



Wzrost stężenia zasad Schiffa w surowicy u chorych z otępieniem*

Elevation of serum Schiff bases in patients with dementia

TADEUSZ PIETRAS¹, ALEKSANDRA MUSIAŁ²

Z: 1. Pracowni Gerontologii Kliniki Pneumonologii i Alergologii Akademii Medycznej w Łodzi
2. Baylor College of Medicine Pulmonary & Critical Care, Houston, Texas, USA

STRESZCZENIE. *Stres oksydacyjny odgrywa ważną rolę w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych ośrodkowego układu nerwowego. Mózg jest szczególnie podatny na oksydacyjne uszkodzenie lipidów ze względu na dużą zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i intensywny metabolizm tlenowy. Wskaźnikami ogólnoustrojowego lub narządowego stresu oksydacyjnego są produkty peroksydacji lipidów w surowicy. Rodzi się pytanie, czy ich stężenie może być większe w otępieniu, niż podczas normalnego starzenia się. Grupę badaną stanowiło 30 chorych z otępieniem i 18 zdrowych w podobnym wieku. U wszystkich chorych wykonano wybrane testy neuropsychologiczne, analizowano historię choroby, badano internistycznie i psychiatrycznie i wykonano tomografię komputerową głowy celem wykluczenia guzów mózgu. W surowicy oznaczono produkty peroksydacji lipidów, takie jak: dieny sprzężone, nadtlenni lipidów, produkty TBA-reaktywne i zasady Schiffa. Stwierdzono, że u chorych z otępieniem wzrosło stężenie zasad Schiffa w surowicy w stosunku do grupy kontrolnej i zmalało nadtlenników lipidów. Natężenie deficytów funkcji poznawczych nie korelowało ze stężeniami produktów peroksydacji lipidów.*

SUMMARY. *Increased oxidative stress may accompany disease of the central nervous system including dementia. The brain is especially susceptible to damage mediated by reactive oxygen species because it has a high rate of oxygen consumption and contains large amounts of readily oxidisable substrates, such as polyunsaturated fatty acids. Indices of systemic oxidative stress, including serum lipid peroxidation may be greater in dementia than in normal ageing. Study groups consisted of 30 patients with dementia and 18 healthy age-matched controls. All patients underwent neuropsychological testing and qualified for the study on the basis of history, physical examination, complementary laboratory tests, and brain computed tomography scan. Serum levels were assessed for the following lipid-oxidation products: conjugated dienes, lipid peroxides, thiobarbituric acid reactive substances, and Schiff bases. There were two statistically significant differences in serum levels of lipid-oxidation product between the study groups. Lipid peroxides were significantly lower ($0,34 \pm 0,03$ absorbance units/ml versus $1,12 \pm 0,96$, $p=0,0055$), while Schiff bases were significantly higher in the subjects with dementia ($589,4 \pm 267,3$ arbitrary fluorescence units/ml versus $329,0 \pm 107,5$ in healthy, $p=0,000282$). Cognitive impairment did not correlate with levels of lipid-oxidation products.*

Słowa kluczowe: otępienie / peroksydacja lipidów / stres oksydacyjny

Key words: dementia / lipid peroxidation / oxidative stress

Otępienia stanowią w chwili obecnej jeden z kluczowych problemów współczesnej

psychiatrii [Parnowski 1995, Parnowski i wsp. 1995]. Otępienia ujmowane w klasyfi-

* Praca finansowana z tematu własnego Akademii Medycznej w Łodzi, nr 502-11-117(570).

kacji ICD-10 stanowią niejednorodną grupę chorób, dla których wspólnym objawem jest postępujące upośledzenie funkcji poznawczych, w tym upośledzenie pamięci [ICD-10, 1997]. Objawy psychopatologiczne i deficyty neuropsychologiczne zależą od uszkodzenia konkretnych części mózgowia (np. hipokampa), a nie od procesu neurodegeneracyjnego będącego pierwotną przyczyną uszkodzenia. Istnieją trzy główne grupy przyczyn otępień. Pierwszą stanowi odkładanie się złogów białek o strukturze drugorzędowej beta w mózgowiu. Należą tu otępienie w chorobie Alzheimera związane z odkładaniem się złogów betaamyloidu. Złogi złożone z białka alfa-synukleiny występują w otępieniu w chorobie Parkinsona (F02.3) i w nie objętym klasyfikacją ICD-10 otępieniu z ciałkami Lewy'ego [Campbel i wsp. 2000]. Inne betaamyloidozy to odkładanie się złogów białka huntingtontiny w otępieniu w chorobie Huntingtona [Parnetti i wsp. 1994], złogów białka tau w chorobie Picka [Arvanitakis i wsp. 2001], oraz złogów białek prionopodobnych w chorobie Creutzfeldta-Jakoba (F02.1) [Mann i wsp. 2000]. Drugą przyczynę otępień stanowią zmiany niedokrwienne w przebiegu miażdżycy tętnic mózgowych i jej powikłań w otępieniu naczyniowym (F01) [Parnetti i wsp. 1994]. Trzecią przyczynę stanowią choroby infekcyjne, w tym otępienie w chorobie wywołanej przez ludzki wirus nabytego upośledzenia odporności [Pietras i wsp. 2001].

W patogenezie każdego rodzaju otępienia istotną, choć nie kluczową rolę odgrywa zjawisko stresu oksydacyjnego. Rola stresu oksydacyjnego jest szczególnie dobrze udokumentowana w przebiegu powstawania otępienia naczyniowego, odkładania się złogów betaamyloidu, w chorobie Parkinsona i w infekcji wirusem HIV. Stres oksydacyjny polega na powstawaniu reaktywnych postaci tlenu, takich jak anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), rodnik hydroksylowy (OH), nad-tlenek wodoru (H_2O_2), tlen singletowy [Metodiewa i wsp. 2000]. Reaktywne postacie

tlenu uszkadzają metabolizm komórki nerwowej indukując proces peroksydacji lipidów – autokatalityczny proces wolnorodnikowy niszczący strukturę i funkcję błon biologicznych i lipidów mózgu [Metodiewa i wsp. 2000]. Funkcjonowanie komórki nerwowej związane jest nierozzerwalnie z prawidłowym przenoszeniem sygnału elektrycznego przez błony komórkowe. Reaktywne postacie tlenu uszkadzają również materiał genetyczny reagując z DNA i hamują biologiczną aktywność białek reagując z centrami katalitycznymi enzymów. Wpływają także na procesy neurotransmisji [por. Pietras 1999].

Złogi betaamyloidu gromadzą dwuwartościowe kationy żelaza, które reagując z nad-tlenkiem wodoru indukują powstawanie reaktywnych postaci tlenu [Markesbery i wsp. 1999, Varadarian i wsp. 2000]. Reaktywne postacie tlenu nasilają krystalizację i wytrącanie złogów [Markesbery 1997]. Powstaje mechanizm błędnego koła. Uważa się, że jednym z mechanizmów toksycznego wpływu betaamyloidu na czynność komórki nerwowej jest indukowanie peroksydacji lipidów przez reaktywne postacie tlenu z wtórnym uszkodzeniem metabolizmu wewnątrzkomórkowego wapnia i aktywacją czynników transkrypcyjnych zależnych od potencjału oksydoredukcyjnego [Markesbery i wsp. 1999, Metodiewa i wsp. 2000]. Innym źródłem reaktywnych postaci tlenu w betaamyloidozach są uszkodzone mitochondria wytwarzające nadmierną ilość anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$). Mutacje w mitochondrialnym DNA i uszkodzenie oksydazy cytochromu C są uznanym czynnikiem ryzyka otępienia [por. Pietras, 1998].

Zupełnie inny charakter posiada stres oksydacyjny w przebiegu otępienia naczyniowego. W chwili zahamowania dopływu tlenu do komórek zahamowaniu ulega mitochondrialna oksydaza cytochromu C, co daje w rezultacie chwilową nadprodukcję anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) indukującego oksydacyjne uszkodzenie komórek [White

i wsp. 1993, Saikumar i wsp. 1998]. Pękające pod wpływem nadmiernego stresu oksydacyjnego mitochondria uwalniają cytochrom C, który indukuje kaskadę kaspaz doprowadzającą do śmierci komórki i uwolnienia silnie neurotoksycznego w nadmiarze glutaminianu [Coyle i wsp. 1993]. W chwili przywrócenia drożności tętnicy pojawia się zjawisko oksydacyjnego uszkodzenia reperfuzyjnego związanego z aktywacją oksydazy ksantynowej i układu oksydazy NADPH komórek żernych wytwarzających anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-) [Metodiewa i wsp. 2000]. Niedobór ATP w komórkach powoduje powstanie adenozynej i napływ jonów wapnia zmieniając aktywność dehydrogenazy ksantynowej na oksydazę, która po ponownym ukrwieniu tkanek wytwarza duże ilości reaktywnych postaci tlenu [Hille i wsp. 1995].

Reaktywne postaci tlenu indukują autokatalityczny proces peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych niezależnie od wywołującej przyczyny. Uważa się, że mózg jako organ szczególnie bogaty w lipidy zawarte w błonach komórkowych i osłonkach mielinowych jest szczególnie narażony na oksydacyjne uszkodzenie. Podatność na uszkodzenie oksydacyjne lipidów nasila duże stężenie żelaza dwuwartościowego w jądrach podkorowych i mała aktywność enzymów zmiatających reaktywne postaci tlenu (dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, peroksydazy glutationowej) [Pietras 1998]. Produkty peroksydacji lipidów są łatwo wykrywalne przy pomocy prostych metod laboratoryjnych [Janero 1990]. Do wczesnych produktów peroksydacji należą dieny sprzężone i ich pochodne – nadtlenki lipidów. Wygasająca reakcja pozostawia tzw. późne produkty, a wśród nich zasady Schiffa, dialdehyd malonowy i produkty TBA reaktywne (reagujące z kwasem tiobarbiturowym), oraz znacznie trudniej wykrywalne węglowodory alifatyczne i szczególnie toksyczny 4-hydroksynonenal [Janero 1990, Pietras 1998]. Znaczenie stresu oksy-

dacyjnego w patogenezie otępienia potwierdzają badania kliniczne z podwójnie ślepą próbą nad wykorzystaniem tokoferolu i selegiliny w dużej dawce w opóźnieniu rozwoju choroby i zmniejszeniu narastania deficytów funkcji poznawczych w czasie [Sano i wsp. 1997, Pitchumoni i wsp. 1998]. Tokoferol należy do najsilniejszych inhibitorów procesu peroksydacji, zwłaszcza w mitochondriach [Vatassery i wsp. 1991]. Uszkodzenie mitochondrialnej oksydazy cytochromu C jest uznanym czynnikiem ryzyka wystąpienia otępienia, co odkryto już na początku lat dziewięćdziesiątych [Parker i wsp. 1990, Pietras 1998]. Selegilina hamuje monoamino oksydazę - mitochondrialny enzym wytwarzający H_2O_2 [Kitani i wsp. 1994]. Aktywność tego enzymu rośnie wraz z wiekiem, co związane jest zarówno z otępieniem, jak i (przede wszystkim) z depresjami u pacjentów w wieku podeszłym [Kitani i wsp. 1994, Bongioanni i wsp. 1996].

Mózgowie człowieka jest narządem o dużej masie i o dużym przepływie krwi. Jest zatem interesujące, czy postępujący proces neurodegeneracyjny objawiający się otępieniem, w patogenezie którego stres oksydacyjny i proces peroksydacji lipidów odgrywa istotną rolę, może wpłynąć na obwodową peroksydację lipidów w surowicy krwi. Z jednej strony duża masa mózgowia, jak i znaczny przepływ krwi przemawia za taką możliwością, choć bariera krew-mózg jest stosunkowo szczelna, a peroksydacja lipidów mózgu nie musi wpływać na peroksydację lipoprotein krążących we krwi obwodowej.

CEL BADANIA

W pracy podjęto próbę oceny procesu peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w surowicy u chorych z otępieniem i w grupie kontrolnej u osób w podobnym wieku bez otępienia. Sformułowano następujące pytania badawcze:

- Czy wytwarzanie reaktywnych postaci tlenu z następczym utlenianiem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych wpływa na peroksydację lipidów w surowicy?
- Czy istnieje korelacja pomiędzy zawartością produktów peroksydacji lipidów a zaburzeniami funkcji poznawczych?

GRUPY BADANE

Badaniom poddano dwie grupy chorych. Grupę pierwszą stanowiło trzydziestu chorych z otępieniem, grupę drugą osiemnastu zdrowych w podobnym wieku w stosunku do pacjentów z grupy pierwszej. Pacjentów kwalifikowano do grupy pierwszej na podstawie historii choroby, badania przedmiotowego, badania psychiatrycznego i przy pomocy testów neuropsychologicznych. Rozpoznanie otępienia dokonywano na podstawie kryteriów ICD-10. U wszystkich chorych z otępieniem wykonano rutynowe badania laboratoryjne i obrazowe (EKG, morfologia krwi, tomografia komputerowa głowy). Grupę chorych z otępieniem stanowiły dwadzieścia trzy kobiety i siedmiu mężczyzn pensjonariuszy domów opieki społecznej w Łodzi i województwie. Średnia wieku wynosiła 79,6. U 13 pacjentów rozpoznano otępienie prawdopodobnie w przebiegu choroby Alzheimera, u 12 otępienie prawdopodobnie naczyniowe, u 5 otępienie mieszane. Różnicowanie pomiędzy otępieniem prawdopodobnie naczyniowym (powyżej 6 punktów), mieszanym (4-6 punktów) i prawdopodobnie w przebiegu choroby

Alzheimera (0-4 punkty) dokonywano przy pomocy skali Hachinskiego [Hachinski i wsp. 1975]. Badanie neuropsychologiczne obejmowało „Krótką skalę oceny otępienia” (*Mini Mental State Examination - MMSE*) wersję tłumaczoną na język polski [Folstein i wsp. 1975, Cockrell i wsp. 1988]. U wszystkich badanych wykonano również test rysowania zegara [Krzywiński 1995] i skalę *ADAS (Alzheimer's Disease Assessment Scale)*, pełną skalę otępienia Blessed z testem pamięć-wiadomości-koncentracja [Blessed i wsp. 1968] celem weryfikacji rozpoznania. Ocena wyników uzyskanych przez pacjentów podczas wykonywania tych skal nie stanowiła celu analizy w przedstawionej pracy. Za chorych z otępieniem uznawano tych, którzy w teście MMSE osiągnęli mniej niż 24 punkty. Z badania wykluczono osoby z urazem głowy w wywiadzie, nowotworem, cukrzycą, niewydolnością serca i jakąkolwiek chorobą ogólnoustrojową w której patogenezie reaktywne postacie tlenu odgrywają istotną rolę. Wykluczono również chorych z nałożonym na otępienie zespołem majaczeniowym, oraz osoby przyjmujące leki przeciwpyschotyczne, antydepresyjne, prokognitywne, selegilinę i tokoferol [Kłosszewska 1998]. Średni wynik w skali MMSE w omawianej grupie wyniósł 11,3. Grupę kontrolną stanowiło osiemnastu zdrowych (trzydzieści kobiet i siedmiu mężczyzn) pensjonariuszy domów opieki społecznej, u których nie stwierdzono towarzyszących chorób. Średni wiek wynosił 76,0 a wynik w skali MMSE 27,5. Charakterystykę obu grup przedstawia tabl. 1.

Tablica 1. Charakterystyka badanych grup

Grupa badana	Chorzy z otępieniem	Zdrowi
Liczebność grupy	30	18
<i>Mini Mental State Examination</i> – średni wynik w punktach	11,3±7,8	27,5±2,0
Średni wiek w latach	79,6±9,3	76,0±9,5
Proporcja kobiet do mężczyzn (w %)	76,6 : 23,4	72,2 : 27,8

Chorych z otepieniem i zdrowych, bez towarzyszących chorób wybrano spośród około 120 przebadanych wstępnie osób – pensjonariuszy domów opieki społecznej. Większość wykluczono z badania z powodu towarzyszących chorób ogólnoustrojowych lub przyjmowanych leków, co mogłoby wpłynąć na ogólnoustrojowe procesy peroksydacji lipidów.

METODY POMIARU ZAWARTOŚCI PRODUKTÓW PEROKSYDACJI LIPIDÓW W SUROWICY

Od badanych pobierano na czczo 10 ml krwi, próbówki z krwią wirowano 10 min. 1500 x g, zbierano surowicę, którą następnie zamrażano do -70°C i przechowywano nie dłużej niż tydzień. W surowicy mierzono zawartość produktów peroksydacji lipidów, takich jak: nadtlenki lipidów i dieny sprzężone przy użyciu spektrofotometru Ultrospec 2000 firmy Pharmacia, oraz zasady Schiffa i produkty TBA reaktywne używając spektrofotometru LS-50 firmy Perkin-Elmer.

Oznaczanie zawartości dienów sprzężonych [Ohakawa i wsp. 1976]. 7 ml mieszaniny chloroformu z metanolem w stosunku objętościowym 2:1 dodawano do 2 ml surowicy, intensywnie mieszano, następnie wirowano 10 min. 1500 x g. Uzyskano podział roztworu na dwie fazy. 5 ml górnej fazy mieszano z wodą destylowaną o pH 2,5, próbki ponownie intensywnie mieszano i odwirowywano, uzyskując ponownie podział roztworu na dwie fazy. 2 ml dolnej fazy odparowywano w temperaturze pokojowej w atmosferze 100% azotu, po odparowaniu dodawano 2 ml spektralnie czystego n-heptanu i mierzono absorbancję przy długości fali 233 nm względem czystego heptanu. Wyniki wyrażano w jednostkach absorbancji na ml surowicy.

Oznaczanie zawartości nadtlenków lipidów [Buege i wsp. 1978]. Jedną dziesiątą

ml 8,1% siarczanu dodecyłu mieszano z 0,75 ml 20% kwasu octowego o pH 3,5 zawierającego kwas tiobarbiturowy o stężeniu 0,8% i z 0,3 ml wody destylowanej, oraz z 0,3 ml surowicy. Po wymieszaniu roztwór inkubowano przez godzinę w łaźni wodnej w temperaturze 100°C . Po wystudzeniu do roztworu dodawano 2,5 ml mieszaniny butanolu i pirydyny w stosunku objętościowym 25:1 i następnie intensywnie mieszano. Mieszaninę wirowano 10 min. 1500 x g, uzyskując rozdział na dwie fazy. W fazie górnej oznaczano absorbancję przy długości fali 532 nm względem fazy organicznej próbki kontrolnej, do której zamiast surowicy dodano sól fizjologiczną.

Oznaczanie produktów reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBA-reaktywnych, dialdehydu malonowego) [Yagi 1987]. Jedną piątą ml 0,05 M kwasu siarkowego i 0,25 ml 1,23 M kwasu trichlorooctowego dodawano do 0,05 ml surowicy, intensywnie mieszano, wirowano 10 min. w temperaturze 4°C 1500 x g, zbierano supernatant mieszając go z 2 ml wody destylowanej. Do mieszaniny dodawano 0,01 ml 0,1% roztworu butylovanego hydroksytoluenu rozpuszczonego w metanolu i 0,5 ml roztworu kwasu tiobarbiturowego (0,67 g TBA/100 ml wody destylowanej mieszanej w stosunku 1:1 z lodowatym kwasem octowym). Otrzymaną mieszaninę inkubowano 30 min. w 100°C . Po ochłodzeniu dodawano 2,5 ml butanolu, intensywnie mieszano, odwirowywano 1500 x g w temperaturze pokojowej. W górnej warstwie butanolowej otrzymanej po odwirowaniu oznaczano produkty TBA-reaktywne metodą fluorescencyjną przy długości fali wzbudzającej 515 nm i fali emisji 546 nm względem butanolu z próbek, w których zamiast surowicy użyto soli fizjologicznej. Wyniki wyrażano w arbitralnych jednostkach fluorescencji na ml surowicy.

Oznaczanie zasad Schiffa [Yagi 1987]. Dziewięć dziesiątych ml mieszaniny chloroformu z metanolem w stosunku objętościowo-

wym 2:1 mieszano z 0,28 ml wody destylowanej o pH 2,3 i z 0,07 ml surowicy. Próbkę intensywnie mieszano, 10 min odwirowywano 1500 x g, 20°C i mierzono w supernatancie intensywność fluorescencji przy długości fali wzbudzającej 360 nm i fali emisji 430 nm względem próbki kontrolnej, w której zamiast surowicy dodano soli fizjologicznej. Wyniki wyrażano w arbitralnych jednostkach fluorescencji na ml surowicy.

Analiza statystyczna. Do obliczania istotności różnicy pomiędzy grupami użyto testu t-Studenta dla prób niezależnych. Jako współczynniki korelacji wykorzystano współczynniki Pearsona. Obliczeń dokonano przy pomocy programu Statistica 5.0.

WYNIKI

U chorych z otępieniem stwierdzono podwyższenie stężenia dienów sprzężonych, produktów TBA-reaktywnych i zasad Schiffa. Tylko wzrost zawartości zasad Schiffa osiągnął istotność statystyczną (589,4±267,3 jednostki absorbancji/ml surowicy u chorych z otępieniem w stosunku do 329,0±107,5 u zdrowych, p=0,000282, tabl. 2). Stężenie nadtlenków lipidów było niższe u chorych, niż u zdrowych (0,34±0,03 jednostek absorbancji/ml w stosunku do 1,12±0,96,

p=0,0055). Nie stwierdzono korelacji pomiędzy wynikami w skali MMSE u chorych z otępieniem a zawartością dienów sprzężonych (r=0,22, p=0,23), nadtlenków lipidów (r=0,26, p=0,16), produktów TBA-reaktywnych (r=0,03, p=0,84) i zasad Schiffa (r=0,22, p=0,22). U chorych z otępieniem stwierdzono istotną statystycznie dodatnią korelację pomiędzy stężeniem dienów sprzężonych i nadtlenków lipidów (r=0,45, p=0,014), dienów sprzężonych i produktów TBA-reaktywnych (r=0,37, p=0,042), nadtlenków lipidów i produktów TBA-reaktywnych (r=0,42, p=0,02). Wykazano istnienie korelacji pomiędzy stężeniem poszczególnych produktów peroksydacji lipidów u osób zdrowych: dienami sprzężonymi a nadtlenkami lipidów (r=-0,86, p=0,001), dienami sprzężonymi a produktami TBA-reaktywnymi (r=0,80, p=0,001), dienami sprzężonymi a zasadami Schiffa (r=0,54, p=0,004), nadtlenkami lipidów a produktami TBA-reaktywnymi (r=-0,82, p=0,001), nadtlenkami lipidów a zasadami Schiffa (r=-0,62, p=0,043), produktami TBA-reaktywnymi a zasadami Schiffa (r=-0,48, p=0,043). U zdrowych stwierdzono negatywną korelację pomiędzy wynikiem MMSE a wiekiem (r=-0,8, p=0,001), oraz pomiędzy wiekiem a zawartością nadtlenków lipidów (r=-0,48, p=0,04).

Tablica 2. Zawartość produktów peroksydacji lipidów w surowicy

Produkty peroksydacji lipidów	Jednostki pomiaru	Chorzy z otępieniem	Zdrowi	Test (p)
Dieny sprzężone	jednostki absorbancji przy długości fali 233 nm/ml surowicy	2,99±1,04	2,74±1,21	0,45
Nadtlenki lipidów	jednostki absorbancji przy długości fali 532 nm/ml surowicy	0,34±0,09	1,12±0,96	0,000055*
Produkty TBA-reaktywne	arbitralne jednostki fluorescencji/ml surowicy	533,9±126,7	447,9±260,2	0,13
Zasady Schiffa	arbitralne jednostki fluorescencji/ml surowicy	589,4±267,3	329,0±107,5	0,000282*

* - istotność statystyczna przy założeniu p<0,05

DYSKUSJA

Tylko stężenie zasad Schiffa wzrosło w istotny sposób u chorych z otępieniem, zaś stężenie nadtlenków lipidów zmalało w porównaniu z grupą kontrolną. Jak zatem wytłumaczyć ten fakt w świetle udowodnionego udziału peroksydacji lipidów w patogenezie otępień? Peroksydacja lipidów obwodowa związana jest nie tylko z uszkodzeniem mózgu, lecz także z procesami metabolicznymi w pozostałych tkankach [Janero 1990, Poter i wsp. 1995]. Bariera krew-mózg może dodatkowo zmniejszać wymianę substancji lipofilnych pomiędzy ośrodkowym układem nerwowym a lipoproteinami surowicy. Dane na temat przepuszczalności bariery dla produktów peroksydacji lipidów są sprzeczne i problem ten pozostaje otwarty [Markesbery i wsp. 1999]. Powiązania pomiędzy metabolizmem obwodowym lipoprotein a otępieniem są powszechnie znane [Heininger 2000]. Należą tu powszechnie uznawane za czynniki ryzyka otępienia powiązania pomiędzy apolipoproteiną E4 a otępieniem, czy polimorfizm eksonu 3 w genie dla receptora lipoprotein o małej gęstości [Heininger 2000]. Biologiczny okres półtrwania poszczególnych produktów peroksydacji lipidów w surowicy nie jest dobrze znany [Janero 1990, Poter i wsp. 1995]. Wiadomo, że zasady Schiffa często połączone z aminokwasami mają podobny okres półtrwania, jak białka surowicy. Fakt ten może tłumaczyć wzrost stężenia zasad Schiffa w otępieniu i stanowić dobry marker długotrwanie toczącego się uszkodzenia wolnorodnikowego. Dni sprężone o krótkim okresie półtrwania *in vitro* stanowią raczej marker gwałtownie przebiegających reakcji wolnorodnikowych [Poter i wsp. 1995]. Przykładowo, ostra niewydolność oddechu dorosłych – ARDS rozwinąć się może w ciągu minut [Janero 1990, Poter i wsp. 1995]. Otępienie stanowi zespół przewlekłe postępujący przez wiele lat o względnie ma-

łej dynamice [Poter i wsp. 1995]. Pomiar produktów TBA-reaktywnych jest czuły, chociaż mało swoisty, albowiem dialdehyd malonowy uwalnia się nie tylko podczas peroksydacji lipidów, lecz także w wyniku reakcji enzymatycznych katalizowanych przez cyklooksygenazy, lipoksygenazy, w metabolizmie kwasów żółciowych, bilirubiny i kwasów nukleinowych [Janero 1990, Poter i wsp. 1995]. W piśmiennictwie światowym ukazało się wiele prac dotyczących pomiaru produktów peroksydacji lipidów w homogenatach mózgow chorych na otępienie [Balazs i wsp. 1994, Palmer i wsp. 1994, Lovell i wsp. 1995]. Prace dotyczące obwodowej peroksydacji w tej grupie chorych są nieliczne [Musiał i wsp. 1998, Musiał i wsp. 2000, Schippling i wsp. 2000, Bourdel-Marchasson i wsp. 2001, Ozcankaya i wsp. 2002]. Nasze własne prace potwierdzają wyniki prezentowane powyżej [Musiał i wsp. 1998, Musiał i wsp. 2000]. W pracach zespołów Bourdel-Marchasson [2001] i Ozcankaya [2002] stwierdzono wzrost stężenia dialdehydu malonowego u chorych z otępieniem, nie mierzono jednak stężenia innych produktów peroksydacji lipidów [Bourdel-Marchasson i wsp. 2001, Ozcankaya i wsp. 2002]. Publikacja zespołu Schipplinga [2000] wykazała u chorych z otępieniem wzrost utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w lipoproteinach surowicy mierzony w podobny sposób, jak w naszej pracy oznaczaliśmy stężenie dienów sprzężonych. Nasze wyniki nie potwierdzają tego wzrostu.

Wśród wyników na szczególną uwagę zasługuje zaobserwowany spadek stężenia nadtlenków lipidów u chorych z otępieniem. Niskie stężenie nadtlenków lipidów jest prawdopodobnie związane z fizjologicznym starzeniem się mózgu, w którym maleje zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w cząsteczkach fosfolipidów [Wallin i wsp. 1989]. Podobnie zmniejsza się ilość cerebrozydów i sulfatydów, czemu

może towarzyszyć wzrost ilości nienasyconych kwasów w lipoproteinach surowicy [Wallin i wsp. 1989, Musiał i wsp. 2000]. W starzejącym się zdrowym mózgu rośnie ilość wytwarzanego anionorodnika ponadtlenkowego przez mitochondria w związku ze spadkiem aktywności oksydazy cytochromu C i wzrost wytwarzania H_2O_2 przez monoaminoksydazę [Sohal 1993]. Spadek zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w mózgu jest prawdopodobnie mechanizmem obronnym przed reaktywnymi postaciami tlenu zabezpieczającym mózg przed chorobami neurodegeneracyjnymi [Musiał i wsp. 2000]. Naszym zdaniem, świadczy również o tym zaobserwowana ujemna korelacja pomiędzy stężeniem nadtlenu lipidów a zawartością innych produktów peroksydacji lipidów. Innym dowodem nasilenia obrony przed reaktywnymi postaciami tlenu w starzejących się mózgach jest wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych, stwierdzany równolegle ze spadkiem aktywności oksydazy cytochromu C [Vertechy i wsp. 1993]. Z drugiej strony, zaobserwowano w przebiegu otępienia zmniejszenie się obrony antyoksydacyjnej w surowicy pod postacią niższego niż u zdrowych stężenia tokoferolu, retinolu i kwasu askorbinowego [Bourdel-Marchasson i wsp. 2001]. Podobnie w mózgach osób zmarłych z powodu otępienia stwierdzono zmniejszenie aktywności katalazy przy niezmienionej aktywności dysmutazy ponadtlenkowej [Gsel i wsp. 1995]. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych w erytrocytach i w surowicy wg jednych prac wzrasta [Serra i wsp. 1994], wg innych spada [Fernandes i wsp. 1993]. Nasze pilotażowe badania wskazują raczej na wzrost obrony antyoksydacyjnej w erytrocytach u chorych z otępieniem [Pietras i wsp. 1999].

W naszych badaniach nie stwierdziliśmy korelacji pomiędzy obserwowaną peroksydacją lipidów w surowicy a wynikiem w skali MMSE. Skala MMSE jest szeroko stosowana w ocenie funkcji poznawczych

u chorych i używana powszechnie w badaniach epidemiologicznych i praktyce klinicznej [Folstein i wsp. 1975, Cockrell i wsp. 1988]. Skala ta nie spełnia wymogów nowoczesnego badania neuropsychologicznego, chociaż jest użyteczna dla lekarzy psychiatrów ze względu na prostotę wykonania, powtarzalność, trafność, standaryzację, neutralność kulturową i możliwość wykonania przez osoby nie zapoznane z teorią testu psychologicznego [Folstein i wsp. 1975, Cockrell i wsp. 1988]. Znajomość zasad użycia testów psychologicznych staje się niezbędna w przypadku wykorzystania bardziej skomplikowanych narzędzi psychometrycznych [Folstein i wsp. 1975, Cockrell i wsp. 1988]. Wynik w skali MMSE różnicuje osoby zdrowe i chore, nie koreluje jednak z czasem trwania choroby, ani procesami neuropatologicznymi toczącymi się w obrębie mózgowia, w tym z uszkodzeniem oksydacyjnym lipidów [Musiał i wsp. 2000].

Niedociągnięciem naszych badań jest brak standaryzacji wykorzystanych metod, brak długofalowych badań nad zmianami peroksydacji lipidów u chorych w czasie, brak uwzględnienia stylu życia, diety i profilu lipidowego (choć badania wykonano u chorych ze względnie prawidłowym lipidogramem). Współczesne badania wymagają również uwzględnienia pomiaru bardziej czułych i specyficznych metod pomiaru produktów peroksydacji, w tym węglowodorów i 4-hydroksynonenalu, których oznaczenie wymaga metod chromatograficznych. Pewne wątpliwości może budzić liczebność grupy kontrolnej (porównawczej). Populacja ludzi starych, jak i starych chorujących na otępienie, cierpi przede wszystkim z powodu chorób układu krążenia i przyjmuje leki. Substancje farmakologiczne, jak i towarzyszące choroby, stanowią zmienną zakłócającą pomiar stężenia produktów peroksydacji lipidów, uniemożliwiająca porównanie grupy chorych na otępienie i zdrowych. Wskazane jest również skorelowanie wyników badań biochemicznych z danymi pochodzącymi

z użycia innych skal psychometrycznych niż MMSE, takich jak ADAS czy skala Reisberga [Reisberg i wsp. 1989, Kłoszewska 1998a].

WNIOSKI

1. U chorych z otępieniem wzrasta w surowicy stężenie zasad Schiffa – końcowego produktu peroksydacji lipidów.
2. Obniżenie stężenia nadtlenków lipidów w surowicy jest charakterystyczne dla otępienia.
3. Nie znaleziono korelacji pomiędzy stężeniem produktów peroksydacji lipidów u chorych z otępieniem a upośledzeniem funkcji poznawczych mierzonych przy pomocy skali MMSE.

PIŚMIENNICTWO

1. Arvanitakis Z, Wszolek ZK. Recent advances in the understanding of tau protein and movement disorders. *Curr Opin Neurol* 2001; 14: 491-7.
2. Balazs L, Leon M. Evidence of an oxidative challenge in the Alzheimer's brain. *Neurochem Res* 1994; 19: 1131-7.
3. Blessed G, Tomlinson BE, Roth M. The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br J Psychiatry* 1968; 114: 797-811.
4. Bongioanni P, Donato M, Castagna M, Gemigani F. Platelet phenosulphotransferase activity, monoamine oxidase activity and peripheral-type benzodiazepine binding in demented patients. *J Neural Transm* 1996; 103: 491-501.
5. Bourdel-Marchasson I, Delmas-Beauvieux MC, Peuchant E, Richard-Hartson S, Decamps A, Reinger B, Emeriau JP, Rainfray M. Antioxidant defence and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. *Age Ageing* 2001; 30: 235-41.
6. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302-10.
7. Campbell BC, Li QX, Culvenor JG, Jakala P, Cappai R, Beyreuther K, Masters CL, McLellan CA. Accumulation of insoluble alpha-synuclein in dementia with Lewy bodies. *Neurobiol Dis* 2000; 7: 192-200.
8. Cockrell JR, Folstein MF. Mini Mental State Examination (MMSE). *Psychopharmacology* 1988; 24: 689-92.
9. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 1993; 262: 689-95.
10. Fernandes MAS, Santana I, Januario C, Cunha L, Oliveira CR. Decreased superoxide dismutase activity in erythrocytes from patients with Alzheimer's disease. *Med Sci Res* 1993; 21: 679-82.
11. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. Mini-mental state: a practical method for grading the state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975; 12: 189-98.
12. Gsel W, Conrad R, Hückethier M, Sofic E, Frölich L, Wichart I, Jellinger K, Moll G, Ransmayr G, Beckmann H, Riederer P. Decreased catalase activity but unchanged superoxide dismutase activity in brains of patients with dementia with Alzheimer type. *J Neurochem* 1995; 64: 1216-23.
13. Hachinski VC, Iliff LD, Zilhka E, DuBoulay GH, McAllister VL, Marshall J, Russel RWR, Symon L. Cerebral blood flow in dementia. *Arch Neurol* 1975; 32: 632-37.
14. Heininger K. A unifying hypothesis of Alzheimer's disease. III. Risk factors. *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 2000; 15: 1-70.
15. Hille R, Nishimo T. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J* 1995; 9: 995-1003.
16. ICD-10. Klasyfikacja zaburzeń psychicznych i zaburzeń zachowania w ICD-10. Opisy kliniczne i wskazówki diagnostyczne. Kraków-Warszawa: Uniw Wyd Med „Vesalius”, IPiN; 1997.
17. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 515-40.
18. Kitani K, Kanai S, Carillo MC, Ivy GO. (-)Deprenyl increases the life span as activities of superoxide dismutase and catalase but

- not of glutathione peroxidase in selective brain regions in fischer rats. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 717: 60-70.
19. Kłoszewska I. Częstość występowania objawów psychotycznych i zaburzeń zachowania w poszczególnych stadiach choroby Alzheimera. *Post Psychiatr Neurol* 1998; 7: 305-15.
 20. Kłoszewska I. Majaczenie w ośpieniu. *Post Psychiatr Neurol* 1998; 7: 299-304.
 21. Krzywiński S. Test rysowania zegara. *Post Psychiatr Neurol* 1995; 4, supl 1 (2): 21-30.
 22. Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology* 1995; 45: 1594-601.
 23. Mann DM, McDonagh AM, Snowdwn J, Neary D, Pickering-Brown SM. Molecular classification of the dementias. *Lancet* 2000; 355: 626.
 24. Markesbery WR, Carney JM. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 1999; 9: 133-46.
 25. Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 1997; 23: 134-47.
 26. Metodiewa D, Końska C. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species: relevance to cyto(neuro)toxic events and neurologic disorders. An overview. *Neurotox Res* 2000; 1: 197-223.
 27. Musiał A, Karlińska I, Pietras T, Mazerant P, Kołomecka M, Nowak D. Serum lipid peroxidation products in demented subjects. 4th Symposium Free Radicals in Biology and Medicine, Materiały Zjazdowe, Łódź 1998; 131-2.
 28. Musiał A, Pietras T, Nowak D. Serum Schiff bases are elevated in patients with dementia. *J Anti-aging Med* 2000; 3: 251-7.
 29. Ohakawa H, Ohishi O, Yagi K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1976; 95: 351-8.
 30. Ozcankaya R, Delibas N. Malondialdehyde, superoxide dismutase, melatonin, iron, copper, and zinc blood concentration in patients with Alzheimer disease: cross-sectional study. *Croat Med J* 2002; 43: 28-32.
 31. Palmer AM, Burns MA. Selective increase in lipid peroxidation in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1990; 112: 333-7.
 32. Parker WD, Filley CM, Parks JK. Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurology* 1990; 40: 1302-3.
 33. Parnetii L, Mari D, Mecocci P, Senin U. Pathogenetic mechanisms in vascular dementia. *Int J Clin Res* 1994; 24: 15-22.
 34. Parnowski T, Pużyński S. Opieka nad osobami z zaburzeniami psychicznymi w wieku podeszłym. *Post Psychiatr Neurol* 1995; 4, supl 1 (2): 7-11.
 35. Parnowski T. Medyczne i psychologiczne problemy wieku podeszłego. *Post Psychiatr Neurol* 1995; 4, supl 1 (2): 1-6.
 36. Pietras T, Bąkiewicz K, Witusik A, Kędziora P, Kołomecka M, Nowak D. Aktywność katalazy w erytrocytach krwi u chorych z ośpieniem leczonych i nieleczonych witaminą E. IX Ogólnopolski Zjazd Naukowy Sekcji Geriatrycznej Polskiego Towarzystwa Lekarskiego, Polskiego Towarzystwa Gerontologicznego, Materiały Zjazdowe, Gdańsk 1999; 43.
 37. Pietras T, Witusik A, Górski P. Ośpienie w przebiegu infekcji ludzkim wirusem nabytego upośledzenia odporności. *Post Psychiatr Neurol* 2001; 10: 245-56.
 38. Pietras T. Mutacje w mitochondrialnych genach dla oksydazy cytochromu C jako czynnik ryzyka zespołów ośpiennych. *Post Psychiatr Neurol* 1998; 7: 291-7.
 39. Pietras T. Udział procesu peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w patogenezie zespołów ośpiennych. *Post Psychiatr Neurol* 1999; 8: 419-30.
 40. Pitchumoni SS, Doraiswamy PM. Current status of antioxidant therapy for Alzheimer's disease. *J Am Geriat Soc* 1998; 12: 1566-72.
 41. Potter NA, Caldwell SE, Mills KA. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 1995; 30: 277-90.
 42. Reisberg B, Franssen E, Sclan SG, Kluger A, Ferris SH. Stage specific incidence of potentially remediable behavioral symptoms in aging and Alzheimer's disease. A study of 120 patients using BEHAVE-AD. *Bull Clin Neurosci* 1989; 54: 95-112.

43. Saikumar P, Dong Z, Weinberg JM, Venkatchalam MA. Mechanism of cell in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene* 1998; 17: 3341-9.
44. Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schaffer K, Grundman M, Woodbury P, Growdon J, Cotman CW, Pfeiffer E, Schneider LS, Thal L. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 1997; 36: 1216-22.
45. Schippling S, Kontush A, Buhmann C, S rürenburg H, Mann U, Müller-Thomsen T, Beilsiegel U. Increased lipoprotein oxidation in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28: 351-60.
46. Serra JA, Famulari AL, Kohan S, Marschoff ER, Dominguez RO, Lustig ES. Cooper-zinc superoxide dismutase activity in red blood cells in probable Alzheimer's patients and their first-degree relatives. *J Neurol Sci* 1994; 122: 179-88.
47. Sohal RS. Aging, cytochrome oxidase activity, and hydrogen peroxide release by mitochondria. *Free Radic Biol Med* 1993; 14: 586-8.
48. Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M, Butterfield A. Review: Alzheimer's amyloid β -peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J Struct Biol* 2000; 130: 184-208.
49. Vatassery GT, Nelson MJ, Maletta GJ, Kuskowski MA. Vitamin E (tocopherols) in human cerebrospinal fluid. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 95-9.
50. Vertechy M, Cooper MB, Ghirardi O, Ramacci MT. The effect of age on the activity of enzymes of peroxide metabolism in rat brain. *Exp Gerontol* 1993; 28: 77-85.
51. Wallin A, Gottfries CG, Karlsson J, Svennerholm L. Decreased myelin lipids in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Acta Neurol Scand* 1989; 80: 319-23.
52. White BC, Grossman LI, Krause GS. Brain injury by global ischemia and reperfusion: a theoretical perspective on membrane damage and repair. *Neurology* 1993; 43: 1656-65.
53. Yagi K. Lipid peroxides and human diseases. *Chem Phys Lipids* 1987; 45: 337-51.

Adres: Dr Tadeusz Pietras, Pracownia Gerontologii Kliniki Pneumonologii i Alergologii Akademii Medycznej, ul. Kopcińskiego 22, 90-153 Łódź, tel. (42) 6787505, fax: (42) 6782129