała $A\beta_{(1-42)}$ i LPS (RI=66,5), jednak RI dla tej grupy nie różnił się od wyniku dla grupy zwierząt, które otrzymały $A\beta_{(1-42)}$ i był istotnie niższy w porównaniu z grupą kontrolną.





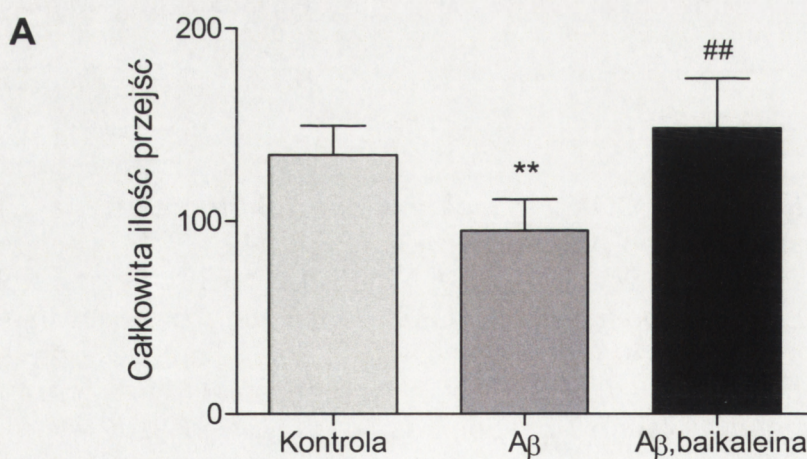
Rycina 19. Wpływ inhibitora COX-2 na aktywność lokomotoryczną i pamięć rozpoznawczą u myszy 7 dni po podaniu A β ₍₁₋₄₂₎ i LPS

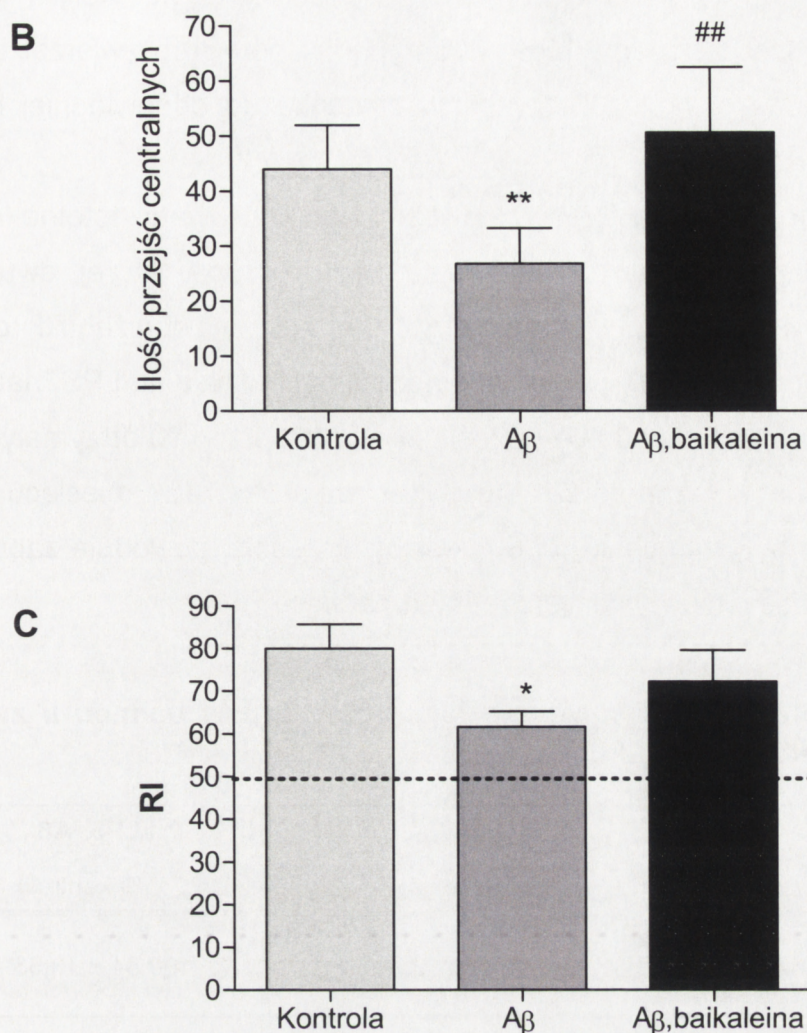
Myszom podawano dokomorowo A β ₍₁₋₄₂₎ (1 nmol) lub PBS (grupa kontrolna) oraz dootrzewnowo LPS (1 mg/kg m.c.). LPS podawano równocześnie z A β . NS-398 (5 mg/kg m.c.) podawano dootrzewnowo, 1 raz dziennie przez 4 dni, począwszy od dnia podania A β i LPS. Test otwartego pola (**A**, **B**) oraz pamięci rozpoznawczej (**C**) przeprowadzono 7 dni po podaniu A β i LPS. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z sześciu niezależnych doświadczeń \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-test Bonferroniego. *, ** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej, odpowiednio: $p < 0,05$, $p < 0,01$. #, ### - Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy zwierząt, którym podano A β ₍₁₋₄₂₎ i LPS, odpowiednio: $p < 0,05$, $p < 0,001$. @ - Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy zwierząt, którym podano A β ₍₁₋₄₂₎, $p < 0,05$.

Z uzyskanych danych wynika, że $A\beta_{(1-42)}$ podany dokomorowo powodował u myszy zaburzenia lokomotoryczne i zaburzenia pamięci rozpoznawczej. Podanie LPS równocześnie z $A\beta_{(1-42)}$ istotnie pogłębiało wywołane przez $A\beta_{(1-42)}$ zaburzenia pamięci, natomiast zahamowanie COX-2 za pomocą NS-398 powodowało istotną poprawę pamięci zwierząt.

4.2.2. Działanie inhibitorów LOX

W przypadku badania udziału LOX w neurotoksyczności $A\beta_{(1-42)}$ zastosowano inhibitory LOX, nieselektywny inhibitor, NDGA oraz specyficzny dla 12-LOX, baikaleinę. Inhibitory zastosowano początkowo w dawce 30 mg/kg m.c., która jest powszechnie stosowana i nie jest toksyczna dla zwierząt. Podanie NDGA lub baikaleiny zwierzętom, które uprzednio otrzymały dokomorowo $A\beta_{(1-42)}$ i dootrzewnowo LPS spowodowało niemal 100% śmiertelność zwierząt, przy czym dawka ta nie była toksyczna dla zwierząt kontrolnych. Badania powtórzono z obniżoną dawką baikaleiny, 10 mg/kg m.c. i w tym przypadku również stwierdzono wysoką śmiertelność. Baikaleina w dawce 10 mg/kg nie była toksyczna dla zwierząt kontrolnych ani dla zwierząt poddanych działaniu samego $A\beta_{(1-42)}$. W przypadku zwierząt, którym oprócz $A\beta_{(1-42)}$ podawano baikaleinę stwierdzono brak zaburzeń lokomotorycznych (Rycina 20A, B) oraz zaburzeń pamięci (Rycina 20C).





Rycina 20. Wpływ inhibitora 12-LOX na aktywność lokomotoryczną i pamięć rozpoznawczą 12-miesięcznych myszy 7 dni po podaniu A β ₍₁₋₄₂₎

Myszom podawano dokomorowo A β ₍₁₋₄₂₎ (1 nmol) lub PBS (grupa kontrolna). Baikaleinę (10 mg/kg m.c.) podawano dootrzewnowo 1 raz dziennie przez 4 dni, począwszy od dnia podania A β . Test otwartego pola (**A**, **B**) oraz pamięci rozpoznawczej (**C**) przeprowadzono 7 dni po podaniu A β . Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-test Bonferroniego. *, ** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej, odpowiednio: $p < 0,05$, $p < 0,01$. #, ### - Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy zwierząt, którym podano A β ₍₁₋₄₂₎ i LPS, odpowiednio: $p < 0,05$, $p < 0,001$. @ - Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy zwierząt, którym podano A β ₍₁₋₄₂₎, $p < 0,05$.

4.2.3. Ocena wpływu A β ₍₁₋₄₂₎ na aktywność lokomotoryczną i pamięć rozpoznawczą u zwierząt poddanych uprzednio działaniu LPS

Kolejne badania prowadzono na zwierzętach, u których dokomorowe podanie A β ₍₁₋₄₂₎ w 12 miesiącu życia poprzedzone było dwukrotnym dootrzewnowym podaniem LPS 5 i 8 miesięcy wcześniej. Testowane zwierzęta wykazywały

zaburzenia w teście otwartego pola porównywalne do zwierząt, którym podano $A\beta_{(1-42)}$ bez wcześniejszego podania LPS. W przypadku obu grup zwierząt badane parametry były obniżone o około 30 – 40% w stosunku do odpowiedniej kontroli (Tabela 5).

W przypadku testu pamięci rozpoznawczej zaobserwowano istotne różnice pomiędzy grupą zwierząt, która nie otrzymała LPS i grupą, której dwukrotnie dootrzewnowo wstrzyknięto LPS. Stwierdzono, że $A\beta_{(1-42)}$ obniża RI o 23% w stosunku do kontroli w przypadku zwierząt niepoddanych działaniu LPS, natomiast RI nie ulega zmianie na skutek podania $A\beta$ jeśli zwierzęta uprzednio otrzymały LPS.

Podsumowując, wykazano, że $A\beta_{(1-42)}$ podany w 12 miesiącu życia zwierzętom, które przebyły zapalenie 5 i 8 miesięcy wcześniej powoduje zaburzenia lokomotoryczne, natomiast nie wywołuje zaburzeń pamięci.

Tabela 5. Wpływ $A\beta_{(1-42)}$ na aktywność lokomotoryczną i pamięć u zwierząt poddanych uprzednio działaniu LPS

Badane parametry	$A\beta_{(1-42)}$ [% kontroli]	PreLPS+ $A\beta_{(1-42)}$ [% kontroli]
Całkowita ilość wejść do kwadratów	70,76 ± 12,06*	60,84 ± 13,53*
Ilość wejść do kwadratów centralnych	60,91 ± 14,68*	69,58 ± 18,03***
Indeks rozróżnienia (RI)	77,02 ± 4,45*	95,86 ± 15,98

12-miesięcznym myszom podawano dokomorowo $A\beta_{(1-42)}$ (1 nmol) lub PBS (grupa kontrolna). Odpowiedniej grupie zwierząt podawano dootrzewnowo LPS (1 mg/kg m.c.) w 4 i 7 miesiącu życia (PreLPS). Test otwartego pola oraz pamięci rozpoznawczej przeprowadzono 7 dni po podaniu $A\beta_{(1-42)}$. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z sześciu niezależnych doświadczeń ± SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-test Bonferroniego. *,*** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do odpowiedniej grupy kontrolnej, odpowiednio: $p < 0,05$, $p < 0,01$.

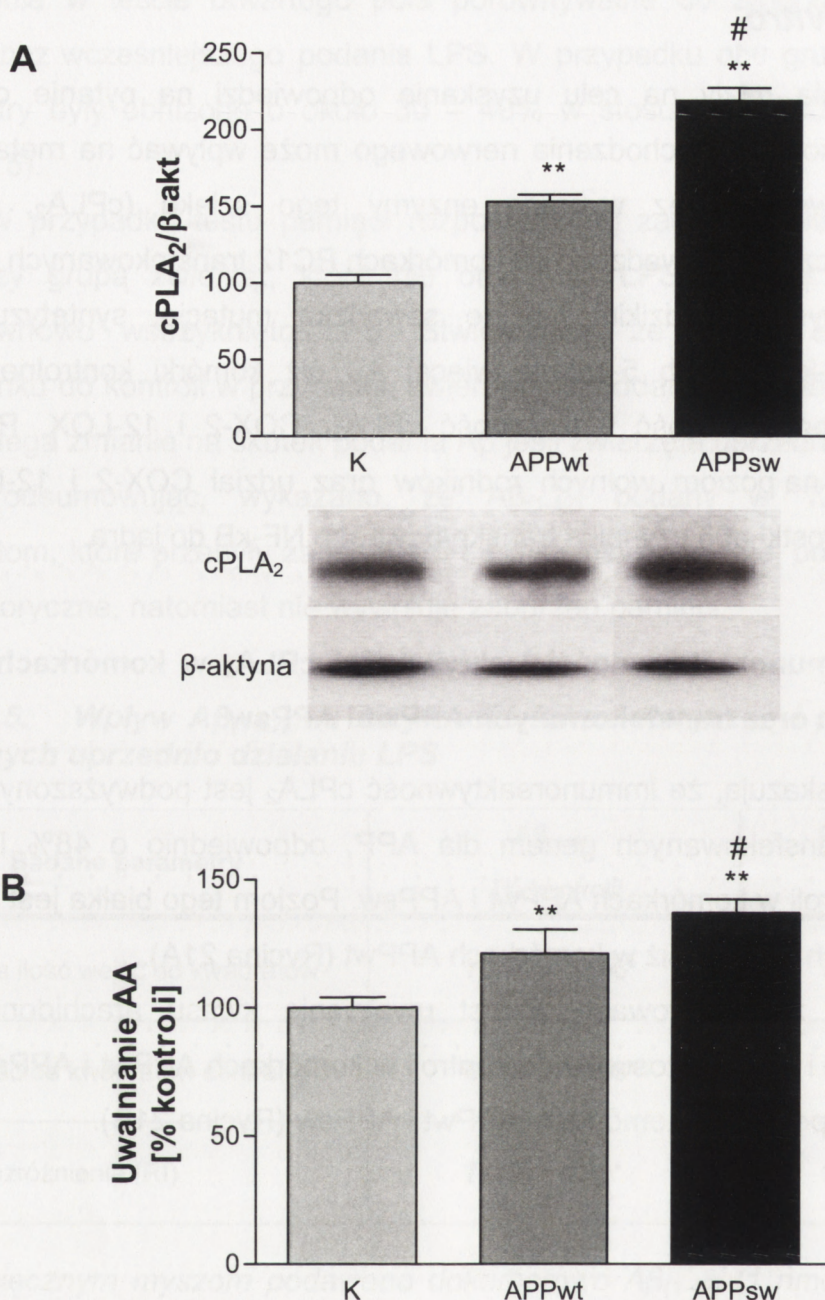
4.3. Badania *in vitro*

Prowadzone badania miały na celu uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy A β wytwarzany przez komórki pochodzenia nerwowego może wpływać na metabolizm kwasu arachidonowego przez wybrane enzymy tego szlaku (cPLA₂, COX-2 i 12-LOX). Doświadczenia prowadzono na komórkach PC12 transfekowanych genem białka prekursorowym A β , dzikim lub ze szwedzką mutacją, syntetyzujących odpowiednio ok. 3-krotnie lub 5-krotnie więcej A β niż komórki kontrolne [260]. Oznaczano immunoreaktywność i aktywność cPLA₂, COX-2 i 12-LOX. Ponadto badano wpływ A β na poziom wolnych rodników oraz udział COX-2 i 12-LOX w translokacji podjednostki p65 czynnika transkrypcyjnego NF- κ B do jądra.

4.3.1. Analiza immunoreaktywności i aktywności cPLA₂ w komórkach PC12 kontrolnych oraz transfekowanych APPwt i APPsw

Uzyskane wyniki wskazują, że immunoreaktywność cPLA₂ jest podwyższony w obu liniach komórek transfekowanych genem dla APP, odpowiednio o 48% i 122% w stosunku do kontroli w komórkach APPwt i APPsw. Poziom tego białka jest istotnie wyższy w komórkach APPsw niż w komórkach APPwt (Rycina 21A).

Analogicznie zaobserwowano wzrost uwalniania kwasu arachidonowego, odpowiednio o 20% i 35% w stosunku do kontroli w komórkach APPwt i APPsw oraz znamiennej różnicę pomiędzy komórkami APPwt i APPsw (Rycina 21B).

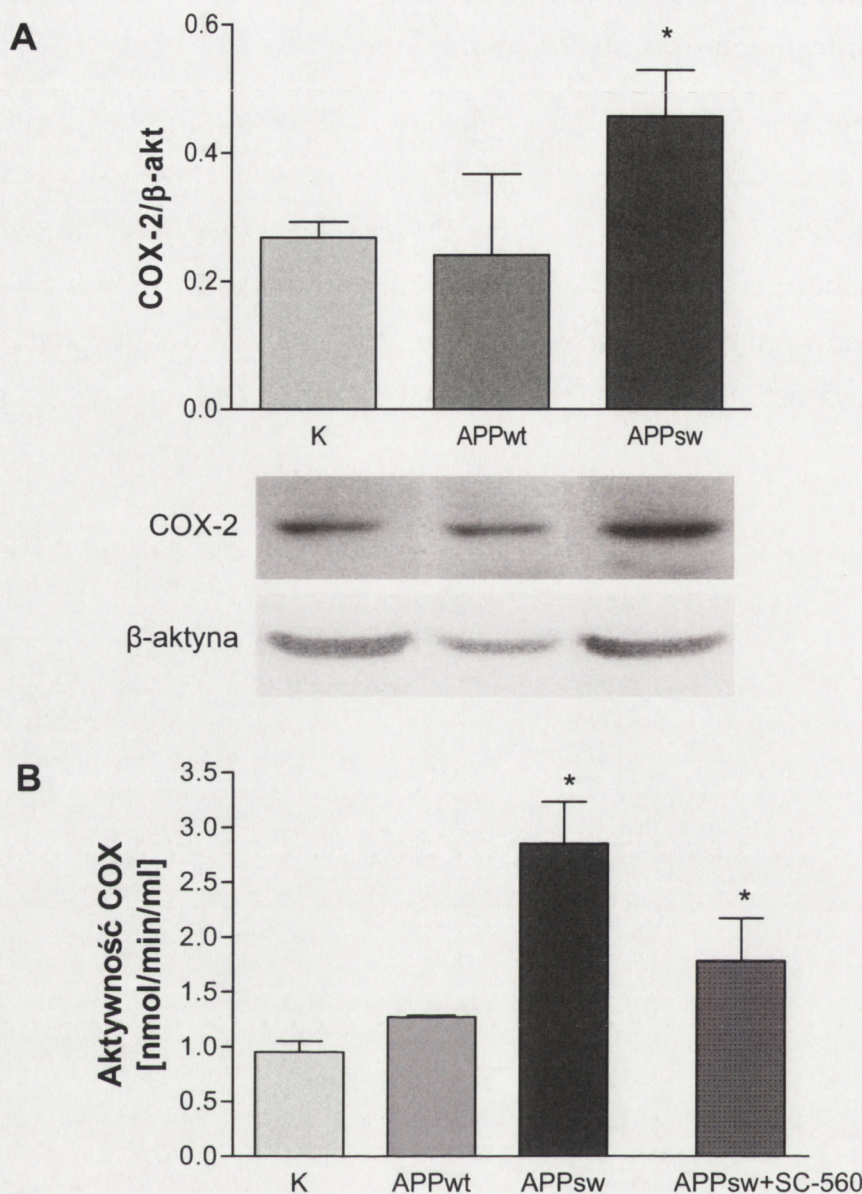


Rycina 21. Immunoreaktywność i aktywność cPLA₂ w komórkach PC12 kontrolnych oraz transfekowanych APPwt i APPsw

(A) Poziom białka cPLA₂ badano metodą Western blot. Wykres przedstawia wyniki analizy densytometrycznej normalizowane względem β-aktyny i stanowią średnią arytmetyczną z pięciu niezależnych doświadczeń ± SEM. Pod wykresem zamieszczono przykładowy wynik Western blot. (B) Aktywność cPLA₂ oznaczano poprzez pomiar ilości uwalnianego, znakowanego izotopowo kwasu arachidonowego (³H)AA). Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-test Bonferroniego. ** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, p<0,01, # - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek APPwt, p<0,05.

4.3.2. Ocena immunoreaktywności COX-2 i aktywności COX w komórkach PC12 kontrolnych oraz transfekowanych APPwt i APPsw

W komórkach transfekowanych APP z mutacją szwedzką zaobserwowano wzrost immunoreaktywności COX-2 o 70% (Rycina 22A) oraz wzrost aktywności COX o 200% (Rycina 22B) w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Aktywność COX-2 mierzona w obecności inhibitora COX-1, SC-560, w komórkach APPsw była wyższa o 83% w porównaniu z komórkami kontrolnymi. W komórkach APPwt nie stwierdzono wzrostu poziomu COX-2 ani aktywności COX.

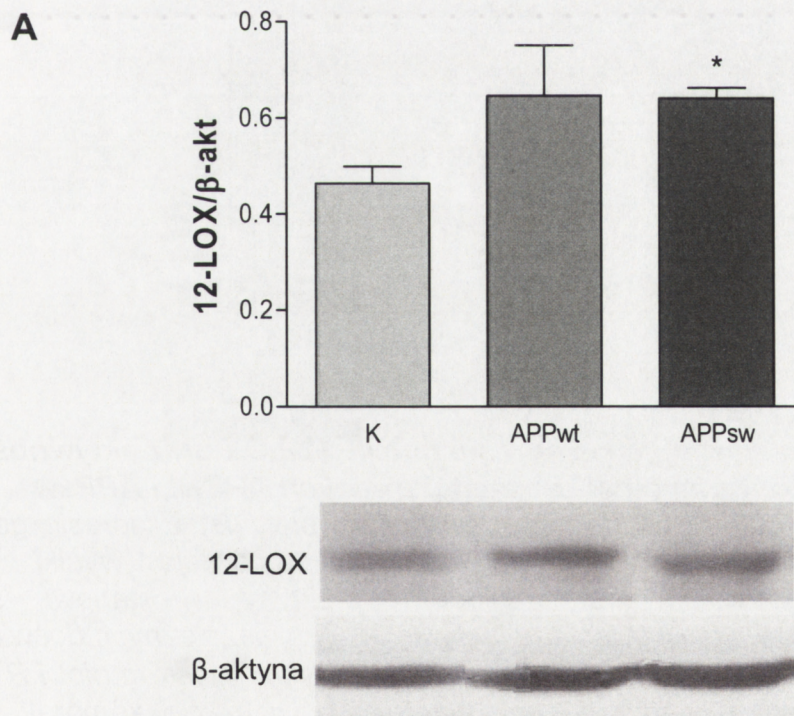


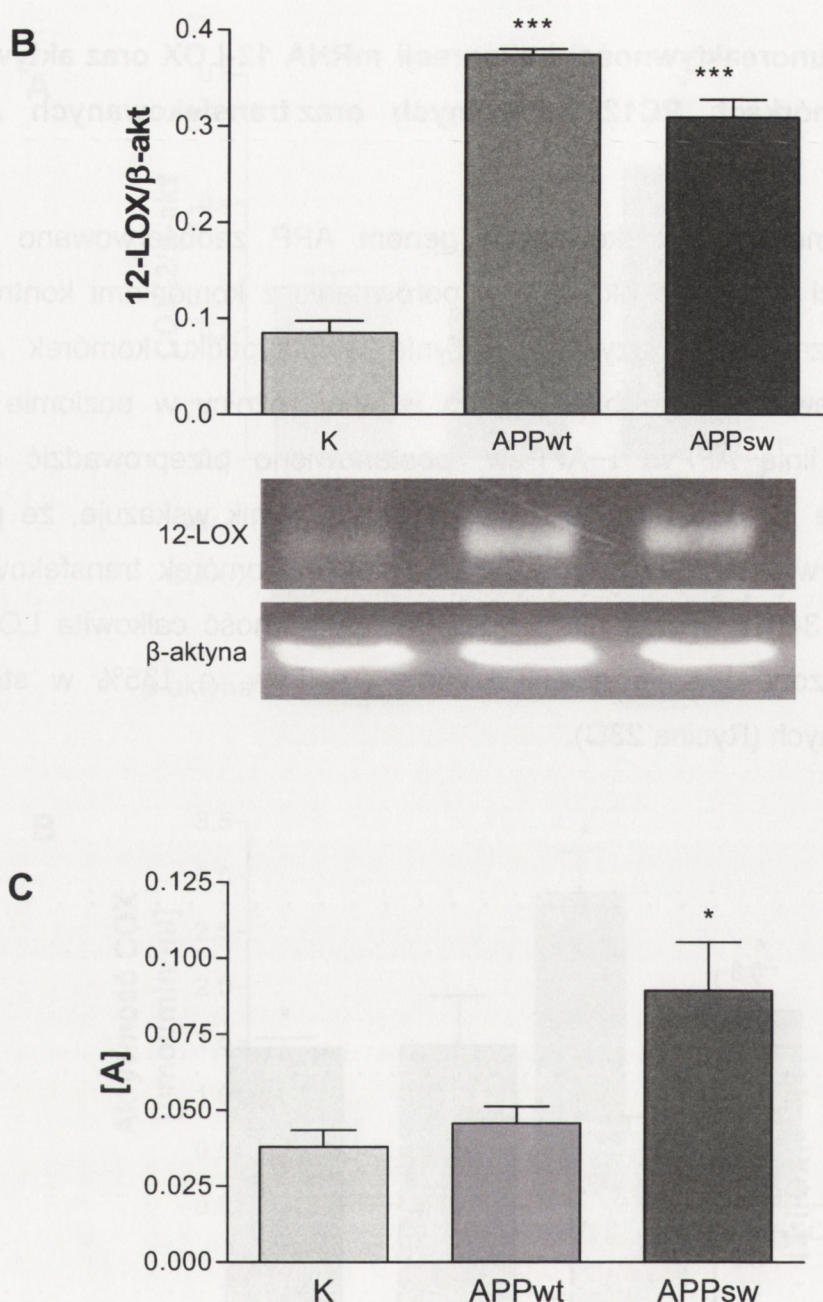
Rycina 22. Aktywność COX i immunoreaktywność COX-2 w komórkach PC12 kontrolnych oraz transfekowanych APPwt i APPsw

(A) Poziom białka COX-2 badano metodą Western blot. Wykres przedstawia wynik analizy densytometrycznej normalizowany względem β -aktyny. Pod wykresem zamieszczono przykładowy wynik Western blot. (B) Aktywność COX badano metodą kolorymetryczną w cytozolu komórek. W celu oceny aktywności COX-2, aktywność COX-1 eliminowano za pomocą inhibitora SC-560. Wyniki stanowi średnią arytmetyczną trzech niezależnych doświadczeń (w przypadku aktywności COX w dwóch powtórzeniach) \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-test Bonferroniego. * - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, $p < 0,05$.

4.3.3. Ocena immunoreaktywności i ekspresji mRNA 12-LOX oraz aktywności LOX w komórkach PC12 kontrolnych oraz transfekowanych APPwt i APPsw

W obu liniach komórek transfekowanych genem APP zaobserwowano wzrost immunoreaktywności 12-LOX o ok. 40% w porównaniu z komórkami kontrolnymi, przy czym wynik znamieny uzyskano jedynie w przypadku komórek APPsw (Rycina 23A). Ponieważ nie zaobserwowano istotnej różnicy w poziomie białka 12-LOX pomiędzy linią APPwt i APPsw, postanowiono przeprowadzić analizę ekspresji mRNA dla 12-LOX (Rycina 23B). Uzyskany wynik wskazuje, że poziom mRNA jest porównywalnie podwyższony w obu liniach komórek transfekowanych genem APP o ok. 340% w stosunku do kontroli. Aktywność całkowita LOX była natomiast podwyższona jedynie w linii komórek APPsw, o 135% w stosunku do komórek kontrolnych (Rycina 23C).



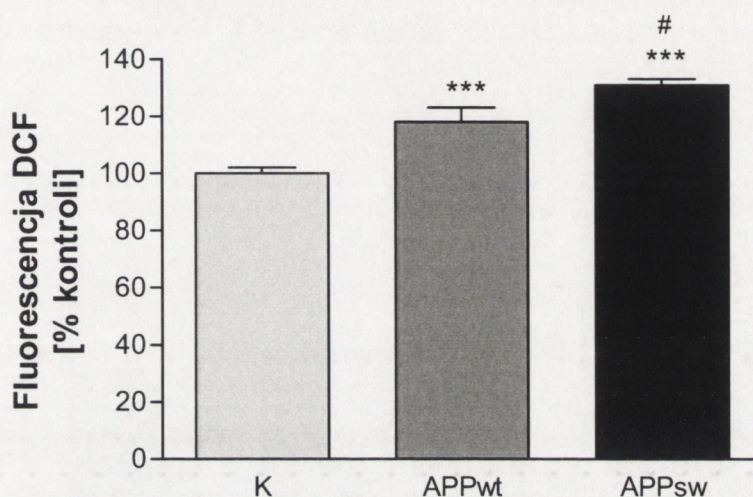


Rycina 23. Immunoreaktywność i ekspresja mRNA 12-LOX oraz aktywność LOX w komórkach PC12 kontrolnych oraz transfekowanych APPwt i APPsw

(A) Poziom białka 12-LOX badano metodą Western blot. (B) Ekspresję genu dla 12-LOX badano metodą RT-PCR. Wykresy przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej normalizowane względem β-aktyny i stanowi średnią arytmetyczną z trzech (western blot) lub pięciu (RT-PCR) niezależnych doświadczeń ± SEM. Pod wykresami zamieszczono przykładowe wyniki Western blot i RT-PCR. (C) Aktywność LOX badano metodą kolorymetryczną w lizacie komórek. Wyniki stanowi średnią arytmetyczną trzech niezależnych doświadczeń w dwóch powtórzeniach ± SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-test Bonferroniego. *, *** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, odpowiednio $p < 0,05$, $p < 0,001$.

4.3.4. Ocena poziomu wolnych rodników w komórkach PC12 kontrolnych oraz transfekowanych APPwt i APPsw

Poziom wolnych rodników tlenowych w komórkach APPwt był wyższy o 19%, natomiast w komórkach APPsw o 34% w stosunku do komórek kontrolnych. Różnica w poziomie wolnych rodników pomiędzy obiema liniami komórek transfekowanych była także istotna statystycznie. Reasumując, można stwierdzić, że poziom wolnych rodników wzrastał wraz ze wzrostem poziomu A β w komórkach.



Rycina 24. Poziom wolnych rodników w komórkach transfekowanych APP

Poziom wolnych rodników oznaczano metodą fluorymetryczną z zastosowaniem DCF. Wyniki wyrażono jako % kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z pięciu niezależnych doświadczeń \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-test Bonferroniego. *** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych $p < 0,001$. # - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek APPwt $p < 0,05$.

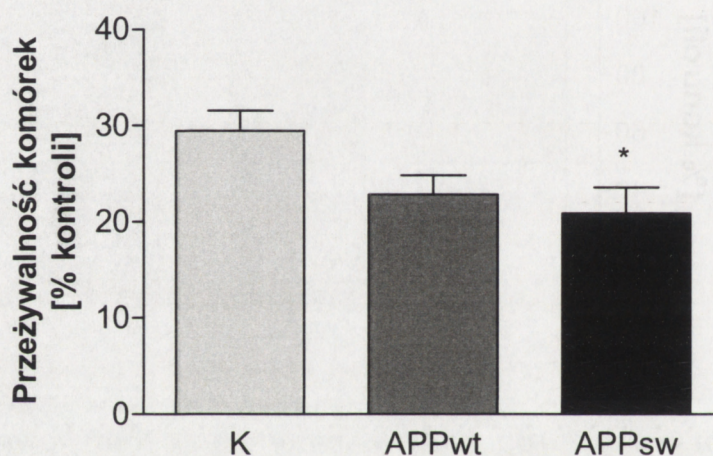
4.3.5. Analiza przeżywalności komórek poddanych działaniu nitroprusydku sodu oraz wpływ inhibitorów COX i LOX

Nitroprusydek sodu (SNP), donor tlenu azotu i rodnika ponadtlenkowego (O_2^-) [269], działał toksycznie na komórki, powodując ich obumieranie. Po 24 h inkubacji z 0,5 mM SNP obumarało ok. 70 - 80 % komórek (Rycina 25), przy czym stwierdzono, że komórki APPsw są istotnie bardziej wrażliwe na SNP niż komórki kontrolne.

Zastosowanie nieselektywnego inhibitora COX, indometacyny oraz inhibitorów LOX, powodowało statystycznie znamiennej wzrost przeżywalności wszystkich typów

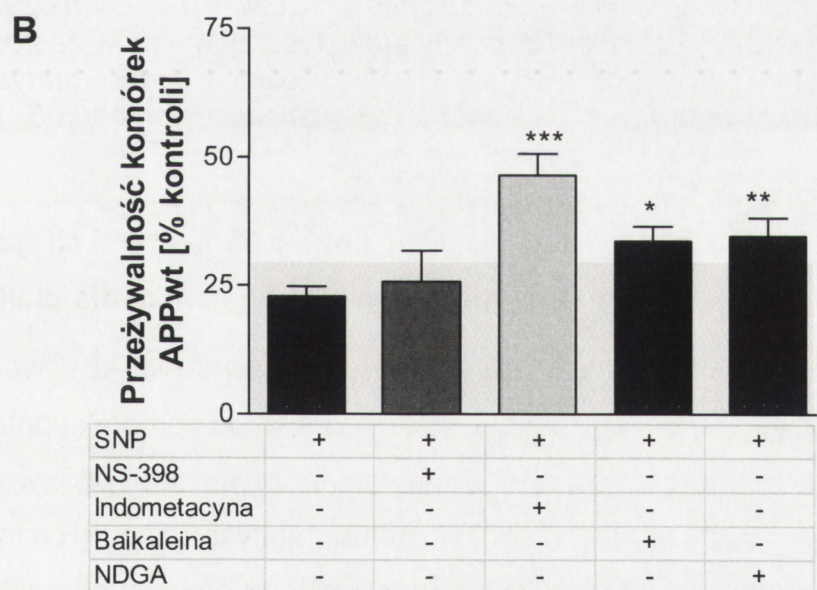
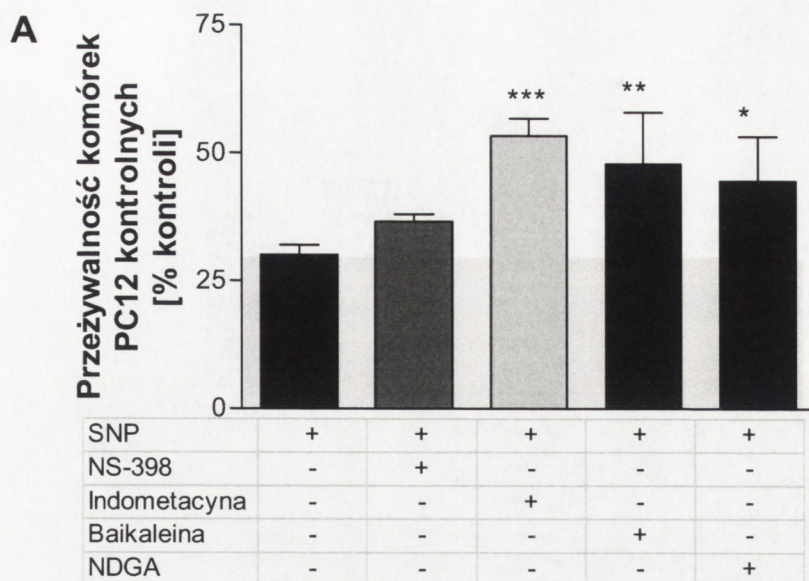
komórek (Rycina 26). Selektywny inhibitor COX-2, NS-398, wykazał protekcyjne działanie jedynie w przypadku komórek z mutacją szwedzką w genie APP, powodując nieznaczny, lecz statystycznie zamienny wzrost ich przeżywalności do 30% w stosunku do komórek APPsw nie poddanych działaniu SNP (Rycina 26C). Przeżywalność komórek APPsw poddanych działaniu SNP i NS-398 była porównywalna z przeżywalnością komórek kontrolnych poddanych działaniu samego SNP.

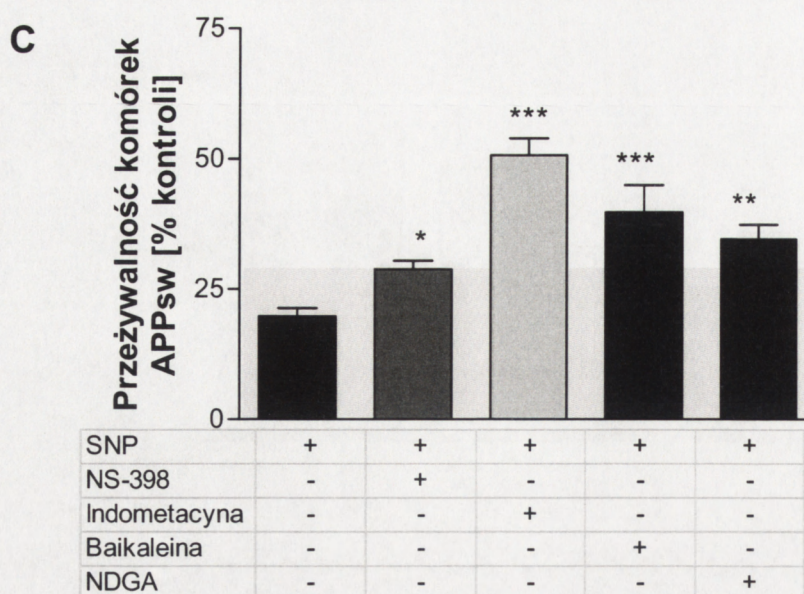
Z uzyskanych danych wynika, że komórki APPsw są bardziej wrażliwe na stres oksydacyjny, natomiast COX-2 jest zaangażowany w procesy, które prowadzą do zwiększonej wrażliwości komórek APPsw na stres oksydacyjny.



Rycina 25. Przeżywalność komórek poddanych działaniu SNP

0,5 mM SNP dodawano do medium na 24 h. Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-test Bonferroniego. * - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych poddanych działaniu SNP, $p < 0,05$





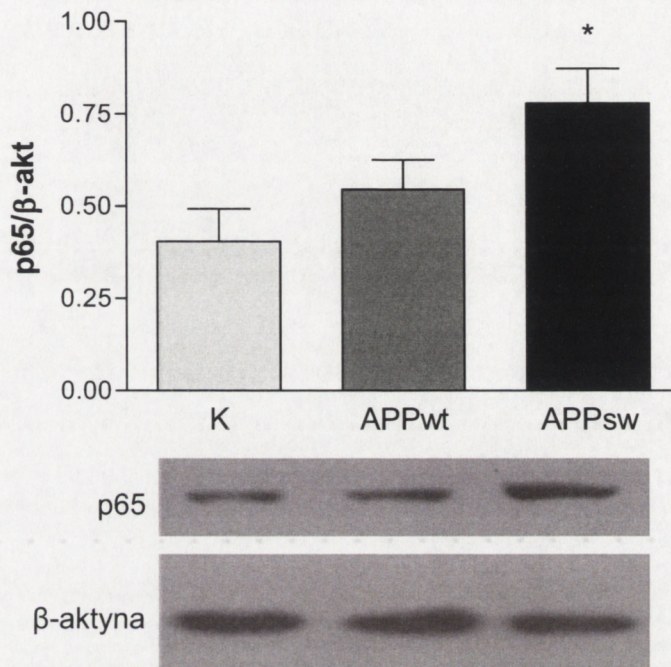
Rycina 26. Wpływ inhibitorów COX i LOX na obumieranie komórek pod wpływem SNP

Komórki kontrolne (A), APPwt (B) i APPsw (C) inkubowano z 0,5 mM SNP oraz jednym z inhibitorów (NS-398, 1 μ M; indometacyną, 25 μ M; baikaleiną, 2,5 μ M lub NDGA, 0,5 μ M) przez 24 h. Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-test Bonferroniego. *, **, *** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek poddanych działaniu SNP, odpowiednio: $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$.

4.3.6. Wpływ inhibitorów COX i LOX na poziom p65 we frakcji jądrowej komórek PC12 kontrolnych oraz transfekowanych genem dla białka APP

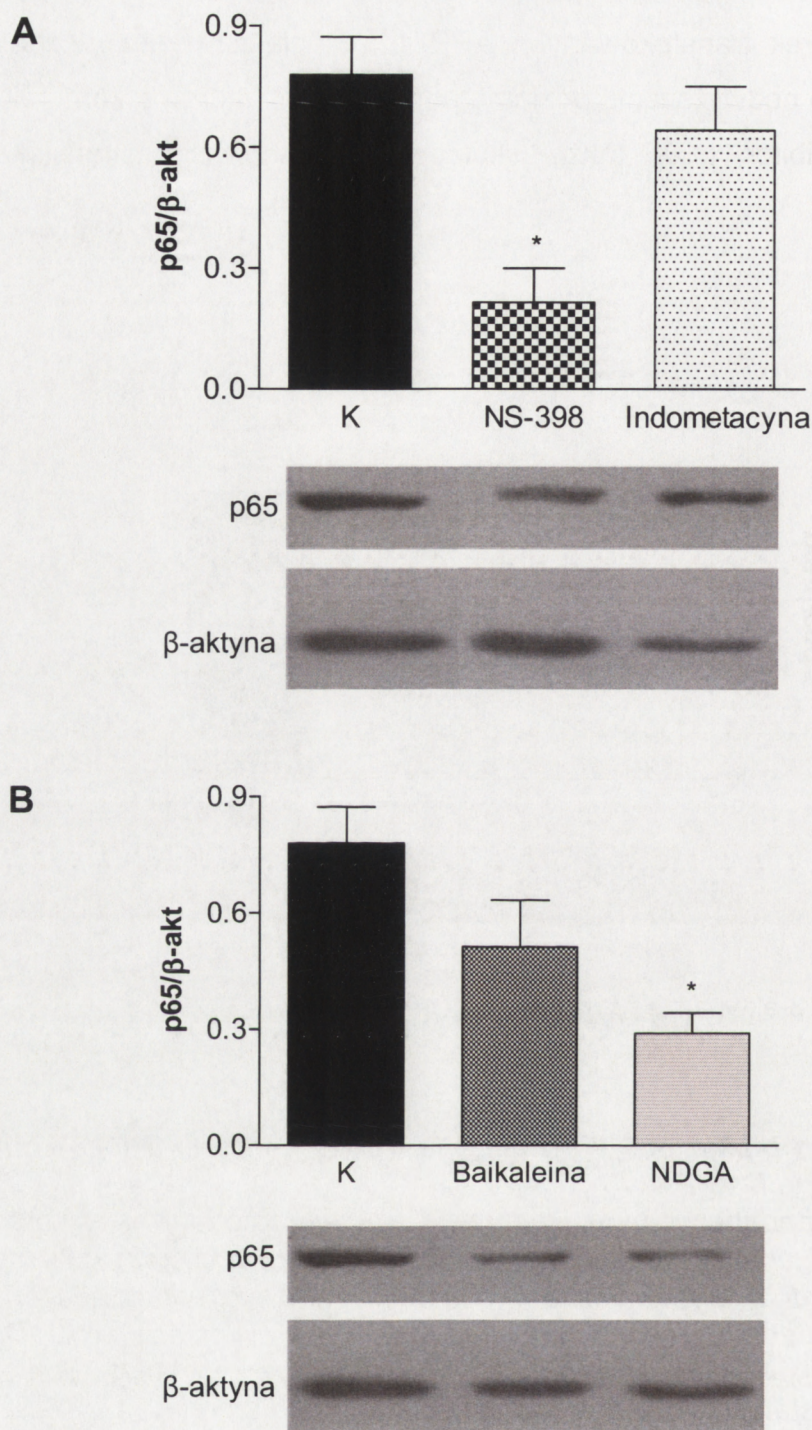
Poziom p65, podjednostki czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, we frakcji jądrowej komórek linii APPsw był wyższy o 92% w stosunku do komórek kontrolnych. W linii komórek APPwt zaobserwowano 35% wzrost zawartości p65 we frakcji jądrowej, przy czym różnica ta była nieistotna statystycznie (Rycina 27). Zastosowane inhibitory COX i LOX nie wywierały wpływu na immunoreaktywność p65 we frakcji jądrowej komórek kontrolnych, ani komórek transfekowanych genem APP typu dzikiego. W przypadku komórek APPsw selektywny inhibitor COX-2, NS-398, oraz nieselektywny inhibitor LOX, NDGA, skutecznie zapobiegały translokacji p65 do jądra. Indometacyna nie wywierała wpływu na translokację p65, natomiast selektywny inhibitor 12-LOX, baikaleina, obniżał immunoreaktywność p65 we frakcji jądrowej o 35% w porównaniu z komórkami kontrolnymi APPsw, ale wynik ten nie był istotny statystycznie.

Reasumując, stwierdzono zwiększoną translokację NF- κ B do jądra jedynie w przypadku komórek transfekowanych APP z mutacją szwedzką. Zahamowanie COX-2 zapobiegało podwyższeniu poziomu p65 we frakcji jądrowej komórek APPsw. Nieselektywny inhibitor LOX także skutecznie przeciwdziałała translokacji p65 do jąder.



Rycina 27. Poziom białka p65 we frakcji jądrowej komórek PC12 kontrolnych oraz transfekowanych APPwt i APPsw

Poziom białka p65 badano we frakcji jądrowej komórek metodą Western blot. Wykres przedstawia wyniki analizy densytometrycznej normalizowane względem β-aktyny, które stanowią średnią arytmetyczną z ośmiu niezależnych doświadczeń \pm SEM. W dolnym panelu zamieszczono przykładowy wynik Western blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-test Bonferroniego. * - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, $p < 0,05$.



Rycina 28. Wpływ inhibitorów COX i LOX na poziom białka p65 we frakcji jądrowej komórek APPsw

Inhibitory COX (**A**), NS-398 (1 μ M) i indometacynę (25 μ M) oraz LOX (**B**), baikaleinę (2,5 μ M) i NDGA (0,5 μ M), dodawano do medium na 24 h. Poziom białka p65 badano we frakcji jądrowej komórek metodą Western blot. Wykresy przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej normalizowane względem β -aktyny, które stanowią średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń \pm SEM. W dolnym panelu zamieszczono przykładowy wynik Western blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-test Bonferroniego. * - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, $p < 0,05$.

5. Dyskusja

Od dawna uważa się, że procesy zapalne i aktywacja enzymów związanych z odpowiedzią zapalną, takich jak cyklooksygenazy i lipoksygenazy, odgrywa istotną rolę w rozwoju choroby Alzheimera, choć ich znaczenie jest ciągle przedmiotem dyskusji. Obecnie zwraca się uwagę na możliwość bezpośredniego udziału tych enzymów w toksyczności peptydów A β , co miałyby poprzedzać indukcję odpowiedzi zapalnej. Ostatnie badania zwróciły ponadto uwagę badaczy na wpływ uogólnionych reakcji zapalnych na rozwój i postęp choroby Alzheimera [70, 72, 73]. Obydwa te zjawiska stawiają w nowym świetle wyniki prób terapeutycznych z zastosowaniem inhibitorów COX i LOX i zmuszają do ponownej weryfikacji stawianych dotychczas hipotez. Przedmiotem przeprowadzonych przez nas badań była ocena roli COX i LOX w toksyczności peptydów A β i ocena wpływu uogólnionego zapalenia na procesy wywołane przez peptydy A β .

W celu zbadania mechanizmów choroby Alzheimera oraz działania związków farmakologicznie czynnych w tej chorobie wprowadzono wiele zwierzęcych modeli eksperymentalnych. Stosowane są transgeniczne myszy np. z wprowadzonym genem dla APP zawierającym mutację szwedzką lub inne mutacje odpowiedzialne u ludzi za wystąpienie rodzinnej formy tej choroby, genem dla białka tau lub genem dla α -synukleiny. Modele te charakteryzuje obecność wielu typowych objawów i cech choroby Alzheimera. Ponadto stosowane są modele doświadczalne, w których peptydy A β podaje się w formie jednorazowych wstrzyknięć lub długotrwałych infuzji do mózgu. Stwierdzono, że obydwie sposoby podania A β powodują aktywację astrocytów i mikrogleju [270 - 273] czemu towarzyszy synteza cytokin prozapalnych w mózgu [272]. W korze czołowociemieniowej oraz w hipokampie obserwuje się ubytek zakończeń cholinergicznym [273 - 277], który jest prawdopodobnie przyczyną obserwowanych zaburzeń pamięci [274, 278, 279]. Stwierdzono, że domózgowe podanie peptydów A β , szczególnie A $\beta_{(1-42)}$ powoduje utratę pamięci u gryzoni (Tabela 6) [280, 281]. Kluczową rolę przypisuje się oligomerom A β , które wstrzyknięte do kory mózgowej szczura lub podane dokomorowo powodują zaburzenia plastyczności synaptycznej i upośledzenie zdolności uczenia się zwierząt [282, 283, 284]. Podanie A $\beta_{(1-42)}$ za pomocą pomp infuzyjnych nastęrcza pewnych problemów ponieważ A β szybko agreguje w pompach i dochodzi do zatrzymania infuzji bądź braku penetracji A β w mózgu [285]. Uważa się, że jednorazowe

wstrzyknięcie peptydów A β do mózgu jest właściwym modelem do badania potencjalnych mechanizmów zaangażowanych w fazę indukcji i rozwoju odpowiedzi na peptydy A β i towarzyszącej im odpowiedzi zapalnej [272].

Tabela 6. Wpływ dokomorowego podania A β na pamięć i zachowanie zwierząt oraz poziom cytokin i inne parametry

Zwierzę / rodzaj A β (dawka)	Czas od podania A β do badań	Obserwowane zaburzenia behawioralne	Inne obserwacje	Odnosi- nik
Myszy / zagregowany A $\beta_{(25-35)}$ (4-16 nmola) oraz niezagregowany A $\beta_{(1-42)}$ (200-800 pmola)	7 dni	Zaburzenia pamięci w teście biernego unikania		[286]
Myszy / A β świeży i zagregowany A $\beta_{(1-42)}$ (205 pmoli)	1,5 h - 2 dni		Wzrost poziomu IL-6, IL-1 β , TNF- α w osoczu oraz w mózgu	[271]
Myszy / A $\beta_{(1-42)}$ (115 μ g)	6 – 48 h		Wzrost poziomu IL-1 α , IL-1 β , IL-6, MCP-1 po 6 h, 9 h, 24 h oraz wzrost poziomu TNF α utrzymujący się do 48 h w hipokampie i korze	[272]
Myszy / zagregowany A $\beta_{(25-35)}$ (5 μ l, 1 g/l)	11-14 dni	Zaburzenia uczenia się i pamięci w labiryncie wodnym Morrisa	Wzrost ekspresji 19 genów min. NF- κ B	[287]
Myszy / zagregowany A $\beta_{(25-35)}$ (3, 9 nmol)	6 - 7 dni	Zaburzenia pamięci w teście Y i teście biernego unikania		[274]
Szczury / zagregowany A $\beta_{(25-35)}$ (7,5 nmola)	10 tygodni	Zaburzenia uczenia się w labiryncie promieniowym	Ubytek neuronów w warstwie CA1 hipokampa	[288]
Szczury / zagregowany A $\beta_{(25-35)}$ (15 nmol)	3,5 i 30 dni		Wzrost stężenia TBARS i O $^{2-}$ w hipokampie	[288]
Myszy / A $\beta_{(25-35)}$ zagregowany (3 μ l, 3 mg/ml)	7-9 dni	Upośledzenie pamięci w teście Y i teście biernego unikania		[289]

W prowadzonych przez nas badaniach *in vivo* zastosowano model dokomorowego podania A $\beta_{(1-42)}$. Ponadto badano czy reakcja na A $\beta_{(1-42)}$ może być modyfikowana przez uogólnioną reakcję zapalną wywołaną dootrzewnowym podaniem toksyny bakteryjnej, lipopolisacharydu (LPS). W celu odpowiedzi

na pytanie jak toksyczność peptydów A β podlega wpływowi towarzyszącej odpowiedzi zapalnej, LPS podawano równocześnie z A $\beta_{(1-42)}$, natomiast w celu określenia efektów przebytych procesów zapalnych na toksyczność peptydów A β , LPS podawano 5 i 8 miesięcy przed podaniem A $\beta_{(1-42)}$. Znaczenie COX-2 w powstawaniu zaburzeń behawioralnych po podaniu A $\beta_{(1-42)}$ i LPS badano po zastosowaniu selektywnego inhibitora COX-2, NS-398. Do badań wybrano myszy 12-miesięczne określane jako dorosłe-stare. Jak wiadomo z wiekiem wzrasta ilość mikrogleju w mózgu oraz dochodzi do jego aktywacji [290 - 292], co może istotnie wpływać na procesy neurodegeneracyjne. Testy behawioralne i badania biochemiczne prowadzono po upływie tygodnia od podania A $\beta_{(1-42)}$, który to czas wybrano na podstawie przeglądu prac zamieszczonych w tabeli 6.

Systemowe podanie LPS-u powoduje indukcję odpowiedzi zapalnej w mózgu i jest szeroko stosowane przez wielu badaczy. Nasze wstępne badania pozwoliły potwierdzić istotny wpływ uogólnionej reakcji zapalnej na poziom COX-2 w mózgu. Stwierdzono znamienne wzrost immunoreaktywności COX-2 już po 3 h od podania LPS i szybki spadek do poziomu kontrolnego (Rycina 14). Podobną dynamikę zmian zaobserwowano w hipokampie i w korze mózgu. Wynik ten jest zgodny z naszymi poprzednimi badaniami, które także wykazały istotny wpływ dootrzewnowego podania LPS na mózg. Stwierdziliśmy, że LPS wywołuje stres oksydacyjny w mózgu, co prowadzi do zaburzeń energetyki komórek [68] oraz translokacji czynnika indukującego apoptozę z mitochondriów do jąder, zjawiska charakterystycznego dla procesów apoptotycznych [69].

Dalsze badania wykazały, że myszy, które otrzymały dokomorowo A $\beta_{(1-42)}$ wykazują obniżoną aktywność lokomotoryczną i mają upośledzoną pamięć w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi. Podanie LPS równocześnie z A $\beta_{(1-42)}$ powodowało pogłębienie zaburzeń zachowania i statystycznie znamienne nasilenie zaburzeń pamięci zwierząt (Rycina 19). Badania prowadzone przez Kitazawa i wsp. (2005) [293] wykazały, że przewlekła uogólniona odpowiedź zapalna (LPS, 0,5 mg/kg, dootrzewnowo, 2 x na tydzień, przez 6 tygodni) nasila zmiany neuropatologiczne (hiperfosforylację tau) w mózgu zwierząt transgenicznych (APP_{K670N;M671L}, PS1_{M146V} i tau_{P301L}) oraz zwiększa aktywację mikrogleju w korze i hipokampie. Podobny wpływ uogólnionego zapalenia obserwuje się także w przypadku innych chorób neurodegeneracyjnych i uszkodzeń mózgu, np. podanie LPS tuż po wywołaniu niedokrwienia mózgu zwiększa ubytek neuronów hipokampa

oraz zwiększa poziom lęku zwierząt i zaburzenia zachowania w teście otwartego pola [294]. Według Spencera i wsp. (2007) efekt LPS zdaje się być niezależny od aktywacji mikrogleju i produkcji cytokin prozapalnych. Badania prowadzone na zwierzętach transgenicznych APPsw wykazały natomiast, że LPS podawany dootrzewnowo powoduje niemal 2-krotny wzrost poziomu APP, 3-krotny wzrost uwalniania $A\beta_{(1-40/1-42)}$ oraz zwiększenie akumulacji peptydów $A\beta$ wewnątrz neuronów i aktywację mikrogleju [295]. LPS podany dootrzewnowo zwiększa ekspresję genu dla APP także u starych zwierząt [290]. Wyniki te wskazują, że LPS, poprzez aktywowanie procesów zapalnych w mózgu lub/oraz poprzez wpływ na uwalnianie $A\beta$ może nasilać zmiany neuropatologiczne charakterystyczne dla choroby Alzheimera (złogi peptydów $A\beta$, hiperfosforylacja tau) i pogłębiać zaburzenia behawioralne.

W odróżnieniu od obserwowanego nasilenia toksyczności peptydów $A\beta$ przez towarzyszące procesy zapalne, nasze badania wykazały, że przebyte zapalenia mogą odmiennie modulować działanie peptydów $A\beta$. W przypadku myszy, którym podano $A\beta_{(1-42)}$ w 12 miesiącu życia, po uprzednim dwukrotnym podaniu LPS (5 i 8 miesięcy wcześniej), zaobserwowano zaburzenia w teście otwartego pola, natomiast nie stwierdzono upośledzenia pamięci w odróżnieniu od zwierząt, które nie przechodziły zapalenia, a u których obserwowano istotne zaburzenia pamięci po $A\beta_{(1-42)}$ (Tabela 5). Dane te wskazują, że działanie $A\beta$ może być modyfikowane przez zmiany biochemiczne i molekularne wywołane w mózgu przez krótkie epizody zapalne przebyte w trakcie życia. Wyniki te są szczególnie istotne w odniesieniu do badań epidemiologicznych skuteczności NLPZ w chorobie Alzheimera. Badania te były prowadzone w populacji chorych leczonych przewlekłe z powodu różnych chorób zapalnych. Wobec powyższego nie można wykluczyć, że procesy zapalne toczące się w organizmach tych osób miały istotny wpływ na uzyskane wyniki. Nasze dane sugerują taką możliwość i wskazują na znaczenie ponownej oceny wyników powyższych badań.

W prowadzonych przez nas badaniach wpływ zapalenia na toksyczność $A\beta_{(1-42)}$ był uzależniony od tego czy podanie LPS poprzedzało czy następowało równocześnie z $A\beta_{(1-42)}$. Jest to zgodne z wcześniejszymi obserwacjami wskazującymi, że aktywacja odpowiedzi immunologicznej w mózgu może wywierać dwojaki efekt: cytotoksyczny lub neuroprotekcyjny, w zależności od tego, czy aktywujący ją czynnik poprzedza czy też występuje po innym bodźcu, jak

również od charakteru tego bodźca. Od dawna wiadomo, że aktywacja odpowiedzi zapalnej przez LPS prowadzi do wzrostu ekspresji antygenów MHC klasy II i powoduje wzrost produkcji wielu cytokin prozapalnych, takich jak IL-1, IL-6, IL-8, TNF i α MCP-1 w mikrogleju [296]. Z drugiej strony aktywowany mikroglej może wytwarzać wiele czynników troficznych, takich jak czynnik wzrostu nerwów (NGF), neurotropina 3, czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (BDNF), zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF), czynnik wzrostu hepatocytów (HGF) i plazminogen [296] oraz może indukować proliferację neuronów [297]. Zaobserwowano, że komórki apoptotyczne mogą aktywować mikroglej w taki sposób, że wytwarza on cząstki neuroprotektcyjne i przeciwzapalne takie jak TGF- β i IL-10 [298].

LPS podawany dootrzewnowo w dawce 1 mg/kg powoduje rozwój uogólnionej reakcji zapalnej, która wywiera istotny wpływ na mózg prowadząc min. do aktywacji procesów autofagii i apoptozy [68, 69]. Wywoływana przez LPS reakcja ma charakter ostrego zapalenia, które charakteryzuje się szybkim rozwojem odpowiedzi na czynnik patologiczny. Ostre zapalenie jest reakcją dobrze kontrolowaną i ulega na ogół dość szybkiemu wygaszeniu, a jego efektem jest usunięcie szkodliwego czynnika, a często także regeneracja tkanek. W odróżnieniu od ostrego zapalenia, zapalenie przewlekłe rozwija się powoli i jest procesem długotrwałym, prowadzącym na ogół do dalszych uszkodzeń. Zapalenie tego rodzaju towarzyszy przewlekłym chorobom neurodegeneracyjnym, a jego przyczyną mogą być patologiczne białka np. peptydy A β . Jest ono często trudne do wygaszenia, gdyż wywołujący go czynnik nie może być usunięty. Uszkodzenia powstałe w mózgu na skutek podawania LPS mogły więc pobudzać procesy regeneracyjne w mózgu, natomiast LPS podawany równocześnie z A β mógł potęgować lub przyspieszać rozwój odpowiedzi zapalnej związanej z A β , a przez to pogarszać stan zwierząt.

Uważa się, że obwodowe procesy zapalne mogą powodować zmianę profilu cytokin w mózgu z przeciwzapalnego na prozapalny [70]. W przypadku, gdy mikroglej jest wstępnie aktywowany przez procesy neurodegeneracyjne, obwodowe procesy zapalne mogą powodować znacznie silniejszą odpowiedź mózgu i rozwój przewlekłego zapalenia [71]. Z drugiej strony procesy zapalne poprzedzające procesy neurodegeneracyjne mogą zmniejszać ich nasilenie. Zjawisko to określa się mianem pre Kondycjonowania (hartowania, tolerancji). W naszych warunkach eksperymentalnych uogólniona odpowiedź zapalna poprzedzająca podanie A β ₍₁₋₄₂₎ powodowała, że zaburzenia pamięci rozpoznawczej

wywoływane przez peptydy A β nie były obserwowane. Ponieważ LPS podawano zwierzętom 5 i 8 miesięcy przed podaniem A β ₍₁₋₄₂₎, obserwowanego przez nas efektu nie można nazwać klasycznym prekondycjonowaniem. Prekondycjonowanie jest procesem polegającym na zmniejszaniu wrażliwości komórek i tkanek na czynnik uszkadzający na skutek wcześniejszej ekspozycji na ten lub podobny czynnik w mniejszym nasileniu. Zjawisko to jest najlepiej poznane w odniesieniu do niedokrwienia mózgu i serca, gdzie krótki okres niedokrwienia znacznie zmniejsza obumieranie komórek na skutek dłuższego niedokrwienia. Proces ten przebiega dwuetapowo. W pierwszej fazie, trwającej około 2 godziny od prekondycjonowania, dochodzi do aktywacji pewnych szlaków sygnalizacyjnych prowadzących do zmian metabolicznych, które czynią komórki mniej wrażliwymi na dalsze uszkodzenia. Druga faza protekcji, trwająca od 24 h do 4 dni związana jest z syntezą białek odpowiedzialnych za wydajniejszą ochronę przed uszkodzeniami, takich jak białka szoku cieplnego, enzymy antyoksydacyjne, ale także syntaza tlenu azotu oraz COX [299]. Czynnikiem prekondycjonującym może być nie tylko niedokrwienie, lecz także wiele innych procesów i związków chemicznych, takich jak wziewne środki znieczulające [300], ozon [301], hipertermia [302], LPS i wiele innych.

Stwierdzono, że LPS może zmniejszać uszkodzenia wywołane w mózgu zwierząt przez niedokrwienie i reperfuzję, ale może je także znacznie zwiększyć w zależności od czasu pomiędzy podaniem LPS i niedokrwieniem. LPS podany 24 h przed niedokrwieniem znacznie zmniejszał uszkodzenia, natomiast podany 6 lub 72 h wcześniej powodował nawet kilkukrotny ich wzrost [303]. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku wewnątrzmacicznej ekspozycji płodów na LPS, która powodowała nasilenie uszkodzeń wywołanych przez niedokrwienie u noworodków myszy C57Bl6, natomiast znacznie je zmniejszała w przypadku myszy dorosłych [304]. Kluczowe znaczenie zdaje się więc odgrywać odstęp czasowy pomiędzy czynnikiem prekondycjonującym i uszkadzającym, przy czym uważa się, że okno terapeutyczne prekondycjonowania jest dość krótkie i wynosi maksymalnie kilka dni. Brak jest jednak danych odnośnie odległych efektów prekondycjonowania, dlatego nie można wykluczyć, że takie efekty występują. Wskazują na to nasze badania, jak również najnowsze badania Wanga i wsp. (2007) [304] oraz Spencera i wsp. (2006) [305], którzy obserwowali, że ekspozycja na LPS w życiu płodowym lub 15 dni po urodzeniu może dawać neuroprotektoryjne efekty w życiu dorosłym (nawet 75 dni później).

Mechanizm obserwowanych zjawisk nie jest do końca poznany. Pewną rolę mogą tu odgrywać procesy związane z odpowiedzią immunologiczną. Zaobserwowano, że prekondycjonowanie LPS-em hamuje napływ neutrofilów do mózgu i hamuje aktywację mikrogleju po niedokrwieniu [306]. Stwierdzono także, że zarówno prekondycjonowanie ischemiczne, jak i za pomocą LPS-u powoduje obniżenie zawartości czynnika NF- κ B w jądrach oraz ekspresji cytokin [307]. Wydaje się, że zjawisko tolerancji wywołane LPS-em oraz niedokrwieniem polega na wyciszeniu odpowiedzi immunologicznej. Jak wiadomo odpowiedź immunologiczna wywoływana przez LPS polega na aktywacji receptorów TLR4 (*ang. Toll-like receptors*), co prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, który inicjuje transkrypcję genów dla cytokin prozapalnych, takich jak TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 [308]. Wydaje się możliwe, że prekondycjonowanie może być związane z wpływem na szlak sygnalizacyjny TLR/cytokiny [309]. Receptory TLR mogą być aktywowane przez LPS, ale także przez produkty rozpadu uszkodzonych i nekrotycznych komórek, co prowadzi do indukcji syntezy cytokin i odpowiedzi zapalnej. Jednocześnie uwalniane są także endogenne inhibitory zapalenia, takie jak IL-4, IL-10, IL-13 oraz wiele innych inhibitorów wewnątrzkomórkowych. Inhibitory te hamują odpowiedź zapalną i zmniejszają podatność na indukcję zapalenia przez kolejne szkodliwe czynniki [309]. Stwierdzono także, że aktywacja receptorów TLR4 w mózgu przez LPS powoduje napływ progenitorów oligodendrocytów i rozpoczyna proces remielinacji w miejscach, które uległy uszkodzeniu [310].

Kolejnym aspektem działania TLR4 jest ich udział w rozwoju nabytej odpowiedzi zapalnej. Choć aktywacja receptora TLR4 jest zjawiskiem charakterystycznym dla odpowiedzi wrodzonej, to od niedawna wiadomo, że w istotny sposób nasila także odpowiedź nabytą skierowaną przeciw różnym antygenom i pełni kluczową rolę w procesie przejścia odpowiedzi wrodzonej w nabytą [311]. Stymulacja TLR4 zwiększa zdolność prezentacji antygeny przez mikroglej [312], co może zwiększać zdolność usuwania prezentowanych antygenów. LPS podany systemowo może powodować uszkodzenie bariery krew-mózg, co może ułatwiać leukocytom inwazję do mózgu, a antygenom obecnym w mózgu umożliwiać wydostawanie się poza barierę krew-mózg. W połączeniu z wpływem aktywowanych receptorów TLR4 na efektywność prezentowania antygeny, zjawisko to może ułatwiać rozwój odpowiedzi nabytej na antygeny obecne w mózgu, również odpowiedzi autoimmunologicznej. Jak wiadomo, jednym z endogennych aktywatorów

TLR4 są peptydy A β [313], natomiast aktywacja receptorów TLR4 powoduje wzrost wychwytu peptydów A β przez mikroglej [314, 315]. Najnowsze badania wskazują na istnienie endogennych przeciwciał przeciw peptydom A β . Ich obecność w postaci immunokompleksów z peptydami A β zaobserwowano w płynie mózgowo-rdzeniowym niemal u połowy osób zdrowych, natomiast nie wykryto ich u chorych na chorobę Alzheimera [316]. Istnieje więc możliwość, że przeciwciała te odgrywają istotną rolę w procesie usuwania A β , a aktywacja receptorów TLR4 przez LPS wpływa na ich poziom.

Uogólniona odpowiedź zapalna może modulować odpowiedź mózgu na peptydy A β w mechanizmie zależnym od poziomu i aktywności COX-2. Nasze badania wykazały, że selektywny inhibitor COX-2, NS-398, wywiera działanie protekcyjne - zapobiega częściowo zaburzeniom lokomotorycznym i zaburzeniom pamięci rozpoznawczej wywoływanym przez A $\beta_{(1-42)}$ i LPS podane jednocześnie (Rycina 19). Pomimo, że badania kliniczne dotyczące skuteczności NLPZ w terapii choroby Alzheimera nie przyniosły zadawalających rezultatów, rola COX-2 w rozwoju tej choroby jest nadal przedmiotem licznych badań. Najnowsze dane wskazują, że COX-2 w mózgu chorych na choroby Alzheimera jest aktywowany we wczesnych etapach choroby, przed wystąpieniem objawów demencji i poprzedza aktywację mikrogleju, a jego poziom spada w zaawansowanych stadiach choroby [127, 128, 148]. Obserwowano także, że COX-2 może pośredniczyć w aktywacji mikrogleju i indukcji uszkodzeń neuronów [317, 318]. Osoby bez demencji leczone NLPZ wykazują zredukowaną ilość aktywowanego mikrogleju w mózgu w porównaniu z nieleczonymi [107], a przewlekłe stosowanie celekoksibu, selektywnego inhibitora COX-2, zapobiega wzrostowi z wiekiem poziomu czynników prozapalnych w hipokampie (IL-1 β , TNF α , PGE $_2$) [319]. Zahamowanie COX może więc wywierać swoje efekty poprzez zapobieganie lub zmniejszanie aktywacji mikrogleju w mózgu chorych na chorobę Alzheimera.

W naszym modelu badawczym poziom COX-2 w hipokampie oraz aktywność COX, badane ósmego dnia po podaniu A $\beta_{(1-42)}$, były podwyższone w grupie zwierząt, które otrzymały sam A $\beta_{(1-42)}$ w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast były niezmiennymi w grupie, która równocześnie z A $\beta_{(1-42)}$ otrzymała LPS (Rycina 15, Rycina 16). Jednak ochronne działanie inhibitora COX-2 w odniesieniu do zaburzeń pamięci wywołanych przez A β i LPS wskazuje na istotną rolę COX-2 w powstawaniu tych zaburzeń (Rycina 19). Jak wynika z naszych badań, LPS powoduje gwałtowną

indukcję COX-2 w mózgu w 3 h od podania, która szybko zanika. Ta wczesna indukcja COX-2 przez LPS może przyspieszać i nasilać odpowiedź zapalną na peptydy A β , powodując także pogłębienie zaburzeń pamięci. Ósmego dnia od podania A $\beta_{(1-42)}$ indukcja COX-2 może być wygaszona, pomimo jej wcześniejszego wpływu na działanie peptydów A β . Dodatkowo nasze badania wykazały, że aktywność COX w grupie zwierząt, które otrzymały A $\beta_{(1-42)}$, LPS i NS-398 jest niższa niż w grupie, która otrzymała A $\beta_{(1-42)}$ i LPS i niższa niż u zwierząt kontrolnych. Wskazuje to na istotny wpływ inhibitora COX-2 na aktywność COX u zwierząt poddanych działaniu A $\beta_{(1-42)}$ i LPS, pomimo braku istotnej różnicy w poziomie i aktywności COX między tymi zwierzętami, a grupą kontrolną w badanym czasie.

W przypadku zwierząt, u których podanie A $\beta_{(1-42)}$ było poprzedzone dwoma epizodami zapalnymi (5 i 8 miesięcy wcześniej) nie zaobserwowano zarówno wzrostu poziomu COX-2, jak i zaburzeń pamięci (Rycina 17, Tabela 5). W tym przypadku przebyte zapalenie prawdopodobnie chroniło przed indukcją COX-2 w mózgu w odpowiedzi na peptydy A β , a w konsekwencji przed zaburzeniami pamięci. Dla potwierdzenia powyższej hipotezy przydatne byłoby zbadanie poziomu COX-2 w mózgu zwierząt w różnych czasach od podania A $\beta_{(1-42)}$, które to badania zostaną przeprowadzone w przyszłości.

W badaniach mających na celu określenie roli lipoksygenaz w neurotoksyczności peptydów A β w warunkach odpowiedzi zapalnej pojawiły się nieoczekiwane problemy. Pomimo wyboru nietoksycznej dawki inhibitorów LOX (30 mg/kg) zanotowano niemal 100% śmiertelność badanych zwierząt. LD₅₀ dla NDGA w przypadku iniekcji dootrzewnowej myszom wynosi 0,1-0,8 g/kg m.c. [320 - 322]. NDGA jest powszechnie stosowany w dawce 50 mg/kg m.c. dootrzewnowo [323] lub dożylnie [324]. Również w przypadku myszy C57Bl6, NDGA stosowano w dawce 20 mg/kg m.c. podskórnie, przez 4 tygodnie i nie odnotowano toksyczności takiego dawkowania [325]. Podobnie baikaleina stosowana jest w dawkach od 10 – 100 mg/kg m.c. dootrzewnowo lub podskórnie [326 - 328], a nawet w dawce 300 mg/kg dootrzewnowo [329]. Zwierzęta kontrolne, a także zwierzęta, którym podano A $\beta_{(1-42)}$ nie wykazywały żadnych objawów niepożądanych po zastosowaniu inhibitora LOX. Toksyczny efekt baikaleiny ujawnił się jedynie w grupie zwierząt, które otrzymały równocześnie A $\beta_{(1-42)}$ oraz LPS i wystąpił zarówno w przypadku dawki 30 mg/kg m.c. jak i 10 mg/kg m.c. We wcześniejszych badaniach

z zastosowaniem baikaleiny w zwierzęcych modelach uogólnionego zapalenia wywołanego LPS-em także nie stwierdzono toksyczności tego związku. W przypadku szczurów, które otrzymały LPS w dawce 10 mg/kg m.c. oraz baikaleinę w dawce 20 mg/kg m.c. stwierdzono poprawę parametrów hemodynamicznych oraz obniżenie poziomu tlenu azotu i wolnych rodników we krwi w porównaniu z grupą, która otrzymała sam LPS [330]. Stwierdzono ponadto, że baikaleina podawana przez 7 dni w dawce 10-15 mg/kg m.c./dzień chroni przed zaburzeniami pamięci u myszy po dokomorowym podaniu neurotoksycznego fragmentu peptydu A β , A β ₍₂₅₋₃₅₎ (3 nmole/mysz) [327]. Wynik ten udało się potwierdzić także w naszych badaniach, gdzie baikaleina podawana przez 4 dni w dawce 10 mg/kg powodowała poprawę pamięci u zwierząt, którym podano dokomorowo 1 nmol A β ₍₁₋₄₂₎ (Rycina 20). Wydaje się, że baikaleina może zapobiegać wzrostowi aktywności LOX po podaniu A β ₍₁₋₄₂₎ (Rycina 16B). W związku z powyższym wysoka toksyczność baikaleiny u zwierząt poddanych działaniu A β ₍₁₋₄₂₎ i LPS wydaje się zaskakująca. Uzyskany przez nas wynik wskazuje, że poziom 12-LOX ulega porównywalnej zmianie w grupie zwierząt, którym podano sam A β ₍₁₋₄₂₎, jak w grupie zwierząt, które otrzymały A β ₍₁₋₄₂₎ i LPS (Rycina 15), przy czym aktywność LOX zdaje się być znacznie wyższa po podaniu LPS równocześnie z A β ₍₁₋₄₂₎ niż po samym A β ₍₁₋₄₂₎ (Rycina 16B). Brak wpływu baikaleiny na aktywność LOX w grupie poddanej działaniu A β ₍₁₋₄₂₎ i LPS przy jednoczesnym braku wzrostu poziomu białka 12-LOX, sugeruje, że obserwowany wzrost aktywności LOX w tej grupie, jest związany z aktywacją innych izoform LOX. Podanie baikaleiny w tej grupie zdaje się nie wpływać na aktywność LOX, a dodatkowo może powodować wzrost ekspresji genu dla COX-2. Stwierdzono, że np. w preadypocytach 3T3-L1 COX-2 może być indukowany po zastosowaniu baikaleiny [331].

Podsumowując, badania *in vivo* wykazały, że odpowiedź mózgu na peptydy A β jest modyfikowana przez uogólnioną odpowiedź zapalną w dwojaki sposób, w zależności od czasu występowania i charakteru zapalenia. Procesy zapalne oddziaływujące na mózg w czasie, gdy jest on jednocześnie narażony na toksyczność peptydów A β mogą nasilać uszkodzenia mózgu, prawdopodobnie poprzez indukcję COX-2, natomiast przebyte uprzednio procesy zapalne mogą chronić mózg przed zaburzeniami pamięci rozpoznawczej wywołanymi przez A β .

Dalsze badania nad rolą COX i LOX w neurotoksyczności peptydów A β prowadzone *in vitro* miały na celu wyjaśnienie czy COX i LOX są zaangażowane

w odpowiedzi na wewnątrzkomórkową akumulację peptydów A β , bez udziału odpowiedzi zapalnej. Badania te prowadzone były na komórkach PC12 transfekowanych ludzkim genem dla APP, dzikim lub z podwójną mutacją szwedzką. Transfekcja genem dla APP skutkuje zwiększonym wytwarzaniem A $\beta_{(1-40/1-42)}$ przez komórki, przy czym jest ono bardziej nasilone w komórkach APPsw. W badaniach stwierdzono, że ze zwiększonym uwalnianiem A β wiąże się indukcja enzymów odpowiedzialnych za przemiany kwasu arachidonowego, a więc cPLA₂, COX-2 i 12-LOX (Rycina 21, Rycina 22, Rycina 23). Podczas gdy indukcja cPLA₂ oraz COX-2 była szczególnie nasiloną w komórkach APPsw, to immunoreaktywność i ekspresja mRNA 12-LOX ulegała podobnemu wzrostowi w obu liniach komórek, przy czym aktywność całkowita LOX była znamienne wyższa jedynie w komórkach APPsw.

Dotychczasowe badania dotyczące udziału cPLA₂ w patologii choroby Alzheimera dały sprzeczne wyniki. Stwierdzono obniżenie aktywności PLA₂ w płacie ciemieniowym i czołowym kory mózgowej zmarłych z powodu choroby Alzheimera [332, 333], przy czym badania te dotyczyły całkowitej aktywności PLA₂. W jednym z badań rozróżniono izoformy PLA₂ zależne i niezależne od Ca²⁺ i stwierdzono, że spadek aktywności dotyczy zarówno jednych jak i drugich [333]. Obserwowany spadek aktywności PLA₂ mógłby być częściowo odpowiedzialny za zaburzenia pamięci obserwowane w chorobie Alzheimera, ponieważ stwierdzono, że aktywność PLA₂ jest niezbędna dla LTP [334]. Z drugiej jednak strony badania immunohistochemiczne i badania ekspresji genów wykazały wzrost poziomu i ekspresji cPLA₂ [335, 336], a także wzrost ekspresji COX-2 [336]. Ponadto stwierdzono wzrost zawartości metabolitów choliny w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych na chorobę Alzheimera wskazujący na wzmożony katabolizm fosfatydylocholiny, jednego z substratów dla cPLA₂ [337]. Również badania *in vitro* wykazały, że peptydy A β , a szczególne oligomery, mogą aktywować cPLA₂ [338] i powodować apoptozę neuronów korowych, której znacząco może zapobiegać zarówno zahamowanie cPLA₂ jak i COX-2 [339].

Aktywacja COX-2 w mózgu chorych na chorobę Alzheimera, w modelach zwierzęcych, a także w badaniach *in vitro* była stwierdzona już wielokrotnie (wstęp), przy czym dotychczas wiązano ją jedynie z odpowiedzią zapalną i uważano ją za zjawisko wtórne, istotne, co prawda, dla toczących się procesów patologicznych związanych z zapaleniem, ale niezwiązanym bezpośrednio z wewnątrzkomórkowym

metabolizmem A β . Najnowsze badania wskazują jednak, że ekspresja genu dla COX-2 w przebiegu choroby Alzheimera może być indukowana we wczesnej fazie choroby, bezpośrednio pod wpływem peptydów A β . Badania *in vitro* wykazały, że w komórkach PC12 poddanych działaniu peptydów A β dochodzi do indukcji ekspresji COX-2 przy udziale p38 MAPK lub ERK1/2 oraz NF- κ B [125]. Aktywacja szlaku p38 MAPK i ERK1/2 jest prawdopodobnie odpowiedzią na stres oksydacyjny spowodowany działaniem A β . Nasze badania wykazały, że A β wytwarzany przez komórki także może powodować indukcję COX-2. Nadekspresja COX-2 w mózgu myszy powoduje zaburzenia pamięci i zachowań awersyjnych [119], co sugeruje, że indukcja COX-2 przez A β może odgrywać istotną rolę w powstawaniu zaburzeń neurologicznych charakterystycznych dla choroby Alzheimera.

Ponieważ uważa się, że A β powoduje uwalnianie wolnych rodników w komórkach, przeprowadziliśmy analizę ich zawartości w używanych przez nas trzech liniach komórkowych. Zgodnie z naszymi oczekiwaniami stwierdziliśmy wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu wolnych rodników tym większy, im więcej A β syntetyzują komórki (Rycina 24). Analiza wrażliwości komórek na stres oksydacyjny wywołany za pomocą donora tlenu azotu, nitroprusydku sodu, wykazała, że komórki transfekowane APP są tym bardziej wrażliwe na stres oksydacyjny im więcej A β wytwarzają (Rycina 25). Zastosowane inhibitorów COX i LOX wykazywały porównywalne działanie protekcyjne we wszystkich typach komórek, z wyjątkiem NS-398, który poprawiał przeżywalność jedynie w linii APPsw (Rycina 26). Wynik ten może sugerować, że COX-2 jest odpowiedzialny za podwyższoną wrażliwość komórek transfekowanych APP na stres oksydacyjny.

Kolejne badania dotyczyły analizy immunoreaktywności czynnika NF- κ B we frakcji jądrowej poszczególnych linii komórkowych. NF- κ B jest czynnikiem transkrypcyjnym wrażliwym na stres oksydacyjny, zaangażowanym w regulację transkrypcji genów m.in. białek uczestniczących w odpowiedzi zapalnej [340]. Także ekspresja genu dla COX-2 jest regulowana przez NF- κ B [341]. W naszych badaniach stwierdziliśmy, że komórki PC12 transfekowane genem APPsw wykazują istotnie podwyższoną immunoreaktywność podjednostki p65 czynnika NF- κ B w jądrach (Rycina 27). Aktywację NF- κ B obserwowano dotychczas w komórkach traktowanych A β [342], a w mózgu chorych na chorobę Alzheimera odnotowano wzrost jego immunoreaktywności, głównie w neuronach hipokampa [342 - 347], jak również jego translokację do jądra [348] wskazującą na aktywację transkrypcji

genów regulowanych przez NF- κ B. Aktywowany NF- κ B wykrywano głównie w neuronach otaczających blaszki amyloidowe we wczesnym stadium ich formowania, podczas gdy ich dojrzałe formy wykazywały jedynie słabe barwienie na p65, co sugeruje udział NF- κ B we wczesnych stadiach choroby Alzheimerera, podobnie jak w przypadku COX-2. Również w badaniach *in vitro* można znaleźć poparcie dla tej tezy, bowiem najsilniejszą aktywację NF- κ B obserwowano przy zastosowaniu niskich stężeń A β [349]. Dane te sugerują, że COX-2 i NF- κ B wspólnie uczestniczą w patogenezie choroby Alzheimerera, lecz mechanizm tej kooperacji nie został dotychczas w pełni wyjaśniony.

Indukcja ekspresji genu dla COX-2 podczas zapalenia wymaga aktywacji NF- κ B [350], jednak najnowsze badania wskazują, że może istnieć zwrotny mechanizm regulacji aktywności NF- κ B przez COX [351]. W przypadku myszy COX-1(-/-) stwierdzono kompensacyjną indukcję COX-2 i aktywację ścieżki sygnalizacyjnej NF- κ B oraz wzrost ekspresji cytozolowej i sekrecyjnej PLA₂ [352], natomiast u zwierząt pozbawionych COX-2 obserwowano zahamowanie aktywności i ekspresji NF- κ B [353]. NF- κ B może być aktywowany także przez produkty LOX [354, 355]. Te obserwacje sugerują, że COX i LOX mogą być zaangażowane w rozwój odpowiedzi zapalnej na A β także poprzez modulowanie szlaku NF- κ B. W celu weryfikacji tej hipotezy przeprowadziliśmy badania z zastosowaniem inhibitorów COX i LOX, które wykazały, że NS-398, inhibitor COX-2, zapobiega zwiększonej translokacji podjednostki p65 do jądra w komórkach APPsw (Rycina 28). Działanie takie nie było natomiast obserwowane w przypadku indometacyny, która silniej hamuje COX-1 [249, 356, 357]. W przypadku inhibitorów LOX silniejszy efekt wywarł inhibitor nieselektywny LOX, przy czym w zastosowanym stężeniu hamuje on głównie 5-LOX [250, 253]. Inhibitor 12-LOX nie wykazał statystycznie znamiennego działania, co sugeruje mniejszą rolę tej izoformy LOX w badanym procesie. Również obserwowany przez nas efekt inhibitora COX, który zapobiegał wzrostowi immunoreaktywności cPLA₂ w hipokampach mózgu myszy po podaniu A β ₍₁₋₄₂₎ oraz LPS, wskazuje na istnienie zwrotnego mechanizmu regulacyjnego w szlaku przemian kwasu arachidonowego.

O ile w przypadku LOX mechanizm regulacji NF- κ B wydaje się być związany z pośrednimi produktami przemian kwasu arachidonowego o właściwościach wolnych rodników [354, 355], to w przypadku COX sugeruje się raczej mechanizm zależny bezpośrednio od prostaglandyn. Wydaje się, że wpływ COX-2 na NF- κ B

może być różnorodny (aktywujący lub hamujący) w zależności od rodzaju wytwarzanych prostaglandyn. Poligone i Baldwin (2001) stwierdzili, że PGE₂ może aktywować NF-κB, podczas gdy PGJ₂, może hamować jego aktywność [351]. Inni badacze stwierdzili, że COX-2 działa prozapalnie we wczesnym etapie po indukcji, gdy poziom PGE₂ jest wysoki. W późniejszym etapie odpowiedzi zapalnej, gdy wzrasta poziom PGJ₂, COX-2 działa przeciwzapalnie. Zahamowanie COX-2 we wczesnym etapie odpowiedzi zapalnej hamuje tę odpowiedź, natomiast w późnym może ją nasilać [358]. Wydaje się możliwe, że jest to związane z hamowaniem aktywności NF-κB przez PGJ₂, którego poziom wzrasta w późnym etapie działania COX-2. Mechanizm przejścia od syntezy PGE₂ do syntezy PGJ₂ jest natomiast niewyjaśniony.

Obserwowane przez nas zapobieganie translokacji p65 przez NDGA, przy braku znamienego efektu baikaleiny wskazuje, że raczej 5-LOX, a nie 12-LOX jest zaangażowana w ten proces. Wynik ten jest zgodny z obserwacją Wona i wsp. [359], którzy stwierdzili, że zarówno inhibitor cPLA₂, MAFP jak i NDGA, ale nie baikaleina, zapobiegają aktywacji NF-κB i indukcji iNOS przez LPS w komórkach gleju. Autorzy tej pracy nie stwierdzili natomiast udziału COX w regulacji aktywności NF-κB i iNOS w komórkach gleju. Nasze badania potwierdzają znaczenie LOX w regulacji czynnika NF-κB oraz wskazują na obecność podobnej zależności w przypadku COX-2 w komórkach pochodzenia nerwowego.

Podsumowując, badania *in vitro* wykazały, że transfekcja komórek genem dla APP powoduje aktywację szlaku przemian kwasu arachidonowego z udziałem cPLA₂, COX-2 i 12-LOX. Zwiększone wytwarzanie Aβ przez komórki wiąże się także ze wzrostem wewnątrzkomórkowego poziomu wolnych rodników i wrażliwości na stres oksydacyjny. Podwyższona wrażliwość na stres oksydacyjny zdaje się być związana z indukcją COX-2 w tych komórkach. Indukcja COX-2 i LOX może prowadzić do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-κB, co może mieć istotny udział w inicjacji odpowiedzi zapalnej przez peptydy Aβ.

6. Podsumowanie i wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników można wysnuć następujące wnioski:

1. $A\beta_{(1-42)}$ podany dokomorowo powoduje aktywację szlaku przemian kwasu arachidonowego z udziałem $cPLA_2$, COX-2 i 12-LOX. Uogólniona odpowiedź zapalna, zarówno przeżyta przed podaniem $A\beta_{(1-42)}$ jak i wywołana jednocześnie z jego podaniem, modyfikuje odpowiedź $cPLA_2$ i COX-2 na peptydy $A\beta$, natomiast nie wpływa na 12-LOX. Opisane zjawiska mogą mieć istotne znaczenie w procesie toksyczności peptydów $A\beta$ w mózgu.
2. $A\beta_{(1-42)}$ podany dokomorowo wywołuje u myszy zaburzenia lokomotoryczne i zaburzenia pamięci rozpoznawczej. Równoczesne podanie $A\beta_{(1-42)}$ i LPS istotnie pogłębia zaburzenia pamięci, natomiast zahamowanie COX-2 za pomocą NS-398 powoduje istotną poprawę pamięci zwierząt. $A\beta_{(1-42)}$ nie wywołuje zaburzeń pamięci u zwierząt, u których wcześniej wywołano odpowiedź zapalną. Uzyskane wyniki wskazują, że wpływ peptydów $A\beta$ na pamięć rozpoznawczą może być różnorodnie modulowane przez zapalenie w zależności od czasu jego wystąpienia, a w procesie tym ważną rolę odgrywa COX-2.
3. Zwiększone wytwarzanie $A\beta$ w komórkach PC12 na skutek transfekcji genem białka APP powoduje aktywację szlaku przemian kwasu arachidonowego z udziałem $cPLA_2$, COX-2 i 12-LOX i jest to zależne od stężenia $A\beta$ w komórkach. Wskazuje to na zdolność $A\beta$ do aktywacji COX-2 i 12-LOX bez pośrednictwa procesów zapalnych.
4. Wysoki poziom $A\beta$ powoduje wzrost zawartości wolnych rodników w komórkach oraz zwiększa wrażliwość komórek na stres oksydacyjny. Za nadwrażliwość komórek APPsw na stres oksydacyjny wydaje się być odpowiedzialna COX-2.
5. Wysoki poziom $A\beta$ w komórkach powoduje wzrost translokacji podjednostki p65 czynnika NF- κ B do jądra. Zahamowanie COX-2 lub LOX w istotny sposób zapobiega wzrostowi translokacji p65 do jądra komórek APPsw, co może wskazywać na udział COX-2 i LOX w regulacji aktywności tego czynnika i sugeruje, że enzymy te mogą w istotny sposób wpływać na zależną od tego czynnika aktywację transkrypcji genów.

7. Streszczenie

Cyklooksygenazy (COX) i lipoksygenazy (LOX) są enzymami kontrolującymi przebieg reakcji zapalnej, a także uczestniczącymi w licznych procesach fizjologicznych w mózgu. Od dawna sugeruje się, że mogą one odgrywać istotną rolę w rozwoju choroby Alzheimera, przy czym założenie to opiera się w głównej mierze na obserwacji, że inhibitory COX, niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ), znamienne obniżają ryzyko rozwoju tej choroby. Dotychczas uważano, że indukcja COX-2 w mózgu chorych na chorobę Alzheimera jest zjawiskiem wtórnym, związanym z rozwojem zapalenia wywołanego przez złogi peptydów A β i następuje pod wpływem uwalnianych przez mikroglej cytokin. Najnowsze dane wskazują jednak, że aktywacja szlaku przemian kwasu arachidonowego, w tym COX i LOX, w przebiegu choroby Alzheimera może następować we wczesnych fazach rozwoju choroby i poprzedzać zarówno pojawienie się złogów A β jak i aktywację mikrogleju. Sugeruje się, że aktywacja COX-2 może dogrywać istotną rolę w etiopatogenezie choroby Alzheimera. Poziom COX maleje wraz z postępem choroby, co może tłumaczyć niezadowolające wyniki prób zastosowania NLPZ w leczeniu zaawansowanej choroby Alzheimera.

Dalsze badania dotyczące roli COX i LOX w rozwoju choroby Alzheimera i reakcji zapalnej, a także poznania udziału procesów zapalnych w rozwoju tej choroby mogą przyczynić się do opracowania skutecznych metod jej leczenia lub zapobiegania. Poza inhibitorami COX poszukuje się także innych leków, które mogłyby modulować reakcję mózgu na peptydy A β . Jednym z kandydatów są inhibitory LOX. LOX są enzymami, które, obok COX uczestniczą w przemianach kwasu arachidonowego i produkcji mediatorów zapalnych oraz związków pełniących funkcję ważnych przekaźników w układzie nerwowym. Rola LOX w rozwoju choroby Alzheimera jest znacznie słabiej zbadana w porównaniu do COX. Obserwuje się podwyższoną ekspresję 5-LOX i 12/15-LOX w mózgu osób chorych na tę chorobę. Poziom 12/15-HETE koreluje z poziomem białka tau i peroksydacją lipidów, a wstępne badania *in vitro* wskazują na udział 12/15-LOX w apoptozie wywołanej przez A β . Pierwsze badania kliniczne z zastosowaniem podwójnego inhibitora COX i 5-LOX są już w toku, natomiast od niedawna zwraca się uwagę na potencjalne znaczenie w procesach neurodegeneracyjnych 12/15-LOX, izoformy LOX dominującej w układzie nerwowym.

Innym szczególnie słabo poznanym aspektem odpowiedzi zapalnej w przebiegu choroby Alzheimera jest wpływ obwodowych reakcji zapalnych na procesy neurodegeneracyjne w mózgu. Najnowsze obserwacje wskazują, że procesy te mogą w istotny sposób modulować odpowiedź mózgu zarówno w przypadku, gdy występują w trakcie neurodegeneracji jak i w przypadku, gdy ją poprzedzają. Wydaje się, że odpowiedź mikrogleju na czynniki prozapalne jest zależna od tego, czy był on wcześniej aktywowany przez inny czynnik np. pochodzący z obwodu. Z drugiej strony mikroglej aktywowany w wyniku procesów neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera może być bardziej wrażliwy na wpływ prozapalnych czynników obwodowych. Szereg badań epidemiologicznych zdaje się potwierdzać tą hipotezę. Zaobserwowano także, że zdolności poznawcze osób chorych na chorobę Alzheimera ulegają istotnemu pogorszeniu na skutek przebytej uogólnionej reakcji zapalnej, natomiast zwiększone wytwarzanie cytokin prozapalnych, a obniżone – przeciwzapalnych związane jest ze zwiększonym ryzykiem rozwoju tej choroby.

Dotychczasowy stan wiedzy jest niewystarczający, dlatego podjęto próbę wyjaśnienia roli LOX i COX w neurotoksyczności peptydów A β w warunkach towarzyszącego zapalenia. Cel prowadzonych badań obejmował poznanie wpływu peptydów A β na poziom i aktywność enzymów istotnych dla uwalniania i metabolizmu kwasu arachidonowego, cPLA2 oraz COX-2 i 12-LOX w mózgu zwierząt, z uwzględnieniem wpływu obwodowej reakcji zapalnej oraz znaczenia COX-2 i 12-LOX w zaburzeniach pamięci i funkcji lokomotorycznej wywołanej przez peptydy A β . Cel badań dotyczył ponadto poznania bezpośredniego wpływu A β na te enzymy w układzie *in vitro* zawierającym wyłącznie komórki PC12, bez udziału odpowiedzi zapalnej oraz ich roli w toksyczności peptydów A β .

Badania prowadzono na dwóch modelach doświadczalnych:

- 1) W badaniach *in vivo* zastosowano model dokomorowego podania A β ₍₁₋₄₂₎ (1 nmol/mysz) 12-miesięcznym myszom C57Bl6. Badano jak A β ₍₁₋₄₂₎ wpływa na aktywację szlaku przemian kwasu arachidonowego w mózgu i powstawanie zaburzeń behawioralnych u zwierząt oraz czy reakcja na A β ₍₁₋₄₂₎ może być modyfikowana przez uogólnioną reakcję zapalną wywołaną dootrzewnowym podaniem toksyny bakteryjnej, lipopolisacharydu (LPS, 1 mg/kg m.c., dootrzewnowo). W celu odpowiedzi na pytanie jak toksyczność peptydów A β podlega wpływowi towarzyszącego zapalenia, LPS podawano równocześnie z A β ₍₁₋₄₂₎.

natomiast w celu określenia efektów przebytych procesów zapalnych na toksyczność peptydów A β , LPS podawano 5 i 8 miesięcy przed podaniem A β ₍₁₋₄₂₎. Znaczenie COX-2 i 12-LOX w powstawaniu zaburzeń behawioralnych po podaniu A β ₍₁₋₄₂₎ i LPS badano po zastosowaniu selektywnego inhibitora COX-2, NS-398 (5 mg/kg m.c., 1 x dziennie przez 4 dni) lub selektywnego inhibitora 12-LOX, baikaleiny (10 mg/kg m.c., 1 x dziennie przez 4 dni). Poziom cPLA₂, COX-2 i 12-LOX oznaczano w hipokampie zwierząt metodą immunochemiczną, a aktywność COX i LOX testami kolorymetrycznymi. Badania behawioralne obejmowały ocenę aktywności lokomotorycznej zwierząt w teście otwartego pola oraz ocenę pamięci w teście pamięci rozpoznawczej.

2) W badaniach *in vitro*, w celu wyjaśnienia czy COX i LOX są zaangażowane w odpowiedź na wewnątrzkomórkową akumulację peptydów A β , użyto komórek PC12 wytwarzających zwiększone ilości A β _(1-40/1-42) na skutek transfekcji ludzkim genem dla APP, dzikim lub z podwójną mutacją szwedzką. W tej części badań, podobnie jak w badaniach *in vivo*, oznaczano poziom cPLA₂, COX-2 i 12-LOX oraz ich aktywność. Oceniano także wewnątrzkomórkowy poziom wolnych rodników za pomocą fluorymetrycznego testu DCF oraz wrażliwość komórek na stres oksydacyjny za pomocą testu MTT. Ponadto badano wpływ inhibitorów COX i LOX na translokację czynnika NF- κ B do jądra poprzez pomiar immunoreaktywności podjednostki p65 we frakcji jądrowej komórek. Zastosowano nieselektywne inhibitory COX (indometacynę, 25 μ M) i LOX (NDGA, 0,5 μ M) oraz selektywny inhibitor COX-2 (NS-398, 1 μ M) i selektywny inhibitor 12-LOX (baikaleinę, 2,5 μ M).

Wyniki prezentowane w tej pracy wykazały, że A β ₍₁₋₄₂₎ podany dokomorowo powoduje wzrost poziomu cPLA₂, COX-2 i 12-LOX oraz wzrost aktywności COX i 12-LOX w hipokampie mózgu myszy. Uogólniona odpowiedź zapalna, zarówno przebyta przed podaniem A β ₍₁₋₄₂₎, jak i wywołana jednocześnie z jego podaniem modyfikuje odpowiedź cPLA₂ i COX-2 na peptydy A β , natomiast nie wpływa na 12-LOX. A β ₍₁₋₄₂₎ podany dokomorowo wywołuje u myszy zaburzenia lokomotoryczne i zaburzenia pamięci. Równoczesne podanie A β ₍₁₋₄₂₎ i LPS istotnie pogłębia zaburzenia pamięci, natomiast zahamowanie COX-2 za pomocą NS-398 powoduje istotną poprawę pamięci zwierząt. A β ₍₁₋₄₂₎ nie wywołuje zaburzeń pamięci u zwierząt, które 5 i 7 miesięcy wcześniej przebyły stan zapalny.

Badania *in vitro* pozwoliły stwierdzić, że zwiększony poziom A β w komórkach PC12 na skutek transfekcji genem białka APP powoduje zależną od stężenia A β

aktywację szlaku przemian kwasu arachidonowego z udziałem cPLA₂, COX-2 i 12-LOX (obserwowano zarówno wzrost poziomu białek jak i aktywności badanych enzymów). Wysoki poziom A β powodował wzrost zawartości wolnych rodników w komórkach oraz zwiększał wrażliwość komórek na stres oksydacyjny. Indometacyna, NDGA i baikaleina zmniejszyły obumieranie komórek wywołane donorem tlenu azotu, SNP, we wszystkich liniach komórek, natomiast NS-398 dawał korzystne efekty jedynie w linii APPsw. Transfekcja genem APPsw powodowała wzrost translokacji podjednostki p65 czynnika NF- κ B do jądra. Zahamowanie COX-2 lub LOX w istotny sposób zapobiegało wzrostowi translokacji p65 do jądra komórek APPsw.

Otrzymane wyniki wskazują, że A β może bezpośrednio aktywować szlak przemian kwasu arachidonowego z udziałem COX-2 i 12-LOX, natomiast procesy zapalne mogą modyfikować zmiany wywołane przez A β . Zaburzenia behawioralne, a zwłaszcza zaburzenia pamięci, są pogłębiane przez towarzyszące procesy zapalne, natomiast nie są obserwowane w przypadku, gdy odpowiedź zapalna znacznie poprzedza podanie A β . Inhibitor COX-2 w istotny sposób zmniejsza zaburzenia behawioralne wywołane przez A β i LPS. Aktywacja COX-2 oraz LOX może regulować aktywność czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, co sugeruje, że enzymy te mogą w istotny sposób wpływać na zależną od tego czynnika aktywację transkrypcji genów.

Bibliografia

- 1 Barcikowska M, Bilikiewicz A (2004) Choroba Alzheimer'a w teorii i praktyce klinicznej. Wydawnictwo Czelej.
- 2 Alzheimer A (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie* 64: 146–8.
- 3 Cummings JL (2004) Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 351: 56–67.
- 4 Forsyth E, Ritzline PD (1998) An overview of the etiology, diagnosis, and treatment of Alzheimer disease. *Phys Ther* 78: 1325–31.
- 5 Selkoe DJ (2004) Alzheimer Disease: Mechanistic Understanding Predicts Novel Therapies. *Ann Intern Med*, 140: 627–638.
- 6 Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353–6.
- 7 Celone KA, Calhoun VD, Dickerson BC, Atri A., Chua EF, Miller SL, DePeau K, Rentz DM, Selkoe DJ, Blacker D, Albert MS, Sperling RA (2006) Alterations in memory networks in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: an independent component analysis. *J Neurosci*, 26: 10222–10231.
- 8 Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE (1977) Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet* 1: 189.
- 9 Hynd MR, Scott HL, Dodd PR (2004) Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 45: 583–95.
- 10 Strosznajder JB, Łałowski MM: Peptydy amuloidu beta w mózgu starczym i w patomechanizmie choroby Alzheimer'a w: Strosznajder JB, Mossakowski JM (2001) *Mózg a starzenie. Upowszechnianie Nauki – Oświata „UN-O” Warszawa.*
- 11 Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C (1992) Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359: 325–7.
- 12 Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325: 733–6.
- 13 Saitoh T, Sundsmo M, Roch JM, Kimura N, Cole G, Schubert D, Oltersdorf T, Schenk DB (1989) Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell* 58: 615–622
- 14 Mattson M, Cheng B, Culwell A, Esch F, Lieberburg I, Rydel R (1993) Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* 10: 243–254.
- 15 Qiu WQ, Ferreira A, Miller C, Koo EH, Selkoe DJ (1995) Cell-surface beta -amyloid precursor protein stimulates neurite outgrowth of hippocampal neurons in an isoform-dependent manner. *J Neurosci* 15: 2157–2167.
- 16 Vassar R, Bennett BD., Babu-Khan S, Kahn S, Mendiáz 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 J-C, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286: 735–41.
- 17 Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398: 513–7.
- 18 Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD. (1991) A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* 254: 97–9.

- 19 Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269: 973–7.
- 20 Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375: 754–60.
- 21 Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32: 4693–4697.
- 22 Selkoe DJ (1991) The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6: 487–98.
- 23 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 (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6448–53.
- 24 Hartley DM, Walsh DM, Ye CP, Diehl T, Vasquez S, Vassilev PM, Teplow DB, Selkoe DJ (1999) Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci* 19: 8876–84.
- 25 Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH (2006) A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440: 352–7.
- 26 McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL (1999) Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46: 860–6.
- 27 Cheng IH, Scarce-Levie K, Legleiter J, Palop JJ, Gerstein H, Bien-Ly N, Puolivali J, Lesne S, Ashe KH, Muchowski PJ, Mucke L (2007) Accelerating amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. *J Biol Chem* 10.1074/jbc.M701078200.
- 28 Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature* 416: 535–9.
- 29 Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL (2007) Natural Oligomers of the Alzheimer Amyloid- β Protein Induce Reversible Synapse Loss by Modulating an NMDA-Type Glutamate Receptor-Dependent Signaling Pathway. *J Neurosci* 27: 2866–2875.
- 30 Townsend M, Shankar GM, Mehta T, Walsh DM, Selkoe DJ (2006) Effects of secreted oligomers of amyloid β -protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J Physiol* 572: 477–492.
- 31 Illenberger S, Zheng-Fischhofer Q, Preuss U, Stamer K, Baumann K, Trinczek B, Biernat J, Godemann R, Mandelkow EM, Mandelkow E (1998) The endogenous and cell cycle-dependent phosphorylation of tau protein in living cells: implications for Alzheimer's disease. *Mol Biol Cell* 9: 1495–1512.
- 32 Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, De La Monte S, Dikkes P, Tsai LH (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402: 615–622
- 33 Markesbery WR (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*. 23: 134–47.
- 34 Murray IVJ, Liu L, Komatsu H, Uryu K, Xiao G, Lawson JA, Axelsen PH (2007) Membrane mediated amyloidogenesis and the promotion of oxidative lipid damage by amyloid beta proteins. *J Biol Chem* 282: 9335–9345.
- 35 Atamna H, Boyle K (2006) Amyloid-beta peptide binds with heme to form a peroxidase: Relationship to the cytopathologies of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 3381–3386.

- 36 Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE (1992) beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci* 12: 379-389.
- 37 Keil U, Bonert A, Marques CA, Scherping I, Weyermann J, Strosznajder JB, Müller-Spahn F, Haass C, Czech C, Pradier L, Müller WE, Eckert A (2004) Amyloid β -induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. *J Biol Chem* 279: 50310 - 50320.
- 38 Strosznajder JB, Zambrzycka A, Kacprzak MD, Strosznajder RP (1999) Amyloid beta peptide 25-35 modulates hydrolysis of phosphoinositides by membrane phospholipase(s) C of adult brain cortex. *J Mol Neurosci* 12: 101-109.
- 39 Johnson LV, Leitner WP, Rivest AJ, Staples MK, Radeke MJ, Anderson DH (2002) The Alzheimer's A β -peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11830-11835.
- 40 Selkoe DJ (2001) Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiol Rev* 81: 741-766.
- 41 Tuppo EE, Arias HR (2005) The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 289-305.
- 42 Rogers J, Lue LF. (2001) Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid β -peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 39: 333-340.
- 43 Moore AH, O'Banion MK (2002) Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev* 54: 1627-56.
- 44 Weldon DT, Rogers SD, Ghilardi JR, Finke MP, Cleary JP, O'Hare E, Esler WP, Maggio JE, Mantyh PW (1998) Fibrillar β -amyloid induces microglial phagocytosis, expression of inducible nitric oxide synthase, and loss of a select population of neurons in the rat CNS *in vivo*. *J Neurosci* 18: 2161-2173.
- 45 Kopec KK, Carroll RT (1998) Alzheimer's beta-amyloid peptide 1-42 induces a phagocytic response in murine microglia. *J Neurochem* 71: 2123-31.
- 46 Streit WJ, Walter SA, Pennell NA (1999) Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57: 563-581.
- 47 Frautschy SA, Cole GM, Baird A (1992) Phagocytosis and deposition of vascular beta-amyloid in rat brains injected with Alzheimer's beta-amyloid. *American Journal of Pathology* 140: 1389-1399.
- 48 Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, Rosner MR, Safavi A, Hersh LB, Selkoe DJ (1998) Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid β -protein by degradation. *J Biol Chem* 273: 32730-32738.
- 49 Farris W, Mansourian S, Leissring MA, Eckman EA, Bertram L, Eckman CB, Bertram L, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ (2004) Partial loss-of-function mutations in insulin-degrading enzyme that induce diabetes also impair degradation of amyloid beta-protein. *Am J Pathol* 164: 1425-1434.
- 50 Frackowiak J, Wisniewski HM, Wegiel J, Merz GS, Iqbal K, Wang KC (1992) Ultrastructure of the microglia that phagocytose amyloid and the microglia that produce beta-amyloid fibrils. *Acta Neuropathol* 84: 225-233.
- 51 Paresce DM, Chung H, Maxfield FR (1997) Slow Degradation of Aggregates of the Alzheimer's Disease Amyloid beta -Protein by Microglial Cells. *J Biol Chem* 272: 29390-29397.
- 52 Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T (2000) Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nature Med* 6: 916-919.
- 53 Dickson DW (1997) The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 321- 339.
- 54 Yamaguchi H, Sugihara S, Ogawa A, Saido TC, Ihara Y (1998) Diffuse plaques associated with astroglial amyloid β protein, possibly showing a disappearing stage of senile plaques. *Acta Neuropathol (Berl)* 95: 217-222.

- 55 Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J (2003) Adult mouse astrocytes degrade amyloid β *in vitro* and *in situ*. *Nat Med* 9: 453–457.
- 56 Simic G, Lucassen PJ, Krsnik Z, Kruslin P, Kostovic I, Winblad B, Bogdanovi (2000) nNOS expression in reactive astrocytes correlates with increased cell death related DNA damage in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 165: 12–26.
- 57 Chao CC, Hu S, Sheng WS, Bu D, Bukrinsky MI, Peterson PK (1996) Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism. *Glia* 16: 276–284.
58. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strommeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T (2000) Inflammation in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21: 383-421.
- 59 Townsend KP, Praticò D (2005) Novel therapeutic opportunities for Alzheimer's disease: focus on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *FASEB J* 19: 1592 - 1601.
60. Lue LF, Brachova L, Civin WH, Rogers J (1996) Inflammation, A β deposition, and neurofibrillary tangle formation as correlates of Alzheimer's disease neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 1083-8.
- 61 McGeer PL, McGeer EG (2001) Polymorphisms in inflammatory genes and the risk of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 58: 1790-1792.
- 62 Combs CK, Karlo JC, Kao S-C, Landreth GE (2001) β -amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNF α -dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 21: 1179-1183.
- 63 Walker DG, Lue LF, Beach TG (2001) Gene expression profiling of amyloid beta peptide-stimulated human post-mortem brain microglia. *Neurobiol Aging* 22: 957-66.
- 64 Ranaivo HR, Craft JM, Hu W, Guo L, Wing LK, Van Eldik LJ, Watterson DM (2006) Glia as a therapeutic target: selective suppression of human amyloid-beta-induced upregulation of brain proinflammatory cytokine production attenuates neurodegeneration. *J Neurosci* 26: 662-670.
- 65 Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang SM, Iwata N, Saido TC, Maeda J, Suhara T, Trojanowski JQ, Lee VM (2007) Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 53: 337-51.
- 66 Konsman JP, Parnet P, Dantzer R (2002) Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends Neurosci* 25: 154–159.
- 67 Banks WA, Farr SA, Morley JE (2002) Entry of blood-borne cytokines into the central nervous system: effects on cognitive processes. *Neuroimmunomodulation* 3: 319–327.
- 68 Czapski GA, Cakała M, Kopczuk D, Kamińska M, Strosznajder JB (2004) Inhibition of nitric oxide synthase prevents energy failure and oxidative damage evoked in the brain by lipopolysaccharide. *Pol J Pharmacol*, 56: 643-646.
- 69 Czapski GA, Cakala M, Gajkowska B, Strosznajder JB (2006) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibition protects the brain against systemic inflammation. *Neurochem Int* 49: 751-5.
- 70 Perry VH. (2004) The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain Behav Immun* 18: 407–413.
- 71 Combrinck MI, Perry VH, Cunningham C (2002) Peripheral infection evokes exaggerated sickness behaviour in pre-clinical murine prion disease. *Neuroscience* 112: 7-11.
- 72 Holmes C, El-Okli M, Williams AL, Cunningham C, Wilcockson D, Perry VH (2003) Systemic infection, interleukin 1 β , and cognitive decline in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74: 788-789.
- 73 Tarkowski E, Andreasen N, Tarkowski A, Blennow K (2003) Intrathecal inflammation precedes development of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74: 1200-1205.

74. In't Veld B, Ruitenberg A, Hofman A (2001) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *N Eng J Med* 345: 1515-21.
75. Etminan M, Gill S, Samii A (2003) Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Br Med J* 327: 128-132.
76. Szekely CA, Thorne JE, Zandi PP, Ek M, Messias E, Breitner JC, Goodman SN (2004) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of Alzheimer's disease: a systematic review. *Neuroepidemiology* 23: 159-169.
77. Kudo I, Murakami M (2002) Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 3-58.
78. Kołaczowska E (2002) Cyklooksygenazy. I. Rola w odczynie zapalnym. *Postępy Biologii Komórki* 29: 533-554.
79. Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD (2001) Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 661-690.
80. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP (2002) Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 23: 144-150.
81. Bazan NG (2003) Synaptic lipid signaling: Significance of polyunsaturated fatty acids and platelet-activating factor. *J Lipid Res* 44: 2221-33.
82. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 271: 33157-33160.
83. O'Neill GP, Ford-Hutchinson AW (1993) Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett* 330: 156-160.
84. Yang F, Bleich D (2004) Transcriptional Regulation of Cyclooxygenase-2 Gene in Pancreatic β -Cells. *J Biol Chem* 279: 35403-35411.
85. Reddy ST, Wadleigh DJ, Herschman HR (2000) Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene in activated mast cells. *J Biol Chem* 275: 3107-3113.
86. Wadleigh DJ, Reddy ST, Kopp E, Ghosh S, Herschman HR (2000) Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem* 275: 6259-6266.
87. Schmedtje JF Jr, Ji YS, Liu WL, DuBois RN, Runge MS (1997) Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappa B p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 272: 601-608.
88. Hinz B, Brune K (2002) Cyclooxygenase-2 - 10 years later. *J Pharmacol Exp Ther* 300: 367-375.
89. Consilvio C, Vincent AM, Feldman EL (2004) Neuroinflammation, COX-2, and ALS - a dual role? *Exp Neurol* 187: 1-10.
90. Tamura M, Sebastian S, Yang S, Gurates B, Fang Z, Bulun SE (2002) Interleukin-1 β elevates cyclooxygenase-2 protein level and enzyme activity via increasing its mRNA stability in human endometrial stromal cells: an effect mediated by extracellularly regulated kinases 1 and 2. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3263-3273.
91. Huang ZF, Massey JB, Via DP (2000) Differential regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA stability by interleukin-1 beta (IL-1 β) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in human *in vitro* differentiated macrophages. *Biochem Pharmacol* 59: 187-194.
92. Dixon DA, Kaplan CD, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (2000) Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* 275: 11750-11757.
93. Ristimaki A, Garfinkel S, Wessendorf J, Maciag T, Hla T (1994) Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 α . Evidence for post-transcriptional regulation. *J Biol Chem* 269: 11769-11775.
94. Kis B, Snipes JA, Busija DW. (2005) Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 1 - 7.

- 95 Minghetti L (2004) Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 63(9): 901-910.
- 96 Yermakova AV, Rollins J, Callahan LM, Rogers J, O'Banion MK (1999) Cyclooxygenase-1 in human Alzheimer and control brain: quantitative analysis of expression by microglia and CA3 hippocampal neurons. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 1135-46.
- 97 Horton EW, Main IH (1967) Identification of prostaglandins in central nervous tissues of the cat and chicken. *Br J Pharmacol* 30: 582-602.
- 98 Ramwell PW, Shaw JE (1966) Spontaneous and evoked release of prostaglandins from cerebral cortex of anesthetized cats. *Am J Physiol* 211: 125-134.
- 99 Shaw KN, Commins S, O'Mara SM (2003) Deficits in spatial learning and synaptic plasticity induced by the rapid and competitive broad-spectrum cyclooxygenase inhibitor ibuprofen are reversed by increasing endogenous brain-derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci* 17: 2438-46.
- 100 Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF (1993) Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 11: 371-386.
- 101 Piomelli D (1994) Eicosanoids in synaptic transmission. *Crit Rev Neurobiol* 8: 65-83.
- 102 Chen C, Magee JC, Bazan NG (2002) Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E-2 signaling in hippocampal long-term synaptic plasticity. *J Neurophysiol* 87: 2851-2857.
- 103 Chen C, Bazan NG (2005) Endogenous PGE₂ regulates membrane excitability and synaptic transmission in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 93: 929-941.
- 104 Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, DeWitt DL, Smith WL (1995) Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 270: 10902-10908.
- 105 Bhattacharya M, Peri KG, Almazan G, Ribeiro-da-Silva A, Shichi H, Durocher Y, Abramovitz M, Hou X, Varma DR, Chemtob S (1998) Nuclear localization of prostaglandin E2 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15792-15797.
- 106 Netland EE, Newton JL, Majoche LE, Tate BA (1998) Indomethacin reverses the microglial response to amyloid beta-protein. *Neurobiol Aging* 19: 201-4.
- 107 Mackenzie IR, Munoz DG (1998) Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and Alzheimer-type pathology in aging. *Neurology* 1998: 986-90.
- 108 Hoozemans JJM, Rozemuller AJM, Janssen I, De Groot CJA, Veerhuis R, Eikelenboom P (2001) Cyclooxygenase expression in microglia and neurons in Alzheimer's disease and control brain. *Acta Neuropathol* 101 :2-8.
- 109 Maslinska D, Wozniak R, Kaliszek A, Modelska I (1999) Expression of cyclooxygenase-2 in astrocytes of human brain after global ischemia. *Folia Neuropathol* 37: 75-9.
- 110 Hirst WD, Young KA, Newton R, Allport VC, Marriott DR, Wilkin GP (1999) Expression of COX-2 by normal and reactive astrocytes in the adult rat central nervous system. *Mol Cell Neurosci* 13: 57-68.
- 111 O'Banion MK (1999) Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol* 13:45-82.
- 112 Hull M, Muksch B, Akundi RS, Waschbisch A, Hoozemans JJ, Veerhuis R, Fiebich BL (2006) Amyloid beta peptide (25-35) activates protein kinase C leading to cyclooxygenase-2 induction and prostaglandin E2 release in primary midbrain astrocytes. *Neurochem Int* 48: 663-72.
- 113 Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini BL, Pozzan T, Volterra A (1998) Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391: 281-285.
- 114 Iadecola C, Niwa K, Nogawa S, Zhao X, Nagayama M, Araki E, Morham S, Ross ME (2001) Reduced susceptibility to ischemic brain injury and N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1294-1299.

- 115 Iadecola C, Sugimoto K, Niwa K, Kazama K, Ross ME (2001) Increased susceptibility to ischemic brain injury in cyclooxygenase-1-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 21: 1436-41.
- 116 Wright DH, Abran D, Bhattacharya M, Hou X, Bernier SG, Bouayad AA, Fouron JC, Vazquez-Tello A, Beauchamp MH, Clyman RI, Peri K, Varma DR, Chemtob S (2001) Prostanoid receptors: ontogeny and implications in vascular physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R1343-R1360.
- 117 Ito S, Okuda-Ashitaka E, Minami T (2001) Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin. *Neurosci Res* 41: 299-332.
- 118 Cao C, Matsumura K, Yamagata K, Watanabe Y (1997) Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain. *Am J Physiol* 272: R1712-R1725.
- 119 Andreasson KI, Savonenko A, Vidensky S, Goellner JJ, Zhang Y, Shaffer A, Kaufmann WE, Worley PF, Isakson P, Markowski AL. (2001) Age-Dependent Cognitive Deficits and Neuronal Apoptosis in Cyclooxygenase-2 Transgenic Mice. *J Neurosci* 21: 8198-8204.
- 120 McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG (1996) Arthritis and inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiological studies. *Neurology* 47: 425-32.
- 121 Zandi PP, Breitner JCS (2001) Do NSAIDs prevent Alzheimer's disease? And, if so, why? The epidemiological evidence. *Neurobiol Aging* 22: 811-817.
- 122 Ho L, Pieroni C, Winger D, Purohit DP, Aisen PS, Pasinetti GM. Regional distribution of cyclooxygenase-2 in the hippocampal formation in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 1999;57:295-303.
- 123 Pasinetti GM, Aisen PS (1998) Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neuroscience* 87: 319-24.
- 124 Moolwaney AS, Igwe AJ (2005) Regulation of cyclooxygenase-2 system by interleukin-1 β through mitogen-activated protein kinase signaling pathways: A comparative study of human neuroglioma and neuroblastoma cells. *Molec Brain Res* 137: 202-212.
- 125 Jang JH, Surh YJ (2005) β -Amyloid-induced apoptosis is associated with cyclooxygenase-2 up-regulation via the mitogen-activated protein kinase-NF- κ B signaling pathway. *Free Rad Biol Med* 38: 1604-13.
- 126 Hoozemans JJ, Bruckner MK, Rozemuller AJ, Veerhuis R, Eikelenboom P, Arendt T (2002) Cyclin D1 and cyclin E are co-localized with cyclooxygenase 2 (COX-2) in pyramidal neurons in Alzheimer disease temporal cortex. *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 678-88.
- 127 Yermakova AV, O'Banion MK (2001) Downregulation of neuronal cyclooxygenase-2 expression in end stage Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22: 823-36.
- 128 Hoozemans JJ, van Haastert ES, Veerhuis R, Arendt T, Scheper W, Eikelenboom P, Rozemuller AJ (2005) Maximal COX-2 and ppRb expression in neurons occurs during early Braak stages prior to the maximal activation of astrocytes and microglia in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 2: 27-31.
- 129 Combrinck M, Williams J, De Berardinis MA, Warden D, Puopolo M, Smith AD, Minghetti L (2006) Levels of CSF prostaglandin E2, cognitive decline and survival in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77: 85-88.
- 130 Bate C, Kempster S, Williams A (2006) Prostaglandin D2 mediates neuronal damage by amyloid-beta or prions which activates microglial cells. *Neuropharmacology* 50: 229-37.
- 131 Shie FS, Montine KS, Breyer RM, Montine TJ (2005) Microglial EP2 as a new target to increase amyloid beta phagocytosis and decrease amyloid beta-induced damage to neurons. *Brain Pathol* 15: 134-8.
- 132 Kadoyama K, Takahashi Y, Higashida H, Tanabe T, Yoshimoto T (2001) Cyclooxygenase-2 stimulates production of amyloid β -peptide in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 281: 483-490.

- 133 Qin W (2003) Cyclooxygenase (COX) – 2 and COX-1 potentiate beta-Amyloid peptide generation through mechanisms that involve gamma-secretase activity. *J Biol Chem* 278: 50970-50977.
- 134 Xiang Z, Ho L, Yemul S, Zhao Z, Qing W, Pompl P, Kelley K, Dang A, Qing W, Teplow D, Pasinetti GM (2002) Cyclooxygenase-2 promotes amyloid plaque deposition in a mouse model of Alzheimer's disease neuropathology. *Gene Expr* 10: 271-8.
- 135 Melnikova T, Savonenko A, Wang Q, Liang X, Hand T, Wu L, Kaufmann WE, Vehmas A, Andreasson KI (2006) Cyclooxygenase-2 activity promotes cognitive deficits but not increased amyloid burden in a model of Alzheimer's disease in a sex-dimorphic pattern. *Neuroscience* 141: 1149-62.
- 136 Xiang Z, Ho L, Valdellon J, Borchelt D, Kelley K, Spielman L, Aisen PS, Pasinetti GM (2002) Cyclooxygenase (COX)-2 and cell cycle activity in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease neuropathology. *Neurobiol Aging* 23: 327-334.
- 137 Ferrera P, Arias C (2005) Differential effects of COX inhibitors against β -amyloid-induced neurotoxicity in human neuroblastoma cells. *Neurochem Int* 47: 589-596.
138. Andersen JM, Myhre O, Fonnum F (2003) Discussion of the role of the extracellular signal-regulated kinase-phospholipase A2 pathway in production of reactive oxygen species in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 28: 319-326.
- 139 Butterfield DA, Howard BJ, LaFontaine MA (2001) Brain oxidative stress in animal models of accelerated aging and the age-related neurodegenerative disorders, Alzheimer's disease and Huntington's disease. *Curr Med Chem* 8: 815-28.
- 140 Nagano S, Huang X, Moir RD, Payton SM, Tanzi RE, Bush AI (2004) Peroxidase Activity of Cyclooxygenase-2 (COX-2) cross-links β -amyloid (A β) and generates A β -COX-2 hetero-oligomers that are increased in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 279: 14673-78.
- 141 Boutaud O, Andreasson KI, Zagol-Ikapitte I, Oates JA (2005) Cyclooxygenase-dependent lipid-modification of brain proteins. *Brain Pathol* 15: 139-42.
- 142 Zagol-Ikapitte I, Masterson TS, Amarnath V, Montine TJ, Andreasson KI, Boutaud O, Oates JA (2005) Prostaglandin H(2)-derived adducts of proteins correlate with Alzheimer's disease severity. *J Neurochem* 94: 1140-5.
- 143 Liu DX, Greene LA (2001) Neuronal apoptosis at the G1/S cell cycle checkpoint. *Cell Tissue Res* 305: 217-228.
- 144 Mirjany M, Ho L, Pasinetti MG (2002) Role of Cyclooxygenase-2 in Neuronal Cell Cycle Activity and Glutamate-Mediated Excitotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 301: 494-499.
- 145 Nagy Z, Esiri MM, Smith AD (1998) The cell division cycle and the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 87: 731-9.
- 146 Hoozemans JJM, Veerhuis R, Rozemuller AJM, Arendt T, Eikelenboom P (2004) Neuronal COX-2 expression and phosphorylation of pRb precede p38 MAPK activation and neurofibrillary changes in AD temporal cortex. *Neurobiol Disease* 15: 492-499.
- 147 Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)* 82: 239-259.
- 148 Hoozemans JJM, Veerhuis R, Rozemuller JM, Eikelenboom P (2006) Neuroinflammation and regeneration in the early stages of Alzheimer's disease pathology. *Int J Dev Neurosci* 24: 157-165.
- 149 Yamamoto S, Suzuki H, Ueda N (1997) Arachidonate 12-lipoxygenases. *Prog Lipid Res* 36: 23-41
- 150 Brash AR (1999) Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate *J Biol Chem* 274: 23679-23682.
- 151 Kuhn H, Thiele BJ (1999) The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett.* 449: 7-11.

- 152 Sun D, McDonnell M, Chen X-S, Lakkis MM, Li H, Isaacs SN, Elsea SH, Patel PI, Funk CD (1998) Human 12(R)-Lipoxygenase and the Mouse Ortholog. Molecular cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *J Biol Chem* 273: 33540-33549.
- 153 Kinzig A, Heidt M, Fürstenberger G, Marks F, Krieg P (1999) cDNA cloning, genomic structure and chromosomal localization of a novel murine epidermis-type lipoxygenase. *Genomics* 58: 158-164.
- 154 Yu Z, Schneider C, Boeglin WE, Marnett LJ, Brash AR (2003) The lipoxygenase gene ALOXE3 implicated in skin differentiation encodes a hydroperoxide isomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 9162-9167.
- 155 Kuhn H, Schewe T, Rapoport SM (1986) The stereochemistry of the reactions of lipoxygenases and their metabolites. Proposed nomenclature of lipoxygenases and related enzymes. *Mol Biol* 58: 273-311.
- 156 Chiang N, Serhan CN, Dahlén S-E, Drazen JM, Hay DWP, Rovati GE, Shimizu T, Yokomizo T, Brink C (2006) The lipoxin receptor ALX: Potent ligand-specific and stereoselective actions *in vivo*. *Pharmacol Rev* 58: 463 - 487.
- 157 Sabirsh A, Bywater RP, Bristulf J, Owman C, Haeggstrom JZ (2006) Residues from transmembrane helices 3 and 5 participate in leukotriene B4 binding to BLT1. *Biochemistry* 45: 5733-5744.
- 158 Snider RM, McKinney M, Forray C, Richelson E (1984) Neurotransmitter receptors mediate cyclic GMP formation by involvement of arachidonic acid and lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 3905 - 3909.
- 159 Shearman MS, Naor Z, Sekiguchi K, Kishimoto A, Nishizuka Y (1989) Selective activation of the gamma-subspecies of protein kinase C from bovine cerebellum by arachidonic acid and its lipoxygenase metabolites. *FEBS Lett* 243: 177-82.
- 160 Zuo X, Wu Y, Morris JS, Stimmel JB, Leesnitzer LM, Fischer SM, Lippman SM, Shureiqi I (2006) Oxidative metabolism of linoleic acid modulates PPAR-beta/delta suppression of PPAR-gamma activity. *Oncogene* 25: 1225-41.
- 161 Yu K, Bayona W, Kallen CB, Harding HP, Ravera CP, McMahon G, Brown M, Lazar MA (1995) Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem* 270: 23975-23983.
- 162 Sorensen HN, Treuter E, Gustafsson J-A (1998) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Vitam Horm* 54, 121-166.
- 163 Hada T, Ueda N, Takahashi Y, Yamamoto S (1991) Catalytic properties of human platelet 12-lipoxygenase as compared with the enzymes of other origins. *Biochim Biophys Acta* 1083: 89-93.
- 164 Adesuyi SA, Cockrell CS, Gamache DA, Ellis EF (1985) Lipoxygenase metabolism of arachidonic acid in brain. *J Neurochem* 45: 770-6.
- 165 Watanabe T, Medina JF, Haeggstrom JZ, Radmark O, Samuelsson B (1993) Molecular cloning of a 12-lipoxygenase cDNA from rat brain. *Eur J Biochem* 212: 605-612.
- 166 Miyamoto T, Lindgren JA, Samuelsson B (1987) Isolation and identification of lipoxygenase products from the rat central nervous system. *Biochim Biophys Acta* 922: 372-8.
- 167 Hambrecht GS, Adesuyi SA, Holt S, Ellis EF (1987) Brain 12-HETE formation in different species, brain regions, and in brain microvessels. *Neurochem Res* 12: 1029-1033.
- 168 Yoshimoto T, Kusaka M, Shinjo F, Yamamoto S, Dray F (1984) 12- and 15-lipoxygenases in rat pineal gland. *Prostaglandins* 28: 279-85.
- 169 Ueda N, Hiroshima A, Natsui K, Shinjo F, Yoshimoto T, Yamamoto S, Li K, Gerozissis K, Dray F (1990) Localization of arachidonate 12-lipoxygenase in parenchymal cells of porcine anterior pituitary. *J Biol Chem* 265: 2311 - 2316.
- 170 Ueda N, Hiroshima A, Natsui K, Shinjo F, Yoshimoto T, Yamamoto S, Li K, Gerozissis K, Dray F (1990) Localization of arachidonate 12-lipoxygenase in parenchymal cells of porcine anterior pituitary. *Biol Chem* 265: 2311 - 2316.

- 171 Kawajiri H, Zhuang D, Qiao N, Yoshimoto T, Yamamoto M, Iseki S, Hamaguchi K (2000) Expression of arachidonate 12-lipoxygenase in rat tissues: a possible role in glucagon secretion. *J Histochem Cytochem* 48: 1411-1418.
- 172 Nishiyama M, Okamoto H, Watanabe T, Hori T, Hada T, Ueda N, Yamamoto S, Tsukamoto H, Watanabe K, Kirino T (1992) Localization of arachidonate 12-lipoxygenase in canine brain tissues. *J Neurochem* 58: 1395-400.
- 173 Nishiyama M, Watanabe T, Ueda N, Tsukamoto H, Watanabe K (1993) Arachidonate 12-lipoxygenase is localized in neurons, glial cells, and endothelial cells of the canine brain. *J Histochem Cytochem* 41: 111-117.
- 174 Bendani MK, Palluy O, Cook-Moreau J, Beneytout JL, Rigaud M, Vallat JM (1995) Localization of 12-lipoxygenase mRNA in cultured oligodendrocytes and astrocytes by *in situ* reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Neurosci Lett* 189: 159-162.
- 175 Chanez P, Bonnans C, Chavis C, Vachier I (2002) 15-Lipoxygenase A Janus Enzyme? *Am J Respir Cell Mol Biol* 27: 655-658.
- 176 Zhang L, Zhang W-P, Hu H, Wang M-L, Sheng W-W, Yao H-T, Ding W, Chen Z, Wei E-Q (2006) Expression patterns of 5-lipoxygenase in human brain with traumatic injury and astrocytoma. *Neuropathology* 26: 99-105.
- 177 Zhou Y, Wei EQ, Fang SH, Chu LS, Wang ML, Zhang WP, Yu GL, Ye YL, Lin SC, Chen Z (2006) Spatio-temporal properties of 5-lipoxygenase expression and activation in the brain after focal cerebral ischemia in rats. *Life Sci* 79: 1645-56.
- 178 Lammers C-H, Schweitzer P, Facchinetti P, Arrang J-M, Madamba SG, Siggins GR, Piomelli D (1996) Arachidonate 5-lipoxygenase and its activating protein: prominent hippocampal expression and role in somatostatin signaling. *J Neurochem* 66: 147-152.
- 179 Uz T, Manev H (1998) Circadian expression of pineal 5-lipoxygenase. *Neuroreport* 9: 783-786.
- 180 Mancini JA, Abramovitz M, Cox ME, Wong E, Charleson S, Perrier H, Wang Z, Prasit P, Vickers PJ (1993) 5-lipoxygenase-activating protein is an arachidonate binding protein. *FEBS Lett* 318: 277-281.
- 181 Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takuwa Y, Shimizu T (1997) A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. *Nature* 367: 620-624.
- 182 Unterberg A, Schmidt W, Wahl M, Baethmann A (1990) Role of leukotrienes as mediator compounds in brain edema. *Adv Neurol* 52: 211-214.
- 183 Hariri RJ, Ghajar JB, Pomerantz KB, Hajjar DP, Giannuzzi RF, Tomich E, Andrews DW, Patterson Jr RH (1989) Human glial cell production of lipoxygenase-generated eicosanoids: a potential role in the pathophysiology of vascular changes following traumatic brain injury. *J Trauma* 29: 1203-1210.
- 184 Piomelli D, Feinmark S, Shapiro E, Schwartz JH (1988) Formation and biological activity of 12-keto-eicosateuanoic acid in the nervous system of *Aplysia*. *J Biol Chem* 263:16591-16597.
- 185 Piomelli D, Shapiro E, Zipkin R, Schwartz JH, Feinmark S (1989) Formation and action of 8-hydroxy-11,12-epoxy-5,9,14-eicosanoic acid in *Aplysia* a possible second messenger in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1721-1726.
- 186 Piomelli D, Volterra A, Dale N, Siegelbaum SA, Kandel ER, Schwartz JH, Belardetti F (1987) Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid as second messenger for presynaptic inhibition of *Aplysia* sensory cell. *Nature* 328: 38-44.
- 187 Drapeau C, Pellerin L, Wolfe LS, Avoli M (1990) Long-term changes of synaptic transmission induced by arachidonic acid in the CA1 subfield of the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 115: 286-92.
- 188 Wolfe LS, Horrocks LA (1994) Eicosanoids. w: *Basic Neurochemistry*. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB. Raven Press, New York 475-490.
- 189 Dumuis A, Sebben M, Hayes L, Pin J-P, Bockaert J (1988) NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature* 336: 68-75.

- 190 Freeman EJ, Damron DS, Terrian DM, Dorman RV (1991) 12-Lipoxygenase products attenuate the glutamate release and Ca^{2+} accumulation evoked by depolarization of hippocampal mossy fiber nerve endings. *J Neurochem* 56: 1079-82.
- 191 Dorman RV, Hamm TF, Damron DS, Freeman EJ (1992) Modulation of glutamate release from hippocampal mossy fiber nerve endings by arachidonic acid and eicosanoids. *Adv Exp Med Biol* 318: 121-136.
- 192 Khanna S, Roy S, Ryu H, Bahadduri P, Swaan PW, Ratan RR, Sen CK (2003) Molecular basis of vitamin E action: tocotrienol modulates 12-lipoxygenase, a key mediator of glutamate-induced neurodegeneration. *J Biol Chem* 278: 43508 - 43515.
- 193 Chabot C, Gagné J, Giguère C, Bernard J, Baudry M, Massicotte G (1998) Bidirectional modulation of AMPA receptor properties by exogenous phospholipase A2 in the hippocampus. *Hippocampus* 8: 299-309.
- 194 Feinmark SJ, Begum R, Tsvetkov E, Goussakov I, Funk CD, Siegelbaum SA, Bolshakov VY (2003) 12-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid mediate metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression at hippocampal CA3-CA1 synapses. *J Neurosci* 23: 11427-11432.
- 195 Takahashi Y, Kawajiri H, Yoshimoto T, Hoshi N, Higashida H (1999) 12-Lipoxygenase overexpression in rodent NG108-15 cells enhances membrane excitability by inhibiting M-type K^+ channels. *J Physiol* 521: 567-576.
- 196 Zhu M, Natarajan R, Nadler JL, Moore JM, Gelband CH, Sumners C (2000) Angiotensin II increases neuronal delayed rectifier K^+ current: Role of 12-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. *J Neurophysiol* 84: 2494-2501.
- 197 Canals S, Casarejos MJ, de Bernardo S, Rodríguez-Martín E, Mena MA (2003) Nitric oxide triggers the toxicity due to glutathione depletion in midbrain cultures through 12-lipoxygenase. *J Biol Chem* 278: 21542 - 21549.
- 198 Li Y, Maher P, Schubert D (1997) A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion. *Neuron* 19: 453-63.
- 199 Kuhn H, Romisch I, Belkner J (2005) The role of lipoxygenase-isoforms in atherogenesis. *Mol Nutr Food Res* 49: 1014-29.
- 200 Praticò D, Zhukareva V, Yao Y, Uryu K, Funk CD, Lawson JA, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (2004) 12/15-Lipoxygenase is increased in Alzheimer's disease: Possible involvement in brain oxidative stress. *Am J Pathol* 164: 1655 - 1662.
- 201 Chen X, Sood S, Yang CS, Li N, Sun Z (2006) Five-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in carcinogenesis and cancer chemoprevention. *Curr Cancer Drug Targets* 6: 613-22.
- 202 Qu T, Uz T, Manev H (2000) Inflammatory 5-LOX mRNA and protein are increased in brain of aging rats. *Neurobiol Aging* 21: 647-52.
- 203 Manev H, Manev R (2006) 5-Lipoxygenase (ALOX5) and FLAP (ALOX5AP) gene polymorphisms as factors in vascular pathology and Alzheimer's disease. *Med Hypotheses* 66: 501-3.
- 204 Klegeris A, McGeer PL (2002) Cyclooxygenase and 5-lipoxygenase inhibitors protect against mononuclear phagocyte neurotoxicity. *Neurobiol Aging* 23: 787-94.
- 205 Kwon KJ, Jung YS, Lee SH, Moon CH, Baik EJ (2005) Arachidonic acid induces neuronal death through lipoxygenase and cytochrome P450 rather than cyclooxygenase. *J Neurosci Res* 81: 73-84.
- 206 Yao Y, Clark CM, Trojanowski JQ, Lee VM, Praticò D (2005) Elevation of 12/15 lipoxygenase products in AD and mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 58(4): 623-6.
- 207 Lebeau A, Terro F, Rostene W, Pelaprat D (2004) Blockade of 12-lipoxygenase expression protects cortical neurons from apoptosis induced by beta-amyloid peptide. *Cell Death Differ* 11: 875-84.
- 208 Lebeau A, Esclaire F, Rostene W, Pelaprat D (2001) Baicalein protects cortical neurons from beta-amyloid (25-35) induced toxicity. *Neuroreport* 12: 2199-202.

- 209 Cinzia M. Chinnici, Yuemang Yao, Tao Ding, Colin D. Funk, and Domenico Praticò (2005) Absence of 12/15 lipoxygenase reduces brain oxidative stress in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol* 167: 1371 – 1377.
- 210 Bleich D, Chen S, Zipser B, Sun D, Funk CD, Nadler JL (1999) Resistance to type 1 diabetes induction in 12-lipoxygenase knockout mice. *J Clin Invest* 103: 1431 – 1436.
- 211 Nakatsuka M, Osawa Y (1994) Selective inhibition of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism by L-arginine or sodium nitroprusside in intact human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 1630-1634.
- 212 Hotter G, Closa D, Pi F, Fernandez-Cruz L, Gelpi E, Rosello-Catafau J (1996) Nitric oxide enhances 12-HETE versus LTB₄ generation in pancreatic transplantation. *Inflammation* 20: 23-31.
- 213 Zhang Y, Wang H, Li J, Jimenez DA, Levitan ES, Aizenman E, Rosenberg PA (2004) Peroxynitrite-induced neuronal apoptosis is mediated by intracellular zinc release and 12-lipoxygenase activation. *J Neurosci* 24: 10616 – 10627.
- 214 Murphy S, Rich G, Orgren KI, Moore SA, Faraci FM (1994) Astrocyte-derived lipoxygenase product evokes endothelium-dependent relaxation of the basilar artery. *J Neurosci Res* 38: 314-318.
- 215 Breitner JC (1996) The role of anti-inflammatory drugs in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Annu Rev Med* 47: 401–411.
- 216 Hoozemans JJ, Veerhuis R, Rozemuller AJ, Eikelenboom P (2003) Non-steroidal antiinflammatory drugs and cyclooxygenase in Alzheimer's disease. *Current Drug Targets* 4: 361–468.
- 217 In't Veld BA, Launer LJ, Breteler MMB, Hofman A, Stricker BHC (2002) Pharmacologic agents associated with a preventive effect on Alzheimer's disease: a review of the epidemiologic evidence. *Epidemiol Rev* 24: 248–268.
- 218 Mahyar E, Gill S, Samii A (2003) Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ* 327: 128–131.
- 219 McGeer PL, McGeer E, Rogers J, Sibley J (1990) Antiinflammatory drugs and Alzheimer's disease. *Lancet* 335: 1037-1047.
- 220 Pasinetti GM (2002) From epidemiology to therapeutic trials with anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease: the role of NSAIDs and cyclooxygenase in beta-amyloidosis and clinical dementia. *Alzheimers Dis* 4: 435– 445.
- 221 Andersen K, Launer LJ, Ott A, Hoes AW, Breteler MM, Hofman A (1995) Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease the risk for Alzheimer's disease? The Rotterdam study. *Neurology* 45: 1441-1445.
- 222 Mackenzie IRA (2001) Postmortem studies of the effect of anti-inflammatory drugs on Alzheimer-type pathology and associated inflammation. *Neurobiol Aging* 22: 819–822.
- 223 Weggen S, Eriksen JL, Das P, Sagi SA, Wang R, Pietrzik CU, Findlay KA, Smith TE, Murphy MP, Bulter T, Kang DE, Marquez-Sterling N, Golde TE, Koo EH (2001) A subset of NSAIDs lower amyloidogenic A β 42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* 414: 212–216.
- 224 Eriksen JL, Sagi SA, Smith TE, Weggen S, Das P, McLendon DC, Ozols VV, Jessing KW, Zavitz KH, Koo EH, Golde TE (2003) NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target γ -secretase and lower A β 42 *in vivo*. *J Clin Invest* 112: 440-446.
- 225 Weggen S, Eriksen JL, Sagi SA, Pietrzik CU, Ozols V, Fauq A, Golde TE, Koo EH (2003) Evidence that nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease amyloid β 42 production by direct modulation of γ -secretase activity. *J Biol Chem* 278: 31831–31837.
- 226 Sastre M, Dewachter I, Landreth GE, Willson TM, Klockgether T, van Leuven F, Heneka MT (2003) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists modulate immunostimulated processing of amyloid precursor protein through regulation of β -secretase. *J Neurosci* 23: 9796–9804.

- 227 Hirohata M, Ono K, Naiki H, Yamada M (2005) Non-steroidal anti-inflammatory drugs have anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils *in vitro*. *Neuropharmacology* 49: 1088-1099.
- 228 Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA (1997) Peroxisome proliferator-activated receptors α and γ are activated by indomethacin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 272: 3406-3410.
- 229 Combs CK, Bates P, Karlo JC, Landreth GE (2001) Regulation of β -amyloid stimulated proinflammatory responses by peroxisome proliferators-activated receptor α . *Neurochem Int* 39: 449-457.
- 230 Rich JB, Rastrusson DX, Folstein MF, Carson KA, Kawas C, Brandt J (1995) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease. *Neurology* 45: 51-55.
- 231 Rogers J, Kirby LC, Hempelman SR, DL Berry, McGeer PL, Kaszniak AW, Zalinski J, Cofield M, Mansukhani L, Willson P, Kogan F (1993) Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease. *Neurology* 43: 1609-1611.
- 232 Scharf S, Mander A, Ugoni A, Vajda F, Christophidis N (1999) A double-blind, placebo-controlled trial of diclofenac/misoprostol in Alzheimer's disease. *Neurology* 53: 197-201.
- 233 Wilcock GK, Black SE, Haworth J, Hendrix SB, Laughlin M, Zavitz KH, Christensen D, Bass S, Swabb E (2006) Efficacy and safety of MPC-7869 (R-flurbiprofen), a selective A β 42-lowering agent, in Alzheimer's disease (AD): Results of a 12-month phase 2 trial and 1-year follow-on study. *Alzheimers Dement* 2: S81-S82.
- 234 Aisen PS, Schafer KA, Grundman M, Pfeiffer E, Sano M, Davis KL, Farlow MR, Jin S, Thomas RG, Thal LJ (2003) Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on Alzheimer disease progression: A randomized controlled trial. *JAMA* 289: 2819-2826.
- 235 Soininen H, West C, Robbins J, Niculescu L (2007) Long-term efficacy and safety of celecoxib in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 23: 8-21.
- 236 Aisen PS, Davis KL, Berg JD, Schafer K, Campbell K, Thomas RG, Weiner MF, Farlow MR, Sano M, Grundman M, Thal LJ (2000) A randomized controlled trial of prednisone in Alzheimer's disease. *Neurology* 54: 588-596.
- 237 Firuzi O, Pratico D (2006) Coxibs and Alzheimer's disease: should they stay or should they go? *Ann Neurol* 59: 219-228.
- 238 Ho L, Qin W, Stetka BS, Pasinetti GM (2006) Is there a future for cyclo-oxygenase inhibitors in Alzheimer's disease? *CNS Drugs* 20: 85-98.
- 239 White WB, West CR, Borer JS, Gorelick PB, Lavange L, Pan SX, Weiner E, Verburg KM (2007) Risk of cardiovascular events in patients receiving celecoxib: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Am J Cardiol* 99: 91-98.
- 240 White WB, Borer JS, Gorelick PB, Pan SX, West CR, Weiner E, Verburg KM (2006) Cardiovascular events in clinical trials involving over 41,000 patients evaluating the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib. *Ann Rheum Dis* 65: 411-417.
- 241 Chen LC, Ashcroft DM (2006) Do selective COX-2 inhibitors increase the risk of cerebrovascular events? A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Clin Pharm Ther* 31: 565-576.
- 242 Salpeter SR, Gregor P, Ormiston TM, Whitlock R, Raina P, Thabane L, Topol EJ (2006) Meta-analysis: cardiovascular events associated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 119: 552-559.
- 243 Leone S, Ottani A, Bertolini A (2007) Dual acting anti-inflammatory drugs. *Curr Top Med Chem* 7: 265-275.
- 244 Sugaya K, Uz T, Kumar V, Manev H (2000) New anti-inflammatory treatment strategy in Alzheimer's disease. *Jpn J Pharmacol* 82: 85-94.
- 245 Międzybrodzki R (2004) Kierunki poszukiwań i zastosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych. *Post Hig Med Dosw* 58: 438-448.

- 246 Sagi SA, Weggen S, Eriksen J, Golde TE, Koo EH (2003) The non-cyclooxygenase targets of non-steroidal anti-inflammatory drugs, lipoxygenases, peroxisome proliferator-activated receptor, inhibitor of κ B kinase, and NF κ B, do not reduce amyloid β 42 production. *J Biol Chem*. 278: 31825 - 31830.
- 247 Ouellet M, Percival MD (1995) Effect of inhibitor time-dependency on selectivity towards cyclooxygenase isoforms. *Biochem J* 306: 247-251.
- 248 Gierse JK, Hauser SD, Creely DP, Koboldt C, Rangwala SH, Isakson PC, Seibert K (1995) Expression and selective inhibition of the constitutive and inducible forms of human cyclooxygenase. *Biochem J* 305: 479-84.
- 249 Meade EA, Smith WL, DeWitt DL (1993) Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 268: 6610 - 6614.
- 250 Salari H, Braquet P, Borgeat P (1984) Comparative effects of indomethacin, acetylenic acids, 15-HETE, nordihydroguaiaretic acid and BW755C on the metabolism of arachidonic acid in human leukocytes and platelets. *Prostaglandins Leukot Med* 13: 53-60.
- 251 Shen TY, Winter CA (1977) Chemical and biological studies on indomethacin, sulindac and their analogs. *Adv Drug Res* 12: 90-245.
- 252 Sekiya K, Okuda H (1982) Selective inhibition of platelet lipoxygenase by baicalein. *Biochem Biophys Res Commun* 105: 1090-5.
- 253 Hope WC, Welton AF, Fiedler-Nagy C, Batula-Bernardo C, Coffey JW (1983) In vitro inhibition of the biosynthesis of slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) and lipoxygenase activity by quercetin. *Biochem Pharmacol* 32: 367-71.
- 254 Asakawa T, Matsushita S (1980) Color conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxide. *Lipids* 15: 137 - 141.
- 255 Paxinos G, Franklin KBJ (1997) The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. San Diego, CA
- 256 Carter RJ, Morton AJ, Dunnett SB: Motor co-ordination and balance in rodents. In: *Current Protocols in Neuroscience*. Ed. Wiley, Chichester, 2001, 8.12.1-8.12.14.
- 257 Meziane H, Dodart J-C, Mathis C, Little S, Clemens J, SM Paul, Ungerer A (1998) Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12683-12688.
- 258 Ennaceur A, Delacour J (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31: 47-59.
- 259 Eckert A, Steiner B, Marques C, Leutz S, Romig H, Haass C, Muller WE (2001) Elevated vulnerability to oxidative stress-induced cell death and activation of caspase-3 by the Swedish amyloid precursor protein mutation. *J Neurosci Res* 64: 183-192.
- 260 Chalimoniuk M, Stolecka A, Cakala M, Hauptmann S, Schulz K, Lipka U, Leuner K, Eckert A, Muller W.E, Strosznajder J.B (2007) Elevated amyloid β generation enhances expression and activity of cytosolic phospholipase A2 via the nitric oxide/cGMP pathway. *Acta Biochim Pol* (przyjęty do druku)
- 261 Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265 - 269.
- 262 Waslidge NB, Hayes DJ (1995) A colorimetric method for the determination of lipoxygenase activity suitable for use in a high throughput assay format. *Anal Biochem* 231: 354-358
- 263 Royall JA, Ischiropoulos H (1993) Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H_2O_2 in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 302: 348-355.
- 264 Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- 265 Samanta S, Perkinson MS, Morgan M, Williams RJ (1998) Hydrogen peroxide enhances signal-responsive arachidonic acid release from neurons: role of mitogen-activated protein kinase. *J Neurochem* 70: 2082-2090.
- 266 Xu J, Weng YI, Simonyi A, Krugh BW, Liao Z, Weisman GA, Sun GY, Simoni A (2002) Role of PKC and MAPK in cytosolic PLA₂ phosphorylation and arachidonic acid release in primary murine astrocytes. *J Neurochem* 83: 259-270.
- 267 Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.
- 268 Song D-K, Im Y-B, Jung J-S, Suh H-W, Huh S-O, Song J-H, Kim Y-H (1999) Central injection of nicotine increases hepatic and splenic interleukin 6 (IL-6) mRNA expression and plasma IL-6 levels in mice: involvement of the peripheral sympathetic nervous system. *FASEB J* 13: 1259-1267.
- 269 Aleryani S, Milo E, Kostka P (1999) Formation of peroxynitrite during thiol-mediated reduction of sodium nitroprusside. *Biochim Biophys Acta* 1472: 181-190.
- 270 Scali C, Prospero C, Giovannelli L, Bianchi L, Pepeu G, Casamenti F (1999) β (1-40) Amyloid peptide injection into the nucleus basalis of rats induces microglia reaction and enhances cortical γ -aminobutyric acid release *in vivo*. *Brain Res* 831: 319-321.
- 271 Song DK, Im YB, Jung JS, Cho J, Suh HW, Kim YH (2001) Central beta-amyloid peptide-induced peripheral interleukin-6 responses in mice. *J Neurochem* 76: 1326-1335.
- 272 Szczepanik AM, Ringheim GE (2003) IL-10 and glucocorticoids inhibit A β (1-42)- and lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine and chemokine induction in the central nervous system. *J Alzheimer's Dis* 5 105: 105-117.
- 273 Craft JM, Watterson DM, Van ALJ Eldik (2006) Human amyloid β -induced neuroinflammation is an early event in neurodegeneration. *Glia* 53: 484-490.
- 274 Maurice T, Lockhart BP, Privat A (1996) Amnesia induced by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res* 706: 181-193.
- 275 Emre M, Geula C, Ransil BJ, Mesulam MM (1992) The acute neurotoxicity and effects upon cholinergic axons of intracerebrally injected beta-amyloid in the rat brain. *Neurobiol Aging* 13: 553-9.
- 276 Kowall NW, Beal MF, Busciglio J, Duffy LK, Yankner BA (1991) An *in vivo* model for the neurodegenerative effects of β amyloid and protection by substance P. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7247-7253.
- 277 Minogue AM, Schmid AW, Fogarty MP, Moore AC, Campbell VA, Herron CE, Lynch MA (2003) Activation of the c-Jun N-terminal kinase signaling cascade mediates the effect of amyloid- β on long term potentiation and cell death in hippocampus. *J Biol Chem* 278: 27971-27980.
- 278 Abe E, Casamenti F, Giovannelli L, Scali C, Pepeu G (1994) Administration of amyloid beta-peptides into the medial septum of rats decreases acetylcholine release from hippocampus *in vivo*. *Brain Res* 636: 162-164
- 279 Nitta A, Itoh A, Hasegawa T, Nabeshima T (1994) β -Amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model. *Neurosci Lett* 170: 63-66.
- 280 Yamada K, Tanaka T, Han D, Senzaki K, Kameyama T (1999) Protective effects of idebenone and alfa-tocopherol on β -amyloid-(1-42)- induced learning and memory deficits in rats: implications of oxidative stress in β amyloid - induced neurotoxicity *in vivo*. *Eur J Neurosci* 11: 83-90.
- 281 Nakamura S, Murayama N, Noshita T, Annoura H, Ohno T (2001) Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta(1-42)-amyloid peptide. *Brain Res* 912: 128-36.
- 282 Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature* 416: 535-539.

- 283 Townsend M, Cleary JP, Mehta T, Hofmeister J, Lesne S, O'Hare E, Walsh DM, Selkoe DJ (2006) Orally available compound prevents deficits in memory caused by the Alzheimer amyloid-beta oligomers. *Ann Neurol* 60: 668-76.
- 284 Klyubin I, Walsh DM, Lemere CA, Cullen WK, Shankar GM, Betts V, ET Spooner, Jiang L, Anwyl R, Selkoe DJ, Rowan MJ (2005) Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity *in vivo*. *Nat Med* 11: 556-61.
- 285 Frautschy SA, Hu W, Kim P, Miller SA, Chu T, Harris-White ME, Cole GM (2001) Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal of Abeta-induced cognitive deficits and neuropathology. *Neurobiol Aging* 22: 993-1005.
- 286 Mazzola C, Micale V, Drago F (2003) Amnesia induced by beta-amyloid fragments is counteracted by cannabinoid CB1 receptor blockade. *Eur J Pharmacol* 477: 219-225.
- 287 Kong L-N, Zuo P-P, Mu L, Liu Y-Y, Yang N (2005) Gene expression profile of amyloid beta protein-injected mouse model for Alzheimer disease. *Acta Pharmacol Sin* 26: 666-672.
- 288 Stepanichev MY, Zdobnova IM, Zarubenko II, Moiseeva YV, Lazareva NA, Onufriev MV, Gulyaeva NV (2004) Amyloid- b(25-35)-induced memory impairments correlate with cell loss in rat hippocampus. *Physiol Behav* 80: 647-655.
- 289 Urani A, Romieu P, Roman FJ, Maurice T (2002) Enhanced antidepressant effect of sigma(1) (sigma(1)) receptor agonists in beta(25-35)-amyloid peptide-treated mice. *Behav Brain Res* 134: 239-247.
- 290 Godbout JP, Chen J, Abraham J, Richwine AF, Berg BM, Kelley KW, Johnson RW (2005) Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice after activation of the peripheral innate immune system. *FASEB J* 19: 1329-1331.
- 291 Ogura K, Ogawa M, Yoshida M (1994) Effects of ageing on microglia in the normal rat brain: immunohistochemical observations. *Neuroreport* 5: 1224-1226.
- 292 Sheng JG, Mrak RE, Griffin WS (1998) Enlarged and phagocytic, but not primed, interleukin-1 alpha-immunoreactive microglia increase with age in normal human brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 95: 229-234.
- 293 Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, LaFerla FM (2005) Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates Tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 25: 8843 - 8853.
- 294 Spencer SJ, Mouihate A, Pittman QJ (2007) Peripheral inflammation exacerbates damage after global ischemia independently of temperature and acute brain inflammation. *Stroke* 38:1570-1577.
- 295 Sheng JG, Bora SH, Xu G, Borchelt DR, Price DL, Koliatsos VE (2003) Lipopolysaccharide-induced-neuroinflammation increases intracellular accumulation of amyloid precursor protein and amyloid beta peptide in APP^{sw} transgenic mice. *Neurobiol Dis* 14:133-145.
- 296 Kim SU, de Vellis J (2005) Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81: 302-313.
- 297 Morgan SC, Taylor DL, Pocock JM (2004) Microglia release activators of neuronal proliferation mediated by activation of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and delta-Notch signalling cascades. *J Neurochem* 90: 89-101.
- 298 De Simone R, Ajmone-Cat MA, Tirassa P, Minghetti L (2003) Apoptotic PC12 cells exposing phosphatidylserine promote the production of anti-inflammatory and neuroprotective molecules by microglial cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 62: 208-216.
- 299 Yellon DM, Downey JM (2003) Preconditioning the myocardium: From cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 83: 1113-1151.
- 300 Riess ML, Stowe DF, Warltier DC (2004) Cardiac pharmacological preconditioning with volatile anesthetics: from bench to bedside? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H1603 - H1607.
- 301 Zamora ZB, Borrego A, Lopez OY, Delgado R, Gonzalez R, Menendez S, Hernandez F, Schulz S (2005) Effects of ozone oxidative preconditioning on TNF-alpha release and antioxidant-prooxidant intracellular balance in mice during endotoxic shock. *Mediators Inflamm* 2005: 16-22.

- 302 Khaliulin I, Clarke SJ, Lin H, Parker J, Suleiman M-S, Halestrap AP (2007) Temperature preconditioning of isolated rat hearts – a potent cardioprotective mechanism involving a reduction in oxidative stress and inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Physiol* 581: 1147 - 1161.
- 303 Eklind S, Mallard C, Arvidsson P, Hagberg H (2005) Lipopolysaccharide induces both a primary and a secondary phase of sensitization in the developing rat brain. *Pediatr Res* 58: 112-116.
- 304 Wang X, Hagberg H, Nie C, Zhu C, Ikeda T, Mallard C (2007) Dual role of intrauterine immune challenge on neonatal and adult brain vulnerability to hypoxia-ischemia. *J Neuropathol Exp Neurol* 66 552-561.
- 305 Spencer SJ, Auer RN, Pittman QJ (2006) Rat neonatal immune challenge alters adult responses to cerebral ischaemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 456-467.
- 306 Rosenzweig HL, Lessov NS, Henshall DC, Minami M, Simon RP, Stenzel-Poore MP (2004) Endotoxin preconditioning prevents cellular inflammatory response during ischemic neuroprotection in mice. *Stroke* 35: 2576-2582.
- 307 Hiasa G, Hamada M, Ikeda S, Hiwada K (2001) Ischemic preconditioning and lipopolysaccharide attenuate nuclear factor-kappaB activation and gene expression of inflammatory cytokines in the ischemia-reperfused rat heart. *Jpn Circ J* 65: 984-990.
- 308 Beutler B (2004) Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430: 257-263.
- 309 Kariko K, Weissman D, Welsh FA (2004) Inhibition of toll-like receptor and cytokine signaling--a unifying theme in ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 24: 1288-1304.
- 310 Glezer I, Lapointe A, Rivest S (2006) Innate immunity triggers oligodendrocyte progenitor reactivity and confines damages to brain injuries. *FASEB J* 20: 750-752.
- 311 Jiang ZH, Koganty RR (2003) Synthetic vaccines: the role of adjuvants in immune targeting. *Curr Med Chem* 10: 1423-1439.
- 312 Olson JK, Miller SD (2004) Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 173: 3916-3924.
- 313 Fassbender K, Walter S, Kühl S, Landmann R, Ishii K, Bertsch T, Stalder AK, Muehlhauser F, Liu Y, Ulmer AJ, Rivest S, Lentschat A, Gulbins E, Jucker M, Staufenbiel M, Brechtel K, Walter J, Multhaup G, Penke B, Adachi Y, Hartmann T, Beyreuther K (2004) The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. *FASEB J*, 18: 203-205.
- 314 Tahara K, Kim H-D, Jin J-J, Maxwell JA, Li L, Fukuchi K-I (2006) Role of toll-like receptor signalling in A β uptake and clearance. *Brain* 129: 3006 - 3019.
- 315 Chen K, Iribarren P, Hu J, Chen J, Gong W, Cho EH, Lockett S, Dunlop NM, Wang JM J (2006) Activation of Toll-like receptor 2 on microglia promotes cell uptake of Alzheimer disease-associated amyloid beta peptide. *Biol Chem* 281: 3651 - 3659.
- 316 Henkel AW, Dittrich PS, Groemer TW, Lemke EA, Klingauf J, Klafki HW, Lewczuk P, Esselmann H, Schwille P, Kornhuber J, Wiltfang J (2007) Immune complexes of auto-antibodies against Abeta1-42 peptides patrol cerebrospinal fluid of non-Alzheimer's patients. *Mol Psychiatry* 12: 601-610.
- 317 Sanchez-Pernaute R, Ferree A, Cooper O, Yu M, Brownell A-L, Isacson O (2004) Selective COX-2 inhibition prevents progressive dopamine neuron degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* 1: 6-15.
- 318 Vijitruth R, Liu M, Choi DY, Nguyen XV, Hunter RL, Bing G (2006) Cyclooxygenase-2 mediates microglial activation and secondary dopaminergic cell death in the mouse MPTP model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* 3: 6-17.
- 319 Casolini P, Catalani A, Zuena AR, Angelucci L (2002) Inhibition of COX-2 reduces the age-dependent increase of hippocampal inflammatory markers, corticosterone secretion, and behavioral impairments in the rat. *J Neurosci Res* 68: 337-343.
- 320 Fujii K, Jaffe H, Bishop Y, Arnold E, Mackintosh D, Epstein SS (1970) Structure-activity relations for methylenedioxyphenyl and related compounds on hepatic microsomal enzyme function, as

- measured by prolongation of hexobarbital narcosis and zoxazolamine paralysis in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 16: 482–494.
- 321 Kozubik A, Hofmanova J, Hola J, Netikova J (1993) The effect of nordihydroguaiaretic acid, an inhibitor of prostaglandin and leukotriene biosynthesis, on hematopoiesis of gamma-irradiated mice. *Exp Hematol* 21: 138–142.
- 322 Madrigal-Bujaidar E, Diaz Barriga S, Cassani M, Molina D, Ponce G (1998) *In vivo* and *in vitro* induction of sister-chromatid exchanges by nordihydroguaiaretic acid. *Mutat Res* 412: 139–144.
- 323 Parry EW (1993) Cycloheximide or nordihydroguaiaretic acid protects mice against the lethal and hepatocytolytic effects of a combined challenge with D-galactosamine and bacterial endotoxin. *J Comp Pathol* 108: 185–190.
- 324 Lambert JD, Meyers RO, Timmermann BN, Dorr RT (2001) Pharmacokinetic analysis by highperformance liquid chromatography of intravenous nordihydroguaiaretic acid in the mouse. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 754: 85–90.
- 325 Hsu BR, Juang JH, Fu SH, Kuo CH, Lu WT (2001) Reduction in primary nonfunction of syngeneic islet transplants with nordihydroguaiaretic acid, a lipoxygenase inhibitor. *Cell Transplant* 10: 255–262.
- 326 Liao J-F, Hung W-Y, Chen C-F (2003) Anxiolytic-like effects of baicalein and baicalin in the Vogel conflict test in mice. *Eur J Pharmacol* 464: 141–146.
- 327 Wang S-Y, Wang H-H, Chi C-W, Chen C-F, Liao J-F (2004) Effects of baicalein on β -amyloid peptide-(25-35)-induced amnesia in mice. *Eur J Pharmacol* 506: 55–61.
- 328 Takizawa H, DelliPizzi AM, Nasjletti A (1998) Prostaglandin I₂ contributes to the vasodepressor effect of baicalein in hypertensive rats. *Hypertension* 31: 866–871.
- 329 Van Leyen K, Kim HY, Lee S-R, Jin G, Arai K, Lo EH (2006) Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain. *Stroke* 37: 3014 - 3018.
- 330 Cheng PY, Lee YM, Wu YS, Chang TW, Jin JS, Yen MH (2007) Protective effect of baicalein against endotoxic shock in rats *in vivo* and *in vitro*. *Biochem Pharmacol* 73: 793–804.
- 331 Cha MH, Kim IC, Lee BH, Yoon Y (2006) Baicalein inhibits adipocyte differentiation by enhancing COX-2 expression. *J Med Food* 9: 145–153.
- 332 Gattaz WF, Maras A, Cairns NJ, Levy R, Forstl H (1995) Decreased phospholipase A₂ activity in Alzheimer brains. *Biol Psychiatry* 37: 13–17.
- 333 Ross BM, Moszczynska A, Erlich J, Kish SJ (1998) Phospholipid-metabolizing enzymes in Alzheimer's disease: increased lysophospholipid acyltransferase activity and decreased phospholipase A₂ activity. *J Neurochem* 70: 786–793.
- 334 Schaeffer EL, Gattaz WF (2007) Requirement of hippocampal phospholipase A₂ activity for long-term memory retrieval in rats. *J Neural Transm* 114: 379–385.
- 335 Stephenson DT, Lemere CA, Selkoe DJ, Clemens JA (1996) Cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) immunoreactivity is elevated in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis* 3: 51–63.
- 336 Colangelo V, Schurr J, Ball MJ, Palacios PR, Bazan NG, Lukiw WJ (2002) Gene expression profiling of 12633 genes in Alzheimer hippocampal CA1: transcription and neurotrophic factor down-regulation and up-regulation of apoptotic and pro-inflammatory signaling. *J Neurosci Res* 70: 462–473.
- 337 Walter A, Korth U, Hilgert M, Hartmann J, Weichel O, Hilgert M, Fassbender K, Schmitt A, Klein J (2004) Glycerophosphocholine is elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *Neurobiol Aging* 25: 1299–1303.
- 338 Chalimoniuk M, Stolecka A, Cakala M, Hauptmann S, Schulz K, Lipka U, Leuner K, Eckert A, Muller W.E, Strosznajder J.B (2007) Elevated amyloid β generation enhances expression and activity of cytosolic phospholipase A₂ via the nitric oxide/cGMP pathway. *Acta Biochim Pol.* (przyjęty do druku)
- 339 Kriem B, Sponne I, Fifre A, Malaplate-Armand C, Lozac'h-Pillot K, Koziel V, Yen-Potin FT, Bihain B, Oster T, Olivier J-L, Pillot T (2005) Cytosolic phospholipase A₂ mediates neuronal apoptosis induced by soluble oligomers of the amyloid- β peptide *FASEB J* 19: 85–87.

- 340 Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerle PA (2000) Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor κ B. *Free Radic Biol Med* 28: 1317–1327.
- 341 Hwang D, Jang BC, Yu G, Boudreau M (1997) Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase induced by lipopolysaccharide: mediation through both mitogen-activated protein kinase and NF κ B signaling pathways in macrophages. *Biochem Pharmacol* 54: 87–96.
- 342 Terai K, Matsuo A, McGeer PL (1996) Enhancement of immunoreactivity for NF- κ B in the hippocampal formation and cerebral cortex of Alzheimer's disease. *Brain Res* 735: 159–168.
- 343 Akama KT, Van Eldik LJ (2000) Beta-amyloid stimulation of inducible nitric-oxide synthase in astrocytes is interleukin-1 β - and tumor necrosis factor- α (TNF α)-dependent, and involves a TNF α receptor-associated factor- and NF κ B-inducing kinase-dependent signaling mechanism. *J Biol Chem* 275: 7918–7924.
- 344 Akama KT, Albanese C, Pestell RG, Van Eldik LJ (1998) Amyloid beta-peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NF κ B-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5795–5800.
- 345 Boissiere F, Hunot S, Faucheux B, Duyckaerts C, Hauw JJ, Agid Y, Hirsch EC (1997) Nuclear translocation of NF- κ B in cholinergic neurons of patients with Alzheimer's disease. *Neuroreport* 8: 2849–2852.
- 346 Kitamura Y, Shimohama S, Ota T, Matsuoka Y, Nomura Y, Taniguchi T (1997) Alteration of transcription factors NF- κ B and STAT1 in Alzheimer's disease brains. *Neurosci Lett* 237: 17–20.
- 347 Huang Y, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX (2005) NF- κ B precursor, p105, and NF- κ B inhibitor, I κ B γ , are both elevated in Alzheimer disease brain. *Neurosci Lett* 373: 115–118.
- 348 Ferrer I, Marti E, Lopez E, Tortowa A (1998) NF- κ B immunoreactivity is observed in association with beta A4 diffuse plaques in patients with Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24: 271–277.
- 349 Kaltschmidt B, Uherek M, Volk B, Baeuerle PA, Kaltschmidt C (1997) Transcription factor NF- κ B is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2642–2648.
- 350 Nadjar A, Tridon V, May MJ, Ghosh S, Dantzer R, Amedee T, Parnet P (2005) NF κ B activates *in vivo* the synthesis of inducible COX-2 in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 1047–1059.
- 351 Poligone B, Baldwin AS (2001) Positive and negative regulation of NF- κ B by COX-2. Roles of different prostaglandins. *J Biol Chem* 276: 38658–38664.
- 352 Choi SH, Langenbach R, Bosetti F (2006) Cyclooxygenase-1 and -2 enzymes differentially regulate the brain upstream NF- κ B pathway and downstream enzymes involved in prostaglandin biosynthesis. *J Neurochem* 98: 801–811.
- 353 Rao JS, Langenbach R, Bosetti F (2005) Down-regulation of brain nuclear factor- κ B pathway in the cyclooxygenase-2 knockout mouse. *Brain Res Mol Brain Res* 139(2): 217–224.
- 354 Bonizzi G, Piette J, Schoonbroodt S, Greimers R, Havard L, Merville M-P, Bours V (1999) Reactive oxygen intermediate-dependent NF- κ B activation by interleukin-1 β requires 5-lipoxygenase or NADPH oxidase activity. *Mol Cell Biol* 19: 1950–1960.
- 355 Los M, Schenk H, Hexel K, Baeuerle PA, Droge W, Schulze-Osthoff K (1995) IL-2 gene expression and NF- κ B activation through CD28 requires reactive oxygen production by 5-lipoxygenase. *EMBO J* 14: 3731–3740.
- 356 Warner TD, Vojnovic I, Bishop-Bailey D, Mitchell JA (2006) Influence of plasma protein on the potencies of inhibitors of cyclooxygenase-1 and -2. *FASEB* 20: 542–544.
- 357 Laufer S, Zechmeister P, Klein T (1999) Development of an *in-vitro* test system for the evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Inflamm Res* 48: 133–138.

-
- 358 Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby DA (1999) Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* 5: 698-701.
- 359 Won J-S, Im Y-B, Khan M, Singh AK, Singh I (2005) Involvement of phospholipase A₂ and lipoxygenase in lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase expression in glial cells. *Glia* 51: 13-21.)