

Znaczenie cyklooksygenaz w neurotoksyczności peptydów amyloidu β w chorobie Alzheimerera

The role of cyclooxygenases in neurotoxicity of amyloid β peptides in Alzheimer's disease

Magdalena Cząkała, Joanna B. Strosznajder

Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie

Neurologia i Neurochirurgia Polska 2010; 44, 1: 65–79

Streszczenie

Przewlekłe procesy zapalne odgrywają istotną rolę w przebiegu choroby Alzheimerera (ChA). Dotychczas uważano, że rozwijają się one w odpowiedzi na zewnątrzkomórkowe agregaty peptydów amyloidu β ($A\beta$) odkładające się w mózgu chorych na ChA. Badania epidemiologiczne wykazały, że długotrwałe stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) zmniejsza ryzyko zachorowania na ChA. Leki te są inhibitorami cyklooksygenaz (COX), enzymów syntetyzujących eikozanoidy, główny składnik odpowiedzi zapalnej w organizmie. Najnowsze badania przyniosły dwa zaskakujące odkrycia: 1) toksyczną formą $A\beta$ nie są agregaty, lecz raczej oligomery $A\beta$, występujące zarówno wewnątrzkomórkowo, jak i zewnątrzkomórkowo; 2) aktywacja COX-2 zachodzi na wczesnych etapach rozwoju ChA i poprzedza powstawanie blaszek starczych oraz aktywację mikrogleju. Odkrycia te wskazują na możliwy udział COX w toksyczności peptydów $A\beta$ w komórkach nerwowych w I fazie ChA, a nie tylko w rozwoju odpowiedzi zapalnej w komórkach glejowych w zaawansowanym stadium choroby. Uzyskane wyniki wskazują na konieczność dalszych badań nad rolą COX w patogenezie/patomechanizmie ChA.

Słowa kluczowe: choroba Alzheimerera, cyklooksygenaza, zapalenie, amyloid β .

Abstract

In the course of Alzheimer's disease (AD), chronic inflammation is initiated by amyloid β ($A\beta$) peptide aggregates that extensively participate in neurodegeneration. Epidemiological studies have shown that long-term use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) reduces the risk of developing AD. NSAIDs are inhibitors of cyclooxygenases (COXs), enzymes involved in synthesis of eicosanoids, a major component of the inflammatory process. Recent studies have brought two new findings: 1) the toxic form of $A\beta$ is its intra- and extracellular oligomers, rather than aggregates; 2) COX-2 activation is an early event in AD, preceding plaque formation and microglia activation. This finding suggests that COX might participate in $A\beta$ toxicity in neurons in the early stage of AD independently of its role in the inflammatory reaction in glial cells in the advanced stage of AD. However, further studies on the role of COXs in the pathogenesis/pathomechanism of AD are needed.

Key words: Alzheimer's disease, cyclooxygenase, inflammation, amyloid β .

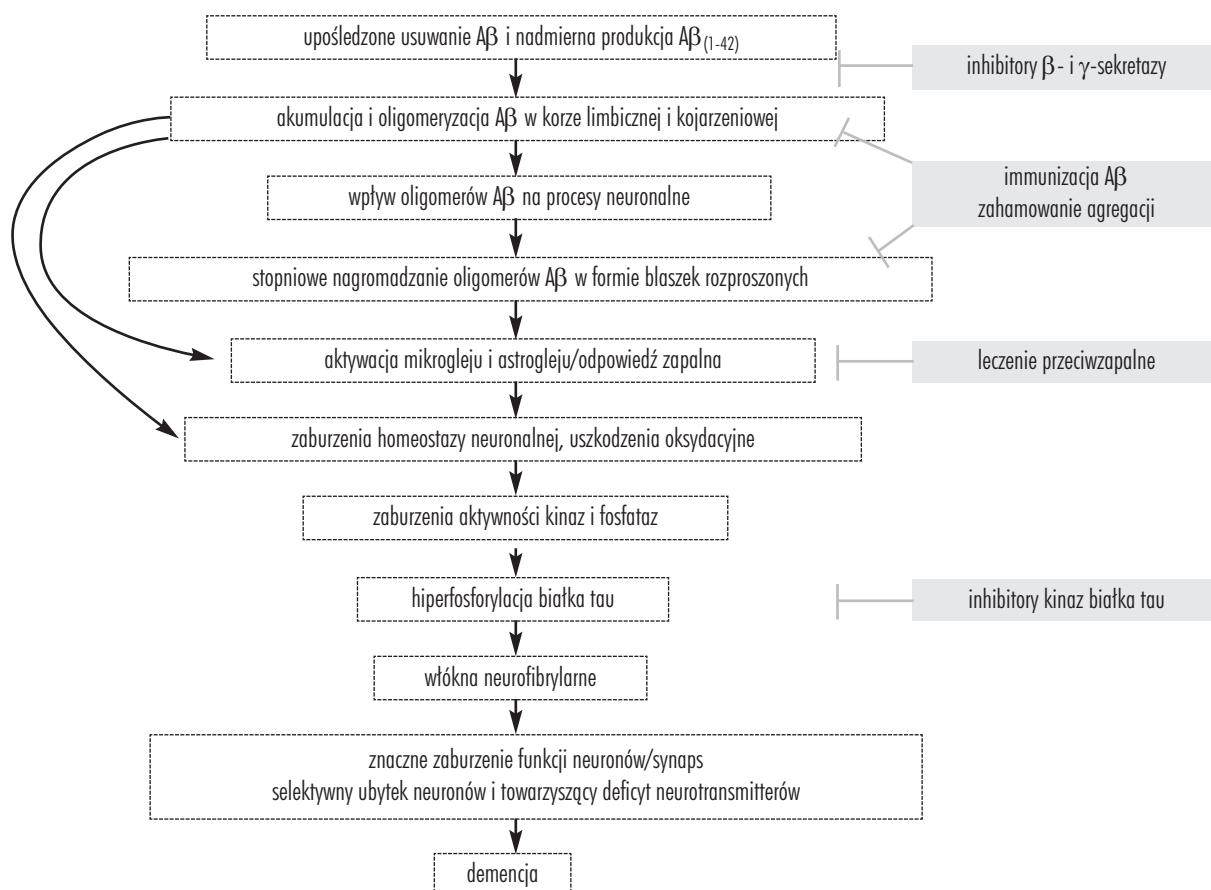
Adres do korespondencji: Joanna Strosznajder, Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa, tel. +48 22 608 64 14, faks +48 22 608 66 13, e-mail: joannas@cmdik.pan.pl
Pracę otrzymano: 6.07.2009; przyjęto do druku: 25.11.2009

Charakterystyka choroby Alzheimerera

Choroba Alzheimerera (ChA) to postępujące, nieodwracalne zwyrodnienie ośrodkowego układu nerwowego, z narastającym zespołem otępiennym, zespołem zaburzeń poznawczych, pamięci, osądu, podejmowania decyzji, orientacji i mowy [1]. Choroba Alzheimerera odpowiada za ok. 50% wszystkich przypadków otępienia. Jej przyczyna 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 (*familial Alzheimer's Disease* – FAD). Populacyjne badania genetyczne wykazały, że 5–10% wszystkich przypadków choroby stanowią zachorowania o podłożu rodzinnym [2].

Etiopatogeneza choroby Alzheimerera

Obecnie etiologia ChA nadal pozostaje niejasna. Uważa się, że na rozwój choroby może wpływać wiele czynników, a – jak wspomniano – tylko w nielicznych przypadkach są za to odpowiedzialne czynniki genetyczne. W mózgu chorych na ChA występują charakterystyczne zmiany morfologiczne. Do zmian tych zalicza się przede wszystkim blaszki starcze i inne formy złogów peptydów amyloidu β ($A\beta$) oraz zwyrodnienia włóknkowe (*neurofibrillary tangles* – NFT), zawierające hiperfosforylowane białka tau [3]. Od kilku lat dominuje pogląd, że kluczową rolę w patogenezie ChA odgrywa $A\beta$ [4], a procesy odpowiedzialne za jego nagromadzenie i kaskada zdarzeń prowadząca do uwalniania i oligomeryzacji $A\beta$ i do uszkodzenia zakończeń synaptycznych oraz obumierania neuronów mogą być punktem uchwytu dla skutecznego leczenia tej choroby (ryc. 1.). Należy zaznaczyć, że poza hipotezą amy-



Ryc. 1. Znaczenie peptydów $A\beta$ w patogenezie choroby Alzheimerera z zaznaczonymi miejscami uchwytu dla leków wg Hardy i Selkoe [4]

Fig. 1. The role of amyloid beta in the pathogenesis of Alzheimer's disease with the points for therapeutic intervention according to Hardy and Selkoe [4]

loidową ChA istnieją inne, przede wszystkim hipoteza związana z nadmierną fosforylacją białka tau. Kolejne hipotezy są związane z zaburzeniem homeostazy jonów wapnia oraz z zaburzeniem funkcji kinaz cyklu komórkowego. Zwolennicy hipotezy patogenezy ChA zależnej od nadmiernej fosforylacji białka tau w dalszym ciągu uważają, że jest to zjawisko fundamentalne i zapoczątkujące zmiany w mózgu. Można również przyjąć, że te dwa procesy patobiochemiczne toczą się przez dłuższy czas niezależnie od siebie.

Peptydy A β występują również w zdrowym mózgu [5] i są uwalniane w wyniku proteolizy białka prekursorowego amyloidu β (β -amyloid precursor protein – APP). Gen kodujący APP jest zlokalizowany na dłuższym ramieniu chromosomu 21. Białko prekursorowe amyloidu β to białko błonowe, obecne w licznych komórkach, również w nieneuronalnych, choć w neuronach jego zawartość jest stosunkowo duża. W mózgu występują 3 izoformy białka APP o długości 695, 751 oraz 770 aminokwasów, a główną izoformą neuronalną jest 695APP.

W porównaniu z normalnie starzejącym się mózgiem, w mózgu osób chorych na ChA obserwuje się większe 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 [6]. Amyloid 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 neuryty i aktywowany mikroglej oraz są otoczone przez reaktywne astrocyty [7]. W blaszkach starczych wykryto także inne białka, m.in. apolipoproteiny E i J, białko tau, α_1 -antychymotrypsynę, α_2 -makroglobulinę, ubikwitynę, α -synukleinę, białka komplementu, witro-nektyny, gelsoliny i cystatyny oraz wielocukry.

Najnowsze badania wskazują, że główną neurotoksyczną formą A β nie są zewnątrzkomórkowe, nierozpuszczalne blaszki amyloidowe, lecz raczej rozpuszczalne oligomery A β zwane profibrylami, gromadzące się wewnątrzkomórkowo oraz zewnątrzkomórkowo. Stwierdzono, że oligomery A β powodują zaburzenia pamięci poprzedzające wystąpienie zmian morfologicznych [8–11], a stężenie rozpuszczalnego A β koreluje ze stopniem zaburzeń poznawczych u chorych na ChA [12]. U zwierząt transgenicznych nasilone tworzenie blaszek amyloidowych z jednoczesnym zmniejszeniem

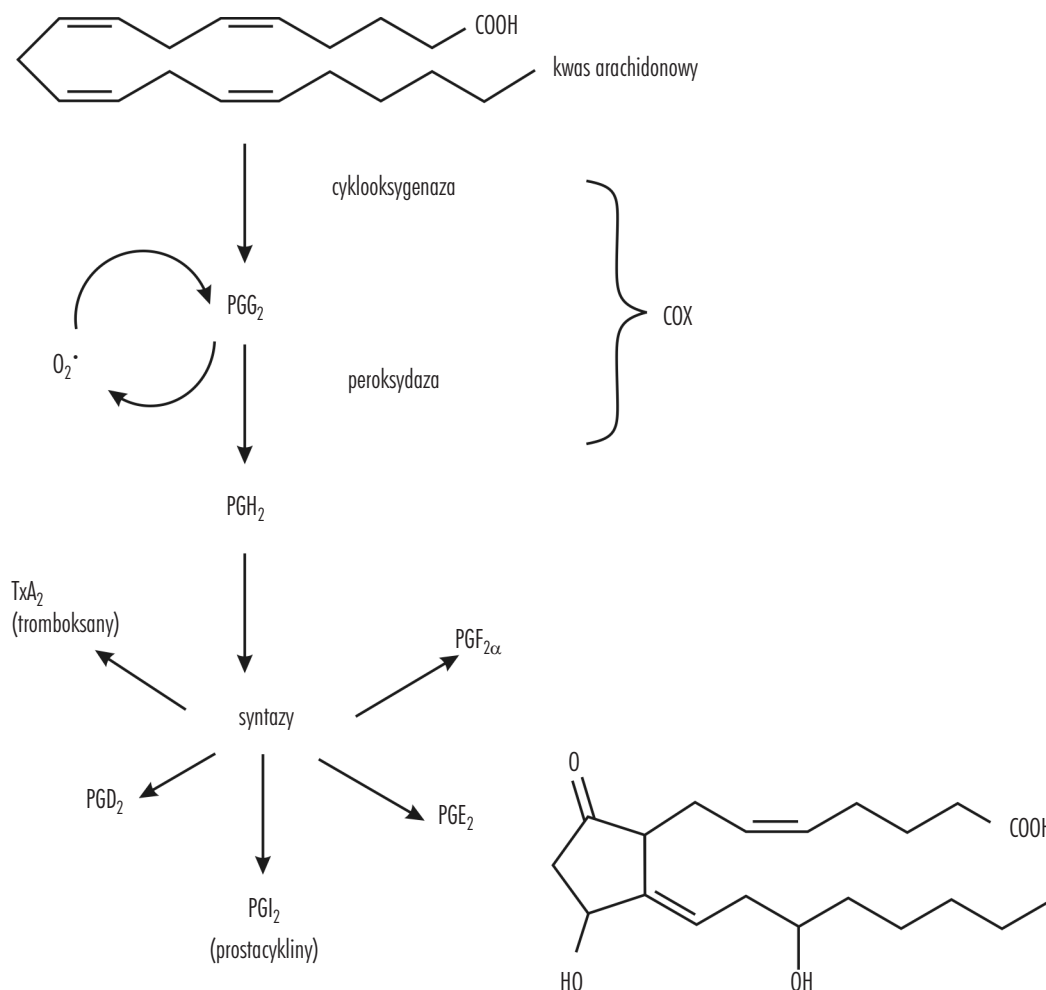
ilości oligomerów wiąże się ze zmniejszeniem zaburzeń behawioralnych [13]. To właśnie oligomery, a nie monomery lub agregaty A β zaburzają plastyczność synaptyczną mózgu [14] i powodują upośledzenie pamięci [10] oraz ubytek synaps [15], przy czym największą toksyczność przypisuje się trimerom A β [11].

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

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 ChA i inne choroby neurodegeneracyjne występuje reakcja zapalna o charakterze przewlekłym [16]. Wydaje się, że patologiczne, nierozpuszczalne złoże A β rozpoznawane są jako obcy materiał i powodują aktywację komórek odpowiedzi zapalnej [17]. W przebiegu zapalenia w ośrodkowym układzie nerwowym zaangażowane są głównie komórki mikrogleju i astrocyty, których nagromadzenie stwierdza się w okolicach złogów A β [18].

Liczne badania wskazują na istotną rolę zapalenia w rozwoju ChA. Stwierdzono, że osoby, w mózgu których nie wykryto cech zapalenia, nie wykazują także objawów klinicznych choroby, mimo obecności patologicznych złogów A β [19]. Badania genetyczne wskazują, że polimorfizm niektórych genów prozapalnych może zwiększać ryzyko wystąpienia ChA. W badaniach *in vitro* potwierdzono, że A β może aktywować mikroglej i astrocyty [20,21]. Podawanie myszom inhibitora syntezy cytokin (MW01-5-188WH) zapobiegało uszkodzeniu synaps w hipokampie i znosiło zaburzenia behawioralne wywołane wlewem A β (1–42), ale nie miało wpływu na liczbę blaszek amyloidowych [22]. Obserwowana neuroprotekcja była więc związana wyłącznie z hamowaniem aktywacji odpowiedzi zapalnej gleju. Najnowsze badania prowadzone na myszach transgenicznych ze 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 [23].



Ryc. 2. Cyklooksygenazy (COX) w metabolizmie kwasu arachidonowego

Fig. 2. Cyclooxygenases (COX) in arachidonic acid metabolism

Znaczenie cyklooksygenaz w patogenezie choroby Alzheimera i w procesach zapalnych w mózgu

Rolę zapalenia w patogenezie ChA potwierdza fakt, że długotrwałe stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) istotnie zmniejsza ryzyko zachorowania na tę chorobę [24–26]. Niesteroidowe leki przeciwzapalne to grupa leków, których mechanizm działania polega na hamowaniu aktywności cyklooksygenaz (COX), 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.

Charakterystyka cyklooksygenaz

Cyklooksygenazy wykazują podwójną aktywność katalityczną: dioksygenazy (cyklooksygenazy), która odpowiada za syntezę prostaglandyny G_2 (PGG_2) z kwasu arachidonowego, oraz peroksydazy, która odpowiada za redukcję PGG_2 do prostaglandyny H_2 (PGH_2) (ryc. 2.). Prostaglandyna H_2 jest następnie przekształcana przez swoje dla określonych tkanek syntazy lub izomerazy do kolejnych prostaglandyn (PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$), prostacyklin (PGI_2) oraz tromboksanów (TxA_2). Wszystkie te produkty (prostanoidy) wykazują silne działanie autokryne i parakryne poprzez stymulację swoistych receptorów: EP1, EP2, EP3 i EP4 [27]. Produkty COX wywierają różnorodne, często przeciwstawne działania, swoje dla

poszczególnych tkanek i narządów. Jak wspomniano powyżej, są one silnymi mediatorami zapalenia [28], jednak mogą działać zarówno prozapalnie, jak i przeciwzapalnie, w zależności od rodzaju czynnika wywołującego zapalenie oraz rodzaju syntetyzowanego prostanoidu, a także profilu receptorów prostanoidowych w danym typie komórek [28].

Znane są 3 izoformy COX: COX-1, COX-2 i COX-3. W patogenezie ChA możliwy jest udział zarówno COX-1, jak i COX-2, jednak COX-2 wydaje się odgrywać ważniejszą rolę [29].

COX-1 charakteryzuje się konstytutywną ekspresją w tkankach i odpowiada za syntezę prostaglandyn zaangażowanych w utrzymanie homeostazy komórkowej [30]. COX-2 jest izoformą indukowaną, której podstawowa ekspresja w ludzkich tkankach jest mała, natomiast ulega indukcji w przebiegu odpowiedzi immunologicznej, w reakcji na bodźce zewnątrzkomórkowe i wewnątrzkomórkowe [31]. Wzrost ekspresji genu *COX-2* powodują m.in. cytokiny prozapalne, mitogeny i czynniki wzrostu. Z kolei glikokortykoidy i niektóre cytokiny hamują ekspresję genu *COX-2* (tab. 1.) [32–34]. Ponadto, sugeruje się, że prostaglandyny uwalniane w przebiegu zapalenia aktywują ekspresję genu *COX-2* w drodze pozytywnego sprzężenia zwrotnego. Wskazuje na to m.in. obniżenie poziomu aktywności tego enzymu przez indometacynę (nieselektywny inhibitor COX), jak również nasilenie ekspresji genu *COX-2* przez PGE_2 w wielu typach komórek [33].

COX-3 to niedawno odkryta izoforma COX, powstała z genu *COX-1* w wyniku alternatywnego składowania. Znaczenie COX-3 nie jest dotąd poznane, niepewne jest także, czy jest to enzym w pełni funkcjonalny [35].

Występowanie i znaczenie cyklooksygenazy w mózgu

W niektórych tkankach i narządach COX-2 ulega konstytutywnej ekspresji. Należy do nich tkanka nerwowa [31,36]. 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 swoiste populacje neuronów [37].

W mózgu szczura COX-2 występuje w neuronach hipokampa i kory mózgowej, natomiast COX-1 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 odgrywa

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

Table 1. Factors influencing the expression of the *COX-2* gene

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 glutaminianergicznego typu N-metylo-D-asparaginianowego	

ważną rolę w fizjologicznej funkcji neuronów, może również brać udział w procesach neurotoksyczności.

W hipokampie człowieka główną izoformą jest COX-2 [37]. Występuje ona 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 [38] i mogą być uwalniane do przestrzeni międzysynaptycznej [39]. Postuluje się rolę tego enzymu w procesach plastyczności, pamięci i uczenia [40]. Sugeruje się także, że PGE_2 wytwarzana przez COX wpływa na plastyczność synaptyczną poprzez modulację przekazywania adrenergicznego, noradrenergicznego i glutaminergicznego i/lub remodelowanie aktyny cytoszkieletu oraz zmiany pobudliwości błony [30]. Stwierdzono, że COX-2 jest zaangażowana w inicjację długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (*long-term potentiation* – LTP), uważanego za podstawę procesu uczenia się i pamięci na poziomie komórkowym [41]. Podwyższona aktywność synaptyczna, związana z LTP, nasila ekspresję COX-2 [42]. W trakcie indukcji LTP, prostaglandyny (PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ i PGD_2) modulują aktywność synaptyczną, wywierając działanie parakrynnie poprzez receptory presynaptyczne i postsynaptyczne oraz działanie autokrynnie jako neuronalne i glejowe przekaźniki drugorzędowe [42]. 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 skutkowało odwróceniem tego efektu [43]. Inhibitory COX-2 powodowały także zmniejszenie pobudliwości błon w neuronach piramidowych warstwy CA1 hipokampa, czemu

także przeciwdziałało podanie PGE_2 . Zwiększanie pobudliwości błon przez PGE_2 było związane z zahamowaniem prądu jonów K^+ , co z kolei zwiększało napływ Ca^{2+} . Zahamowanie kinazy białkowej A i kinazy białkowej C (PKA i PKC) blokowało wpływ PGE_2 na pobudliwość błon [44].

Cyklooksygenaza może także wpływać na transkrypcję genów. Stwierdzono, że w trakcie stymulacji komórek nerwowych, COX-2 ulega translokacji do otoczki jądrowej [45]. Powstała PGE_2 oddziałuje z jądrowymi receptorami EP1, a przez to wpływa na mobilizację wapnia i transkrypcję genów [46].

Komórki mikrogleju zawierają głównie COX-1, ale pod wpływem różnorodnych czynników, takich jak toksyna bakterii Gram-ujemnych, lipopolisacharyd (LPS), mogą syntezować także COX-2 [35]. Aktywność COX może mieć znaczenie dla procesu aktywacji komórek mikrogleju; wykazano, że indometacyna zmniejsza aktywację mikrogleju po domózgowym wlewie $\text{A}\beta$ u szczurów [47], a osoby leczone za pomocą NLPZ wykazują zmniejszony odsetek aktywowanego mikrogleju w mózgu [48].

W piśmiennictwie istnieją rozbieżne dane dotyczące ekspresji COX w astrocytach. Według Hoozemansa i wsp. [49] astrocyty nie syntezują COX-1 ani COX-2 zarówno w mózgu kontrolnym, jak i u chorych na ChA. Inni badacze obserwowali jednak ekspresję COX-2 w astrocytach mózgu ludzi zmarłych na skutek niedokrwienia [50], a także w mózgu szczura, przy czym obserwowano jego indukcję pod wpływem kainianu [51]. W badaniach *in vitro* wykazano pobudzenie ekspresji COX-2 w astrocytach pod wpływem LPS, $\text{TNF-}\alpha$ estrów forbolu i bFGF [50,52], a także pod wpływem peptydów $\text{A}\beta$ [53]. Stwierdzono także, że PGE_2 może pośredniczyć w uwalnianiu glutaminy z astrocytów podczas stymulacji receptorów AMPA i kainianowych poprzez wpływ na stężenie wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} [54].

Badania prowadzone na myszach znokautowanych (*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 glutaminy u tych zwierząt [55]. 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 [56].

Prostaglandyny odgrywają istotną rolę w regulacji krążenia mózgowego krwi. PGD_2 i PGI_2 działają roz-

kurczająco na naczynia, podczas gdy $\text{PGF}_{2\alpha}$ i TXA_2 powodują skurcz naczyń, przy czym efekt ten zależy od pobudzenia odpowiednich receptorów. Wiadomo, że istnieje wiele typów receptorów dla prostaglandyn, które mają różne szlaki przekazywania sygnału i mogą ulegać koekspresji [57].

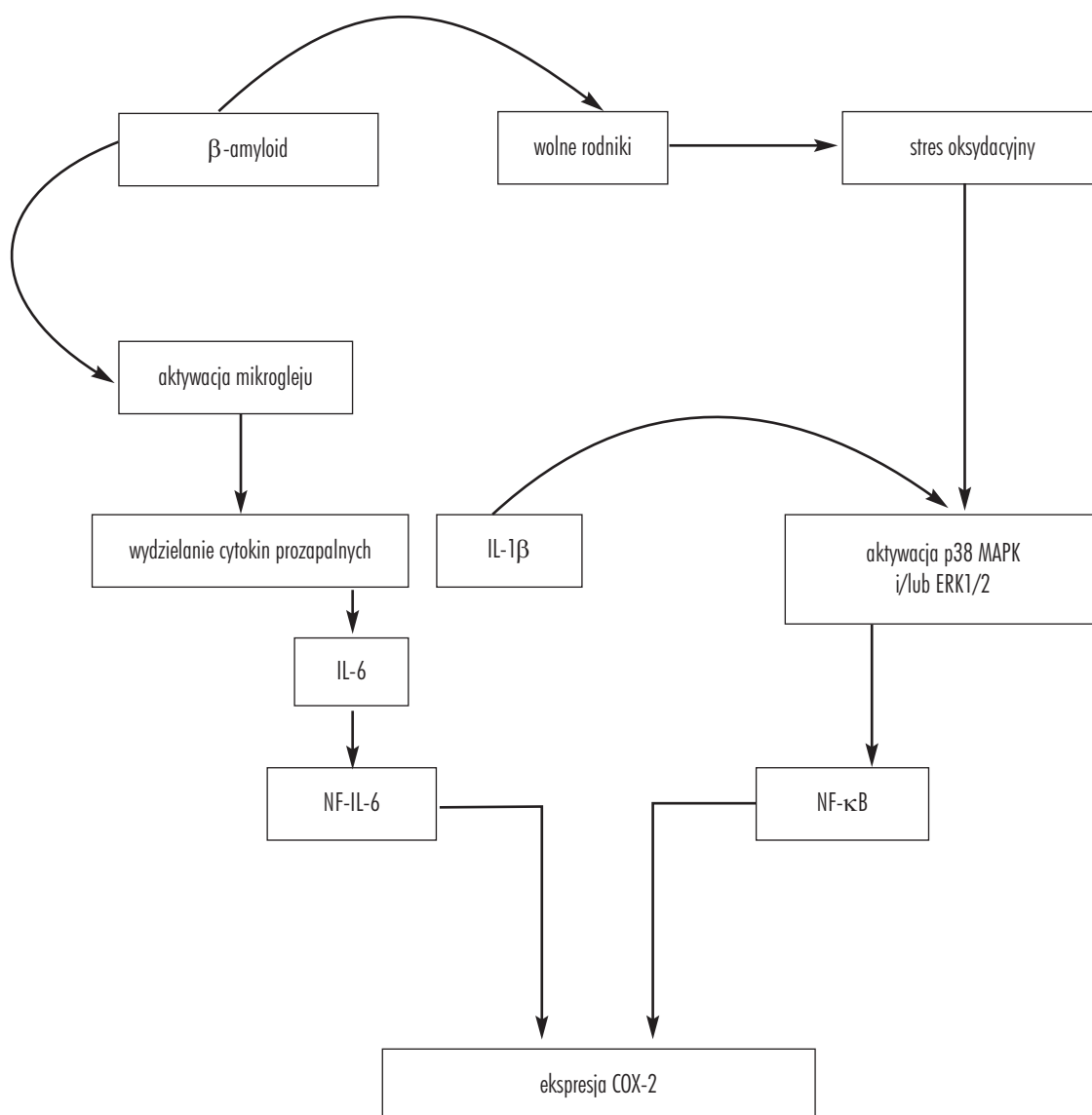
Cyklooksygenazy, szczególnie COX-2, odgrywają także kluczową rolę w procesie transmisji bólu w mózgu i rdzeniu kręgowym [58] oraz w procesie indukcji gorączki [59].

Rola cyklooksygenazy 2 w patogenezie choroby Alzheimera

Uważa się, że neuronalna COX-2 bierze udział w rozwoju procesów neurodegeneracyjnych w ChA. 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 [60]. Ponadto, ponad 20 badań epidemiologicznych wskazuje na skuteczność NLPZ w zapobieganiu ChA [61,62]. W mózgu osób chorych na ChA obserwowano zwiększenie ekspresji COX-2 w neuronach, głównie w hipokampie oraz w korze czołowej [50,63,64]. Dotychczas uważano, że indukcja COX-2 w mózgu chorych na ChA jest zjawiskiem wtórnym, związanym z rozwojem zapalenia wywołanego przez złogi peptydów $\text{A}\beta$ i następuje pod wpływem uwalnianych przez mikroglej cytokin, m.in. interleukiny (IL) 1β . Indukcję COX-2 i zwiększenie syntezy PGE_2 pod wpływem IL- 1β zaobserwowano *in vitro* w komórkach *neuroblastoma* i *neuroglioma* [50]. Stwierdzono udział p38 MAPK w przekazywaniu tego sygnału [65].

Najnowsze badania wskazują jednak, że ekspresja COX-2 w przebiegu ChA może być indukowana także bezpośrednio pod wpływem peptydów $\text{A}\beta$. Zjawiska prowadzące do ekspresji COX-2 obrazuje ryc. 3. Badania *in vitro* prowadzone na komórkach PC12 wykazały, że $\text{A}\beta$ może indukować ekspresję COX-2 przy udziale p38 MAPK lub ERK1/2 oraz NF- κB [66]. Aktywacja szlaku p38 MAPK i ERK1/2 jest prawdopodobnie odpowiedzią na stres oksydacyjny spowodowany działaniem $\text{A}\beta$. Najnowsze badania sugerują, że wzrost poziomu ekspresji genu COX-2 w mózgu następuje w początkowych stadiach choroby, natomiast liczba neuronów wykazujących ekspresję COX-2 maleje wraz z jej postępem [67,68].

Obniżenie ekspresji genu COX-2 koreluje z aktywacją mikrogleju i astrocytów, co wskazuje, że indukcja



Ryc. 3. Regulacja ekspresji genu *COX-2* w chorobie Alzheimera

Fig. 3. Regulation of the *COX-2* gene expression in Alzheimer's disease

COX-2 nie jest następstwem reakcji zapalnej, lecz raczej ją poprzedza [69]. Podobnie, stężenie PGE_2 w płynie mózgowo-rdzeniowym jest zwiększone u pacjentów z łagodnymi zaburzeniami pamięci i zmniejsza się wraz z narastaniem otępienia [70]. Stwierdzono, że PGD_2 i PGE_2 syntetyzowane przez COX pod wpływem $\text{A}\beta_{(1-42)}$ powodują zmiany w neuronach, które prowadzą do aktywacji mikrogleju i niszczenia neuronów w kokulturach [71]. 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 $\text{A}\beta_{(1-42)}$ nie na-

bywa właściwości neurotoksycznych, natomiast zwiększa się jego zdolność do fagocytozy peptydów $\text{A}\beta$ [72].

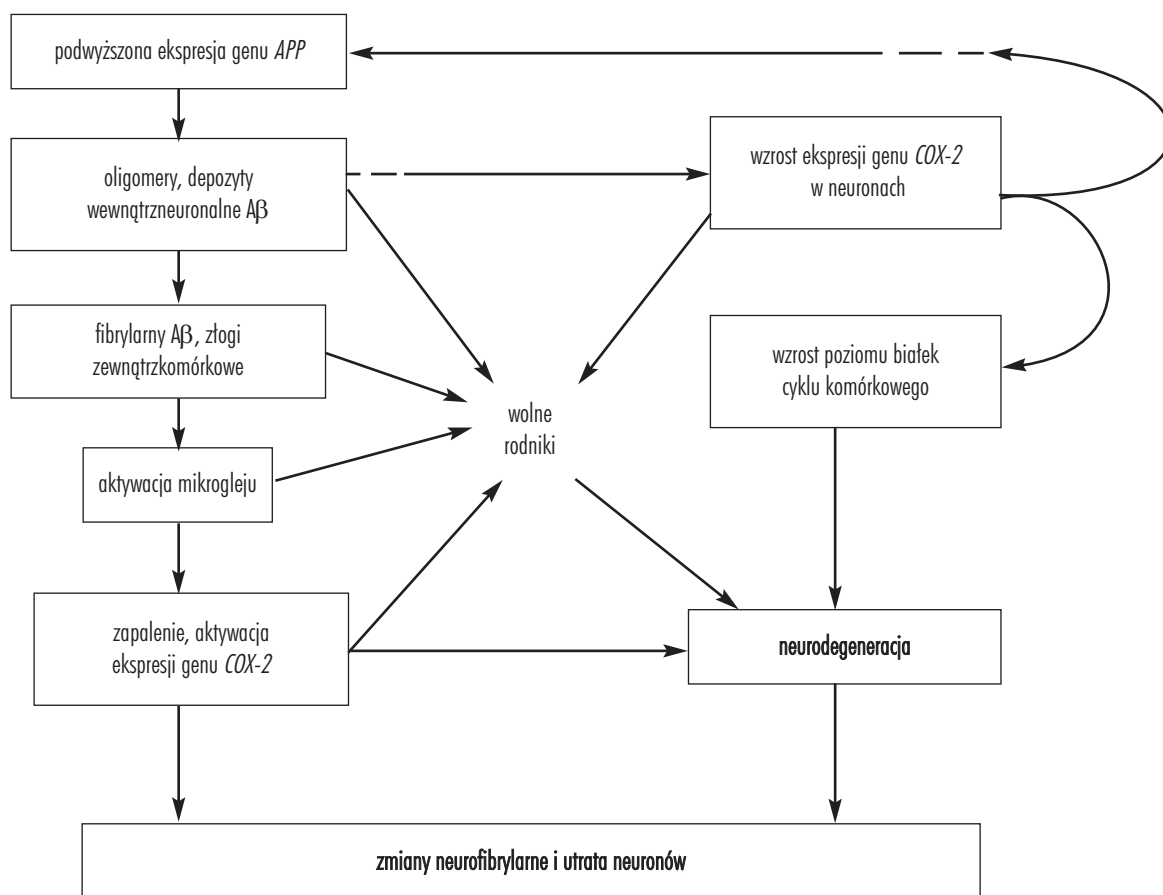
Poza wtórną aktywacją COX-2 w przebiegu odpowiedzi zapalnej postuluje się zatem bezpośrednią rolę neuronalnej COX-2 w neurotoksyczności peptydów $\text{A}\beta$ oraz udział w aktywacji tejże odpowiedzi. Mogłoby to mieć znaczenie we wczesnych stadiach choroby, jeszcze przed powstaniem zewnątrzkomórkowych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

Mechanizm uczestnictwa COX-2 w śmierci neuronów w przebiegu ChA tłumaczy kilka hipotez. Zaobserwowano, że COX-2 może nasilać uwalnianie peptydów A β poprzez wpływ na stężenie 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 PGE₂. Komórki hCOX-2 syntezowały dwa razy więcej APP w porównaniu z komórkami nietransfekowanymi, czemu towarzyszyło zwiększone stężenie A β i wydzielniczej formy APP (sAPP). Indometacyna i selektywny inhibitor COX-2 (JTE-522) obniżały ekspresję genu *APP* i w konsekwencji uwalnianie A β i sAPP [73].

Kolejne badania prowadzone na ludzkich komórkach *neuroglioma* wykazały, że nadekspresja genu *hCOX-2* powoduje zwiększenie syntezy peptydów A β , przy czym jest to spowodowane wpływem PGE₂ na aktywność γ -sekreazy. Ibuprofen (nieselektywny inhibitor COX)

zapobiegał nadprodukcji A β w tym modelu [74]. Badania *in vivo* na mysim modelu ChA potwierdziły, że neuronalna nadekspresja genu dla hCOX-2 może zwiększać uwalnianie peptydów A β oraz odkładanie blaszek starczych, bez jednoczesnej nadekspresji APP [75]. Dane te wskazują na wpływ aktywności COX-2 na metabolizm APP i uwalnianie A β z białka prekursorowego. Należy jednak zauważyć, że zależność pomiędzy aktywnością COX a akumulacją peptydów A β i powstawaniem blaszek starczych nie została ostatecznie udowodniona. Badania przeprowadzone na mysim modelu ChA nie wykazały wpływu nadekspresji genu *COX-2* na akumulację peptydów A β , natomiast wykazały związek między aktywnością COX a zaburzeniem zdolności poznawczych tych zwierząt [76].

Oprócz sugerowanego wpływu COX-2 na ilość uwalnianego A β postuluje się, że enzym ten może mieć udział w toksyczności zarówno zewnątrzkomórkowych, jak i wewnątrzkomórkowych złogów A β (ryc. 4.).



Ryc. 4. Znaczenie COX-2 w stresie oksydacyjnym, neurodegeneracji i śmierci neuronów w chorobie Alzheimera wg Hoozemans i wsp. [69]

Fig. 4. The role of COX-2 in oxidative stress, neurodegeneration and neuronal death in Alzheimer's disease according to Hoozemans et al. [69]

Hipoteza ta znajduje potwierdzenie w wielu danych doświadczalnych, jednak mechanizm wpływu COX-2 na neurotoksyczność peptydów $A\beta$ nie został wyjaśniony.

Amyloid β wytwarzany w zwiększonej ilości na skutek nadekspresji APP ulega oligomeryzacji, a następnie dalszej agregacji prowadzącej do powstania depozytów i zewnątrzkomórkowych złogów $A\beta$. Złogi $A\beta$ aktywują mikroglej i powodują rozwój zapalenia, w tym aktywację COX-2. Wewnątrzkomórkowe formy $A\beta$ mogą również bezpośrednio powodować zwiększenie 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 $A\beta$, 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 $A\beta$ (1-42) [77]. Z kolei działanie na komórki PC12 neurotoksycznym fragmentem $A\beta$ 25-35 powodowało zwiększenie ekspresji COX-2 i zwiększenie syntezy PGE_2 oraz aktywację śmierci na drodze apoptozy. Selekttywne zahamowanie COX-2 zapobiegało śmierci komórek w tych warunkach doświadczalnych. Stwierdzono również, że PGE_2 nasila cytotoksyczne działanie peptydów $A\beta$ na komórki PC12 [67]. Badania wykazały również ochronne działanie indometacyny w komórkach *neuroblastoma* na zaburzenia wywołane przez peptydy $A\beta$, 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 $A\beta$. Świadczy to o udziale kwasu arachidonowego oraz jego metabolitów w toksyczności $A\beta$. W badaniach *in vivo* na mysim modelu ChA potwierdzono, że nadekspresja genu dla COX-2 zwiększa neurotoksyczność $A\beta$, czemu zapobiega zahamowanie COX-2.

Nie jest jasne, w jaki sposób COX-2 zwiększa toksyczność peptydów $A\beta$. 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 [79,80].

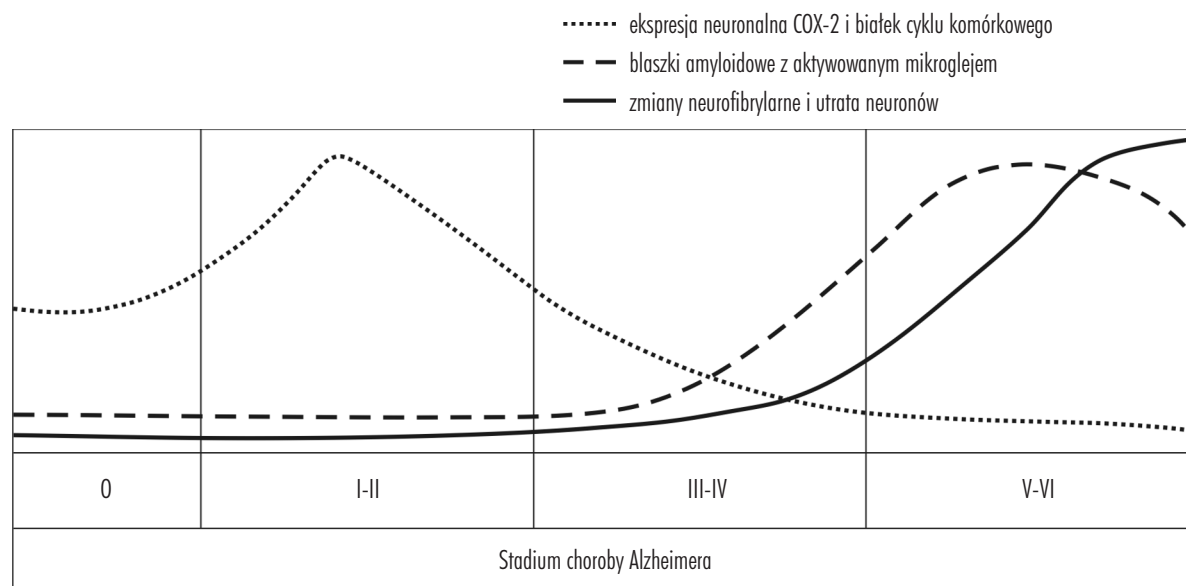
Cyklooksygenaza 2 może także nasilać toksyczność oligomerów $A\beta$. Stwierdzono, że aktywność peroksydazowa COX-2 może przyczyniać się do tworzenia hete-

rooligomerów β -amyloidu i COX-2 [81]. Ponadto, wiadomo, że w środowisku wodnym możliwa jest konwersja PGH_2 do lewuglandyn E_2 i D_2 . Związki te są ketoaldehydami o dużej aktywności chemicznej i przyłączają się do grup aminowych białek. W ten sposób może dochodzić m.in. do modyfikacji struktury $A\beta$ i tworzenia jego neurotoksycznych oligomerów [82]. Lewuglandyny mogą reagować także z innymi białkami. Liczba zmodyfikowanych białek w hipokampie koreluje ze stopniem zaawansowania choroby [83]. 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 [84].

W badaniach *in vivo* zaobserwowano zaburzenia poziomu białek cyklu komórkowego w mózgu, m.in. zmniejszone stężenie białka p18 (inhibitor cyklu komórkowego) [78]. Stwierdzono, że zaburzeniom poziomu tego białka zapobiega zahamowanie COX-2 [85]. Nieprawidłowości w poziomie białek kontrolujących przebieg cyklu obserwuje się także w mózgu osób chorych na ChA [86]. W obszarach mózgu uszkodzonych w przebiegu choroby wykazano m.in. podwyższony poziom stężenia białek cyklu komórkowego: cyklin B, D, E oraz kinaz cyklinozależnych (CDK-4, CDK-5, CDK-2) [87]. Zaburzenia te korelują ze zmianami poziomu ekspresji COX-2 [68,86,87]. 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) [78]. Maksymalne zmiany w ekspresji COX-2 i w poziomie białka cyklu komórkowego pRb w neuronach stwierdzono we wczesnych stadiach ChA [54,88], stąd przypuszczenie, że COX-2 i białka cyklu komórkowego są zaangażowane w odpowiedź na wewnątrzneuralny $A\beta$, zanim powstaną złogi zewnątrzkomórkowe (ryc. 5.).

Inhibitory cyklooksygenazy w chorobie Alzheimera

Obecnie, na podstawie wyników przeprowadzonych badań epidemiologicznych, uważa się, że NLPZ, których główny mechanizm działania polega na hamowaniu COX, zmniejszają ryzyko zachorowania na ChA [62,88-93]. W badaniach tych porównywano częstość występowania ChA w całej populacji oraz w populacji osób przyjmujących przewlekle NLPZ (np. z powodu



Ryc. 5. Zmiany w mózgu w przebiegu stadiów choroby Alzheimera wg Hoozemans i wsp. [69]

Fig. 5. Alterations in the brain during stages of Alzheimer's disease according to Hoozemans et al. [69]

reumatoidalnego zapalenia stawów). W badaniu Rotterdam otrzymano odsetek 1,4% chorych na ChA w grupie pacjentów stosujących NLPZ w porównaniu z 2,5% w całej badanej populacji [94]. Metaanaliza wyników 17 badań z różnych ośrodków potwierdziła skuteczność NLPZ w zmniejszaniu ryzyka zachorowania na ChA [62,63]. Badania *post mortem* wykazały, że NLPZ zmniejszają nasilenie procesów zapalnych w mózgu chorych na ChA [95].

Mechanizm ochronnego działania NLPZ nie został 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 zmniejszaniu ryzyka zachorowania na ChA. Dotychczas stwierdzono, że niektóre leki z tej grupy mogą bezpośrednio wpływać na wytwarzanie A β . Dla przykładu, ibuprofen, flurbiprofen, indometacyna i sulindak obniżały stężenie A β w hodowlach komórkowych, a także w mózgu zwierząt transgenicznych nawet o 80%. W przypadku naproksenu, celekoksylu i kwasu acetylosalicylowego nie obserwowano takiego działania [96,97]. Mechanizm tego zjawiska może być związany z hamowaniem γ -sekreazy [98] lub β -sekreazy [99]. Stwierdzono także, że NLPZ mogą wpływać na proces formowania włókien amyloidowych [100]. Wiadomo również, że mogą one aktywować receptory PPAR. Jest to grupa receptorów jądrowych – czynników transkryp-

cyjnych, które hamują transkrypcję genów prozapalnych [101]. Stwierdzono, że agoniści tych receptorów hamują ekspresję IL-6 i TNF- α oraz COX-2 w hodowlach komórkowych [102].

Wyniki badań mających potwierdzić skuteczność NLPZ u pacjentów z już rozpoznaną ChA nie są jednoznaczne. W badaniu Baltimore porównano 32 pacjentów stosujących NLPZ ze 177 niestosującymi tych leków. Po roku trwania badania stwierdzono wolniejszy rozwój choroby u osób leczonych za pomocą NLPZ [103]. Badania kliniczne mające potwierdzić korzystny wpływ konkretnych leków wykazały, że różnią się one między sobą skutecznością. Korzystne efekty udało się udowodnić w przypadku podawania indometacyny. Badania przeprowadzone na 28 chorych na ChA wykazały, że stosowanie indometacyny hamuje postęp choroby (badanie trwające 6 miesięcy, prowadzone metodą podwójnie ślepej próby z grupą kontrolną otrzymującą placebo) [104]. W innych badaniach dowiedziono, że także diklofenak spowalnia rozwój choroby [105]. Najnowsze badania drugiej fazy R-flurbiprofenu potwierdziły skuteczność tego związku w leczeniu łagodnej ChA, lecz nie wykazały poprawy u pacjentów ze średnio zaawansowaną chorobą [106]. W próbach klinicznych nie sprawdziły się natomiast: rofekoksyl, naproksen [107], celekoksyl [108], a także prednizon, mający inny mechanizm działania przeciwzapalnego [109].

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 taka mogła być skuteczna. Podczas gdy dane epidemiologiczne dotyczą populacji osób przyjmujących NLPZ przed pojawieniem się pierwszych objawów klinicznych choroby, badania lekowe prowadzone są na chorych z jej zaawansowaną postacią. Wydaje się, że terapia przeciwzapalna mogłaby być skuteczna w przypadku profilaktycznego jej zastosowania u osób z dużym ryzykiem rozwoju ChA. Dotychczas nie przeprowadzono badań, które potwierdziłyby tę hipotezę, ponieważ stwierdzono, że NLPZ cechują się dużą kardiotoxycznością. Niemniej jednak obecnie trwa intensywna debata nad możliwością ich stosowania w tym celu [110,111]. Najnowsze metaanalizy badań klinicznych z użyciem celekoksylu [112–114] lub niselektywnych NLPZ [115] nie potwierdziły zwiększonego ryzyka wystąpienia uszkodzenia serca lub 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 ChA, zanim w mózgu pojawią się zewnątrzkomórkowe złogi $A\beta$, a także przed wystąpieniem odpowiedzi zapalnej [68–70]. Istotną rolę mogą tu odgrywać oligomery $A\beta$ nagromadzające się wewnątrz- i zewnątrzkomórkowo [8–11].

Kolejnym aspektem, który trzeba wziąć pod uwagę w analizie wyników badań epidemiologicznych, jest fakt, że były one prowadzone u chorych z przewlekłymi chorobami zapalnymi, takimi jak zapalenie kości i stawów, reumatoidalne zapalenie stawów czy zeszytniające zapalenie stawów kręgosłupa. Możliwe jest, że wystąpienie tych chorób jest negatywnie skorelowane z ryzykiem rozwoju ChA. Od niedawna zwraca się uwagę na wpływ procesów zapalnych przebiegających poza układem nerwowym na mózg. Sugeruje się, że zakażenia układowe mogą zmieniać profil cytokin w mózgu i nasilać odpowiedź immunologiczną, a przez to wpływać na postęp choroby [116–118]. Dlatego też korzystne działanie leków przeciwzapalnych może być związane ze zmianą profilu cytokin w mózgu i zapobieganiem aktywacji odpowiedzi zapalnej przez $A\beta$.

Pomimo licznych niejasności nadal wiąże się duże nadzieje z terapią przeciwzapalną w ChA. Obecnie poszukuje się nowych substancji, które działałyby selektywnie na COX-2, a przy tym byłyby lepiej tolerowane od obec-

nie dostępnych preparatów. Trwające badania koncentrują się na roli PGE_2 i jej specyficznym działaniu przez aktywację receptorów EP1, EP2 i EP4 [120–122]. Poszukuje się także innych punktów uchwytu dla tych leków, takich jak PLA_2 , receptory PPAR, NF- κ B i lipooksygenazy (*peroxisome proliferator-activated receptor*).

Niewątpliwie dotychczasowy stan wiedzy jest niewystarczający i wymaga dalszych badań dotyczących roli COX i różnych eikozanoidów, w tym przede wszystkim PGE_2 , w warunkach fizjologicznych i patologicznych, znaczenia odpowiedzi zapalnej w patogenezie ChA, jak i szczegółowych mechanizmów działania NLPZ oraz syntezy bezpieczniejszych i lepiej tolerowanych leków przeciwzapalnych. Istnieją dane doświadczalne wskazujące na korzystne i prawdopodobnie bezpieczne działanie specyficznych inhibitorów dla receptorów dla PGE_2 .

Oświadczenie

Badania finansowane z działalności statutowej IMDiK PAN. Autorki zgłaszają brak konfliktu interesów.

Piśmiennictwo

1. Barcikowska M., Bilikiewicz A. Choroba Alzheimera w teorii i praktyce klinicznej. *Czelej*, Lublin 2004.
2. Selkoe D.J. Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann Intern Med* 2004; 140: 627–638.
3. Strosznajder J.B., Łałowski M.M. Peptydy amyloidu beta w mózgu starczym i w patomechanizmie choroby Alzheimera. W: Strosznajder J.B., Mossakowski J.M. (red.). *Mózg a starzenie. Upowszechnianie Nauki – Oświata „UN-O”*, Warszawa 2001.
4. Hardy J., Selkoe D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297: 353–356.
5. Seubert P., Vigo-Pelfrey C., Esch F. i wsp. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 1992; 359: 325–327.
6. Jarrett J.T., Berger E.P., Lansbury P.T. Jr. 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* 1993; 32: 4693–4697.
7. Selkoe D.J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 1991; 6: 487–498.
8. Lambert M.P., Barlow A.K., Chromy B.A. i wsp. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6448–6453.
9. Hartley D.M., Walsh D.M., Ye C.P. i wsp. Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci* 1999; 19: 8876–8884.

10. Lesné S., Koh M.T., Kotilinek L. i wsp. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 2006; 440: 352-357.
11. Townsend M., Shankar G.M., Mehta T. i wsp. Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J Physiol* 2006; 572: 477-492.
12. McLean C.A., Cherny R.A., Fraser F.W. i wsp. Soluble pool of Aβ amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999; 46: 860-866.
13. Cheng I.H., Searce-Levie K., Legleiter J. i wsp. Accelerating amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. *J Biol Chem* 2007; 282: 23818-23828.
14. Walsh D.M., Klyubin L., Fadeeva J.V. i wsp. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 2002; 416: 535-539.
15. Shankar G.M., Bloodgood B.L., Townsend M. i wsp. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 2007; 27: 2866-2875.
16. Johnson L.V., Leitner W.P., Rivest A.J. i wsp. The Alzheimer's A beta-peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 11830-11835.
17. Selkoe D.J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 2001; 81: 741-766.
18. Tuppo E.E., Arias H.R. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 289-305.
19. Lue L.F., Brachova L., Civin W.H. i wsp. Inflammation, A beta deposition, and neurofibrillary tangle formation as correlates of Alzheimer's disease neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 1083-1088.
20. Combs C.K., Karlo J.C., Kao S-C. i wsp. beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFα-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 2001; 21: 1179-1188.
21. Walker D.G., Lue L.F., Beach T.G. Gene expression profiling of amyloid beta peptide-stimulated human post-mortem brain microglia. *Neurobiol Aging* 2001; 22: 957-966.
22. Ralay Ranaivo H., Craft J.M., Hu W. i wsp. Glia as a therapeutic target: selective suppression of human amyloid-beta-induced upregulation of brain proinflammatory cytokine production attenuates neurodegeneration. *J Neurosci* 2006; 26: 662-670.
23. Yoshiyama Y., Higuchi M., Zhang B. i wsp. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 2007; 53: 337-351.
24. in 't Veld B., Ruitenberg A., Hofman A. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2001; 345: 1515-1521.
25. Etminan M., Gill S., Samii A. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ* 2003; 327: 128.
26. Szekely C.A., Thorne J.E., Zandi P.P. i wsp. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of Alzheimer's disease: a systematic review. *Neuroepidemiology* 2004; 23: 159-169.
27. Breyer R.M., Bagdassarian C.K., Myers S.A. i wsp. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 661-690.
28. Harris S.G., Padilla J., Koumas L. i wsp. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 2002; 23: 144-150.
29. Bazan N.G. Synaptic lipid signaling: significance of polyunsaturated fatty acids and platelet-activating factor. *J Lipid Res* 2003; 44: 2221-2233.
30. Smith W.L., Garavito R.M., DeWitt D.L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996; 271: 33157-33160.
31. O'Neill G.P., Ford-Hutchinson A.W. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett* 1993; 330: 156-160.
32. Kołaczowska E. Cyklooksygenazy. I. Rola w odczynie zapalnym. *Post Biol Kom* 2002; 29: 533-554.
33. Hinz B., Brune K. Cyclooxygenase-2 – 10 years later. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 367-375.
34. Consilvio C., Vincent A.M., Feldman E.L. Neuroinflammation, COX-2, and ALS – a dual role? *Exp Neurol* 2004; 187: 1-10.
35. Kis B., Snipes J.A., Busija D.W. Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315: 1-7.
36. Minghetti L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63: 901-910.
37. Yermakova A.V., Rollins J., Callahan L.M. i wsp. Cyclooxygenase-1 in human Alzheimer and control brain: quantitative analysis of expression by microglia and CA3 hippocampal neurons. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58: 1135-1146.
38. Horton E.W., Main I.H. Identification of prostaglandins in central nervous tissues of the cat and chicken. *Br J Pharmacol Chemother* 1967; 30: 582-602.
39. Ramwell P.W., Shaw J.E. Spontaneous and evoked release of prostaglandins from cerebral cortex of anesthetized cats. *Am J Physiol* 1966; 211: 125-134.
40. Shaw K.N., Commins S., O'Mara S.M. 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* 2003; 17: 2438-2446.
41. Yamagata K., Andreasson K.I., Kaufmann W.E. i wsp. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 1993; 11: 371-386.
42. Piomelli D. Eicosanoids in synaptic transmission. *Crit Rev Neurobiol* 1994; 8: 65-83.

43. Chen C., Magee J.C., Bazan N.G. Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E-2 signaling in hippocampal long-term synaptic plasticity. *J Neurophysiol* 2002; 87: 2851-2857.
44. Chen C., Bazan N.G. Endogenous PGE2 regulates membrane excitability and synaptic transmission in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 2005; 93: 929-941.
45. Morita I., Schindler M., Regier M.K. i wsp. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 1995; 270: 10902-10908.
46. Bhattacharya M., Peri K.G., Almazan G. i wsp. Nuclear localization of prostaglandin E2 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15792-15797.
47. Netland E.E., Newton J.L., Majocha L.E. i wsp. Indomethacin reverses the microglial response to amyloid beta-protein. *Neurobiol Aging* 1998; 19: 201-204.
48. Mackenzie I.R., Munoz D.G. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and Alzheimer-type pathology in aging. *Neurology* 1998; 50: 986-990.
49. Hoozemans J.J., Rozemuller A.J., Janssen I. i wsp. Cyclooxygenase expression in microglia and neurons in Alzheimer's disease and control brain. *Acta Neuropathol* 2001; 101: 2-8.
50. Maślińska D., Woźniak R., Kaliszek A. i wsp. Expression of cyclooxygenase-2 in astrocytes of human brain after global ischemia. *Folia Neuropathol* 1999; 37: 75-79.
51. Hirst W.D., Young K.A., Newton R. i wsp. Expression of COX-2 by normal and reactive astrocytes in the adult rat central nervous system. *Mol Cell Neurosci* 1999; 13: 57-68.
52. O'Banion M.K. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol* 1999; 13: 45-82.
53. Hüll M., Mülsch B., Akundi R.S. i wsp. Amyloid beta peptide (25-35) activates protein kinase C leading to cyclooxygenase-2 induction and prostaglandin E2 release in primary midbrain astrocytes. *Neurochem Int* 2006; 48: 663-672.
54. Bezzi P., Carmignoto G., Pasti L. i wsp. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 1998; 391: 281-285.
55. Iadecola C., Niwa K., Nogawa S. i wsp. 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* 2001; 98: 1294-1299.
56. Iadecola C., Sugimoto K., Niwa K. i wsp. Increased susceptibility to ischemic brain injury in cyclooxygenase-1-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 1436-1441.
57. Wright D.H., Abran D., Bhattacharya M. i wsp. Prostanoid receptors: ontogeny and implications in vascular physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 281: R1343-R1360.
58. Ito S., Okuda-Ashitaka E., Minami T. Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin. *Neurosci Res* 2001; 41: 299-332.
59. Cao C., Matsumura K., Yamagata K. i wsp. Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain. *Am J Physiol* 1997; 272: R1712-R1725.
60. Andreasson K.I., Savonenko A., Videny S. i wsp. Age-dependent cognitive deficits and neuronal apoptosis in cyclooxygenase-2 transgenic mice. *J Neurosci* 2001; 21: 8198-8209.
61. McGeer P.L., Schulzer M., McGeer E.G. Arthritis and inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiological studies. *Neurology* 1996; 47: 425-432.
62. Zandi P.P., Breitner J.C. Do NSAIDs prevent Alzheimer's disease? And, if so, why? The epidemiological evidence. *Neurobiol Aging* 2001; 22: 811-817.
63. Ho L., Pieroni C., Winger D. i wsp. Regional distribution of cyclooxygenase-2 in the hippocampal formation in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 1999; 57: 295-303.
64. Pasinetti G.M., Aisen P.S. Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neuroscience* 1998; 87: 319-324.
65. Moolwaney A.S., Igwe A.J. Regulation of cyclooxygenase-2 system by interleukin-1beta through mitogen-activated protein kinase signaling pathways: a comparative study of human neuroglioma and neuroblastoma cells. *Brain Res Mol Brain Res* 2005; 137: 202-212.
66. Jang J.H., Surh Y.J. Beta-amyloid-induced apoptosis is associated with cyclooxygenase-2 up-regulation via the mitogen-activated protein kinase-NF-kappaB signaling pathway. *Free Rad Biol Med* 2005; 38: 1604-1613.
67. Hoozemans J.J., Brückner M.K., Rozemuller A.J. i wsp. 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* 2002; 61: 678-688.
68. Yermakova A.V., O'Banion M.K. Downregulation of neuronal cyclooxygenase-2 expression in end stage Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2001; 22: 823-836.
69. Hoozemans J.J., Veerhuis R., Rozemuller J.M. i wsp. Neuroinflammation and regeneration in the early stages of Alzheimer's disease pathology. *Int J Dev Neurosci* 2006; 24: 157-165.
70. Combrinck M., Williams J., De Berardinis M.A. i wsp. Levels of CSF prostaglandin E2, cognitive decline and survival in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77: 85-88.
71. Bate C., Kempster S., Williams A. Prostaglandin D2 mediates neuronal damage by amyloid-beta or prions which activates microglial cells. *Neuropharmacology* 2006; 50: 229-237.
72. Shie F.S., Montine K.S., Breyer R.M. i wsp. Microglial EP2 as a new target to increase amyloid beta phagocytosis and decrease amyloid beta-induced damage to neurons. *Brain Pathol* 2005; 15: 134-138.
73. Kadoyama K., Takahashi Y., Higashida H. i wsp. Cyclooxygenase-2 stimulates production of amyloid beta-peptide in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281: 483-490.
74. Qin W., Ho L., Pompl P.N. i wsp. Cyclooxygenase (COX)-2 and COX-1 potentiate beta-amyloid peptide generation

- through mechanisms that involve gamma-secretase activity. *J Biol Chem* 2003; 278: 50970-50977.
75. Xiang Z., Ho L., Yemul S. i wsp. Cyclooxygenase-2 promotes amyloid plaque deposition in a mouse model of Alzheimer's disease neuropathology. *Gene Expr* 2002; 10: 271-278.
 76. Melnikova T., Savonenko A., Wang Q. i wsp. Cyclooxygenase-2 activity promotes cognitive deficits but not increased amyloid burden in a model of Alzheimer's disease in a sex-dimorphic pattern. *Neuroscience* 2006; 141: 1149-1162.
 77. Xiang Z., Ho L., Valdellon J. i wsp. Cyclooxygenase (COX)-2 and cell cycle activity in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease neuropathology. *Neurobiol Aging* 2002; 23: 327-334.
 78. Ferrera P., Arias C. Differential effects of COX inhibitors against beta-amyloid-induced neurotoxicity in human neuroblastoma cells. *Neurochem Int* 2005; 47: 589-596.
 79. Andersen J.M., Myhre O., Fonnum F. 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* 2003; 28: 319-326.
 80. Butterfield D.A., Howard B.J., LaFontaine M.A. 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* 2001; 8: 815-828.
 81. Nagano S., Huang X., Moir R.D. i wsp. Peroxidase Activity of Cyclooxygenase-2 (COX-2) cross-links beta-amyloid (Aβeta) and generates Aβeta-COX-2 hetero-oligomers that are increased in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 2004; 279: 14673-14678.
 82. Boutaud O., Andreasson K.I., Zagol-Ikapitte I. i wsp. Cyclooxygenase-dependent lipid-modification of brain proteins. *Brain Pathol* 2005; 15: 139-142.
 83. Zagol-Ikapitte I., Masterson T.S., Amarnath V. i wsp. Prostaglandin H (2)-derived adducts of proteins correlate with Alzheimer's disease severity. *J Neurochem* 2005; 94: 1140-1145.
 84. Liu D.X., Greene L.A. Neuronal apoptosis at the G1/S cell cycle checkpoint. *Cell Tissue Res* 2001; 305: 217-228.
 85. Mirjany M., Ho L., Pasinetti M.G. Role of cyclooxygenase-2 in neuronal cell cycle activity and glutamate-mediated excitotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301: 494-499.
 86. Nagy Z., Esiri M.M., Smith A.D. The cell division cycle and the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 1998; 87: 731-739.
 87. Hoozemans J.J., Veerhuis R., Rozemuller A.J. i wsp. Neuronal COX-2 expression and phosphorylation of pRb precede p38 MAPK activation and neurofibrillary changes in AD temporal cortex. *Neurobiol Dis* 2004; 15: 492-499.
 88. Breitner J.C. The role of anti-inflammatory drugs in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Annu Rev Med* 1996; 47: 401-411.
 89. Hoozemans J.J., Veerhuis R., Rozemuller A.J. i wsp. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase in Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets* 2003; 4: 461-468.
 90. in t'Veld B.A., Launer L.J., Breteler M.M. i wsp. Pharmacologic agents associated with a preventive effect on Alzheimer's disease: a review of the epidemiologic evidence. *Epidemiol Rev* 2002; 24: 248-268.
 91. Etminan M., Gill S., Samii A. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ* 2003; 327: 128.
 92. McGeer P.L., McGeer E., Rogers J. i wsp. Antiinflammatory drugs and Alzheimer's disease. *Lancet* 1990; 335: 1037.
 93. Pasinetti G.M. 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. *J Alzheimers Dis* 2002; 4: 435-445.
 94. Andersen K., Launer L.J., Ott A. i wsp. Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease the risk for Alzheimer's disease? The Rotterdam study. *Neurology* 1995; 45: 1441-1445.
 95. Mackenzie I.R. Postmortem studies of the effect of anti-inflammatory drugs on Alzheimer-type pathology and associated inflammation. *Neurobiol Aging* 2001; 22: 819-822.
 96. Weggen S., Eriksen J.L., Das P. i wsp. A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Aβeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* 2001; 414: 212-216.
 97. Eriksen J.L., Sagi S.A., Smith T.E. i wsp. NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target gamma-secretase and lower Aβeta42 in vivo. *J Clin Invest* 2003; 112: 440-449.
 98. Weggen S., Eriksen J.L., Sagi S.A. i wsp. Evidence that non-steroidal anti-inflammatory drugs decrease amyloid beta42 production by direct modulation of gamma-secretase activity. *J Biol Chem* 2003; 278: 31831-31837.
 99. Sastre M., Dewachter I., Landreth G.E. i wsp. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists modulate immunostimulated processing of amyloid precursor protein through regulation of beta-secretase. *J Neurosci* 2003; 23: 9796-9804.
 100. Hirohata M., Ono K., Naiki H. i wsp. Non-steroidal anti-inflammatory drugs have anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Neuropharmacology* 2005; 49: 1088-1099.
 101. Lehmann J.M., Lenhard J.M., Oliver B.B. i wsp. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 1997; 272: 3406-3410.
 102. Combs C.K., Bates P., Karlo J.C. i wsp. Regulation of beta-amyloid stimulated proinflammatory responses by peroxisome proliferators-activated receptor alpha. *Neurochem Int* 2001; 39: 449-457.
 103. Rich J.B., Rastrusson D.X., Folstein M.F. i wsp. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease. *Neurology* 1995; 45: 51-55.
 104. Rogers J., Kirby L.C., Hempelman S.R. i wsp. Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease. *Neurology* 1993; 43: 1609-1611.
 105. Scharf S., Mander A., Ugoni A. i wsp. A double-blind, placebo-controlled trial of diclofenac/misoprostol in Alzheimer's disease. *Neurology* 1999; 53: 197-201.
 106. Wilcock G.K., Black S.E., Haworth J. i wsp. Efficacy and safety of MPC-7869 (R-flurbiprofen), a selective

- Abeta42-lowering agent, in Alzheimer's disease (AD): Results of a 12-month phase 2 trial and 1-year follow-on study. *Alzheimers Dement* 2006; 2: S81-S82.
107. Aisen P.S., Schafer K.A., Grundman M. i wsp. Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on Alzheimer disease progression: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003; 289: 2819-2826.
 108. Soininen H., West C., Robbins J. i wsp. Long-term efficacy and safety of celecoxib in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2007; 23: 8-21.
 109. Aisen P.S., Davis K.L., Berg J.D. i wsp. A randomized controlled trial of prednisone in Alzheimer's disease. *Neurology* 2000; 54: 588-593.
 110. Firuzi O., Praticò D. Coxibs and Alzheimer's disease: should they stay or should they go. *Ann Neurol* 2006; 59: 219-228.
 111. Ho L., Qin W., Stetka B.S. i wsp. Is there a future for cyclooxygenase inhibitors in Alzheimer's disease? *CNS Drugs* 2006; 20: 85-98.
 112. White W.B., West C.R., Borer J.S. i wsp. Risk of cardiovascular events in patients receiving celecoxib: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Am J Cardiol* 2007; 99: 91-98.
 113. White W.B., Borer J.S., Gorelick P.B. i wsp. Cardiovascular events in clinical trials involving over 41,000 patients evaluating the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 411-417.
 114. Chen L.C., Ashcroft D.M. Do selective COX-2 inhibitors increase the risk of cerebrovascular events? A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Clin Pharm Ther* 2006; 31: 565-576.
 115. Salpeter S.R., Gregor P., Ormiston T.M. i wsp. Meta-analysis: cardiovascular events associated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 2006; 119: 552-559.
 116. Combrinck M.I., Perry V.H., Cunningham C. Peripheral infection evokes exaggerated sickness behaviour in pre-clinical murine prion disease. *Neuroscience* 2002; 112: 7-11.
 117. Holmes C., El-Okl M., Williams A.L. i wsp. Systemic infection, interleukin 1beta, and cognitive decline in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74: 788-789.
 118. Cakala M., Malik A.R., Strosznajder J.B. Inhibitor of cyclooxygenase-2 protects against amyloid beta peptide-evoked memory impairment in mice. *Pharmacol Rep* 2007; 59: 164-172.
 120. Kawano T., Anrather J., Zhou P. i wsp. Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity. *Nat Med* 2006; 12: 225-229.
 121. Hoshino T., Nakaya T., Homan T. i wsp. Involvement of prostaglandin E2 in production of amyloid-beta peptides both in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2007; 282: 32676-32688.
 122. Kotilinek L.A., Westerman M.A., Wang Q. i wsp. Cyclooxygenase-2 inhibition improves amyloid-beta-mediated suppression of memory and synaptic plasticity. *Brain* 2008; 131: 651-664.