

**Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze**  
**Katedra Fyziologie živočichů a vývojové biologie**  
**Fyziologický ústav Akademie věd České republiky**  
**Oddělení neurochemie**

## **Cholinerní mechanismy v patogenezi Alzheimerovy nemoci**

Bakalářská práce

Školitel: MUDr. Vladimír Doležal, DrSc.

Garant: RNDr. Jan Moravec, PhD.

Vypracovala: Eva Šantrůčková

Obor: Biologie

Praha 2007

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat za pomoc a rady panu školiteli MUDr. Vladimíru Doležalovi, DrSc., dále Mgr. Janu Jakubíkovi, PhD. a celému oddělení Neurochemie Fyziologického ústavu AV ČR. Můj dík patří též RNDr. Janu Moravcovi, PhD. z katedry Fyziologie živočichů a vývojové biologie Přírodovědecké fakulty UK.

# Obsah

Abstrakt.....	3
Použité zkratky.....	4
<b>1. Úvod.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Charakteristika Alzheimerovy nemoci.....</b>	<b>6</b>
2.1. Z historie.....	6
2.2. Stadia nemoci.....	6
2.3. Symptomy.....	8
2.4. Formy onemocnění.....	9
<b>3. Patogeneze Alzheimerovy nemoci.....</b>	<b>11</b>
3.1. Protein prekursor amyloidu.....	11
3.2. Usazování $\beta$ -amyloidu, neuritické plaky.....	12
3.3. Fyziologická úloha prekursoru amyloidu.....	13
3.4. Neurofibrilární klubíčka.....	14
3.5. Oxidativní stres a zánětlivé procesy.....	14
<b>4. Postižení centrálních cholinergních neuronů.....</b>	<b>18</b>
4.1. Biochemie a fyziologie cholinergních neuronů a cholinergní neurotransmise.....	18
4.2. Cholinergní systém v mozku.....	21
4.3. Cholinergní hypotéza Alzheimerovy nemoci.....	22
4.3.1. Úvod.....	22
4.3.2. Poškození cholinergních neuronů při Alzheimerově nemoci.....	23
4.3.3. Vliv $\beta$ -amyloidu na cholinergní neurotransmisi.....	24
4.3.4. Dysfunkce cholinergních neuronů a nervový růstový faktor.....	26
<b>5. Závěr.....</b>	<b>28</b>
<b>6. Literatura.....</b>	<b>30</b>

## Abstrakt

Alzheimerova choroba je v současné době nevléčitelné progresivní neurodegenerativní mozkové onemocnění převážně vyššího věku. Přichází plíživě a zpočátku nenápadně. Ale postupem času projevy nemoci, mezi něž patří hlavně zhoršování krátkodobé paměti, prostorové orientace a pozornosti, stále více omezují život postiženého člověka, až se stane plně odkázaným na péči okolí. Počet nemocných Alzheimerovou nemocí se vlivem prodlužující se průměrné délky života neustále zvětšuje. Mozek zasažený Alzheimerovou chorobou vykazuje četné patologické změny. Těmi nejvýznamnějšími a nejcharakterističtějšími jsou neuritické (senilní) plaky – extracelulární usazeniny  $\beta$ -amyloidu a neurofibrilární klubíčka tvořená hyperfosforylovanou formou proteinu tau asociovanou s mikrotubuly. Při Alzheimerově nemoci rovněž vzrůstá míra oxidativního stresu a dochází k aktivaci mikroglíí a k nastartování zánětlivých procesů. Mnoho studií ukázalo poruchy funkcí cholinergního systému v mozku, konkrétně jader na bázi předního mozku a projekčních drah odtud vybíhajících. Tyto nálezy vedly k formulaci tzv. cholinergní hypotézy Alzheimerovy nemoci. Cholinergní neurony a neurotransmise jsou postiženy na mnoha úrovních, k čemuž nepochybně přispívá působení oxidativního stresu či poruchy v signalizaci prostřednictvím nervového růstového faktoru. Nejnovější výzkumy však prokazují, že prvotní příčinou při vzniku a rozvoji Alzheimerovy nemoci je zvýšená produkce rozpustných oligomerních forem  $\beta$ -amyloidu, které nepříznivě ovlivňují činnost synapsí. U familiálních forem nemoci je zvýšená produkce  $\beta$ -amyloidu zapříčiněna mutacemi v genech APP, PS1 a PS2, zatímco u většiny případů sporadických forem není příčina známa. Alzheimerova choroba není výlučně cholinergní nemocí, nicméně ochabování muskarinové transmise, které se projevuje poruchami paměti, učení či pozornosti i v průběhu přirozeného stárnutí a ve vystupňované podobě u Alzheimerovy nemoci, svědčí pro významnou úlohu cholinergní neurotransmise při rozvoji onemocnění. Zejména pozorované oslabování přenosu přes muskarinové M1 receptory ukazuje na možnosti selektivních M1 agonistů při léčbě nemoci.

## Abstract

Alzheimer's disease is an incurable progressive neurodegenerative brain disorder that occurs mostly in elderly. It begins very slowly and the first symptoms are nearly indistinguishable. As the disease progresses, its manifestations (mainly deteriorations of short-term memory, spatial orientation and attention) limit person's life more and more. In the final stage of the disease, a patient becomes totally dependent on a caregiver. There is an increasing number of people with Alzheimer's disease all around the world because of growing lifespan. The brain of an individual with Alzheimer's disease exhibits numerous pathologic changes. The most apparent of them are neuritic (senile) plaques formed by deposits of  $\beta$ -amyloid and neurofibrillary tangles consisting of hyperphosphorylated form of protein tau associated with microtubules. The level of oxidative stress is also elevated in Alzheimer's disease's brain, microglia get activated and inflammatory processes start. Many studies have shown impairment of cholinergic neurons in the basal forebrain and their projections. These observations led to formulation of cholinergic hypothesis. Cholinergic and other neurons are certainly affected by oxidative stress or disturbances in NGF signalling. However, recent findings indicate that the primary event in the pathogenesis of Alzheimer's disease is increased production of soluble  $\beta$ -amyloid oligomers that have adverse effects on synapses. Increased production of  $\beta$ -amyloid in familial cases is due to known mutations in APP, PS1, and PS2 genes whereas in most sporadic cases the reason of increased production remains still unexplained. Alzheimer's disease is not an exclusively cholinergic disorder but decline of muscarinic neurotransmission that occurs during natural aging and in accentuated form in Alzheimer's disease implicates an important role in pathogenesis of the disease. Particularly weakening of transmission through M1 muscarinic receptor subtypes shows potential of selective agonists of M1 muscarinic receptors in treatment of the disease.

## Použité zkratky

AD	Alzheimerova nemoc
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
AChR	acetylcholinový receptor
ApoE	apolipoprotein E
APP	protein prekurzor amyloidu
A $\beta$	$\beta$ -amyloid
A $\beta$ <sub>40</sub> (A $\beta$ <sub>1-40</sub> )	krátká forma $\beta$ -amyloidu
A $\beta$ <sub>42</sub> (A $\beta$ <sub>1-42</sub> )	dlouhá forma $\beta$ -amyloidu
CNS	centrální nervový systém
ER	endoplazmatické retikulum
HACU	vysokoafinní vychytávání cholinu
ChAT	cholinacetyltransferáza
mAChR	muskarinový acetylcholinový receptor
nAChR	nikotinový acetylcholinový receptor
NGF	nervový růstový faktor
PNS	periferní nervový systém
PS1	presenilin 1
PS2	presenilin 2
sAPP $_{\alpha}$	sekretovaný fragment prekurzoru amyloidu produkováný $\alpha$ -sekretázou

# 1. Úvod

Alzheimerova choroba (AD; z anglického Alzheimer's disease) je progresivní neurodegenerativní mozkové onemocnění postihující především starší osoby. U postižených dochází nejprve ke zhoršování krátkodobé paměti a schopnosti učit se nové věci. V pozdějších fázích nemoci ztrácejí smysl pro orientaci, kontrolu nad svými emocemi, jejich chování se stává nepředvídatelným. Konečné stádium je charakteristické naprostou závislostí na pečující osobě - pacienti přestávají být schopni samostatně se najíst, jsou odkázáni na lůžko. V současnosti není nemoc vyléčitelná, ale moderní medikamenty dokáží její průběh zmírnit a tím i prodloužit životy pacientů. Alzheimerova choroba se stává novodobým strašákem v celosvětovém měřítku. S neustále rostoucí délkou života přibývá i případů tohoto onemocnění. Čísla hovoří jasně. Mezi pětadesátiletými lidmi jsou postižena zhruba 2 – 3 %, každých 5 let se toto procento zdvojnásobuje. Ve skupině 80letých je postižena polovina populace. V současné době se odhaduje, že je ve světě kolem 20 miliónů lidí trpících Alzheimerovou chorobou. V České republice je to přibližně 80 000 osob ([www.pfizer.cz](http://www.pfizer.cz)). Předpokládá se, že počet nemocných se každých 20 let zdvojnásobí na 42 milionů v roce 2020 a 81 milionů v roce 2040. Je nutno dodat, že tato čísla neberou do úvahy žádné změny v mortalitě ani účinnou prevenci či efektivní léčebný postup. Porovnáme-li zastoupení obyvatel rozvojových a vyspělých zemí mezi nemocnými, pak 60% lidí s AD je z rozvojových zemí. V roce 2040 vzroste tento podíl na 71%. Očekává se, že nemocných bude v rozvojových zemích přibývat třikrát až čtyřikrát rychleji než ve vyspělých zemích (Ferri a spol., 2005).

Mnoho studií ukázalo, že s Alzheimerovou nemocí významně souvisí narušení funkce cholinergní neurotransmise. Cílem této práce je tedy podat základní přehled o poškození funkce cholinergních neuronů a faktorech, které k tomu mohou přispívat.

## 2. Charakteristika Alzheimerovy nemoci

### 2.1. Z historie

AD byla poprvé popsána před více než sto lety, v listopadu roku 1906, německým psychiatrem a neuroanatomem Aloisem Alzheimerem (1864-1915). Zkoumal mozek jednapadesátileté ženy Augusty D., která zemřela několik let poté, co se u ní objevila demence. Ale symptomy neodpovídaly žádnému z mozkových onemocnění, která byla tehdy známa. Doktor Alzheimer popsal celou řadu symptomů souvisejících s výrazným poškozením paměti i schopností logického myšlení, dále potíže s vyjadřováním, dezorientaci, náhlé zvraty v chování či halucinace.

Alzheimer již disponoval poměrně kvalitním mikroskopem, a tak v mozkové tkáni identifikoval na základě barvení stříbrem podivnou tmavou hmotu (dnes víme, že jde o  $\beta$ -amyloidové plaky) a v celé řadě neuronů pozoroval chumáče vláček (v současnosti označovaných jako neurofibrilární klubíčka). Obě dvě charakteristiky jsou dodnes považovány za hlavní posmrtný ukazatel nemoci.

### 2.2. Stádia nemoci

První příznaky Alzheimerovy nemoci se u pacienta objevují velmi pozvolna a nenápadně. Lidé často své potíže přisuzují přirozenému stárnutí a nepřipouštějí si, že by mohlo jít o vážnější problém. Rychlost postupu nemoci je velice individuální. Od prvních projevů trvá nemoc průměrně deset let, ale mezi jednotlivými lidmi jsou velké rozdíly. Nemoc bývá členěna na tři fáze (<http://www.nia.nih.gov/Alzheimers/Publications/stages.htm>):

#### *První stádium – lehká demence*

Počáteční fáze nemoci začíná často téměř nepostřehnutelně. Člověk zapomíná, nedokáže si zapamatovat nové věci a události. Naproti tomu si často perfektně vzpomíná na své dětství a mládí a dokáže o tom se zaujetím hovořit. Předměty běžné potřeby ukládá na neobvyklá místa, má problémy s jejich opětovným nalezením. Dochází ke zhoršování obrazové představivosti či uvažování, objevují se menší potíže s počítáním. Typickým projevem jsou poruchy prostorové orientace, nemocný se může ztratit v místech, kde prožil celý svůj život. Trpí rovněž problémy s orientací v čase, nevzpomene si, jaký je zrovna den,

měsíc či rok. Pacient mívá potíže se souvislým vyjadřováním, mohou se vyskytnout i první poruchy chování, jako jsou deprese, úzkost nebo agresivita. Nemocní své problémy s pamětí zlehčují, cítí se zdraví. Někdy také obviňují své blízké ze záměrného schovávání věcí. Přes všechny těžkosti jsou lidé v tomto stádiu nemoci stále ještě schopni vést téměř normální život.

#### *Druhé stádium – střední demence*

Tato fáze začíná většinou dva až tři roky po nástupu prvních příznaků. Postupem času můžeme u nemocného zaznamenat vážnější problémy, které mu pozvolna znemožňují vykonávat běžné činnosti. Pacienti nejsou schopni se soustředit, nedovedou pojmenovat předměty denní potřeby, místo konkrétních slov používají vyjádření opisem. Přestávají umět počítat, číst i psát. Krátkodobá paměť se velmi zhoršuje, ale střípky vzpomínek z doby dávno minulé zůstávají zachovány. Poruchy orientace v prostoru jsou stále závažnější, nemocný člověk se může ztratit dokonce i ve svém vlastním domě. Výrazný problém představují změny chování a osobnosti – z osoby přátelské a milé se může stát člověk sobecký, podezíravý, náladový a agresivní. Mohou se vyskytovat přechodné stavy zmatenosti, přesto bývá nemocný nadále schopen společenské konverzace na jednoduché téma. Proto se při letmém kontaktu s postiženou osobou nemusí její obtíže zdát tak vážné. Ale člověk se pomalu stává závislý na pomoci okolí, má potíže s osobní hygienou, nedovede se přiměřeně obléci a udržovat chod domácnosti. Kromě toho vzrůstá nebezpečí úrazu a zranění, která mohou mít fatální následky.

#### *Třetí stádium – těžká demence*

V poslední fázi Alzheimerovy choroby dochází k naprosté ztrátě soběstačnosti, nemocný se stává zcela závislý na cizí pomoci. Obtížně se pohybuje, posléze přestává chodit úplně. Poruchy chování se prohlubují, nemocný trpí halucinacemi. Nepoznává přátele ani členy rodiny, je zmatený, nechápe dění okolo sebe. Postižený člověk se přestává umět souvisle a smysluplně slovně vyjadřovat, často opakuje jedno nebo několik slov či vět. Vyskytují se u něj problémy s příjmem potravy a tekutin, později se člověk sám vůbec není schopen najíst. Z toho často pramení tělesné chátrání a rychlý váhový úbytek. Nemocný přestává být schopen dodržovat osobní hygienu, neudrží moč ani stolici. V posledním stádiu Alzheimerovy choroby může pacient souběžně trpět dalšími nemocemi. Ačkoliv se v mnoha případech jedná o zcela banální onemocnění, pro člověka postiženého Alzheimerovou chorobou mohou představovat velké riziko.



## 2.3. Symptomy

Jak již bylo uvedeno, Alzheimerova nemoc přichází velmi plíživě a zpočátku bývá nesnadné odlišit projevy AD od problémů souvisejících s pokročilým věkem. Lékaři se shodují na deseti varovných znacích, které by se v žádném případě u staršího člověka neměly brát na lehkou váhu.

### 1. Ztráta paměti

Zapomínání nedávných událostí je jedním z nejběžnějších a nejčasnějších projevů demence. Osoba začíná zapomínat stále častěji a později si není schopná nově nabytou informaci vybavit.

### 2. Obtíže při běžných denních činnostech

Pro postiženého člověka představuje velký problém plánovat nebo dokončit každodenní aktivity. Plete si posloupnost jednotlivých kroků při přípravě jídla či při telefonickém hovoru, popřípadě si na započatou práci nevzpomíná.

### 3. Problémy s mluvením

Člověk s AD často během hovoru zapomíná jednoduchá slova. Neumí se vyjádřit přímo, používá občas velmi neobvyklé výrazy, které jsou pro okolí špatně srozumitelné.

### 4. Dezorientace v čase i prostoru

Osoba se najednou ztratí v důvěrně známém prostředí. Neví, kde je ani jak se na dané místo dostala. Zároveň si v daném okamžiku nedokáže uvědomit, jak se dostat zpět domů.

### 5. Zhoršená schopnost úsudku, stále obtížnější rozhodování

Typicky se tento problém projevuje při oblékání. Člověk není schopen se obléci podle aktuálního počasí. V parném dni si na sebe vezme několik teplých vrstev, naproti tomu v zimě jen slabé tričko.

### 6. Potíže s abstraktním myšlením

Nemocný má nepřekonatelné problémy s úkoly, při kterých musí pracovat s čísly. Neuvědomuje si přesně, co daná čísla znamenají, neumí provádět číselné operace.

### *7. Ukládání věcí na nesprávná místa*

Člověk s AD dává věci úplně jinam, než kam za normální situace patří. Cítí se potom velice zmateně, protože je nemůže najít, podezřívá své okolí z krádeží.

### *8. Změny nálady a chování*

Osoba postižená Alzheimerovou chorobou vykazuje náhlé změny rozpoložení – bez zjevné příčiny se rozčlíí, často nemá daleko k slzám.

### *9. Proměna osobnosti*

Osobnost lidí s demencí se může velmi dramaticky a zásadně změnit. Člověk se stává zmateným, nedůvěřivým, někdy až bojácným. Může se vyskytnout extrémní závislost na některém členovi rodiny.

### *10. Ztráta iniciativy*

Typicky začne být nemocný velmi pasivní, dokáže hodiny sedět před televizní obrazovkou nebo prospat mnohem víc času než dříve. Nemá zájem o koníčky.

## **2.4. Formy onemocnění**

Z hlediska etiologie panuje v současnosti shoda v tom, že primární příčinou vzniku onemocnění je zvýšená hladina oligomerů  $\beta$ -amyloidu. Ta je u familiálních forem způsobena různými mutacemi v genech pro bílkovinu prekursor amyloidu (APP) nebo v bílkovinách presenilin 1 a presenilin 2 (PS1, PS2), které jsou součástí komplexu  $\gamma$  sekretázy (Selkoe, 2001; Haass a Selkoe, 2007). U sporadické formy onemocnění je její příčina nejasná. Může být spojena s mutacemi v genech, které nejsou přímo spojeny s metabolismem APP, ale zvyšují pravděpodobnost onemocnění. Takových mutací byla popsána celá řada z nichž nejznámější jsou alelické varianty apolipoproteinu E (Corder a spol., 1993. Klinicky rozlišujeme 3 formy Alzheimerovy choroby lišící se v různých aspektech ([www.webmd.com/alzheimers/guide/alzheimers-types](http://www.webmd.com/alzheimers/guide/alzheimers-types)):

### *Alzheimerova choroba s brzkým nástupem*

Jde o velmi vzácný typ AD vyskytující se u méně než 10% pacientů. U této minoritní skupiny lidí se většinou vyvine více mozkových abnormalit než u pacientů s AD s pozdním

nástupem. Navíc mají pacienti postižení AD s brzkým nástupem větší pravděpodobnost rozvoje tzv. myoklonu – stavu, kdy dochází náhle u jednotlivých svalů nebo skupin svalů ke křečím nebo záškubům.

#### *Alzheimerova choroba s pozdním nástupem*

Tato forma onemocnění je nejběžnější, příznaky se začínají obvykle projevovat po pětadesátém roce věku. Může i nemusí být spojena s genovými mutacemi. Bývá též nazývána sporadická AD, protože se na rozdíl od familiální formy většinou nevyskytuje pravidelně po generace.

#### *Familiální Alzheimerova choroba*

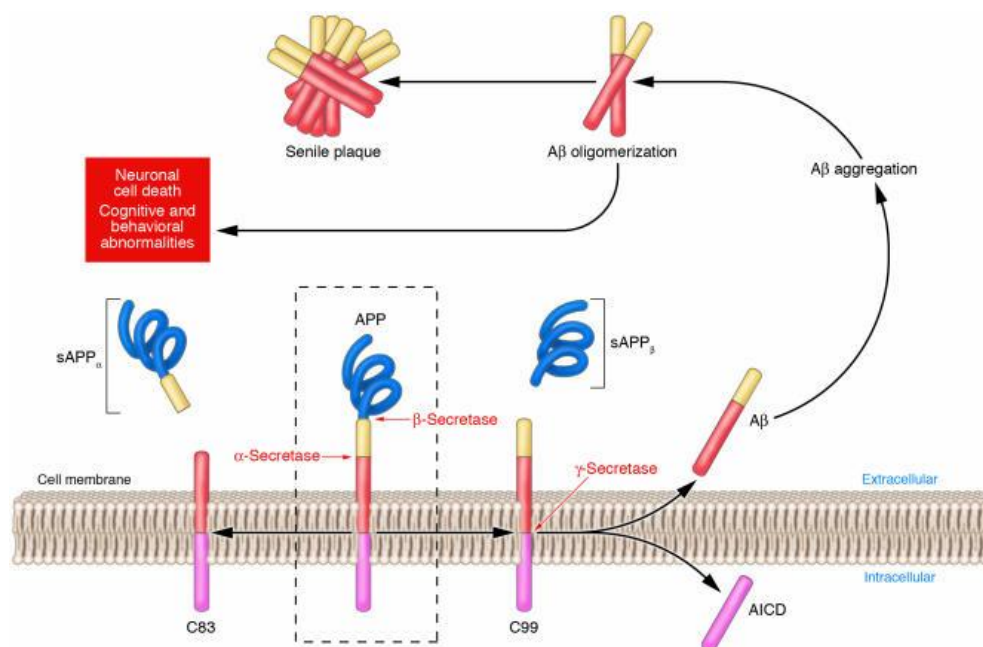
Tento typ AD má velmi řídké zastoupení a je úplně dědičný. Familiální Alzheimerova nemoc zahrnuje méně než 5% všech případů AD. Symptomy přicházejí velice brzy, často již krátce po dovršení 40 let věku. Je možné kompletně vysledovat rodinnou historii choroby.

## 3. Patogeneze Alzheimerovy nemoci

### 3.1. Protein prekursor amyloidu a $\beta$ -amyloid

Jasným diagnostickým ukazatelem Alzheimerovy nemoci *post mortem* jsou plaky tvořené  $\beta$ -amyloidem ( $A\beta$ ). Jde o hydrofobní peptid o váze 4kDa složený z 29-43 aminokyselin.  $A\beta$  vzniká z prekursoru  $\beta$ -amyloidu (amyloid precursor protein; APP). APP je transmembránový protein jednou procházející přes buněčnou membránu. N-konec proteinu je orientován dovnitř a C-konec ven z buňky. Je exprimován mnoha buněčnými typy včetně neuronů. Kóduje ho gen na chromozomu 21. Je důležité říci, že lidé postižení Downovým syndromem (trisomií 21. chromozomu) vykazují neuropatologické změny nerozlišitelné od těch typických pro AD, které se ale objevují v poměrně raném věku. Fakt, že jedna genová kopie navíc vede ke klasické patologii AD (Tanzi a spol., 1987; Podlisny a spol., 1987) podporuje hypotézu pokládající  $A\beta$  za klíčový faktor při vzniku Alzheimerovy nemoci (Haass a Selkoe, 1993). Během syntézy APP na ribozomu probíhá zároveň jeho translokace do endoplazmatického retikula (ER). Po usazení v membráně následují posttranslační modifikace odehrávající se jak v ER, tak v Golgiho aparátu. Jde o proteolytická štěpení zajišťovaná třemi různými enzymy:  $\alpha$ -sekretázou,  $\beta$ -sekretázou a  $\gamma$ -sekretázou. Cesta  $\alpha$ -sekretázy vede ke štěpení uvnitř  $\beta$ -amyloidové sekvence, takže zamezuje tvorbě  $A\beta$ . Vzniká při ní sAPP $_{\alpha}$ , což je velký sekretovaný fragment extracelulární domény APP a karboxy-terminální fragment o 83 aminokyselinách zůstávající v membráně.

Jak už název napovídá, o vznik  $\beta$ -amyloidu se zaslouhuje  $\beta$ -sekretáza doplňovaná  $\gamma$ -sekretázou.  $\beta$ -sekretáza nejprve štěpí APP opět na velký fragment sekretovaný do extracelulárního prostoru (tentokrát ale značený sAPP $_{\beta}$ ) a karboxy-terminální část dlouhou 99 aminokyselin, která je stejně jako v prvním případě membránově vázaná (obrázek 1). Tato transmembránová část se stává substrátem pro  $\gamma$ -sekretázu, jež odštěpení fragmentů  $A\beta$  dokončí. Činností  $\gamma$ -sekretázy mohou vznikat buď krátké formy  $A\beta$  (značené  $A\beta_{40}$  či  $A\beta_{1-40}$ ) nebo dlouhé formy  $A\beta$  (ty se značí  $A\beta_{42}$  či  $A\beta_{1-42}$ ). Velká většina  $A\beta$  vyprodukovaného buňkou (95%) je tvořena krátkou formou, méně než 5% představuje forma dlouhá. Liší se co do neurotoxicity i schopnosti agregovat do podoby plaků. Zdá se, že  $A\beta_{42}$  je nejen více toxický, ale má i větší tendenci oligomerizovat a posléze i tvořit senilní plaky (Carter a Lipka, 2001, Gandy, 2005).



**Obrázek 1**  
Vznik  
β-amyloidu  
(podle:  
Gandy a spol.,  
2005)

### 3.2. Usazování Aβ, neuritické plaky

Neuritické (nebo také senilní) plaky jsou jedním z klíčových znaků při *post-mortem* diagnostikování Alzheimerovy nemoci. V konečném stádiu této choroby se v mozku pacientů nalézají velmi velké množství těchto plaků – nejpostiženějšími místy jsou mozková kůra a hippocampus. Nejprve dochází k usazování Aβ<sub>42</sub>, který má daleko lepší předpoklady pro tvorbu fibrilárních struktur než Aβ<sub>40</sub> (Carter a Lippa, 2001) do difúzních (zatím ještě nefibrilárních) útvarů. V neuritických placích má potom β-amyloid nerozpustný vláknitý charakter a je tu zastoupen jak delší (Aβ<sub>42</sub>), tak i kratší formou (Aβ<sub>40</sub>), která se ukládá později. Zralý neuritický plak není zdaleka tvořen jen usazeninami β-amyloidu. Nedílnou součástí plaků jsou dále atrofované neurity, aktivované mikrogliaální buňky a reaktivní astrocyty. Kromě toho se tu dále nachází různé proteiny komplementové kaskády, apolipoprotein E, α-1-antichymotrypsin, lysozomální proteázy či antioxidační enzymy (Atwood a spol., 2002; Kar a spol., 2004).

Podle výzkumů z posledních let se zdá více a více pravděpodobné a zřejmé, že rozsáhlé uložení β-amyloidu představují zásobárny malých difuzibilních oligomerních forem Aβ. S ohledem na tento poznatek byl předpoklad o iniciátorové roli amyloidových plaků zastíněn jinou představou. Ta říká, že plaky samy o sobě nejsou tak škodlivé jako Aβ oligomery, které jsou s plaky v rovnováze. Tento koncept je podporován i výsledky pozorování, při kterých bylo zjištěno, že ztráta presynaptických zakončení lépe lépe koreluje

s hladinami A $\beta$  v mozkové kůře než s počtem a velikostí  $\beta$ -amyloidových plaků (Mucke a spol., 2000) a že někteří lidé nevykazují žádné symptomy choroby, ačkoliv mají v mozkové kůře mnoho těchto plaků (Hardy a Selkoe, 2002). Kromě toho k nejmasivnějšímu usazování  $\beta$ -amyloidu dochází v jiných mozkových oblastech, než kde nastává nejhorší úbytek neuronů – plaky jsou přítomny typicky v hippocampu a kortexu, zatímco odumíráním neuronů je nejvíce postižena bazální oblast předního mozku.

### 3.3. Fyziologická úloha APP

Díky tomu, že neuritické plaky složené z  $\beta$ -amyloidu jsou jasným a nezpochybnitelným projevem AD, byl vznik  $\beta$ -amyloidu považován čistě za patologický jev. Tato domněnka se ukázala být chybnou, neboť A $\beta$  je sekretován do média nejrůznějšími druhy buněk exprimujícími APP. V médiu byly totiž identifikovány peptidy o velikosti 4 kDa pomocí imunoprecipitace protilátkami proti  $\beta$ -amyloidu. Je rovněž důležité zdůraznit, že A $\beta$  byl nalezen nejen v médiu buněk pěstovaných v kultuře, ale i v tělních tekutinách zdravých lidí (např. v mozkomíšním moku), kde se vyskytuje v pikomolárních až nanomolárních koncentracích (Seubert a spol., 1992 a 1993; Shoji a spol., 1992).

Fyziologický význam APP a jeho metabolitů zůstával dlouho nejasný. Odstranění genu pro APP u myši (APP knockout) nevedlo k žádnému výraznému fenotypu, zvířata byla fertilní a bez zjevných poruch (Zheng a spol., 1996). Extracelulární fragment sAPP $\alpha$  vznikající  $\alpha$ -sekretázovým štěpením APP má neuroprotektivní účinky (Furukawa a spol., 1996; Mattson, 1997). Fyziologická úloha amyloidogenních fragmentů, které vznikají štěpením APP  $\beta$ -sekretázovou a poté  $\gamma$ -sekretázovou aktivitou začala být objasňována teprve nedávno. Přirozeně se vyskytující koncentrace A $\beta$  mohou mít neuromodulační účinky v regulaci normálních funkcí cholinergních neuronů díky svým vlivům na uvolňování a syntézu acetylcholinu (Kar a spol., 1996, 1998 a 2004). Grimm a spolupracovníci (2005) nedávno prokázali, že fragmenty  $\beta$ -amyloidu regulují aktivitu enzymů hydroxymetylglutarylCoA syntázy a sfingomyelinázy. HydroxymetylglutarylCoA je "rate limiting" enzym při biosyntéze cholesterolu. Tyto nálezy jsou velmi důležité, protože spojují  $\beta$ -amyloid s metabolismem lipidů. Výsledky epidemiologických studií ukazují, že zejména u sporadických případů Alzheimerovy nemoci je důležitým faktorem na vznik onemocnění vliv výživy a zejména její lipidické složky.

### 3.4. Neurofibrilární klubička

Mnoho neuronů v mozkových oblastech, které jsou při Alzheimerově nemoci postižené (hippokampus, amygdala, entorhinální kůra, asociační oblasti čelního, spánkového, temenního a týlního laloku a jádra projikující do těchto oblastí) obsahuje neurofibrilární klubička. Jde o mohutné svazky vláken nevážících se na membránu, které vyplňují značnou část cytoplazmy. Skládají se hlavně z PHF (paired helical filaments) – dvojic vláken tvořících spolu  $\alpha$ -helix, někdy také doplněných jednoduchými rovnými filamenti, která často obsahují hyperfosforylovanou formu proteinu tau asociovanou s mikrotubuly (Kosik a spol., 1986; Nukina a spol., 1987; Selkoe, 2001; Zheng a spol., 2002). Ve zdravých neuronech se tau váže na mikrotubuly a stabilizuje je. Mikrotubuly tvoří významnou součást cytoskeletu každé buňky, který podléhá dynamickým změnám spojeným s fosforylací a defosforylací zprostředkovaných specifickými enzymy. Pokud není fosforylovaný protein tau defosforylován, není schopen vázat mikrotubuly a dochází k jeho polymerizaci. Takto abnormální tau již nestabilizuje mikrotubuly, což vede ke kolapsu neuronálního transportu. Rozsah postižení neuronů neurofibrilárními klubičky a částečně také počet korových neurofibrilárních klubiček koreluje pozitivně se závažností příznaků demence (Delacourte a spol., 1999).

Oba charakteristické znaky Alzheimerovy nemoci – plaky tvořené  $A\beta$  a neurofibrilární klubička – se mohou vyskytovat nezávisle na sobě. Klubička obsahující polymerní tau protein, která jsou velmi podobná či nerozlišitelná od těch provázejících AD, byla objevena i u dalších neurodegenerativních onemocnění. A to u takových, kde se ve valné většině nenalézají žádné  $\beta$ -amyloidové plaky. Naproti tomu můžeme vidět plaky u starších jedinců bez jakýchkoliv kognitivních poruch, v jejichž mozcích nejsou po klubičkách ani památky (Selkoe, 2001).

### 3.5. Oxidativní stres a zánětlivé procesy

Oxidativní stres vzniká v důsledku působení volných kyslíkových radikálů na buňky. Největším „producentem“ volných kyslíkových radikálů ( $O_2^-$ ) jsou mitochondrie, kde vznikají během průchodu elektronů elektron-transportním řetězcem. Antioxidační enzym superoxid-dismutáza konvertuje  $O_2^-$  na  $H_2O_2$ , ze kterého může v přítomnosti  $Fe^{2+}$  vznikat hydroxylový radikál ( $OH^\cdot$ ). Kyslíkový radikál může též reagovat s oxidem dusnatým a tvořit peroxynitrit.

Hydroxylový radikál i peroxynitrit vedou k peroxidaci membránových lipidů, která může postihovat jak plazmatickou membránu, tak i membránu mitochondrií či endoplazmatického retikula. Výsledkem peroxidace lipidů je uvolnění 4-hydroxynenal, aldehydu vážícího se na membránové přenašeče a iontové kanály a tím poškozujícího jejich funkce. Díky tomu, že se peroxidace lipidů nevyhýbá ani ER a mitochondriím, dochází v těchto buněčných organelách k narušení iontové homeostáze a k ovlivnění funkce mitochondrií a ER jako zásobáren iontů  $\text{Ca}^{2+}$ . Následkem je zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů (Mattson a Pedersen, 1998). Normální buňka se pohybuje v přibližné rovnováze mezi oxidativními procesy a antioxidačními mechanismy. Když je rovnováha porušena, ať už redukcí hladiny antioxidantů či nárůstem počtu reaktivních radikálů (nebo kombinací obou), buňka se dostává do oxidativního stresu (Velez-Pardo a spol., 1998).

Biochemické analýzy prokázaly, že míra oxidativního stresu je u lidí s AD vyšší než u podobně starých lidí bez příznaků choroby. Byla pozorována zvýšená oxidace proteinů, a to hlavně v těch částech mozku, které jsou při AD nejvíce ohroženy (např. frontální lalok). Poškození postihlo i některé enzymy – příkladem může být výrazně snížená aktivita glutamin syntetázy, což je enzym důležitý při regulaci obsahu dusíku v buňce a součást mnoha zpětnovazebních regulačních mechanismů (Smith a spol., 1991). Oxidativní poškození najdeme i v hippokampu, kde vyšla najevo zvýšená nitrace proteinů pramenící z působení kyslíkového radikálu a oxidu dusnatého. V mozkové tkáni kontrolní skupiny nebyla tato abnormalita detekovatelná (Smith a spol., 1997).

Předpokládá se, že  $\beta$ -amyloid přispívá k intenzitě oxidativního stresu. Jeden z experimentů ukázal, že  $\text{A}\beta$  zvyšuje akumulaci peroxidu vodíku i peroxidaci lipidů a že buňky selektované na odolnost vůči působení  $\text{A}\beta$  nejsou tak náchylné k toxicitě  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Kromě toho dokázalo široké spektrum antioxidantů (např. vitamín E) chránit před účinky  $\text{A}\beta$  a inhibovat hromadění peroxidu vodíku v klonálních buněčných liniích i primárních kulturách (Behl a spol., 1994).

Peroxidace lipidů v důsledku působení  $\text{A}\beta$  má za následek i narušení příjmu glukózy hippokampálními a kortikálními neurony.  $\text{A}\beta$  snížil rychlost transportu glukózy poměrně rychle, už po jedné až dvou hodinách po začátku experimentu. Rovněž zde bránily antioxidanty (vitamín E a propyl-gallát) poklesu rychlosti glukózového přenosu, což by mohlo ukazovat na oxidativní poškození transportéru glukózy. Snížení transportu glukózy bylo následováno i poklesem hladiny buněčného ATP (Mark a spol., 1997).

Cardoso a jeho spolupracovníci (2001) zjistili, že  $\text{A}\beta$  potřebuje k toxickým účinkům na buňky jejich funkční mitochondrie, protože v buňkách bez mitochondriální DNA nebyla



pozorována jejich snížená životaschopnost. V buňkách nezbařených mitochondriální DNA docházelo ke snížení mitochondriálního membránového potenciálu, aktivity enzymů i hladiny ATP, pravděpodobně v důsledku oxidace lipidů pramenící z působení volných kyslíkových radikálů.

Postupně vychází najevo, že i lokální zánětlivé reakce hrají podstatnou roli při vzniku Alzheimerovy nemoci. Aktivované mikrogliaální buňky mající na svém povrchu celou řadu specifických markerů, kterými se odlišují od „klidových“ mikroglia sítlicích v mozku, se často objevují v okolí zrajících  $\beta$ -amyloidových plaků obsahujících už alespoň několik nerozpustných fibril  $\beta$ -amyloidu. Tyto aktivované mikrogliaální buňky produkují velká množství glutamátu, superoxidových radikálů a dalších neurotoxických látek. A právě radikály zapříčiňující oxidativní stres se zdají být hlavními původci neurotoxicity. Vysoce aktivované mikroglie, stejně jako všechny profesionální fagocyty (mikroglie představují vlastně monocyty/makrofágy nervového systému schopné velmi rychle reagovat na nárůst extracelulárního „cizího“ materiálu) vyrábějí z molekul kyslíku superoxidové anionty, které jsou následovány hydroxylovými radikály a peroxidem vodíku. Tento mechanismus je vysoce účinný v boji s cizorodými částicemi. Ovšem pro neurony představují aktivované mikroglie další pohromu zvyšující oxidativní stres a přispívající k jejich degeneraci (McGeer a McGeer, 1999). Je dost dobře možné, že mikrogliaím připadají oligomery  $A\beta$  cizí, protože takové útvary během vývoje mozku nikde neobjevují. Za předpokladu, že se mikroglie aktivují po styku s  $A\beta$  oligomery, dochází následně s velkou pravděpodobností ke spuštění komplementové kaskády. Mikroglie by rovněž mohly být zdrojem cytokinů detekovaných v mozku. Uvolnění cytokinů by zase mohlo vysvětlit přítomnost reaktivních astrocytů, které také obklopují mnoho zrajících plaků bohatých na fibrilární  $A\beta$ . Experiment provedený Gitterem a jeho týmem (1995) ukázal, že fibrilární  $A\beta$  znatelně posiluje výlev interleukinu 6 (IL-6) a interleukinu 8 (IL-8) z lidských astrocytů indukovaný interleukinem 1 $\beta$ . Když byl použit čerstvý  $A\beta$  (nefibrilární), nebyla zvýšená sekrece IL-6 a IL-8 prakticky měřitelná. To vede k domněnce, že tento efekt  $A\beta$  závisí na jeho stupni agregace. Tyto astrocyty rovněž sekretují celou škálu látek podporujících zánětlivou reakci včetně proteinů akutní fáze zánětu (Selkoe, 2001).

Jedna z nedávných studií dále prohloubila představu o důležitosti zánětlivých procesů pro rozvoj AD. V hippokampální tkáni lidí s diagnostikovanou AD byla zjištěna zvýšená koncentrace prostaglandinu  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) a  $F_2$ -isoprostanů ve srovnání s kontrolní tkání. O prostaglandinech je již dlouho známo, že doprovázejí zánět nebo také bolest. Zdá se, že obě tyto látky hrají přímou roli v patogenezi choroby, protože jejich hladina nezávisí na věku

pacienta, ze kterého tkáň pocházela. Přítomnost  $\text{PGF}_{2\alpha}$  a  $\text{F}_2$ -isoprostanů tedy ukazuje na přítomnost intenzivního zánětu v mozku postiženém AD (Casadesus a spol., 2007).

V současnosti existuje poměrně značné množství důkazů o přítomnosti zvýšeného oxidativního stresu a zánětlivých reakcí při Alzheimerově nemoci. Mnoho publikací oběma těmito jevům přikládá velkou důležitost a schopnost přispět značnou měrou k progresi onemocnění. Pravděpodobně však nejde o primární příčiny AD. To jim ale neubírá na důležitosti, protože by se v budoucnu mohly stát cílem antioxidačních protizánětlivých léčiv schopných zpomalit postup nemoci.

## 4. Postižení centrálních cholinergních neuronů

Již od počátků výzkumu Alzheimerovy nemoci je cholinergní systém (s acetylcholinem jako neurotransmiterem) středem zájmu badatelů. Rozsáhlá ztráta cholinergních neuronů je neměnnou charakteristikou pokročilého stadia Alzheimerovy choroby. Stupeň poškození cholinergního systému odpovídá závažnosti příznaků nemoci. Vzhledem k tomu, že AD není žádnou okrajovou záležitostí, probíhá její intenzivní výzkum po řadu desetiletí, během kterých došlo k objevu řady faktorů způsobujících narušení cholinergní neurotransmise a přispívajících tím k rozvoji choroby. V současnosti je známo, že poškození cholinergního systému mozku není jedinou příčinou AD. Ale pro jeho úzkou spojitost s hlavními klinickými projevy nemoci (poruchami kognitivních funkcí, chování a obtížemi při běžných denních činnostech) je považováno za velmi důležitý fenomén.

### 4.1. Biochemie a fyziologie cholinergních neuronů a cholinergní neurotransmise

Chemická látka acetylcholin (ACh) byla prvním objeveným neurotransmiterem. Účastní se synaptického přenosu jak v periferním (PNS), tak i v centrálním (CNS) nervovém systému mnoha organismů včetně člověka. ACh je ester kyseliny octové a cholinu s chemickým vzorcem  $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ . Systematický název zní 2-(acetyloxy)-N,N,N-trimethylethanaminium. Poprvé byl identifikován v roce 1914 Henrym Hallettem Dalem pro jeho účinky na srdeční sval. Jeho funkce coby neurotransmiteru byla prokázána Otto Loewim, který dal této látce název „Vagusstoff“, protože se uvolňovala z nervu vagu. Za odhalení acetylcholinu jako neuromediátoru a průkaz chemické neurotransmise obdrželi tito dva autoři v roce 1936 Nobelovu cenu za medicínu (Donnerer a Lembeck, 2006).

Acetylcholin je syntetizován v cytoplasmě cholinergních zakončení enzymem cholinacetyltransferázou (ChAT) z cholinu a acetylkoenzymu A (Tuček, 1985). Syntetizovaný acetylcholin je transportován do synaptických váček, ze kterých je uvolňován při depolarizaci zakončení do synaptické štěrby. Acetylcholinesteráza (AChE) a butyrylcholinesteráza rozkládají uvolněný acetylcholin zpět na cholin a acetát. Tyto enzymy jsou odpovědné za rychlé „uklizení“ synaptické štěrby po každém výlevu acetylcholinu (Chatonnet a Lockridge, 1989).

Uvolnění acetylcholinu z presynaptického zakončení samo o sobě nestačí k dalšímu přenosu signálu. K tomu je zapotřebí receptorů na postsynaptické membráně. Rozeznáváme dvě hlavní třídy acetylcholinových receptorů (AChR): nikotinové (nAChR) a muskarinové (mAChR). Objev dvou tříd AChR učinili vědci již v první polovině 20. století, a to na základě odpovědí zprostředkovaných prostřednictvím agonistů – muskarinu (jedu muchomůrky červené) a nikotinu.

Nikotinové acetylcholinové receptory jsou acetylcholinem otvírané iontové kanály, které patří do rozsáhlé skupiny iontových kanálů otvíraných ligandem (Sargent, 1993; Dani, 2001). Nacházejí se na periférii i v centrálním nervovém systému. Skládají se z pěti podjednotek orientovaných okolo centrálního iontového kanálu, podobně jako glycinové či GABA<sub>A</sub> receptory. Periferní nAChR na nervosvalové ploténce se skládají ze dvou podjednotek  $\alpha 1$  a dále podjednotek  $\beta 1$ ,  $\gamma$  a  $\delta$  nebo  $\epsilon$  u embryonální tkáně. Nervové nAChR můžeme rozdělit do dvou skupin. První skupina zahrnuje receptory složené z kombinací podjednotek  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  nebo  $\alpha 4$  s  $\beta 2$  a  $\beta 4$  podjednotkami, někdy také s  $\beta 5$ . Tyto nAChR neváží  $\alpha$ -bungarotoxin ( $\alpha$ -Bgt). Do druhé skupiny se zařazují nAChR tvořené z  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$  nebo  $\alpha 9$  podjednotek, které mohou tvořit homooligomery. Na rozdíl od první skupiny váží  $\alpha$ -Bgt (Lindstrom et al, 1996). Díky tomu, že existují četné podjednotkové variace, jsou i nAChR velmi rozmanité ve svých funkčních a farmakologických charakteristikách. V jedné oblasti mozku se může nacházet více subtypů nAChR a v některých částech mozku může jeden neuron exprimovat na svém povrchu zároveň více typů nAChR (Albuquerque a spol., 1996).

Muskarinové acetylcholinové receptory se rovněž vyskytují v celém těle a mají celou řadu funkcí jak v centrálním, tak i v periferním nervovém systému. Najdeme je v srdci, krevních cévách, plicích, gastrointestinálním traktu, v potních žlázách a samozřejmě také v mozku. Farmakologicky užitím nejrůznějších ligandů byly charakterizovány tři podtypy muskarinových receptorů. V osmdesátých letech minulého století bylo odhaleno pomocí klonování celkem pět podtypů mAChR (M1-M5; Kubo a spol., 1986a,b; Bonner a spol., 1987, 1988, 1989a,b).

Struktura i další přenos signálu muskarinových receptorů jsou zcela odlišné od těch nikotinových. AChR muskarinového typu jsou metabotropními receptory řadícími se do široké rodiny receptorů spřažených s heterotrimerními G-proteiny, které se skládají z podjednotek  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ . Muskarinové receptory tvoří jediná bílkovina obsahující sedm transmembránových  $\alpha$ -helixů (TM I – TM VII) spojených třemi extracelulárními (o1-o3) a třemi intracelulárními (i1-i3) kličkami (Wess a spol., 1996). Právě transmembránové segmenty, které tvoří ortosterické vazebné místo receptoru, představují oblasti s nejvyšší

mírou homologie mezi jednotlivými podtypy mAChR. Naopak největší variabilitu nalezneme v oblasti třetí intracelulární kličky, která se účastní při interakci s G-proteiny. Po aktivaci receptoru dojde ke spřažení a aktivaci G-proteinu, která se projeví změnou afinity pro GDP, výměnou GDP za GTP na  $\alpha$  podjednotce a následnému oddělení podjednotky  $\alpha$  od dimeru podjednotek  $\beta\gamma$ . Obě uvolněné podjednotky ( $\alpha$  a  $\beta\gamma$  dimer) aktivují intracelulární signální dráhy. Podjednotka  $\alpha$  má vlastní GTPázovou aktivitu. Dochází k hydrolýze GTP a opětovnému spojení  $\alpha$  podjednotky s komplexem  $\beta\gamma$ . Tím je přenos signálu ukončen do té doby, než je receptor znovu aktivován navázáním agonisty.

Muskarinové receptory se spřahují s různými typy G-proteinů a liší se i v buněčných odpovědích, které acetylcholin svou vazbou na receptor vyvolá. Liché podtypy muskarinových receptorů (M1, M3, M5) se preferenčně spřahují s G-proteiny označovaným jako  $G_q$  nebo  $G_{11}$ , které aktivují fosfolipázu C (PLC). PLC štěpí fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (PIP<sub>2</sub>) na inositol-1,4,5-trisfosfát (IP<sub>3</sub>) a 1,2-diacylglycerol (DAG). IP<sub>3</sub> se váže na ionotropní receptory na endoplazmatickém retikulu, což způsobí masivní vzrůst intracelulární koncentrace vápenatých iontů. Liché podtypy se rovněž spřahují s  $G_s$  G-proteiny, jejichž  $\alpha$  podjednotka stimuluje aktivitu adenylátcyklázy, enzymu syntetizujícího cAMP z ATP, a tím i syntézu cAMP. Sudé podtypy mAChR (M2, M4) se přednostně spřahují s jinými typy G-proteinů –  $G_i$  a  $G_o$ , které inhibují činnost adenylátcyklázy. V důsledku poklesu hladiny cAMP dochází i ke snížení protein-kinázou A zprostředkované fosforylace různých buněčných proteinů či transkripčních faktorů (Jones a spol., 1988; Loffelholz, 1996). Uvolněný dimer podjednotek  $\beta\gamma$  ovlivňuje iontové kanály, například tlumí vtok vápníku napětově řízenými vápníkovými kanály v nervových zakončeních a tím stimulované uvolňování mediátorů (Herlitze a spol., 1996) nebo zvyšuje vodivost draslíkových kanálů v srdci (Logothetis a spol., 1987), což se projevuje negativně chronotropním a negativně inotropním účinkem.

Jednotlivé podtypy mAChR mají rozdílné zastoupení v různých částech mozku. V mozkové kůře je obzvláště čteně zastoupen M1 muskarinový receptor (Krejčí a Tuček, 2002), zejména na pyramidálních buňkách, kde je hlavním účinkem acetylcholinu snížení propustnosti pro draselné ionty, což ve svém důsledku vede ke zvýšené vnímavosti neuronu k dalším excitačním podnětům. Acetylcholin funguje jako korový neuromodulátor ovlivňující i dopaminergní, glutamatergní a noradrenergní transmissi a bývá mu přisuzována role “dirigenta“ ostatních neuropřenašečů (Giacobini, 2003). Kromě mozkové kůry najdeme množství M1 receptorů ještě v hippocampu nebo neostriatu. M1 muskarinové receptory hrají velevýznamnou roli v tak důležitých procesech, jakými jsou učení nebo paměť. M2 podtypy muskarinových receptorů jsou lokalizovány po celém mozku. Naproti tomu M3 receptorů se

v mozku nachází poměrně málo. V neostriatu jsou hojně M4 muskarinové receptory, zatímco podtyp M5 byl identifikován v projekčních neuronech substantia nigra, pars compacta nebo v hippocampu (Abrams a spol., 2006).

## 4.2. Cholinergní systém v mozku

Centrální cholinergní systém obsahuje šest hlavních oblastí označovaných Ch1-Ch6, z nichž vybíhají projekční dráhy do dalších struktur centrálního nervového systému (Mesulam a spol., 1983; Mesulam 1990 a 2004). Velmi významnou úlohu hrají oblasti Ch1-Ch4 lokalizované v bazální části frontálního mozkového laloku, které společně s oblastmi Ch5 a Ch6 nacházejícími se v mozkovém kmeni tvoří retikulární aktivační systém. Cholinergní komplex bazální části čelního laloku se skládá z nucleus septalis medialis (Ch1), diagonálního Brocova svazku (Ch2, Ch3) a nucleus basalis Meynerti (Ch4). Všechny neurony z oblastí Ch1-Ch4 obsahují AChE, ChAT a jsou jedinými neurony v centrálním nervovém systému dospělého člověka, které exprimují velké množství NGFr (receptoru nervového růstového faktoru). Experimenty na zvířecích modelech ukázaly, že Ch1 a Ch2 zajišťují hlavní cholinergní inervaci pro hippocampus, Ch3 pro čichové struktury a Ch4 pro mozkovou kůru (včetně limbických struktur jako jsou hippocampus, entorhinální kůra a amygdala) – do různých korových oblastí přichází cholinergní inervace z různých částí nucleus basalis Meynerti.

Mozková kůra vykazuje ve všech vrstvách poměrně hustou síť axonů cholinergních neuronů. Nejvíce jich je v povrchových vrstvách (vrstvy I, II, a svrchní část III. vrstvy). Většina korových cholinergních neuronů je nemyelinizovaných a vytváří synapse „en passant“ s mnoha dalšími neurony přítomnými v mozkové kůře. Acetylcholin uvolněný z presynaptického zakončení cholinergního axonu v mozkové kůře působí na nikotinové či muskarinové acetylcholinové receptory. Muskarinové receptory v savčí mozkové kůře převažují. Kromě postsynaptických receptorů obsahují cholinergní axony též presynaptické autoreceptory, které se účastní regulace výlevu acetylcholinu.

Cholinergní dráhy prostupují celou mozkovou kůrou, mohou tedy ovlivňovat všechny stránky chování a vědomí. Kromě toho propojení cholinergních drah s retikulárním aktivačním systémem naznačuje, že tyto dráhy jsou obzvláště podstatné pro udržování pozornosti. Souvislost cholinergního systému s pozorností pramení hlavně z bohatého zastoupení cholinergních synapsí v mozkové kůře a z neuromodulačních účinků

acetylcholinu. Vztah k paměti lze vysvětlit vysokou četností cholinergních zakončení v hippocampu, entorhinální kůře a amygdale ( Mesulam, 2004).

### **4.3. Cholinergní hypotéza Alzheimerovy nemoci**

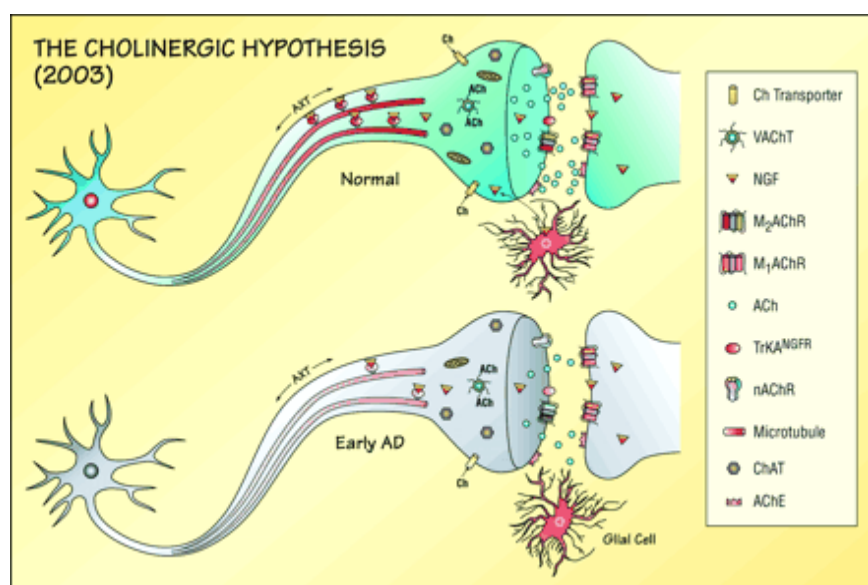
#### **4.3.1. Úvod**

Ještě předtím, než došlo k objevu Alzheimerovy nemoci, považovali vědci demenci za jakousi „ přirozenou progresi “ procesu stárnutí. Ani poté, co Alois Alzheimer poprvé tuto chorobu popsal, nebyla AD zpočátku odlišována od ostatních forem demence, dokonce se o AD ani nemluvilo jako o nemoci. Ovšem v sedmdesátých letech minulého století došlo k prudkému názorovému obratu, neboť neurologický a neurochemický výzkum zažily doslova boom. Průlom znamenaly studie provedené uprostřed 70. let, které ukázaly, že cholinergní neurony podléhají u lidí s AD rozsáhlé degeneraci. Ta postihuje nejen mozkovou kůru, ale i oblasti, ze kterých vedou do kortexu cholinergní projekce (jedná se hlavně o bazální části čelního laloku), a v důsledku znamená i pokles hladin enzymů cholinacetyltransferázy a acetylcholinesterázy. AD se stala „opravdovou“ nemocí s patofyziologií založenou na poškození cholinergního systému (Bowen a spol., 1976; Perry a spol., 1977; White a spol., 1977). Následující výzkumy provedené na konci sedmdesátých a potom v průběhu osmdesátých let přinesly další poznatky na poli cholinergních mechanismů. Mezi ně patřilo zjištění poklesu uvolňování ACh (Sims a spol., 1980; Nilsson a spol., 1986) či ztráty cholinergních neuronů situovaných v nucleus basalis Meynerti (Whitehouse a spol., 1981). Tyto výsledky více a více přispívaly k názoru, že AD je primárně cholinergní nemoc a vedly k formulaci cholinergní hypotézy (Bartus, 1982; Francis a spol., 1999; Doležal a Kašparová, 2003; Mesulam, 2004). Nicméně v dalších letech se ukázalo, že při Alzheimerově nemoci není cholinergní systém tím jediným poškozeným, a koncepce AD jako výlučně cholinergní nemoci začala pomalu ztrácet na pravdivosti. Přesto četná pozorování dokazují, že úloha cholinergních mechanismů v patogenezi AD je důležitá a zasluhuje si právem naši pozornost.

#### 4.3.2. Poškození cholinergních neuronů při Alzheimerově nemoci

Rozsáhlá ztráta cholinergní inervace v mozkové kůře bývá považována za typický projev pokročilého stádia Alzheimerovy nemoci. Nejvýznamnější dopad má v temporálních lalocích včetně entorhinální kůry, kde může být poškozeno až 80% axonů cholinergních neuronů (Geula a Mesulam, 1996). Postižení korových cholinergních axonů je doprovázeno také odumíráním neuronů v nucleus basalis Meynerti. Je zajímavé, že na rozdíl od kortikální cholinergní inervace zůstávají cholinergní neurony striata a thalamu téměř beze změny (Mesulam, 2004).

Poškození (obrázek 2) a posléze odumírání cholinergních neuronů se projevuje i úbytkem enzymů přítomných v presynaptických částech nervových zakončení. Bylo



provedeno velké množství pokusů, které ukázaly citelný pokles aktivity ChAT v temporálním laloku a kůře frontálního a parietálního laloku mozku postiženého AD o 30-90% (Araujo a spol., 1988). ChAT není limitujícím faktorem

**Obrázek 2**  
Charakter poškození cholinergních neuronů při Alzheimerově nemoci (podle: Terry a Buccafusco, 2003)

co se týče rychlosti syntézy ACh, proto se zdá, že popsán pokles aktivity ChAT není příčinou úbytku kognitivních funkcí, ale jen důsledkem odumírání cholinergních neuronů v bazální části čelního mozkového laloku. Několik *post-mortem* studií prozradilo, že snížení aktivity a rozsah ztráty neuronů v nucleus basalis Meynerti odpovídají závažnosti projevů nemoci měřené psychologickými testy. Byly rovněž pozorovány poruchy ve vysokoafinním vylučování cholinu, v uvolňování acetylcholinu či zásobování nervovým růstovým faktorem (Auld a spol., 2002). Další pokusy prokázaly snížení počtu nikotinových a M2 muskarinových receptorů, o nichž se předpokládá, že jsou ve velké míře lokalizovány na presynaptických membránách. Na druhou stranu M1 a M3 muskarinové receptory umístěné na postsynaptické membráně zůstávají relativně uchovány. Kromě toho se také objevují důkazy o poruchách



spřažení muskarinových, zejména M1, receptorů s G-proteiny a s tím souvisejícími změnami v systému druhých poslů (Francis a spol., 1999; Tsang a spol., 2006; Machová a spol., 2007).

Jak již bylo uvedeno, u lidí trpících AD v konečných stádiích byla zjištěna těžká cholinergní denervace mozkové kůry. V případě presenilní formy Alzheimerovy nemoci (AD s brzkým nástupem) se tento patologický jev vyskytuje už i v počátečních fázích choroby. Ovšem výskyt těchto těžkých cholinergních poruch i u začínající senilní Alzheimerovy nemoci (AD s pozdním nástupem) nebyl potvrzen. U změn na cholinergních neuronech při senilní formě AD je nutno vzít do úvahy také přirozené s věkem související zhoršování funkce cholinergních neuronů. Během stárnutí podléhají cholinergní neurony pozvolné degeneraci, jejímiž projevy jsou právě snížení aktivity ChAT nebo dokonce částečné odumírání. Vzájemný vztah mezi ztrátou cholinergních neuronů a mírou kognitivních poruch měřených pomocí testu MMS (Mini mental state) u osob zdravých i postižených demencí prozradil, že poruchy kognitivních funkcí jsou měřitelné až tehdy, když degenerace postihne více než 30% neuronů v bazální části frontálního laloku (Schliebs a Arendt, 2006).

Dysfunkce cholinergních neuronů není osamoceným projevem AD. Patogeneze AD se účastní celý komplex biochemických procesů – ukládání proteinu  $\beta$ -amyloidu v podobě extracelulárních plaků v mozkové kůře a oblasti hippokampu, tvorba neurofibrilárních klubíček uvnitř neuronů, oxidativní stres či poruchy signalizace spojené s nervovým růstovým faktorem (NGF). Věda dosáhla značného pokroku v porozumění těmto dějům, ale přesná příčina vzniku AD dosud zůstává zahalena tajemstvím. Střetávají se tu dva pohledy. První říká, že spouštěcím mechanismem při vzniku AD je kaskáda reakcí, na jejímž konci je  $\beta$ -amyloid usazující se ve formě plaků. Naproti tomu druhý považuje za klíčový krok pro nástup symptomů poškození cholinergních neuronů a s tím spojené poruchy cholinergní neurotransmise.

#### **4.3.3. Vliv $\beta$ -amyloidu na cholinergní neurotransmisi**

Nezměrné množství pokusů bylo a je stále prováděno, aby došlo k objasnění přesného mechanismu působení  $A\beta$  na cholinergní, ale i jiné, neurony. Faktem zůstává, že v případě Alzheimerovy nemoci se v mozku objevuje více  $\beta$  amyloidu než v tkáni zdravé. U sporadické formy není zatím u většiny pacientů přesně znám důvod tohoto jevu. Bylo zjištěno, že alelický polymorfismus v genu pro apolipoprotein E (ApoE) hraje roli v některých případech AD s pozdním nástupem v tom smyslu, že ApoE4 fenotyp snižuje věk pro příchod nemoci. Nicméně situace okolo familiální AD se zdá být o poznání jasnější. Zvýšená hladina  $A\beta$  je tu

způsobena jeho nadměrnou produkcí zapříčiněnou mutacemi v genu pro APP, díky nimž se tento prekursorový protein stává náchylnějším ke štěpení  $\beta$ -sekretázou. Dalším důvodem jsou mutace v genech pro proteiny presenilin 1 na chromozomu 14 a presenilin 2 na chromozomu 1, které vedou k intenzivnějšímu enzymatickému štěpení  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretázou

Několik studií prokázalo, že  $\beta$ -amyloid snižuje výlev acetylcholinu v různých částech krysího mozku (Kar a spol., 1996 a 1998, Vaucher a spol., 2001). Tento efekt je závislý na koncentraci, inhibice výlevu ACh je pozorovatelná při poměrně širokém koncentračním rozpětí ( $10^{-12}$  –  $10^{-18}$ M). Zároveň je působení  $A\beta$  dosti místně specifické – nervová zakončení hippokampu a kůry frontálního laloku jsou k působení  $A\beta$  citlivá, zatímco cholinergní neurony striata zůstávají nezasážené. V účincích  $A\beta$  je rovněž patrná selektivita, protože narušené sekvence nemají na výlev ACh vliv (Kar a spol., 1996).  $\beta$ -amyloid se také podílí na redukcí vysokoafinního vychytávání cholinu (high affinity choline uptake – HACU) neurony z vnějšího prostředí (Kar a spol., 1998, Křištofiková a spol., 2001). Takto zpětně transportovaný cholin je pak neuronem znovu využit pro syntézu ACh. Působení  $A\beta$  je zde těsně spjata s depolarizací membrány, neboť v klidu není vliv  $A\beta$  signifikantní. Depolarizace dosažená experimentálně pomocí KCl výrazně zvýšila hodnoty HACU.  $\beta$ -amyloid o koncentraci 100 nM následně snížil úroveň HACU dosahovanou při depolarizaci na úroveň, která odpovídá klidovému stavu (Křištofiková a spol., 2001).

Pokusy Pedersena a jeho spolupracovníků (1996) ukázaly snížení intracelulární hladiny ACh v SN56 buňkách (buňkách odvozených od myších septálních cholinergních neuronů) v důsledku působení  $A\beta$ . Účinkem  $A\beta_{1-42}$  o koncentraci 100 nM poklesla hladina acetylcholinu v těchto buňkách o 43%. Bylo rovněž zaznamenáno snížení aktivity ChAT v SN56 buňkách jak vlivem  $A\beta_{1-42}$ , tak i vlivem  $A\beta_{1-28}$ , a to o 41%, resp. o 28%. Naproti tomu acetylcholinesterázová aktivita zůstala nezměněna. Dále byla nalezena souvislost poklesu intracelulární hladiny ACh způsobeného  $A\beta$  a tyrosinovou fosforylací, která je vlivem  $A\beta$  naopak zvýšená. Inhibitory tyrosinkináz zabránily snížení hladiny ACh vlivem  $A\beta_{1-42}$  i  $A\beta_{1-28}$  (Pedersen a Blusztajn, 1997). Podobné výsledky zaznamenal i Hoshi a jeho tým. Po dvanáctihodinovém působení  $A\beta_{1-42}$  na primární buněčné kultury z krysího septa poklesla koncentrace ACh až o 40%, efekt  $A\beta_{1-40}$  se neprokázal. Vlivem  $A\beta$  na tyto buňky došlo rovněž ke snížení aktivity pyruvátdehydrogenázy (PDH) až o 30% oproti kontrolní skupině (Hoshi a spol., 1997).

Dalším ze způsobů, kterým  $A\beta$  působí na cholinergní neurotransmisi, je ovlivnění signalizace acetylcholinovými receptory. V krysích hippokampálních interneuronech blokuje 100 nM  $A\beta_{1-42}$  proud iontů procházejících kanálem a snižuje pravděpodobnost otevření

kanálu. Ovlivnění funkce nAChR se děje okamžitě, v řádu milisekund na jednotlivých kanálech a do tří minut na tkáňových řízcích. Různé podtypy nAChR jsou rozdílně náchylné k účinkům  $A\beta_{1-42}$  (Pettit a spol., 2001). Vypadá to, že signalizace prostřednictvím muskarinových AChR je také vnímavá k působení  $\beta$ -amyloidu. Koncentrace  $A\beta$  100nM nebo vyšší prokazatelně snižuje karbacholem vyvolaný vtok vápenatých iontů do buněk. Nebyl prokázán přímo vliv na receptory jako takové, ale vyšly najevo poruchy spřažení G-proteinů s receptorem (Kelly a spol., 1996; Tsang a spol., 2005; Machová a spol., 2006). To by mohlo mít důležitý význam v patogenezi onemocnění. Oslabení přenosu signálu muskarinovými M1 receptory, ale i dalšími receptory spřaženými s  $G_{q/11}$  G-proteiny, vede ke snížení produkce neuroprotektivního sAPP $\alpha$  a zvýšení tvorby  $\beta$ -amyloidních fragmentů (Nitsch a spol., 1992 a 2000; Rossner a spol., 1998)

Stále není zcela jasně vysvětleno, zda je  $\beta$ -amyloid tím spouštěcím faktorem pro degenerativní změny neuronů, které mohou mít za následek Alzheimerovu chorobu. Není však bezdůvodné předpovídat, že  $A\beta$  začíná ovlivňovat cholinergní neurony už ve své solubilní podobě ještě před agregací do podoby plaků. Působení  $A\beta$  na neurony je dlouhodobé, protože AD je převážně nemoc vyššího věku. Pravděpodobně tu v patologickém procesu existuje fáze, kdy zvýšené množství solubilního  $A\beta$  interaguje s neurony ještě bez klinických projevů. Délku této fáze je u pacientů prakticky nemožné určit, ačkoliv procesy v ní probíhající jsou možná těmi klíčovými.

#### **4.3.4. Dysfunkce cholinergních neuronů a nervový růstový faktor**

Nervový růstový faktor (NGF) je nezbytný pro zdárný vývin neuronů během embryonálního vývoje, ale tím jeho úloha zdaleka nekončí. NGF je hojně přítomen v oblasti cholinergních neuronů bazální části frontálního laloku a dále v částech mozku, které jsou těmito cholinergními neurony inervovány. Po celý život pomáhá NGF udržet tyto neurony v životaschopném stavu. K sekreci NGF dochází prostřednictvím cílových buněk inervovaných cholinergním neuronem. Uvolněný NGF se váže na receptory v oblasti nervového zakončení a je retrográdně transportován cholinergním axonem do těla neuronu.

O důležitosti NGF pro cholinergní neurony svědčí experiment s myši exprimujícími neutralizující protilátku proti NGF. Tyto myši vykazují v patnácti měsících rozsáhlé odumírání neuronů, uloženi  $A\beta$  a intenzivní tvorbu neurofibrilárních klubíček. Navíc se u těchto myši projevuje dysfunkce cholinergních neuronů a problémy s prostorovou pamětí a orientací projevující se v behaviorálních testech (Capsoni a spol., 2000).

Mohlo by se zdát, že degeneraci cholinergních neuronů na bázi předního mozku doprovází pokles hladiny NGF v mozkové kůře. Ale *post-mortem* pokusy ukázaly, že je hladina NGF v kortexu při Alzheimerově nemoci naopak vyšší ve srovnání s kontrolní tkání pocházející od zdravých osob. To pravděpodobně souvisí s narušením retrográdního transportu NGF prostřednictvím cholinergních neuronů (Hellweg a spol., 1998). Také při experimentech s myši byly u starších zvířat zaznamenány vyšší korové koncentrace NGF než u mladších jedinců (Katoh-Semba a spol., 1998). Předpoklad o hypofunkčním retrográdním transportu podporují výsledky pokusu, při kterém byl do hippocampu vpraven radioaktivním jódem ( $^{125}\text{I}$ ) značený NGF. Následná analýza septálních neuronů ukázala, že u starých krys dochází k třetinovému poklesu počtu neuronů retrográdně transportujících značený NGF oproti mladým kontrolám. Tyto neurony neschopné transportu NGF byly též znatelně menší než neurony kontrolních krys, u kterých probíhal retrográdní transport značeného NGF bez problémů (Cooper a spol., 1994).

Nedostatek NGF má pro neurony vážné následky a vede k jejich atrofii a snížené funkci. V této souvislosti je zajímavý nálezný poruch kognitivních funkcí a pokles počtu cholinergních neuronů podle imunohistochemie cholinacetyltransferázy bez změny celkového počtu všech neuronů v bazálním mozku u opic středního věku ve srovnání s mladými. Podání NGF tyto změny upravovalo (Smith a spol., 1999; Tuszynski a spol., 2000). Tato pozorování jsou vysvětlována reversibilní dediferenciací cholinergních neuronů způsobenou deprivací trofického vlivu NGF v průběhu stárnutí. Poruchy v signalizaci prostřednictvím NGF jsou dalším fenoménem přispívajícím k hypofunkci neuronů na bázi předního mozku, které jsou na působení NGF obzvláště citlivé. Alzheimerova choroba je charakteristická právě poškozením těchto cholinergních neuronů. Dá se tedy předpokládat, že i NGF představuje další střípek do mozaiky faktorů účastnících se patogeneze AD.

## 5. Závěr

Během posledních několika desítek let došlo díky intenzivnímu vědeckému bádání k prudkému vývoji názorů na mechanismy vzniku a rozvoje Alzheimerovy nemoci. V současnosti panuje shoda na tom, že prvotní příčinou onemocnění je zvýšené hromadění  $\beta$ -amyloidu, které může být způsobeno jeho zvýšenou produkcí nebo sníženým odbouráváním. Nejškodlivější formou  $\beta$ -amyloidu jsou rozpustné oligomery hlavně fragmentu  $A\beta_{1-42}$ . U dědičných forem Alzheimerovy nemoci je zvýšená produkce  $\beta$ -amyloidu zapříčiněna mutacemi v genu pro APP, díky nimž se tento prekurzorový protein stává náchylnějším ke štěpení  $\beta$ -sekretázou. Dalším důvodem jsou mutace v genech pro proteiny presenilin 1 a presenilin 2, které vedou k intenzivnějšímu enzymatickému štěpení  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretázou nebo „gene dosage effect“ u trisomie 21. chromosomu, který obsahuje gen pro APP. U sporadické formy bylo zjištěno, že alelický polymorfismus v genu pro apolipoprotein E hraje roli v některých případech AD s pozdním nástupem v tom smyslu, že ApoE4 fenotyp snižuje věk pro příchod nemoci. Je nutné si však uvědomit, že u převážné většiny pacientů se sporadickou formou onemocnění se nenachází žádný jasný genetický defekt a příčina zvýšení hladiny  $\beta$ -amyloidu není známa.

Alzheimerova choroba sice není výlučně cholinergní nemocí, nicméně mnoho studií potvrdilo výrazné poškození cholinergních neuronů v bazálním mozku a vysokou citlivost cholinergních synapsí k toxickému působení  $\beta$ -amyloidu. Stále se však nepodařilo objasnit iniciační spouštěcí mechanismus zvýšení tvorby  $\beta$ -amyloidu u nejčastěji se vyskytujících sporadických případů. Ten tak nadále zůstává jakýmsi svatým grálem neurologického a neurochemického výzkumu. Pro významnou úlohu cholinergní neurotransmise svědčí přirozené ochabování cholinergní muskarinové neurotransmise v průběhu stárnutí, které může mít za následek snížení stimulace muskarinových M1 receptorů a tím i snížení neamyloidogenního  $\alpha$ -sekretázového štěpení APP. Právě proto se zdají být příslibem do budoucna selektivní agonisté M1 receptorů. V současnosti neexistuje lék, který by byl schopen nemoc zcela vyléčit nebo jí předcházet. K dispozici jsou pouze léčiva umožňující oddálit propuknutí nemoci v plné síle a tím i prodloužit plnohodnotný život postižených osob. Mezi nejpoužívanější patří inhibitory acetylcholinesterázy (např. Donepezil či Rivastigmin), které zpomalují rozklad acetylcholinu uvolněného do synaptické štěrbině a tím prodlužují jeho účinek.

Několik posledních vět vyznívá sice poměrně pesimisticky, ale každý člověk může sám sobě do určité míry snížit riziko onemocnění Alzheimerovou chorobou. Podobně jako svaly, i mozek v důsledku nízkého namáhání trpí a jeho výkonnost klesá. Duševní aktivita a zdravý životní styl mohou tedy částečně přispět ke snížení pravděpodobnosti vzniku AD (Snowdon, 2003). Nehledě na to, že se tak člověk chrání i před dalšími nemocemi, které naši vyspělou společnost v současnosti ohrožují.

## 6. Literatura

- Abrams, P., K.E. Andersson, J.J. Buccafusco, C. Chapple, W.C. de Groat, A.D. Fryer, G. Kay, A. Laties, N.M. Nathanson, P.J. Pasricha, and A.J. Wein. 2006. Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br J Pharmacol* 148:565-78.
- Albuquerque, E.X., E.F. Pereira, R. Bonfante-Cabarcas, M. Marchioro, H. Matsubayashi, M. Alkondon, and A. Maelicke. 1996. Nicotinic acetylcholine receptors on hippocampal neurons: cell compartment-specific expression and modulatory control of channel activity. *Prog Brain Res* 109:111-24.
- Araujo, D.M., P.A. Lapchak, Y. Robitaille, S. Gauthier, and R. Quirion. 1988. Differential alteration of various cholinergic markers in cortical and subcortical regions of human brain in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 50:1914-23.
- Atwood, C.S., R.N. Martins, M.A. Smith, and G. Perry. 2002. Senile plaque composition and posttranslational modification of amyloid-beta peptide and associated proteins. *Peptides* 23:1343-50.
- Auld, D.S., T.J. Kornecook, S. Bastianetto, and R. Quirion. 2002. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog Neurobiol* 68:209-45.
- Bartus, R.T., R.L. Dean, B. Beer, and A.S. Lippa. 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217:408-14.
- Behl, C., J.B. Davis, R. Lesley, and D. Schubert. 1994. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77:817-27.
- Bonner, T.I. 1989. The molecular basis of muscarinic receptor diversity. *Trends Neurosci* 12:148-51.
- Bonner, T.I. 1989. New subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci Suppl*:11-5.
- Bonner, T.I., N.J. Buckley, A.C. Young, and M.R. Brann. 1987. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 237:527-32.
- Bonner, T.I., A.C. Young, M.R. Brann, and N.J. Buckley. 1988. Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* 1:403-10.
- Bowen, D.M., C.B. Smith, P. White, and A.N. Davison. 1976. Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain* 99:459-96.
- Capsoni, S., G. Ugolini, A. Comparini, F. Ruberti, N. Berardi, and A. Cattaneo. 2000. Alzheimer-like neurodegeneration in aged antinerve growth factor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6826-31.
- Cardoso, S.M., S. Santos, R.H. Swerdlow, and C.R. Oliveira. 2001. Functional mitochondria are required for amyloid beta-mediated neurotoxicity. *FASEB J* 15:1439-41.
- Carter, J. and C.F. Lippa. 2001. Beta-amyloid, neuronal death and Alzheimer's disease. *Curr Mol Med* 1:733-7.
- Casadesus, G., M.A. Smith, S. Basu, J. Hua, D.E. Capobianco, S.L. Siedlak, X. Zhu, and G. Perry. 2007. Increased isoprostane and prostaglandin are prominent in neurons in Alzheimer disease. *Mol Neurodegener* 2:2
- Cooper, J.D., D. Lindholm, and M.V. Sofroniew. 1994. Reduced transport of 125I nerve growth factor by cholinergic neurons and down-regulated TrkA expression in the medial septum of aged rats. *Neuroscience* 62:625-9.
- Cooper, J.D., A. Salehi, J.D. Delcroix, C.L. Howe, P.V. Belichenko, J. Chua-Couzens, J.F. Kilbridge, E.J. Carlson, C.J. Epstein, and W.C. Mobley. 2001. Failed retrograde transport of NGF in a mouse model of Down's syndrome: reversal of cholinergic neurodegenerative phenotypes following NGF infusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10439-44.

- Corder, E.H., A.M. Saunders, W.J. Strittmatter, D.E. Schmechel, P.C. Gaskell, G.W. Small, A.D. Roses, J.L. Haines, and M.A. Pericak-Vance. 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261:921-3.
- Dani, J.A. 2001. Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol Psychiatry* 49:166-74.
- Delacourte, A., J.P. David, N. Sergeant, L. Buee, A. Wattez, P. Vermersch, F. Ghzali, C. Fallet-Bianco, F. Pasquier, F. Lebert, H. Petit, and C. Di Menza. 1999. The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 52:1158-65.
- Dolezal, V. and J. Kasparova. 2003. Beta-amyloid and cholinergic neurons. *Neurochem Res* 28:499-506.
- Donnerer, J. and F. Lembeck. 2006. The Chemical Languages of the nervous system: history of scientists and substances. Basel: Karger 2006
- Ferri, C.P., M. Prince, C. Brayne, H. Brodaty, L. Fratiglioni, M. Ganguli, K. Hall, K. Hasegawa, H. Hendrie, Y. Huang, A. Jorm, C. Mathers, P.R. Menezes, E. Rimmer, and M. Sczufca. 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366:2112-7.
- Francis, P.T., A.M. Palmer, M. Snape, and G.K. Wilcock. 1999. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66:137-47.
- Furukawa, K., B.L. Sopher, R.E. Rydel, J.G. Begley, D.G. Pham, G.M. Martin, M. Fox, and M.P. Mattson. 1996. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem* 67:1882-96.
- Gandy, S. 2005. The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest* 115:1121-9.
- Geula, C. and M.M. Mesulam. 1996. Systematic regional variations in the loss of cortical cholinergic fibers in Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* 6:165-77.
- Giacobini, E. 2003. Cholinergic function and Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 18:S1-5.
- Gitter, B.D., L.M. Cox, R.E. Rydel, and P.C. May. 1995. Amyloid beta peptide potentiates cytokine secretion by interleukin-1 beta-activated human astrocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10738-41.
- Grimm, M.O., H.S. Grimm, A.J. Patzold, E.G. Zinser, R. Halonen, M. Duering, J.A. Tschape, B.D. Strooper, U. Muller, J. Shen, and T. Hartmann. 2005. Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nat Cell Biol* 7:1118-23
- Haass, C. and D.J. Selkoe. 1993. Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* 75:1039-42.
- Haass, C. and D.J. Selkoe. 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:101-12.
- Hardy, J. and D.J. Selkoe. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-6.
- Hellweg, R., C.A. Gericke, K. Jendroska, H.D. Hartung, and J. Cervos-Navarro. 1998. NGF content in the cerebral cortex of non-demented patients with amyloid-plaques and in symptomatic Alzheimer's disease. *Int J Dev Neurosci* 16:787-94.
- Herlitze, S., D.E. Garcia, K. Mackie, B. Hille, T. Scheuer, and W.A. Catterall. 1996. Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380:258-62.
- Hoshi, M., A. Takashima, M. Murayama, K. Yasutake, N. Yoshida, K. Ishiguro, T. Hoshino, and K. Imahori. 1997. Nontoxic amyloid beta peptide 1-42 suppresses acetylcholine synthesis. Possible role in cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 272:2038-41.
- Chatonnet, A. and O. Lockridge. 1989. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J* 260:625-34.



- Jones, S.V., J.L. Barker, N.J. Buckley, T.I. Bonner, R.M. Collins, and M.R. Brann. 1988. Cloned muscarinic receptor subtypes expressed in A9 L cells differ in their coupling to electrical responses. *Mol Pharmacol* 34:421-6.
- Kar, S., A.M. Issa, D. Seto, D.S. Auld, B. Collier, and R. Quirion. 1998. Amyloid beta-peptide inhibits high-affinity choline uptake and acetylcholine release in rat hippocampal slices. *J Neurochem* 70:2179-87.
- Kar, S., D. Seto, P. Gaudreau, and R. Quirion. 1996. Beta-amyloid-related peptides inhibit potassium-evoked acetylcholine release from rat hippocampal slices. *J Neurosci* 16:1034-40.
- Kar, S., S.P. Slowikowski, D. Westaway, and H.T. Mount. 2004. Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Psychiatry Neurosci* 29:427-41.
- Katoh-Semba, R., R. Semba, I.K. Takeuchi, and K. Kato. 1998. Age-related changes in levels of brain-derived neurotrophic factor in selected brain regions of rats, normal mice and senescence-accelerated mice: a comparison to those of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Neurosci Res* 31:227-34.
- Kelly, J.F., K. Furukawa, S.W. Barger, M.R. Rengen, R.J. Mark, E.M. Blanc, G.S. Roth, and M.P. Mattson. 1996. Amyloid beta-peptide disrupts carbachol-induced muscarinic cholinergic signal transduction in cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6753-8.
- Kosik, K.S., C.L. Joachim, and D.J. Selkoe. 1986. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4044-8.
- Krejčí, A. and S. Tuček. 2002. Quantitation of mRNAs for M(1) to M(5) subtypes of muscarinic receptors in rat heart and brain cortex. *Mol Pharmacol* 61:1267-72.
- Křištofiková, Z., H. Tejkalová and J. Klaschka. 2001. Amyloid Beta Peptide 1-40 and the Function of Rat Hippocampal Hemicholinium-3 Sensitive Choline Carriers: Effects of a Proteolytic Degradation In Vitro. *Neurochem Res* 26:203-212
- Kubo, T., K. Fukuda, A. Mikami, A. Maeda, H. Takahashi, M. Mishina, T. Haga, K. Haga, A. Ichiyama, K. Kangawa, and a.l. et. 1986. Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 323:411-6.
- Kubo, T., A. Maeda, K. Sugimoto, I. Akiba, A. Mikami, H. Takahashi, T. Haga, K. Haga, A. Ichiyama, K. Kangawa, and a.l. et. 1986. Primary structure of porcine cardiac muscarinic acetylcholine receptor deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett* 209:367-72.
- Lindstrom, J., R. Anand, V. Gerzanich, X. Peng, F. Wang, and G. Wells. 1996. Structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Prog Brain Res* 109:125-37.
- Loffelholz, K. 1996. Muscarinic receptors and cell signalling. *Prog Brain Res* 109:191-4.
- Logothetis, D.E., Y. Kurachi, J. Galper, E.J. Neer, and D.E. Clapham. 1987. The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K<sup>+</sup> channel in heart. *Nature* 325:321-6.
- Machová, E., J. Jakubík, P. Michal, M. Oksman, H. Iivonen, H. Tanila, and V. Doležal. 2006. Impairment of muscarinic transmission in transgenic APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice. *Neurobiol Aging*, v tisku
- Machová, E, J. Jakubík, E.E. El-Fakahany, and V. Doležal. 2007. Wash-resistently bound xanomeline inhibits acetylcholine release by persistent activation of presynaptic M2 and M4 muscarinic receptors in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*, v tisku
- Mark, R.J., Z. Pang, J.W. Geddes, K. Uchida, and M.P. Mattson. 1997. Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation. *J Neurosci* 17:1046-54.
- Mattson, M.P. 1997. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* 77:1081-132.

- Mattson, M.P. and W.A. Pedersen. 1998. Effects of amyloid precursor protein derivatives and oxidative stress on basal forebrain cholinergic systems in Alzheimer's disease. *Int J Dev Neurosci* 16:737-53.
- McGeer, P.L. and E.G. McGeer. 1999. Inflammation of the brain in Alzheimer's disease: implications for therapy. *J Leukoc Biol* 65:409-15.
- Mesulam, M.M. 2004. The cholinergic innervation of the human cerebral cortex. *Prog Brain Res* 145:67-78.
- Mesulam, M.M. 1990. Human brain cholinergic pathways. *Prog Brain Res* 84:231-41.
- Mesulam, M.M., E.J. Mufson, B.H. Wainer, and A.I. Levey. 1983. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* 10:1185-201.
- Mucke, L., E. Masliah, G.Q. Yu, M. Mallory, E.M. Rockenstein, G. Tatsuno, K. Hu, D. Kholodenko, K. Johnson-Wood, and L. McConlogue. 2000. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20:4050-8.
- Nilsson L., A. Nordberg, J. Hardy, P. Wester and B. Winblad. 1986. Physostigmine restores 3H-acetylcholine efflux from Alzheimer brain slices to normal level. *J Neural Transm* 67:275-85
- Nitsch, R.M., M. Deng, M. Tennis, D. Schoenfeld, and J.H. Growdon. 2000. The selective muscarinic M1 agonist AF102B decreases levels of total Abeta in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 48:913-8.
- Nitsch, R.M., B.E. Slack, R.J. Wurtman, and J.H. Growdon. 1992. Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* 258:304-7.
- Nukina, N., K.S. Kosik, and D.J. Selkoe. 1987. Recognition of Alzheimer paired helical filaments by monoclonal neurofilament antibodies is due to crossreaction with tau protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:3415-9.
- Pedersen, W.A. and J.K. Blusztajn. 1997. Characterization of the acetylcholine-reducing effect of the amyloid-beta peptide in mouse SN56 cells. *Neurosci Lett* 239:77-80.
- Pedersen, W.A., M.A. Kloczewiak, and J.K. Blusztajn. 1996. Amyloid beta-protein reduces acetylcholine synthesis in a cell line derived from cholinergic neurons of the basal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8068-71.
- Perry, E.K., R.H. Perry, G. Blessed, and B.E. Tomlinson. 1977. Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet* 1:189
- Pettit, D.L., Z. Shao, and J.L. Yakel. 2001. beta-Amyloid(1-42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. *J Neurosci* 21:RC120
- Podlisny M.B., G. Lee, and D.J. Selkoe. 1987. Gene dosage of the amyloid beta precursor protein in Alzheimer's disease. *Science* 238:669-71
- Rossner, S., U. Ueberham, R. Schliebs, J.R. Perez-Polo, and V. Bigl. 1998. The regulation of amyloid precursor protein metabolism by cholinergic mechanisms and neurotrophin receptor signaling. *Prog Neurobiol* 56:541-69.
- Sargent, P.B. 1993. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Neurosci* 16:403-43.
- Schliebs, R. and T. Arendt. 2006. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 113:1625-44.
- Selkoe, D.J. 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81:741-66.
- Seubert, P., T. Oltersdorf, M.G. Lee, R. Barbour, C. Blomquist, D.L. Davis, K. Bryant, L.C. Fritz, D. Galasko, L.J. Thal, and a.l. et. 1993. Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature* 361:260-3.

- Seubert, P., C. Vigo-Pelfrey, F. Esch, M. Lee, H. Dovey, D. Davis, S. Sinha, M. Schlossmacher, J. Whaley, C. Swindlehurst, and a.l. et. 1992. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359:325-7.
- Shoji, M., T.E. Golde, J. Ghiso, T.T. Cheung, S. Estus, L.M. Shaffer, X.D. Cai, D.M. McKay, R. Tintner, B. Frangione, and a.l. et. 1992. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* 258:126-9.
- Sims, N.R., D.M. Bowen, C.C. Smith, R.H. Flack, A.N. Davison, J.S. Snowden, and D. Neary. 1980. Glucose metabolism and acetylcholine synthesis in relation to neuronal activity in Alzheimer's disease. *Lancet* 1:333-6.
- Smith, C.D., J.M. Carney, P.E. Starke-Reed, C.N. Oliver, E.R. Stadtman, R.A. Floyd, and W.R. Markesbery. 1991. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10540-3.
- Smith, D.E., J. Roberts, F.H. Gage, and M.H. Tuszynski. 1999. Age-associated neuronal atrophy occurs in the primate brain and is reversible by growth factor gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10893-8.
- Smith, M.A., P.L. Richey Harris, L.M. Sayre, J.S. Beckman, and G. Perry. 1997. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 17:2653-7.
- Snowdon, D.A. 2003. Healthy aging and dementia: findings from the Nun Study. *Ann Intern Med* 139:450-4.
- Tanzi, R.E., J.F. Gusella, P.C. Watkins, G.A. Bruns, P. St George-Hyslop, M.L. Van Keuren, D. Patterson, S. Pagan, D.M. Kurnit, and R.L. Neve. 1987. Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235:880-4.
- Terry, A.V., and J.J. Buccafusco. 2003. The Cholinergic hypothesis of Age and Alzheimer's Disease – Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. *J Pharmacol Exp Ther* 306:821-827
- Tsang, S.W., M.K. Lai, S. Kirvell, P.T. Francis, M.M. Esiri, T. Hope, C.P. Chen, and P.T. Wong. 2006. Impaired coupling of muscarinic M(1) receptors to G-proteins in the neocortex is associated with severity of dementia in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 27:1216-23
- Tuček, S. 1983. Acetylcoenzyme A and the synthesis of acetylcholine in neurones: review of recent progress. *Gen Physiol Biophys* 2:313-24.
- Tuszynski, M.H. 2000. Intraparenchymal NGF infusions rescue degenerating cholinergic neurons. *Cell Transplant* 9:629-36.
- Vaucher, E., N. Aumont, D. Pearson, W. Rowe, J. Poirier, and S. Kar. 2001. Amyloid beta peptide levels and its effects on hippocampal acetylcholine release in aged, cognitively-impaired and -unimpaired rats. *J Chem Neuroanat* 21:323-9.
- Velez-Pardo, C., M. Jimenez Del Rio, and F. Lopera. 1998. Familial Alzheimer's disease: oxidative stress, beta-amyloid, presenilins, and cell death. *Gen Pharmacol* 31:675-81.
- Wess, J. 1996. Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit Rev Neurobiol* 10:69-99.
- White, P., C.R. Hiley, M.J. Goodhardt, L.H. Carrasco, J.P. Keet, I.E. Williams, and D.M. Bowen. 1977. Neocortical cholinergic neurons in elderly people. *Lancet* 1:668-71.
- Whitehouse, P.J., D.L. Price, A.W. Clark, J.T. Coyle, and M.R. DeLong. 1981. Alzheimer's disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann Neurol* 10:122-6.
- Zheng, H., M. Jiang, M.E. Trumbauer, R. Hopkins, D.J. Sirinathsinghji, K.A. Stevens, M.V. Conner, H.H. Slunt, S.S. Sisodia, Y.H. Chen, and L.H. van der Ploeg. 1996. Mice deficient for the amyloid precursor protein gene. *Ann N Y Acad Sci* 777:421-6.
- Zheng, W.H., S. Bastianetto, F. Mennicken, W. Ma, and S. Kar. 2002. Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience* 115:201-11.