

Wczesne leczenie cholinergiczne w zapobieganiu zmianom neuropatologicznym w chorobie Alzheimera

Cholinergic treatment: what are the early neuropathological targets?

Matthias W. Riepe

Department of Neurology, University of Ulm, Ulm, Niemcy

Przedrukowano za zgodą z: *European Journal of Neurology* 2005; 12 (supl. 3): 3-9

STRESZCZENIE

Wyróżnienie obszarów mózgu, w obrębie których odchodzi do zmian neuropatologicznych przyczyniających się do rozwoju choroby Alzheimera (AD, *Alzheimer's disease*), umożliwi w przyszłości lepsze zrozumienie patofizjologii tego schorzenia. Dodatkowo wiedza ta pozwoli na skuteczną kontrolę skutków prowadzonego w AD leczenia pod kątem oceny zmian obserwowanych we wspomnianych wyżej obszarach. Utrata funkcji poznawczych we wczesnej fazie AD o łagodnym nasileniu w pierwszej kolejności dotyczy pamięci epizodycznej oraz orientacji przestrzennej. Badania kliniczne oraz eksperymentalne wskazują, że zaburzenia pamięci we wczesnych fazach AD są spowodowane uszkodzeniami mózgu w rejonie hipokampa oraz przyśrodkowej części płatów skroniowych. Czy można zapobiec rozwojowi patologii w tych obszarach mózgu? Działanie neuroprotektoryjne inhibitorów cholinesterazy (ChEI, *cholinesterase inhibitor*) wykazano w wielu badaniach na modelach zwierzęcych AD prowadzonych u myszy transgenicznych. Udowodniono działanie protekcyjne ChEI względem neuronów kory mózgowej w modelu zahamowania dopływu glukozy i tlenu oraz ekspozycji na toksyczne działanie glutamianu, a także względem skutków zaburzeń mitochondrialnych komórek hipo-

kampa. Wnioski z powyższych badań przedklinicznych znajdują odzwierciedlenie w wynikach wielu badań klinicznych, które wskazują jednoznacznie na celowość jak najwcześniejszego podjęcia farmakoterapii donepezilem oraz sugerują, że działanie tego leku może wykazywać również inny niż tylko objawowy mechanizm działania.

Polski Przegląd Neurologiczny 2008; 4 (supl. B): 9-16

Słowa kluczowe: choroba Alzheimera, inhibitor cholinesterazy, otępienie, donepezil, hipokamp, zmiany neuropatologiczne, działanie neuroprotektoryjne

Wstęp

Do tej pory badań klinicznych, w których oceniano skuteczność farmakoterapii w chorobie Alzheimera (AD, *Alzheimer's disease*), nie planowano tak, aby ocenić, czy efekt terapeutyczny wynika z poprawy w zakresie objawów czy też z działania modyfikującego przebieg choroby. W AD lek o działaniu neuroprotektoryjnym powodowałby zachowanie funkcji neuronów i w związku z tym mógłby spowalniać postęp choroby lub też opóźniać pojawienie się jej klinicznych objawów. Wyniki wielu badań przedklinicznych oraz klinicznych sugerują, że donepezil może nie tylko łagodzić objawy, ale również wykazywać działanie protekcyjne względem komórek neuronalnych i w związku z tym potencjalnie korzystnie modyfikować przebieg choroby. Celem tej pracy przeglądowej jest omówienie neurologicznych podstaw utraty funkcji poznawczych w AD oraz wyników badań pod-

Adres do korespondencji: Matthias W. Riepe, MD
Department of Psychiatry, Mental Health and Old Age Psychiatry
Charité Medical University, Eschenalle 3, 14050 Berlin, Germany
tel.: +49 (30) 8445 8201, faks: +49 (30) 8445 8255
e-mail: matthias.riepe@charite.de
Copyright © 2005 by Blackwell Publishing Ltd.
Reproduced with permission of Blackwell Publishing Ltd.
Polski Przegląd Neurologiczny 2008, tom 4, supl. B, 9-16
Tłumaczenie: lek. Wiesław J. Cubala
Wydanie polskie: Via Medica

stawowych wskazujących na działanie neuroprotekcyjne inhibitorów cholinesterazy (ChEI, *cholinesterase inhibitor*), ze szczególnym uwzględnieniem donepezylu w zakresie hamowania aktywności acetylocholinesterazy (AChE, *acetylcholinesterase*) i objawowego leczenia AD.

Identyfikacja obszarów mózgu zaangażowanych w powstawanie zaburzeń funkcji poznawczych we wczesnej chorobie Alzheimera

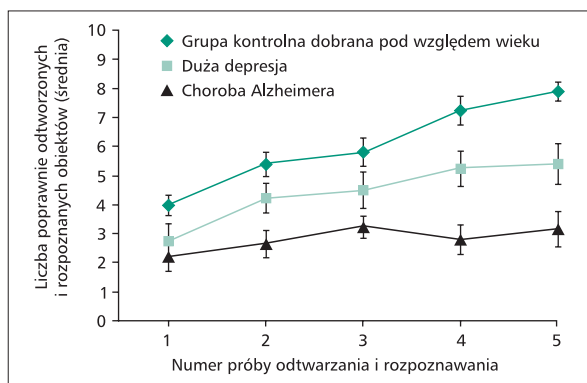
W przebiegu AD wraz z jej postępem obserwuje się liczne zmiany patologiczne oraz topologiczne, związane z narastającym deficytem w zakresie funkcji poznawczych. Wyróżnienie obszarów mózgu, dotkniętych określonymi zmianami neuropatologicznymi związanymi z postępującym upośledzeniem funkcji poznawczych w przebiegu AD, umożliwi szczegółową ocenę zmian patofizjologicznych, zachodzących w tych obszarach, co w dalszej perspektywie pozwoli ocenić efekty farmakoterapii prowadzonej w AD przez monitorowanie tych obszarów ośrodkowego układu nerwowego (OUN).

Ocena zaawansowania AD, zaproponowana przez Braak i Braak (1991), wskazuje na progresję zmian patologicznych z początkowym wyraźnym zajęciem części pośrodkowej płatów czołowych, a także obszaru kory śródwęczowej wraz z hipokampem. Dalszy rozwój zmian patologicznych obejmuje korę ciemieniową oraz czołową, na zajęciu całego mózgowia skończywszy. Istotne wydaje się nie tylko określenie zmian neuroanatomicznych w AD, ale również sekwencji ich występowania prowadzącej do niesprawności czynnościowej. W zależności od stopnia zaawansowania AD można wyróżnić wiele objawów, których występowanie może zależeć od obecności określonych zmian neuroanatomicznych. Stopniowe upośledzenie funkcji poznawczych występuje we wczesnej fazie AD. Zaburzenia pamięci epizodycznej (pamięci zdarzeń) oraz orientacji przestrzennej stwierdza się u chorych w początkowej fazie AD oraz u osób z łagodną postacią tej choroby. Jednak, w przypadku deficytów funkcji poznawczych w zakresie pamięci operacyjnej (zdolności do okresowego zapamiętywania informacji oraz ich przetwarzania), a także funkcji języka, zmiany nie są ewidentne do momentu osiągnięcia umiarkowanego do ciężkiego nasilenia AD (Hodges, 2000).

Gron i wsp. (2002) wyróżnili obszary mózgu odpowiedzialne za wystąpienie deficytów pamięci na wczesnych etapach AD, używając zmodyfikowanego testu przyswajania informacji słownych (Kalifornijski Test Ucznienia się Językowego; CVLT,

California Verbal Learning Test), który jest powszechnie stosowany jako metoda oceny pamięci epizodycznej. Podobnej metodologii, opartej na procesie przyswajania informacji słownych wraz z próbą swobodnego odtwarzania i rozpoznawania po odroczeniu figur geometrycznych, użyto w badaniu z wykorzystaniem obrazowania metodą czynnościowego rezonansu magnetycznego (fMRI, *functional magnetic resonance imaging*), mającym na celu ocenę pamięci epizodycznej. Proces przyswajania informacji oraz próbę swobodnego odtwarzania i rozpoznawania po odroczeniu oceniono w porównywalnych pod względem wieku grupach: kontrolnej (wiek 56–64 lata), pacjentów z prawdopodobnym rozpoznaniem AD (wiek 51–67 lat) oraz u chorych z dużą depresją (wiek 50–65 lat), którzy po raz pierwszy zgłaszali obecność zaburzeń pamięci. U pacjentów z dużą depresją występuje pseudodemencja związana z obrazem depresji, która różni się od otępienia w AD. Jednak u chorych z dużą depresją występują zaburzenia pamięci w podobnym stopniu, co u pacjentów z AD. W trakcie badania fMRI proszono pacjentów o zapamiętanie 10 abstrakcyjnych figur geometrycznych, a następnie o ich odtworzenie i rozpoznanie. Procedurę powtarzano 5-krotnie przy użyciu tego samego zestawu figur. Wyniki opracowano w postaci krzywej uczenia się w odniesieniu do prawidłowych odpowiedzi w obrębie każdego panelu z zakresu ich odtwarzania i rozpoznawania. Wykazano istotną statystycznie różnicę między czwartym ($p = 0,016$) i piątym ($p = 0,01$) panelem odtwarzania i rozpoznawania w grupie kontrolnej oraz u pacjentów z prawdopodobnym rozpoznaniem AD. Badani w grupie kontrolnej wykazywali postęp w zakresie odtwarzania i rozpoznawania, jednak krzywa uczenia się w grupie osób z AD była płaska (ryc. 1). Krzywa uczenia się w grupie chorych z dużą depresją znajdowała się między krzywymi dla grupy kontrolnej oraz osób z AD.

Nasuującym się, istotnym pytaniem jest, czy te różnice znalazły swoje odzwierciedlenie w aktywacji poszczególnych obszarów mózgu. Rejonami mózgu najsilniej zaangażowanymi w rozwiązywanie zadań z zakresu pamięci epizodycznej w grupie kontrolnej były, obustronnie, zakręt przyhipokampowy, hipokamp i części płatów skroniowych oraz zakręt skroniowy dolny. Zaobserwowane obustronnie zmiany aktywności w okolicach przedczołowych, a szczególnie w obrębie hipokampa, u pacjentów z AD nie podlegały aktywacji w tym samym stopniu, co w grupie kontrolnej. Jednak aktywność w obszarze hipokampa była



Rycina 1. Krzywe uczenia się w zadaniach oceniających pamięć epizodyczną (średnia z poprawnie przeprowadzonego odtwarzania i rozpoznawania obiektów \pm odchylenie standardowe) dla zdrowej grupy kontrolnej, porównywalnej pod względem wieku, pacjentów z dużą depresją oraz pacjentów z chorobą Alzheimera w 5 kolejnych próbach. Wynik osób z chorobą Alzheimera według oceny z użyciem *Mini-Mental State Examination* (MMSE) = 25,9 punktu. Przedrukowano z Gron i wsp. (2002) za zgodą John Wiley and Sons

w mniejszym stopniu upośledzona w grupie chorych z dużą depresją, co wskazuje na inne podłoże zaburzeń pamięci w dużej depresji niż w AD. Z zaobserwowanej zwiększonej aktywności w obszarze kory czołowej można wywnioskować, że u pacjentów z AD dochodzi do próby kompensacji w trakcie zadań odtwarzania i rozpoznawania przy użyciu innych struktur mózgu, takich jak lewy zakręt czołowy, prawy dolny zakręt czołowy oraz obustronnie płacik ciemieniowy dolny, zlokalizowany w obrębie kory okołooczołowej, przedczołowej. Te alternatywnie wykorzystywane struktury mózgu wydają się wiązać z pamięcią operacyjną, nie będąc jednocześnie w stanie pełnić zadań z zakresu odtwarzania i rozpoznawania. Stanowi to więc wyjaśnienie dla zaobserwowanej w badaniu płaskiej krzywej uczenia się.

Sprawność związanych z pamięcią epizodyczną zadań odtwarzania oceniano również u pacjentów z AD względem 2 grup kontrolnych różniących się pod względem sprawności pamięci epizodycznej, którą skonstruowano na podstawie podziału na osoby o niskiej (LP, *low performing*) i wysokiej (HP, *high performing*) sprawności funkcji pamięci epizodycznej w zakresie zdolności do rozwiązywania podobnych zadań pamięciowych opartych na zapamiętywaniu figur geometrycznych (Gron i Riepe, 2004). W grupie HP w odniesieniu do grupy LP zaobserwowano zwiększoną aktywność w obrębie obszaru hipokampa oraz tylnego obszaru kory skroniowej w okolicy pośrodkowej. Sprawność mierzona w zadaniach z odtwarzaniem była dodatnio sko-

relowana z aktywnością struktur hipokampa oraz przyśrodkowej części płatów skroniowych. U pacjentów z AD zaobserwowano gorsze wyniki niż u osób z grupy kontrolnej z gorszymi wynikami w zakresie sprawności pamięci epizodycznej (LP) oraz znacząco mniejsze zaangażowanie struktur hipokampa i przyśrodkowej części płatów skroniowych. Upośledzona zdolność pacjentów z AD do angażowania struktur hipokampa do zadań związanych z pamięcią epizodyczną może więc stanowić wskaźnik dla wczesnych stadiów AD. Obszar hipokampa może również stanowić obiekt przyszłych badań dotyczących lokalizacji zmian patofizjologicznych oraz obserwacji zmian zachodzących podczas leczenia w najwcześniejszych stadiach AD.

W teście orientacji przestrzennej, który odpowiada stosowanemu w modelach zwierzęcych testowi labiryntu (Gron i wsp., 2000), pacjentów z amnestycznymi łagodnymi zaburzeniami poznawczymi (MCI, *mild cognitive impairment*) proszono, aby podczas badania MRI wskazali trasę przejścia przez wygenerowany komputerowo labirynt (Gron i wsp., 2005). Pacjenci mieli za zadanie rozpoznać określone wzory na ścianach labiryntu, szereg figur geometrycznych oraz rozdroży, a także długości ścieżek w obrębie labiryntu, a następnie po przeanalizowaniu zdobytych informacji odnaleźć wyjście z labiryntu. W badaniu tym zaobserwowano, że u osób leczonych galantaminą dochodziło do zwiększonej aktywacji obszaru hipokampa oraz rejonu przyhipokampalnego podczas nawigacji przestrzennej. Stwierdzono również, że nastąpiła selektywna poprawa sprawności pamięci epizodycznej, zwłaszcza odroczonego odtwarzania, niezmiennione natomiast pozostały inne elementy funkcji poznawczych, takie jak uwaga, pamięć operacyjna oraz funkcje wykonawcze. Wyniki te wskazują na rolę ChEI w poprawie funkcji obszaru hipokampa na drodze rekrutacji dodatkowych neuronów hipokampalnych.

Wzorec obserwowanego upośledzenia w zakresie zdolności do angażowania określonych rejonów mózgu, zaobserwowany w obu powyższych badaniach *in vivo* u pacjentów z MCI, odpowiada zmianom patologicznym opisanym przez Braak i Braak (1991) w badaniach *post mortem* mózgow pacjentów z AD. W badaniach tych zaobserwowano, że obszar kory śródwęczowej wraz z hipokampem są zajęte przez proces chorobowy na wczesnym jego etapie, natomiast zmiany w obrębie kory ciemieniowej oraz czołowej ujawniają się później. W zaawansowanej chorobie Alzheimera ChEI nie tylko wpływają na poprawę funkcji obszarów skronio-

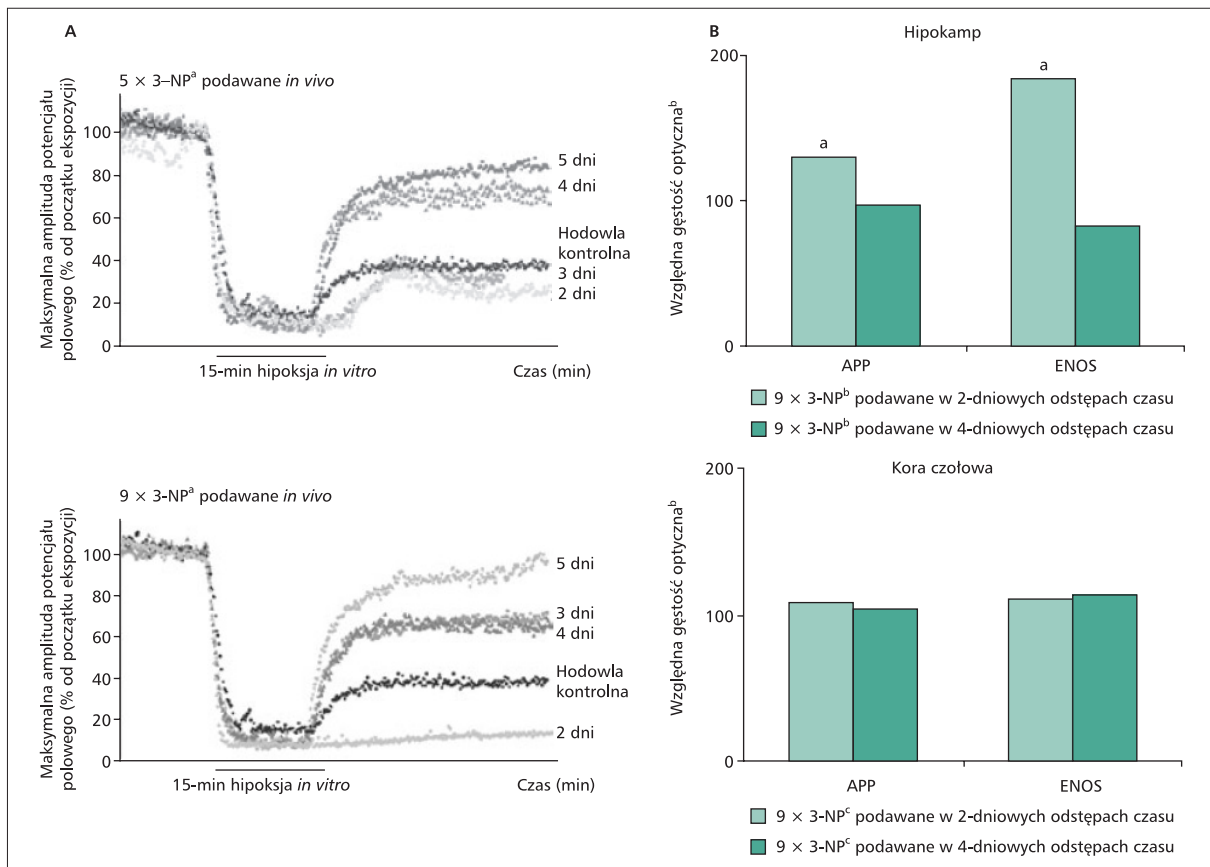
wych i rejonu hipokampa; wiele danych wskazuje, że zarówno riwastygmina, jak i donepezyl mogą skutecznie hamować AChE w obszarach czołowych i ciemieniowych (Kaasinen i wsp., 2002). Wyniki tych badań sugerują, że CHEI mogą również wpływać na poprawę objawów innych niż pamięć epizodyczna w bardziej zaawansowanych stadiach AD, gdy proces chorobowy uległ rozsianiu, zajmując korę czołową oraz ciemieniową. Poprawa ta znajduje swoje odzwierciedlenie w wynikach badań z użyciem skal do pomiaru nasilenia objawów w AD, takich jak skala dla opiekunów chorych *Clinician's Interview-Based Impression of Change* (CIBIC+), czy też przy użyciu innych baterii testów psychologicznych (Feldman i wsp., 2001).

Hipoksja jako czynnik wywołujący zmiany patologiczne we wczesnej chorobie Alzheimera

Mimo że czynniki genetyczne odgrywają znaczącą rolę w wielu przypadkach AD, największa liczba przypadków zachorowań ma charakter osobniczy. W badaniach nad genetyczną predyspozycją do rozwoju AD szerokie zastosowanie mają transgeniczne modele choroby. Jednak w badaniach oceniających osobniczą predyspozycję do zachorowania na AD dostępna jest mniejsza liczba danych. W niedawno przeprowadzonych badaniach na modelach zwierzęcych zaobserwowano, że hipoksja może stanowić czynnik spustowy w wywołaniu łańcucha patofizjologicznego prowadzącego do rozwoju AD. Badanie mające na celu ocenę roli upośledzonego metabolizmu energetycznego w patofizjologii procesów obecnych we wczesnych stadiach AD przeprowadzono na modelu zwierzęcym u 4-miesięcznych myszy ze szczepu B6-Tg (ThylAPP) 23Sdz, stanowiących transgeniczny model dla wczesnego etapu AD, które w momencie rozpoczęcia badania były w fazie bezobjawowej (Buchner i wsp., 2002). W badaniu użyto techniki spektroskopii autofluorescencyjnej *time-resolved* w celu pomiaru wolnego (cytozolowego) oraz związanego z białkami (mitochondrialnego) zredukowanego dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADH, *nicotinamide adenine dinucleotide*) w preparatach tkanki hipokampa. W łańcuchu oddechowym w reakcji fosforylacji oksydatywnej dochodzi do wiązania się NADH z białkami mitochondrialnymi, w związku z czym związane z białkami NADH jest miarą metabolizmu energetycznego. Buchner i wsp. (2002) zaobserwowali, że w preparatach tkanki hipokampa uzyskanych od myszy transgenicznych występuje zmienione spektrum wiązania NADH, co wskazuje na odmienną mikrośrodowiska biał-

kowego enzymów oksydacyjnych. Analogicznie, zdolność do przetrwania epizodów hipoksji w warunkach *in vitro* jest upośledzona u badanych zwierząt, co znajduje odbicie w pomiarach maksymalnej amplitudy potencjału polowego będącej miarą integralności neuronalnej. Odkrycia te wskazują, że hipokampy myszy APP23 są bardziej wrażliwe na skutki ekspozycji na hipoksję niż u myszy z grupy kontrolnej. Wskazuje to na możliwość zainicjowania kaskady neurodegeneracyjnej prowadzącej do rozwoju wczesnych zmian patofizjologicznych w badanym modelu zwierzęcym AD w fazie przedobjawowej.

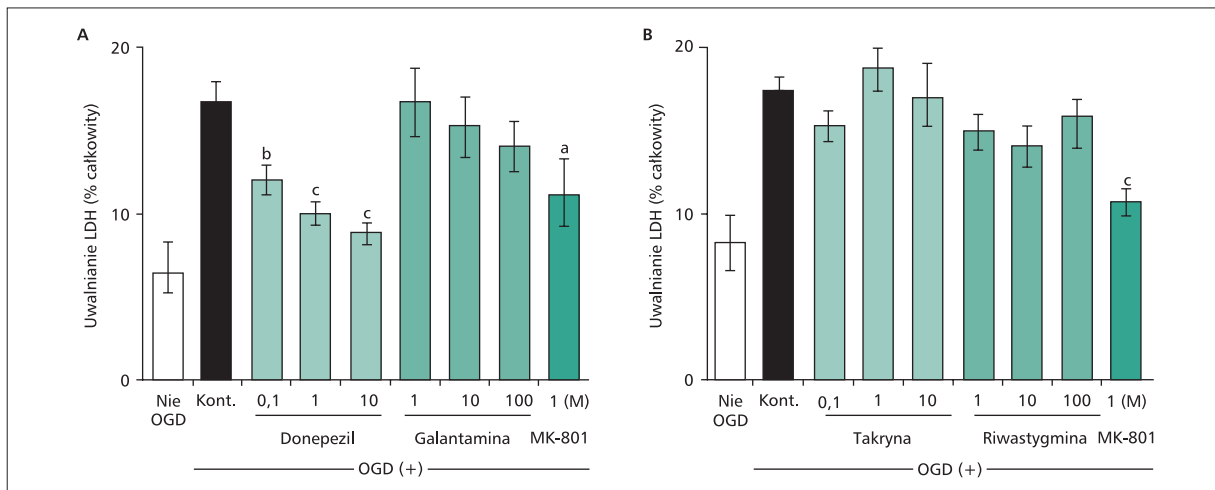
Zaburzenia czynności mitochondriów można wywołać przez ekspozycję na powtarzającą się hipoksję (Hellweg i wsp., 2003), zarówno w preparatach tkanki hipokampa (Riepe i wsp., 1996), jak i w mózгах żywych myszy (Wiegand i wsp., 1999). Modelem zwierzęcym dla neurodegeneracji jest powtarzające się hamowanie fosforylacji oksydatywnej przez podawanie 3-nitropropionianu (3-NP, *3-nitropropionate*). Jednocześnie dowiedziono, że pojedynczy krótkotrwały epizod niedokrwienia lub podawanie 3-NP w niewielkich stężeniach przez krótki czas w mechanizmie warunkowania wstępnego wykazuje działanie chroniące przed skutkami późniejszych epizodów hipoksemii (Kitagawa i wsp., 1990). W badaniu Hellweg i wsp. (2003), w zmiennych odstępach czasu w odniesieniu do grupy kontrolnej, poddawano myszy cyklicznym iniekcjom dootrzewnowym 3-NP (20 mg/kg mc.), który jest selektywnym inhibitorem funkcji mitochondriów. Po zakończeniu procedury przygotowawczej ze zwłok myszy z grupy badanej oraz kontrolnej pobrano preparaty tkanki hipokampa, które poddano perfuzji roztworem Ringera przez 15 minut w celu wywołania epizodu niedokrwienia. Powrót czynności neuronów po epizodzie hipoksemii oceniano w pomiarach maksymalnej amplitudy potencjału polowego dla obszaru CA₁ hipokampa w pobranych preparatach tkanki hipokampa (ryc. 2.A; Hellweg i wsp., 2003). W pobranych preparatach tkanki hipokampa od myszy, które otrzymały 9 iniekcji 3-NP w 5-dniowych odstępach czasu, zaobserwowano prawie zupełną remisję (80–90%) mierzoną wartością maksymalnej amplitudy potencjału polowego w odniesieniu do odpowiedzi na poziomie poniżej 40% w populacji kontrolnej. Można więc wywnioskować, że integralność neuronalna w grupie myszy otrzymujących 3-NP była znacząco wyższa niż w grupie kontrolnej, co podkreśla znaczenie mechanizmów warunkowania wstępnego. Jednocześnie w grupie badanej, w której zwierzęta otrzymały 9 iniekcji 3-NP w 2-dniowych od-



Rycina 2.A. Analiza maksymalnej amplitudy potencjału polowego w trakcie oraz po okresie hipoksji w preparatach tkanki hipokampa pochodzących od zwierząt z grupy kontrolnej oraz od myszy transgenicznycy APP23, którym podawano 5 lub 9 dootrzewnowych iniekcji 3-NP (3-nitropropionianu^a) w dawce 20 mg/kg mc. wraz z oznaczonymi odstępami czasu między kolejnymi iniekcjami (2–5 dni). Przedrukowano z Hellweg i wsp. (2003) za zgodą Elsevier; **B.** Wpływ powtarzanej hipoksji *in vivo* na ekspresję w obrębie hipokampa mRNA dla białka prekursorowego amyloidu (APP, *amyloid precursor protein*) oraz mRNA dla śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (ENOS, *endothelial nitric oxide synthase*) u myszy transgenicznycy APP23; ^a*p* < 0,05 odstęp 2-dniowy vs. odstęp 4-dniowy; ^bgęstość optyczna względem fosforybazylotransferazy hipoksantynowej; ^c3-nitropropionian (Hellweg i wsp., 2003; von Arnim i wsp., 2005)

stępnach czasu, zaobserwowano niski odsetek remisji (10%) mierzonej wartością maksymalnej amplitudy potencjału polowego. Wyniki tego badania wskazują, że powtarzająca się ekspozycja na 3-NP, w przypadku zastosowania długich odstępów czasu, działa neuroprotekcynie oraz że w warunkach *in vitro* po zmianach wywołanych hipoksją może dojść do zupełnej remisji zmian w preparatach tkanki hipokampa. Jednocześnie powtarzająca się ekspozycja na 3-NP, w przypadku zastosowania 2-dniowych odstępów czasu, indukuje procesy neurodegeneracji w preparatach tkanki hipokampa, co powoduje, że nie są one w stanie przetrwać ekspozycji na hipoksję w warunkach *in vitro*. Słaba remisja mierzona jako powrót maksymalnej amplitudy potencjału polowego do wartości wyjściowej

w preparatach tkanki hipokampa pobranych od myszy otrzymujących 3-NP w 2-dniowych odstępach czasu wiązała się ze zwiększeniem ekspresji mRNA dla białka prekursorowego amyloidu (APP, *amyloid precursor protein*) w obrębie hipokampa, ale nie w obszarze kory czołowej (ryc. 2.B; Hellweg i wsp., 2003; von Arnim i wsp., 2005). Obniżona tolerancja na hipoksję wraz ze zwiększoną ekspresją APP występującą w warunkach długotrwałej fosforylacji oksydacyjnej mogą być mechanizmami zaangażowanymi w rozwój uszkodzeń związanych z niedokrwieniem oraz zmianami neurodegeneracyjnymi komórek mózgu. Badania te (Buchner i wsp., 2002; Hellweg i wsp., 2003) sugerują, że upośledzona tolerancja hipoksji może być celem działania terapeutycznego we wczesnych fazach choroby.



Rycina 3. Efekt działania donepezilu, galantaminy, takryny oraz riwastygminy na uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej (LDH, *lactate dehydrogenase*) związany z zahamowaniem dopływu glukozy i tlenu (OGD, *oxygen-glucose deprivation*) w kulturach komórek neuronalnych szczura. Wszystkie inhibitory acetylocholino zastosowano 12 godzin przed procedurą zahamowania dopływu glukozy i tlenu; MK-801 zastosowano godzinę przed procedurą zahamowania dopływu glukozy i tlenu; ^ap < 0,05; ^bp < 0,01; ^cp < 0,005 w odniesieniu do grupy kontrolnej. Przedrukowano z Akasofu i wsp. (2003) za zgodą Elsevier

Wyniki badań przedklinicznych wspierające działanie neuroprotektynne donepezilu

Jest oczywiste, że neurony są podatne na hipoksję (Zhou i wsp., 2001a, b) oraz uszkodzenie ekscytotoksyczne (Choi i wsp., 1987). W związku z faktem, że zmiany patologiczne w AD w dalszych etapach zaawansowania obserwuje się w korze, neurony korowe mogą być używane w badaniach nad oddziaływaniem hipoksji oraz uszkodzenia ekscytotoksycznego w mózgu. W modelach komórkowych zbadano działanie ChEI na egzogenne uszkodzenia cytotoksyczne komórek kory mózgu. Akasofu i wsp. (2003) wykorzystali eksperymentalny model niedokrwienia, w którym oceniali wpływ zahamowania dopływu glukozy i tlenu na hodowlę komórek kory mózgowej. W badaniu mierzono stężenia dehydrogenazy mleczanowej (LDH, *lactate dehydrogenase*) w celu oceny stopnia uszkodzenia hodowli komórek po ekspozycji na zahamowanie dopływu glukozy i tlenu. Komórki poddane zahamowaniu dopływu glukozy i tlenu wykazywały znaczący wzrost uwalniania LDH w odniesieniu do komórek, których nie poddano ekspozycji w modelu eksperymentalnym. Oceniono również działanie ChEI na uwalnianie LDH związane z zahamowaniem dopływu glukozy i tlenu. Wstępne zastosowanie donepezilu przez 24 godziny przed zahamowaniem dopływu glukozy i tlenu wiązało się z zależnym od dawki wzrostem uwalniania LDH (ryc. 3). W przypadku zastosowania największych dawek donepezilu (10 μM) spadek uwalniania LDH był znaczący

w odniesieniu do komórek grupy kontrolnej poddanych procedurze zahamowania dopływu glukozy i tlenu (p < 0,005). Właściwości protekcyjne donepezilu w dawce 10 μM względem zahamowania dopływu glukozy i tlenu były również znacząco wyższe od obserwowanych w przypadku użycia MK-801 (1 μM) — związku o udowodnionym działaniu neuroprotektynnym będącym uznanym komparatorem w badaniach nad neuroprotekcją. Wyniki tych badań wskazują, że donepezil może wykazywać działanie neuroprotektynne względem uszkodzeń związanych z niedokrwieniem w badanym modelu zahamowania dopływu glukozy i tlenu. W powyższym badaniu nie zaobserwowano podobnych działań galantaminy, takryny oraz riwastygminy dla modelu zahamowania dopływu glukozy i tlenu (ryc. 3).

Działanie ekscytotoksyczne, obserwowane przy wysokich stężeniach glutaminianu, jest zaangażowane w śmierć komórek nerwowych (Choi i wsp., 1987). Toksyczne działanie glutaminianu ocenili również Takada i wsp. (2003) w modelu eksperymentalnym na neuronach kory mózgowej szczura. W badaniu tym komórki poddawano ekspozycji na glutaminian (1 mM) przez 120 minut, a podatność na uszkodzenie oceniano, stosując barwienie metodą *Trypan Blue*, w przypadku którego uszkodzone komórki nie ulegają wybarwieniu i pozostają widoczne w kontraście z komórkami nieuszkodzonymi, które wybarwiają się na ciemnoniebiesko. Oceniano efekt ekspozycji na glutaminian oraz 24-godzinne zastosowanie donepezilu na komór-

ki kory mózgowej szczura. Zastosowanie glutaminianu spowodowało wzrost odsetka uszkodzonych komórek z około 50% do 80%. Wykazano silny, zależny od dawki, związek z działaniem neuroprotektynym donepezilu (w dawce 0,1–10 μM), chroniący przed uszkodzeniem około 70% populacji komórek. Stwierdzono również działanie ochronne po ekspozycji na glutaminian względem neuronów korowych takryny, galantaminy, neostygminy, pirydostygminy i metrifonianu w stężeniach 1 μM . W badanym modelu fizostygmina (1 μM) nie wykazywała działania neuroprotektynego.

Mechanizmy działania neuroprotektynego donepezilu

Badania Akasofu i wsp. (2003) wskazują, że działanie neuroprotektynego preparatów, takich jak donepezil nie jest związane z hamowaniem AChE, ponieważ ujawnionego w przypadku donepezilu działania neuroprotektynego nie zaobserwowano w przypadku innych ChEI, takich jak galantamina, takryna czy riwastygmina. Również dawki ChEI, użyte w badaniu Takady (Takada i wsp., 2003), wspierają tę tezę, ponieważ stężenia, przy których obserwowano działanie neuroprotektynego względem ekspozycji na glutaminian, były znacznie wyższe od wartości IC_{50} dla ChEI wyznaczonych dla hamowania acetylocholinesterazy w mózgu (Arnal i wsp., 1990; Tang, 1996; Ogura i wsp., 2000; Rakonczay, 2003). Na przykład, stężenie donepezilu, przy którym występowało działanie neuroprotektynego, wynosiło 0,1–10 μM , znacząco przekraczając wartość IC_{50} (6,7 nM) dla donepezilu w mózgu szczura (Ogura i wsp., 2000). Ponadto nie wykazano wyraźnego działania neuroprotektynego fizostygminy będącej jednym z najsilniejszych ChEI (Ogura i wsp., 2000) względem zastosowania ekspozycji na glutaminian, co potwierdza tezę, że efekt neuroprotektynego pozostałych inhibitorów cholinesterazy nie wiąże się z ich zdolnością do hamowania AChE.

W badaniach przy użyciu tomografii emisyjnej pojedynczego fotonu (SPECT, *single photon emission-computed tomography*) oceniano regionalny przepływ mózgowy (rCBF, *regional cerebral blood flow*) u pacjentów leczonych donepezilem oraz populację otrzymującą placebo w celu określenia obszarów w mózgu, względem których zachodzi efekt ochronny (Nakano i wsp., 2001). W okresie roku zaobserwowano utrzymywanie się stałych wartości przepływu mózgowego w wybranych obszarach zainteresowania, takich jak zakręt skroniowy, na wyższym poziomie w grupie leczonej donepezilem niż u pacjentów otrzymujących place-

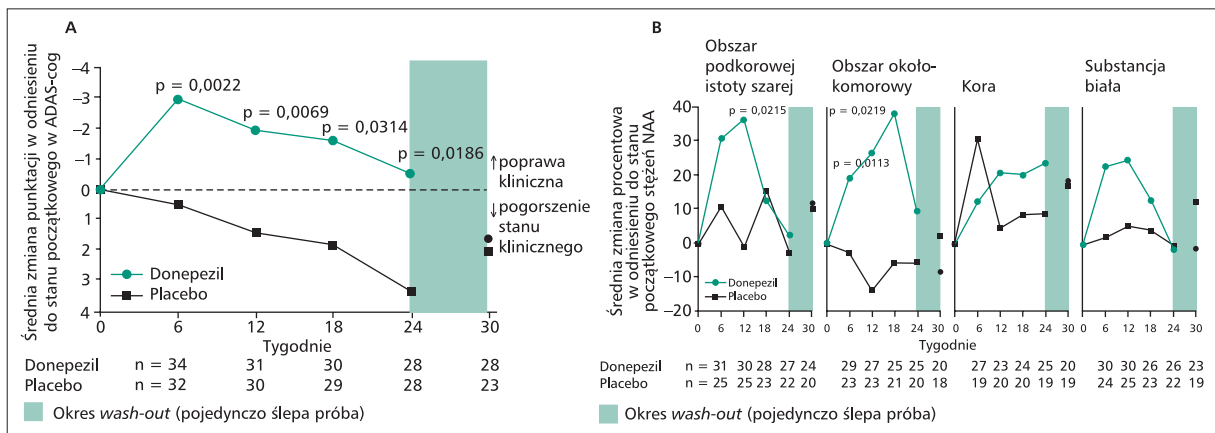
bo. Można więc wysunąć hipotezę, że działanie donepezilu na mózg jest szersze niż tylko wzmożenie aktywności cholinergicznej.

W mózgu w szlaku metabolicznym glukozy dochodzi do wytworzenia wielu metabolitów, między innymi N-acetyloaspartianu (NAA, *N-acetylaspartate*), który stanowi miarę liczby/gęstości neuronów lub też metabolizmu neuronalnego i może być mierzony za pomocą spektroskopii rezonansu magnetycznego (MRS, *magnetic resonance spectroscopy*). W badaniu Krishnana i wsp. (2003) oceniano wpływ donepezilu na stężenia NAA mierzone przy użyciu MRS i wykazano, że po stosowaniu donepezilu (10 mg/d.) przez 6-miesięczny okres badania dochodziło do znaczącego wzrostu stężenia NAA po około 6–8 tygodniach leczenia w porównaniu z pacjentami otrzymującymi placebo. Wzrost stężenia NAA obserwowano wyłącznie w obszarze podkorowej istoty szarej i w obszarach okołokomorowych mózgu; był on skorelowany z wynikami w *Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognition Subscale* (ADAS-cog; ryc. 4.A i 4.B). Zatem donepezil powoduje przynajmniej przejściowe zwiększenie metabolizmu neuronalnego, którego wykładnikiem jest stężenie NAA w tej grupie chorych.

Objętość hipokampa również oceniano w badaniach przy użyciu MRI (Krishnan i wsp., 2003). Po ukończeniu badania trwającego 6 miesięcy w grupie pacjentów leczonych donepezilem zaobserwowano znacząco mniejszy spadek objętości sumarycznej hipokampów oraz prawego hipokampa niż w grupie otrzymującej placebo. Obserwacja ta wskazuje, że leczenie donepezilem może chronić przed postępowaniem neurodegeneracji w obrębie hipokampów u pacjentów z AD.

Wnioski

Za kontrolę pamięci epizodycznej oraz orientację przestrzenną odpowiadają te same struktury neuroanatomiczne, obszar hipokampa oraz część pośrodkowa płata skroniowego, które ulegają zajęciu we wczesnych stadiach AD. Obecność zmian patofizjologicznych w obrębie tych obszarów może stanowić biologiczny wykładnik wielkości wczesnego upośledzenia funkcji OUN, który w warunkach klinicznych obserwuje się u pacjentów z chorobą Alzheimera. W konsekwencji ocena zmian w obrębie tych struktur neuroanatomicznych może być wykładnikiem wielkości wczesnych zmian neuropatologicznych, pomagając w określeniu skuteczności farmakoterapii w AD. Wykazano również, że donepezil może działać neuroprotektynego na kulturę komórek neuronów kory mózgu w modelach



Rycina 4. A. Zmiana w odniesieniu do stanu początkowego w punktacji w *Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive Subscale* (ADAS-cog) w grupie pacjentów z chorobą Alzheimera przydzielonych losowo do grupy leczonej donepezilem (5–10 mg/d.) oraz otrzymującej placebo w trwającym 24 tygodnie badaniu przeprowadzonym metodą podwójnie ślepej próby (Krishnan i wsp., 2003); **B.** Zmiana w odniesieniu do stanu początkowego w zakresie stężeń N-acetyloaspartianu (NAA, *N-acetylaspartate*) w obszarze podkorowej istoty szarej, w obszarach korowych oraz w istocie białej u pacjentów z chorobą Alzheimera przydzielonych losowo do grupy leczonej donepezilem (5–10 mg/d.) oraz otrzymującej placebo w trwającym 24 tygodnie badaniu przeprowadzonym metodą podwójnie ślepej próby (Krishnan i wsp., 2003)

zahamowania dopływu glukozy i tlenu oraz w modelu ekspozycji na toksyczne działanie glutaminy. Działanie donepezilu, modyfikujące przebieg choroby, wykazano w wielu badaniach przeprowa-

dzonych na modelach zwierzęcych, a także w badaniach klinicznych. Powyższy mechanizm oddziaływania donepezilu wydaje się niezależny od jego hamującego wpływu na AChE.

PIŚMIENNICTWO

1. Akasofu S., Kosasa T., Kimura M., Kubota A. Protective effect of donepezil in a primary culture of rat cortical neurons exposed to oxygen-glucose deprivation. *Eur. J. Pharmacol.* 2003; 472: 57–63.
2. Arnal F., Cote L.J., Ginsburg S., Lawrence G.D., Naini A., Sano M. Studies on new, centrally active and reversible acetylcholinesterase inhibitors. *Neurochem. Res.* 1990; 15: 587–591.
3. von Arnim C.A., Hellweg R., Buchner M., Huber R., Riepe M.W. Regional selectivity of amyloid mRNA expression and neurotrophins on repetitive inhibition of oxidative phosphorylation. *J. Neural. Transm.* 2005; 112: 491–498.
4. Braak H., Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1991; 82: 239–259.
5. Buchner M., Huber R., Sturchler-Pierrat C., Staufenbiel M., Riepe M.W. Impaired hypoxic tolerance and altered protein binding of NADH in pre-symptomatic APP23 transgenic mice. *Neuroscience* 2002; 114: 285–289.
6. Choi D.W., Maulucci-Gedde M., Kriegstein A.R. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* 1987; 7: 357–368.
7. Feldman H., Gauthier S., Hecker J., Vellas B., Subbiah P., Whalen E. A 24-week, randomized, double-blind study of donepezil in moderate to severe Alzheimer's disease [errata opublikowano w: *Neurology* 2001; 57: 2153] *Neurology* 2001; 57: 613–620.
8. Gron G., Riepe M.W. Neural basis for the cognitive continuum in episodic memory from health to Alzheimer's disease. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* 2004; 12: 648–652.
9. Gron G., Wunderlich A.P., Spitzer M., Tomczak R., Riepe M.W. Brain activation during human navigation: gender-different neural networks as substrate of performance. *Nat. Neurosci.* 2000; 3: 404–408.
10. Gron G., Bittner D., Schmitz B., Wunderlich A.P., Riepe M.W. Subjective memory complaints: objective neural markers in patients with Alzheimer's disease and major depressive disorder. *Ann. Neurol.* 2002; 51: 491–498.
11. Gron G., Brandenburg I., Wunderlich A.P., Riepe M.W. Inhibition of hippocampal function in mild cognitive impairment: targeting the cholinergic hypothesis. *Neurobiol. Aging* 2006; 27: 78–87.
12. Hellweg R., von Arnim C.A., Buchner M., Huber R., Riepe M.W. Neuroprotection and neuronal dysfunction upon repetitive inhibition of oxidative phosphorylation. *Exp. Neurol.* 2003; 183: 346–354.
13. Hodges J.R. Memory in the dementias. W: Tulving E., Craik F.I.M. (red.). *The Oxford handbook of memory.* Oxford University Press, Oxford 2000: 441–459.
14. Kaasinen V., Nagren K., Jarvenpaa T. i wsp. Regional effects of donepezil and rivastigmine on cortical acetylcholinesterase activity in Alzheimer's disease. *J. Clin. Psychopharmacol.* 2002; 22: 615–620.
15. Kitagawa K., Matsumoto M., Tagaya M. i wsp. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res.* 1990; 528: 21–24.
16. Krishnan K.R., Charles H.C., Doraiswamy P.M. i wsp. Randomized, placebo-controlled trial of the effects of donepezil on neuronal markers and hippocampal volumes in Alzheimer's disease. *Am. J. Psychiatry* 2003; 160: 2003–2011.
17. Nakano S., Asada T., Matsuda H., Uno M., Takasaki M. Donepezil hydrochloride preserves regional cerebral blood flow in patients with Alzheimer's disease. *J. Nucl. Med.* 2001; 42: 1441–1445.
18. Ogura H., Kosasa T., Kuriya Y., Yamanishi Y. Comparison of inhibitory activities of donepezil and other cholinesterase inhibitors on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase *in vitro*. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 2000; 22: 609–613.
19. Rakonczay Z. Potencies and selectivities of inhibitors of acetylcholinesterase and its molecular forms in normal and Alzheimer's disease brain. *Acta Biol. Hung.* 2003; 54: 183–189.
20. Riepe M.W., Niemi W.N., Megow D., Ludolph A.C., Carpenter D.O. Mitochondrial oxidation in rat hippocampus can be preconditioned by selective chemical inhibition of succinic dehydrogenase. *Exp. Neurol.* 1996; 138: 15–21.
21. Takada Y., Yonezawa A., Kume T. i wsp. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection by donepezil against glutamate neurotoxicity in rat cortical neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003; 306: 772–777.
22. Tang X.C. Huperzine A (Shuangyiping): a promising drug for Alzheimer's disease. *Acta Pharmacol. Sin.* 1996; 17: 481–484.
23. Wiegand F., Liao W., Busch C. i wsp. Respiratory chain inhibition induces tolerance to focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 1999; 19: 1229–1237.
24. Zhou J., Fu Y., Tang X.C. Huperzine A and donepezil protect rat *phoeochromocytoma* cells against oxygen-glucose deprivation. *Neurosci. Lett.* 2001a; 306: 53–56.
25. Zhou J., Zhang H.Y., Tang X.C. Huperzine A attenuates cognitive deficits and hippocampal neuronal damage after transient global ischemia in gerbils. *Neurosci. Lett.* 2001b; 313: 137–140.