

**UNIVERZITA KONŠTANTÍNA FILOZOFA V NITRE  
FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED**

**BAKALÁRSKA PRÁCA**

**2012**

**Petra Jarošová**

**UNIVERZITA KONŠTANTÍNA FILOZOFA V NITRE**

**FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED**

**KATEDRA CHÉMIE**

---

**MECHANIZMY PÔSOBENIA MEDI V  
NEURODEGENERATÍVNYCH OCHORENIACH**

**Bakalárska práca**

**Štúdijný program:** učiteľstvo akademických predmetov chémie a ekológia

**Školiace pracovisko:** Univerzita Konštantína filozofa v Nitre, Fakulta prírodných vied

**Školiteľ:** prof. Ing. Marián Valko, DrSc.

**Nitra 2012**

**Petra Jarošová**

## **POĎAKOVANIE**

Touto cestou by som sa ráda poďakovala za trpezlivosť a rady poskytnuté pri písaní Bakalárskej práce svojmu odbornému konzultantovi prof. Ing. Mariánovi Valkovi, DrSc.

## **ABSTRAKT**

JAROŠOVÁ ,Petra: *Mechanizmy pôsobenia medi v neurodegeneratívnych ochoreniach* [bakalárska práca] / Petra Jarošová –Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre,Fakulta prírodných vied,Katedra chémie.-školiťel': prof. Ing.Marián Valko, DrSc.-stupeň odbornej kvalifikácie:Bakalár.-Nitra: FPV UKF,2012. 31 str.

Cieľom bakalárskej práce je oboznámenie sa s úlohou redoxne-aktívnych kovov, predovšetkým medi a jej toxicity pri vzniku neneurodegeneratívnych ochorení, predovšetkým Alzheimerovej choroby a Parkinsonovej choroby. Prvá časť práce je venovaná teoretickým poznatkom medi, jej výskytu a úlohe medi v ľudskom organizme a jej úlohe pri vzniku voľných radikálov. Druhá časť práce je zameraná na neurodegeneratívne ochorenia, ktorých pôvod je spájaný s tvorbou voľných radikálov, resp. oxidačným stresom. Zvlášť popísaná je Alzheimerová choroba a Parkinsonová choroba a ich etiológia.

**Kľúčové slová:** meď, voľné radikály, oxidačný stres, antioxidanty, neurodegeneratívne ochorenia, Parkinsonová choroba, Alzheimerová choroba.

## **ABSTRACT**

JAROŠOVÁ, Petra: *Mechanisms of copper action in neurological diseases* .  
[Bachelor thesis] / Petra Jarošová –The Constantine the philosopher university in Nitra,  
Faculty of natural science, Department of chemistry.-Supervisor: prof.Ing.Marián Valko  
DrSc. – degree of professional qualification: Bachelor.-Nitra : FPV UKF,2012. 31 s.

The Bc Thesis is dealing with the role of redox-active metals, especially copper in the toxicity of neurodegenerative diseases, particularly Alzheimer's and Parkinson's disease. The first part of the Thesis is devoted to the theoretical background of copper, its occurrence, properties, the role of copper in the human body and its role in the formation of free radicals. The second part of the Thesis focuses on neurodegenerative diseases, whose origin is associated with the enhanced formation of free radicals, termed also oxidative stress. The role of oxidative stress in the etiology of Alzheimer's disease and Parkinson's disease is discussed.

**Key words:** copper, free radicals, oxidative stress, antioxidants, neurodegenerative disorders, Alzheimer's disease, Parkinson's disease.

## **OBSAH**

<b>ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Med' v biologických systémoch.....</b>	<b>2</b>
1.1 Všeobecné poznatky o medi.....	2
1.2 Homeostáza medi.....	4
1.3 Med' a voľné radikály.....	6
<b>2. Neurodegeneratívne ochorenia.....</b>	<b>11</b>
2.1 Med' a neurodegeneratívne ochorenia.....	12
2.2 Alzheimerova choroba a antioxidanty.....	16
2.3 Parkinsonová choroba.....	19
<b>3. Záver.....</b>	<b>21</b>
<b>4. Literatúra.....</b>	<b>22</b>

## ÚVOD

Vplyvom redoxných kovov na niektoré závažné ochorenia ,ako je napríklad meď sa zaoberajú rôzne štúdie a výskumy, ktoré potvrdzujú ich účasť na vzniku a rozvoji závažných civilizačných chorôb ,ako sú kardiovaskulárne ochorenia,metabolické poruchy, ale aj neurodegeneratívne ochorenia [1]. Na druhej strane mnohé štúdie preukázali jej pozitívny vplyv, ktorý spočíva v účasti medi na eliminácii škodlivých kyslíkových radikálov. Na základe týchto zistení sa dokázala toxicita tohoto redoxného kovu, medi (Cu) a tiež jeho úloha na vzniku voľných radikálov, ktoré nepriaznivo vplyvajú na bunkové systémy [2]. Mnohé vedecké štúdie sú zamerané práve na neurodegeneratívne ochorenia ako aj príčinu ich vzniku. V súčasnosti je dokázané, že nerovnováha resp.porucha homeostázy medi ako aj iných redoxných kovov v ľudskom organizme má svoj podiel na vzniku tohoto závažného nervového ochorenia, neurodegenerácie [3].

Cieľom mojej bakalárskej práce je predovšetkým priblížiť jednotlivé mechanizmy, ktorými dochádza k vzniku neurodegeneratívnych ochorení práve vplyvom redoxného kovu medi, ako aj možnosťam inhibície týchto závažných ochorení, vplyvom antioxidantných alebo chelatačných činidiel. Samostatná časť bakalárskej práce približuje neurodegeneratívne ochorenia, Alzheimerovu a Parkinsonovu chorobu a samotnú podstatu vzniku týchto závažných ochorení. Dôraz sa kladie hlavne na tvorbu voľných kyslíkových radikálov, ktoré vyvolávajú v organizme oxidačný stres, čo je jedným z kľúčových faktorov vzniku týchto závažných chorôb.

# 1. Med' v biologických systémoch

## 1.1 Všeobecné poznatky o medi

Med' ako 29-ty prvok periodickej tabuľky prvkov, ktorého konfigurácia je  $3d^{10}4s^1$ , je charakteristický viacerými špecifickými vlastnosťami, či už fyzikálnymi alebo chemickými. Medňé ióny ( $Cu^+$ ) majú plne zaplnené d orbitály desiatimi elektrónmi ( $3d^{10}$ ), zatiaľ čo medňaté ióny ( $Cu^{2+}$ ) majú na d orbitáloch iba 9 elektrónov ( $3d^9$ ) s jedným nepáreným elektrónom [4]. Následne, dvojmocná med' Cu(II) reprezentuje najstabilnejší oxidačný stav medi.

Med' má vysokú schopnosť viesť teplo a elektrický prúd, preto má významné priemyselné využitie. Med' spolu so striebrom a zlatom sú v skupine 11 periodickej tabuľky, preto majú viaceré spoločné vlastnosti. Každý z týchto prvkov má jeden elektrón na s-orbitále. Všetky tri prvky sa vyznačujú vysokou ťažnosťou a elektrickou vodivosťou. Zaplnené d-orbitály elektrónmi majú za následok zníženú medzi-atómovú interakciu, ktorej dominuje kovová väzba prostredníctvom s-elektrónov. Z dôvodu nízkeho podielu kovalentného charakteru väzby medzi jednotlivými atómami Cu, má med' nízku tvrdosť a má schopnosť deformovať sa. Na makroskopickú úroveň sa med' najčastejšie vyskytuje v polykryštalickej forme.

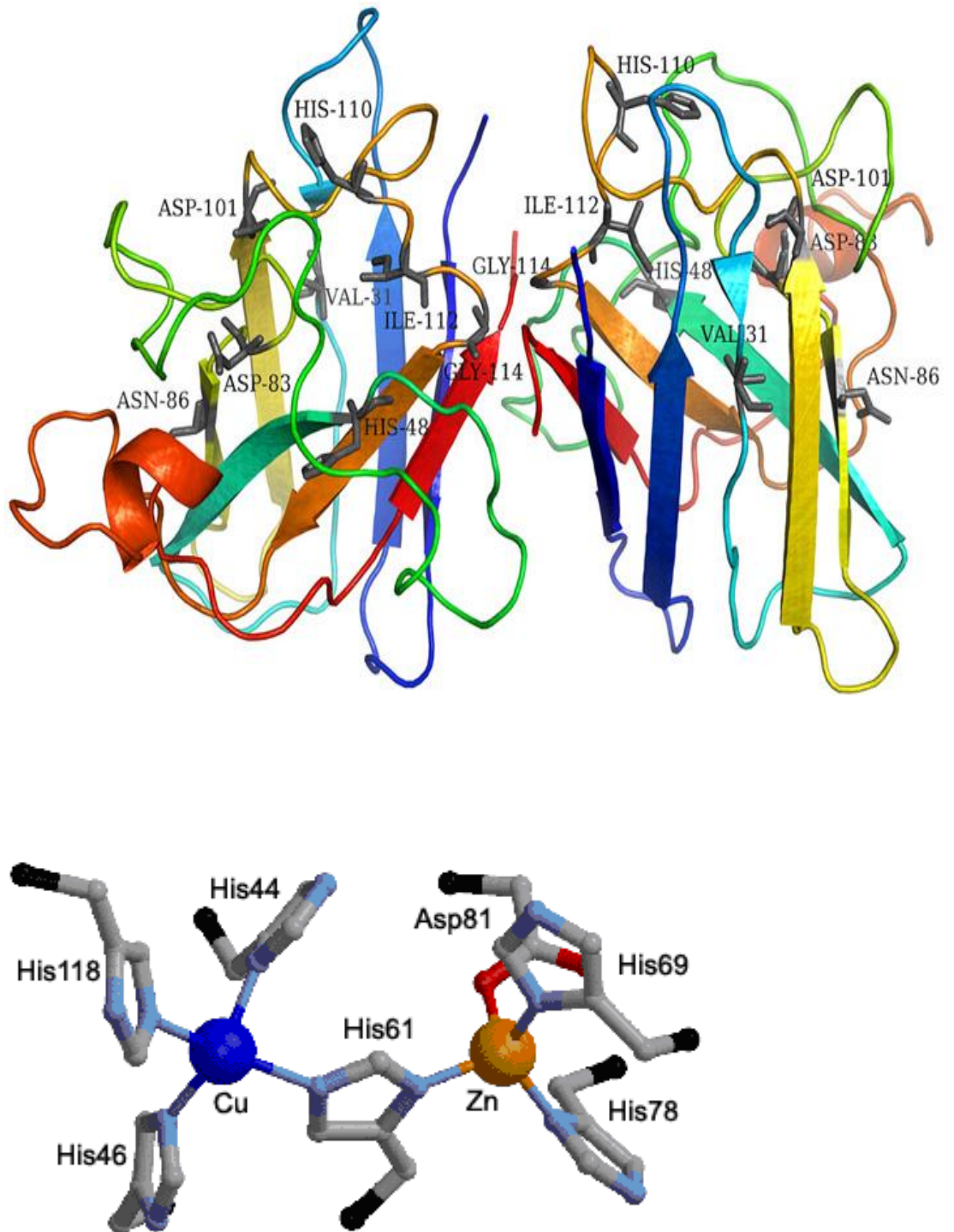
Med' nie je len všadeprítomný kov v technologickom prostredí, je tak isto dôležitý pre funkciu väčšiny živých organizmov. Med' je tiež prítomná v dostatočnom množstve v pôde, vo vode, vo vzduchu a v rastlinnej a živočíšnej zložke potravy. Táto narastajúca spotreba technickej medi v ťažkom priemysle nám umožňuje konštatovať, že ľudský organizmus je skôr ohrozený nadmerným prísunom medi, než jej nedostatkom.

Ako už bolo spomenuté, med' sa vyskytuje v organizme v dvoch oxidačných stupňoch (I a II), čo jej umožňuje vstupovať do oxidačno-redukčných (redoxných) reakcií, pri ktorých sa následne tvoria reaktívne formy kyslíka (metabolity), v čom spočíva jej negatívna úloha [5]. Na druhej strane môže plniť pozitívnu funkciu pri odstraňovaní voľných radikálov, prostredníctvom enzýmu Cu/Zn-SOD – Cu/Zn-superoxiddismutáza (Obr. 1). Med' teda môže vystupovať aj ako donor ale aj ako akceptor elektrónov, pričom radikálový charakter môže mať iba v stupni II.

Med' je esenciálny stopový prvok, ktorý sa nachádza v malom množstve v rôznych bunkách a tkanivách, pričom najväčšie množstvo medi sa nachádza v pečeni. Farmakologické doplnky na báze Cu boli použité na liečbu anémie u zvierat pred takmer

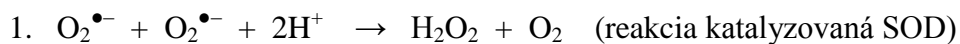


100 rokmi, v roku 1920 [6]. Nedostatok Cu bol prvý krát zaznamenaný u ľudí v roku 1960 [7]. Cu pôsobí ako kofaktor a je nevyhnutná pre štrukturálne a katalytické vlastnosti rôznych dôležitých enzýmov, vrátane cytochrómu c oxidázy a tyrosinázy, p-hydroxyfenyl



Obr. 1. Enzým Cu,Zn-SOD a jeho aktívne miesto.

pyruvátu hydrolázy, dopamín beta-hydroxylázy, lysyl oxidázy. Taktiež pre činnosť enzýmu Cu,Zn- superoxidodismutázy (Cu, Zn -SOD). Enzým Cu,Zn-SOD konvertuje superoxidový aniónový radikál na peroxid vodíka v zmysle reakcie [8]



Tieto enzýmy sa podieľajú na mnohých biologických procesov nevyhnutných pre rast, vývoj a správne fungovanie organizmu. Príjem Cu sa značne líši v závislosti od výberu potravín a stravovacích návykov. Potraviny bohaté na Cu sú predovšetkým ustrice, pečeň, orechy, strukoviny, celozrnné výrobky a sušené ovocie. Prírodná voda má priemernú koncentráciu 4-10 mikrogramov Cu/l, pričom väčšina medi je viazaná na organický substrát [9]. Pitná voda prispieva asi 6-13% z priemerného denného príjmu Cu. Prírodná koncentrácia medi v pôde je približne 50 ppm. Cu sa uvoľňuje do ovzdušia z prírodných zdrojov, ako sú prach, sopky a lesné požiare, a umelé zdroje ako sú napríklad huty. Obsah Cu v atmosfére sa pohybuje od 5 do 20 ng Cu/m<sup>3</sup>.

Z vlastností medi ako bolo spomenuté vyššie, predovšetkým z jej biologických funkcií a chemických vlastností vyplýva, že v organizme môže plniť aj pozitívnu aj negatívnu funkciu. Negatívnou funkciou pre organizmus je predovšetkým úloha medi pri tvorbe reaktívnych foriem kyslíka (metabolitov). Naopak, pozitívna funkcia spočíva v účasti na ich eliminácii prostredníctvom Cu obsahujúcich enzýmov. Vzhľadom k daným skutočnostiam môžeme konštatovať, že úloha medi v organizme môže nepriaznivo ovplyvňovať bunkové systémy a tým spôsobovať rôzne ochorenia ako neurodegeneratívne poruchy, či kardiovaskulárne ochorenia. Pre funkciu nervových systémov a udržanie hladín neurotransmitterov sú dôležité predovšetkým proteíny, ktorých integrálnou súčasťou je práve meď.

## 1.2 Homeostáza medi

Meď v nadbytku vedie k tvorbe voľných radikálov čo má za následok priamu oxidáciu lipidov, proteínov a DNA. Preto rovnováha medzi intracelulárnym a extracelulárnym obsahom medi je riadená bunkovým, transportným systémom, ktorý reguluje príjem, výdaj a intracelulárnu kompartmentalizáciu [10]. Rovnováha medzi potrebami medi a toxicitou medi je regulovaná na bunkovej úrovni a taktiež na úrovni

orgánov. Odporúčaná denná dávka medi pre dospelých je 0,9 mg/deň. Bunky regulujú transport iónov prechodných kovov (napr. medi a železa), pre zachovanie množstva potrebných biologických funkcií, tak, aby nedošlo k vzniku nadmernej hladiny medi, ktorá môže byť toxická.

Metalochaperóny sú proteíny, ktoré riadia a zabezpečujú homeostázu medi v organizme. Tieto proteíny regulujú transport iónov medi (aj iných iónov kovov) a chránia bunku pred možnými reakciami medi s účasťou voľných radikálov [11].

Ešte nedávno sa verilo, že ióny kovov sú v rovnováhe s metaloproteínmi a že v bunke existuje značná kapacita na jej chelataciu a teda existenciu rôznych mechanizmov, ktoré zabránia medi participovať na tvorbe reaktívnych radikálov. Nedávne experimenty ukázali, že voľná hladina medi v bunke je extrémne nízka, iba pár iónov medi na jednu bunku. Dôsledky tohto zistenia sú vážne, najmä ak uvážime aplikabilitu tohto zistenia pre iné fyziologicky dôležité kovy. Tento objav má široké dopady pre mechanizmy vnútrobunkovej tvorby voľných radikálov pomocou Fentonovej chémie.

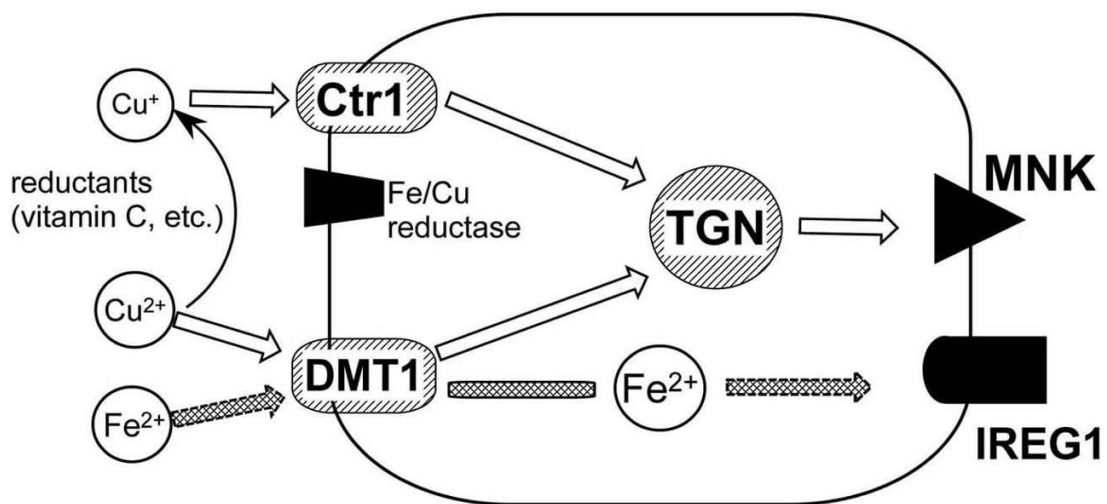
Absorpcia medi v ľudskom tele je zložitý proces a závisí od rôznych faktorov a stravovacích komponentov. Asi 40% požitej Cu sa absorbuje v tenkom čreve, veľmi malé množstvo sa absorbuje v žalúdku [9]. Med' sa vstrebáva hlavne prostredníctvom tzv. aminokyselinového dopravného systému, väčšinou prostredníctvom aminokyseliny histidínu, metionínu, a tiež cysteínu.

Med' vstrebaná z tenkého čreva je transportovaná krvou viazaná prevažne na sérový albumín [12] v krvi je neoddeliteľnou súčasťou ceruloplazmínu (enzým obsahujúci šesť atómov medi a to ako med'natých alebo med'ných iónov Cu).

Homeostatickej regulácia medi je primárny mechanizmus regulácie obsahu medi v organizme. Homeostatická regulácia sa týka vstrebávania a vylučovania medi. Hlavná vylučovacia cesta medi je uložené v pečeni cez žlč (~ 80%). Straty medi stolicou sú u dospelých asi 3 mg/deň. Menšie straty medi sa realizujú prostredníctvom potu (~ 70 mikrogramov/deň) a moču (30 mikrogramov/deň), čo predstavuje iba 3% z denného príjmu medi.

Je iróniou, že podrobné nahliadnutie do metabolizmu medi pôvodne vzišlo z experimentov zameraných na pochopenie toho, ako bunky využívajú železo [13]. Pri výskume a identifikácii súčasti systémov vysokej afinity príjmu železa kvasinkových buniek sa objavil jeden z prvých génov, ktoré kódujú transmembránový transportný proteín, ktorý na prekvapenie nemal žiadnu afinitu k železu, ale k medi.

Tento proteín transportuje kov pre enzým multicopper ferroxidázu potrebnú pre dopravu železa a bol popísaný ako transportér medi Ctr1p. V poslednej dobe tri skupiny vedcov nezávisle potvrdili tieto výsledky na cicavčích bunkách [14]. Kvôli úplnosti uvádzame, že boli objavené dva možné proteíny zodpovedné za vstrebávanie medi z potravy, transportér dvojmocných kovov 1 (DMT1), a tiež transportér dvojmocných kovov 1 (DCT1), a nedávno objavený transportér medi s vysokou afinitou (Ctr1) (Obr. 2.).



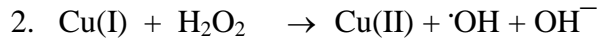
Obr. 2. Jednoduchý model absorpcie medi črevnými enterocytmi.

Proteín Ctr1 je umiestnený naprieč membránou a vytvára tak kanál pre transport medi. Zdroj energie pre transport medi prostredníctvom tohoto prenáša nie je presne známy. Keďže meď je v potrave prítomná predovšetkým v oxidačnom stupni 2+, najprv musí byť redukovaná na meď 1+ a následne tranposportovaná prenášačom Ctr<sup>+</sup>. V literatúre sa diskutuje, že transportér Ctr1 sa pravdepodobne podieľa na transporte iných kovov, avšak toto tvrdenie vyžaduje experimentálny dôkaz.

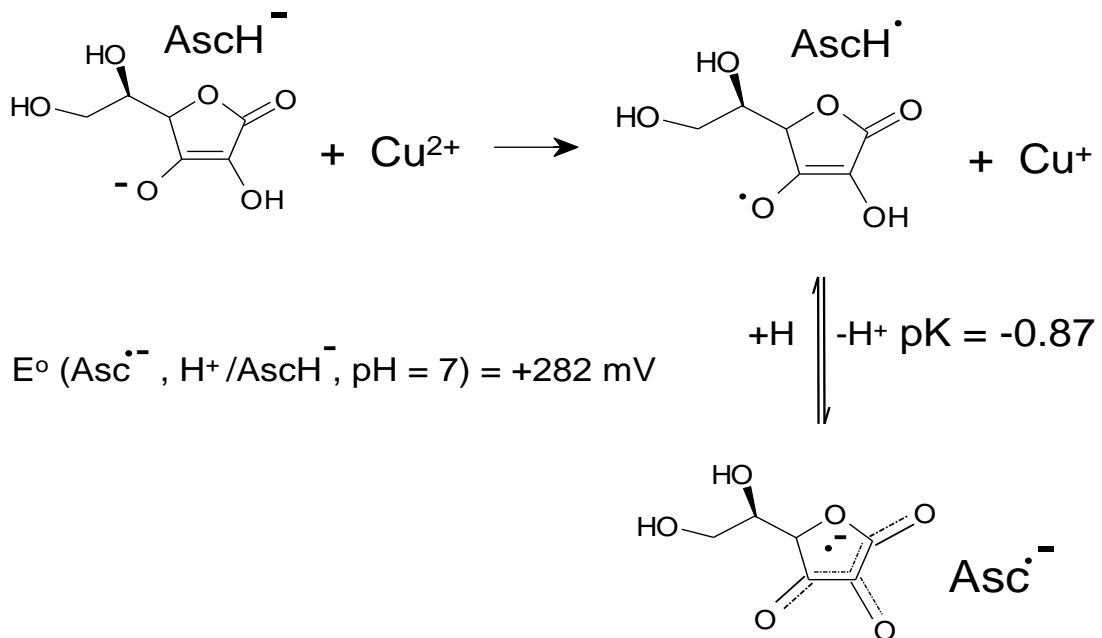
### 1.3 Meď a voľné radikály

Jedným z potvdených vysvetlení skutočnosti, že meď môže pôsobiť toxicky na bunky pochádza z predpokladu, že meďné ióny sa podieľajú na tvorbe reaktívnych foriem kyslíka. Vo všeobecnosti platí, že meďnaté a meďné ióny sa môžu podieľať na oxidačných a redukčných reakciách v bunke [15]. Meďnaté ióny Cu<sup>2+</sup>, za prítomnosti biologických

redukčných činidiel, ako napríklad kyselina askorbová alebo glutatión (GSH), môžu byť redukované na meďné ióny (CuI), ktoré sú schopné katalyzovať vznik reaktívnych hydroxylových radikálov ( $\text{OH}^\bullet$ ), prostredníctvom rozkladu peroxidu vodíka Fentonovou reakciou [16]



Redukciu Cu(II) biologickými reductantmi popisuje rovnica (Obr. 3.)



Obr. 3. Redukcia Cu(II) na Cu(I) kyselinou askorbovou

Hydroxylové radikály sú veľmi reaktívne, a môžu reagovať s ostatnými biologickými molekulami v tesnej blízkosti mechanizmom abstrakcie vodíka.

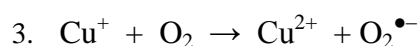
Experimentálne štúdie potvrdzujú, že meď je schopná prostredníctvom tvorby voľných radikálov vyvolať poškodenie DNA a oxidáciu báz DNA (Obr. 3.). Meď v oboch oxidačných stupňoch (meďnatý alebo meďný) bola viac aktívna než železo. K poškodeniu DNA došlo hlavne produktami Fentonovej reakcie, predovšetkým hydroxylového radikálu.

Niektorí autori skúmali vzájomné pôsobenie medi a DNA v roztokoch, ktoré vystavili  $\gamma$ -žiareniu [17]. Štúdie potvrdili, že meď spôsobuje zmeny v konformáciách DNA, naopak v neprítomnosti medi neboli spozorované žiadne konformačné zmeny. Niekoľko ďalších štúdií potvrdilo ochranný účinok antioxidantov proti meďou vyvolaným zmenám v konformáciách DNA vyvolané  $\gamma$ -žiarením.

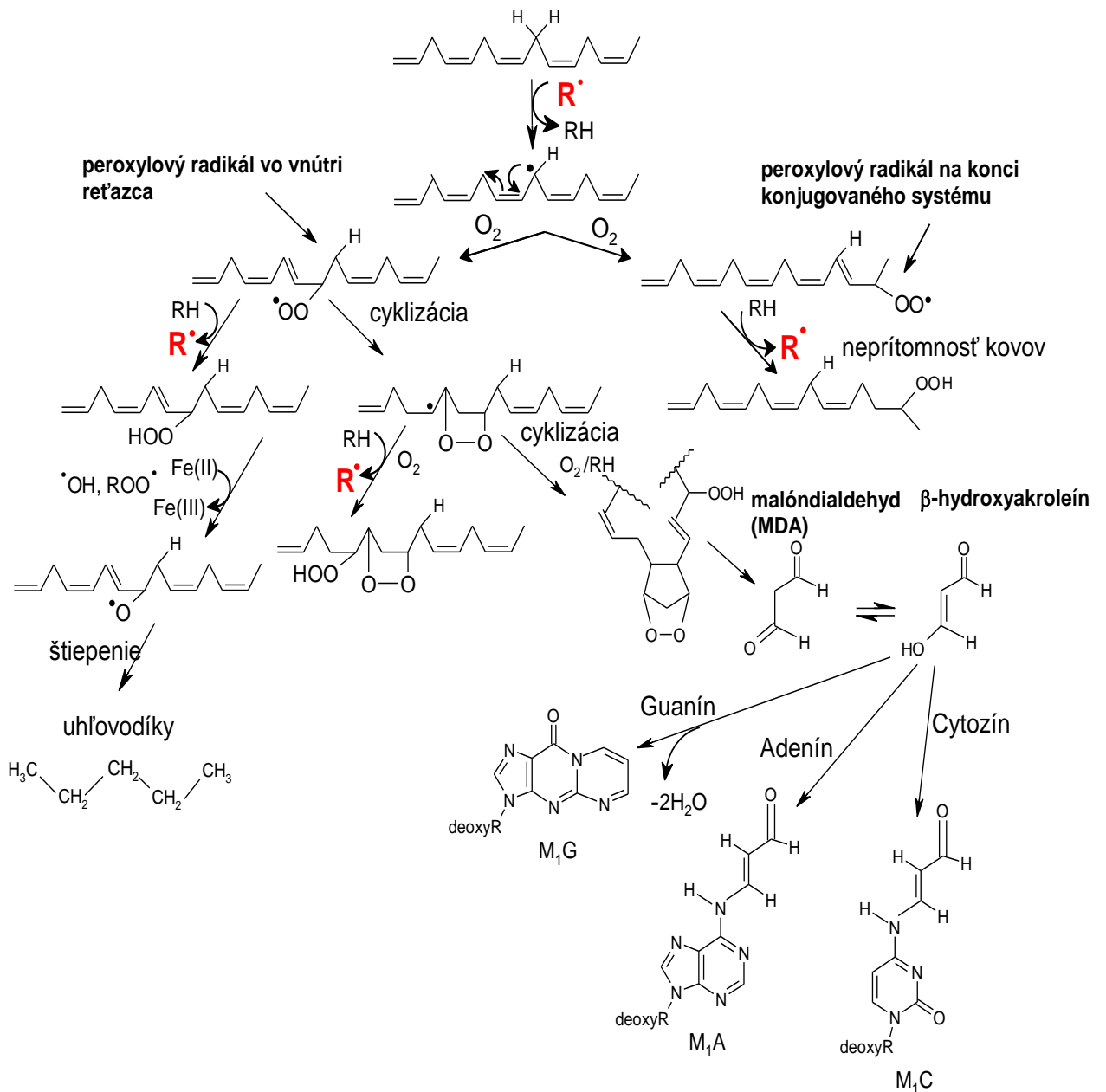
Viacero štúdií bolo realizovaných za účelom získavania poznatkov o úlohe medi pri oxidácii LDL proteínov [18]. Oxidácia LDL má viaceré dôsledky, vrátane podpory ateroschézy a to tým, že zvyšuje premenu makrofágov do buniek, a zvyšuje protrombotické vlastnosti.

Zatiaľ čo relevantnosť zahájenia oxidácie LDL in vivo iónmi medi nie je jasná, štúdie in vitro jasne preukázali oxidáciu LDL, ktorá bola vyvolaná meďou. Štúdie in vitro LDL oxidácie sú realizované inkubovaním systému s iónmi medi. Vzorky majúce aterosklerotické lézie obsahujú buď meď alebo ióny železa schopné katalyzovať tvorbu voľných radikálov. Okrem štúdií oxidácie LDL, je tiež známe, že aj lipoproteíny HDL sú citlivé na oxidáciu. Tieto štúdie sú veľmi dôležité, pretože oxidácia HDL výrazne ovplyvňuje ich kardioprotektívne vlastnosti. Predpokladá sa, že HDL je ešte viac náchylná na meďou vyvolané oxidačné poškodenie ako LDL z dôvodu zvýšenej účinnosti vo vitamíne E sprostredkovanom peroxidačnom modeli. V tomto modeli nenasýtené mastné kyseliny sú oxidované radikálom vitamínu E generovaného v procese redukcie Cu(II) na Cu(I) vitamínom E.

Jednomocná meď môže reagovať s kyslíkom za vzniku superoxidového aniónového radikálu podľa rovnice

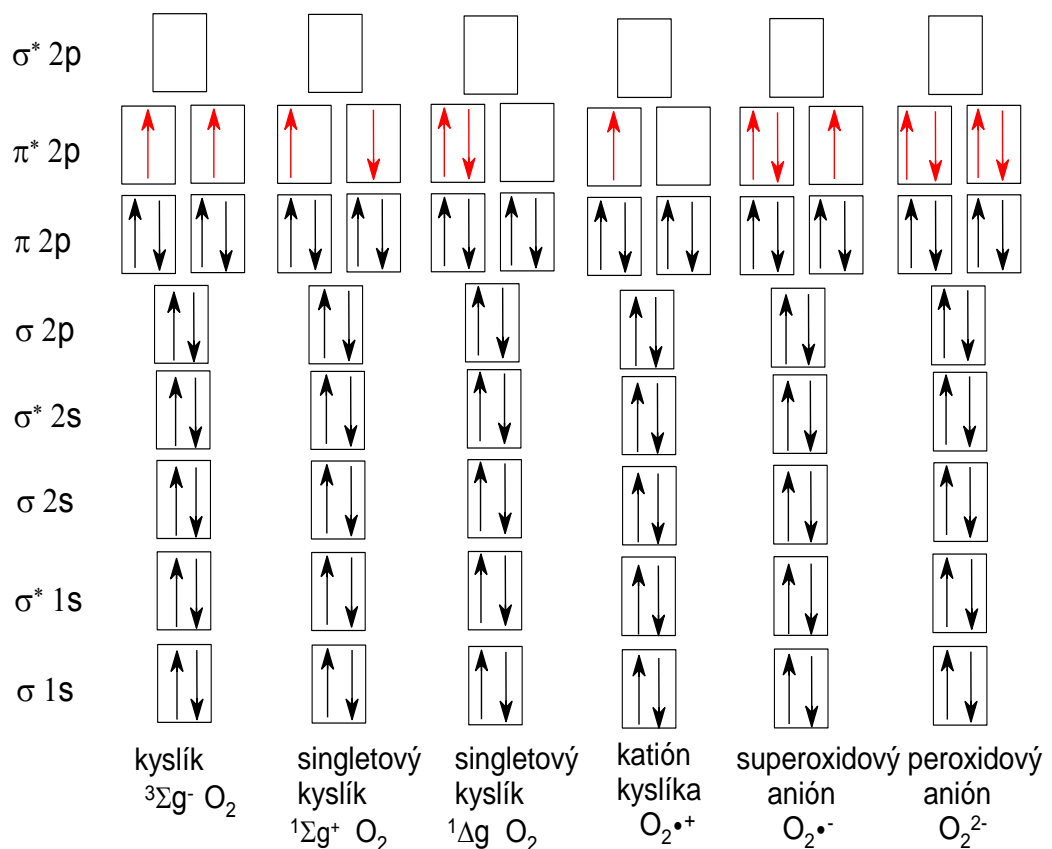


ktorý sa považuje za počiatok radikálových reakcií v živých systémoch. Samotný superoxidový aniónový radikál nie je veľmi reaktívny, poškodzuje biologické tkanivá iba mierne, avšak radikály odvodené od superoxidového aniónového radikálu, ako napríklad peroxid vodíka, hydroxylový radikál, singletový kyslík sú všetko vysoko reaktívne častice s poškodzujúcim účinkom na živé systémy (Obr. 4.). Elektrónové konfigurácie kyslíka a radikálov odvodených od kyslíka sú uvedené na Obr. 5 [19]. Rýchlostné konštanty reakcií radikálov s biomolekulami sú uvedené v Tabuľke č.1.



Obr. 4. Mechanizmy tvorby voľných radikálov a ich reakcie s biomolekulami.

SOD je zvyčajne zapojená do mechanizmu ochrany buniek pred voľnými radikálmi. Nedávne štúdie skúmali vplyv nedostatku medi na oxidačné poškodenie DNA na lymfocytoch. Výsledky ukázali, že nedostatok medi má vážny vplyv na poškodenie DNA. Tento poznatok sa dá vysvetliť riadením bunkovej antioxidačnej obrany prostredníctvom enzýmu SOD. Vyčerpanie medi a následnej zníženej tvorbe enzýmu SOD zvyšuje náchylnosť na oxidačné poškodenie buniek.



Obr. 5. Elektrónová konfigurácia kyslíka a radikálových foriem kyslíka

Ako bolo uvedené vyššie, med' ako základná potreba každej bunky, je sprostredkovateľom produkcie voľných radikálov a následne priamej oxidácie lipidov, proteínov a DNA. Preto rovnováha medzi intracelulárnym a extracelulárnym obsahom medi je poháňaná bunkovým transportným systémom, ktorý reguluje príjem, výdaj ako aj intracelulárne rozčlenenie. Rovnováha medzi zohľadňujúca nutnosť a toxicitu tohto kovu sa tak dosiahne na bunkovej úrovni ako aj na úrovni tkanív a orgánov. Obsah prechodných kovov (napr. medi a železa), potrebných pre biologické funkcie je prísne kontrolovaný, bez toho aby uchovali nadmerné množstvá týchto kovov, ktoré by mohli byť toxické. Medzi faktory, ktoré sú potrebné na dosiahnutie homeostázy týchto kovových iónov patria metalochaperóny, proteíny. Tieto proteíny rovnako ako chaperony v bežnom živote vedú a chránia prechod kovových iónov vo vnútri buniek. Metallo-chaperones tiež môžu zabrániť rôznym nebezpečným reakciám, ktoré môžu spôsobiť poškodenia bunky [20].



**Tabuľka č.1.** Rýchlostné konštanty pre bimolekulové reakcie radikálov  $\cdot\text{OH}$  a  $\cdot\text{OOH}/\text{O}_2^{\cdot-}$  s vybranými látkami

Testovaná látka	Rýchlostná reakcie $\cdot\text{OH}$ , $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (pH)	konštantas $\cdot\text{OH}$ , (pH)	Rýchlostná reakcie $\cdot\text{OOH}/\text{O}_2^{\cdot-}$ , $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (pH)	konštantas $\cdot\text{OOH}/\text{O}_2^{\cdot-}$ , (pH)
Adenín	$3,0 \times 10^9$ (7,4)		–	
Adenozín	$2,5 \times 10^9$ (7,7)		–	
Askorbát	$7,2 \times 10^9$ (1,0)		$2,7 \times 10^5$ (7,4)	
Cysteín	$7,9 \times 10^9$ (1,0)		$\sim 1,8 \times 10^4$ (3–5,1)	
Deoxyribóza	$3,1 \times 10^9$ (7,4)		–	
Glukóza	$1,0 \times 10^9$ (7,0)		–	
Glutaman	$7,9 \times 10^7$ (2,0)		$< 0,39$ (8,7)	
Guanín	$1,0 \times 10^{10}$		–	
Peroxid vodíka	$4,5 \times 10^7$ (7,0)		$0,13$ (7,0–9,9)	
Hemoglobín	$3,6 \times 10^{10}$		$1,4 \times 10^3$ (7,8)	
Kataláza	$2,6 \times 10^{11}$		$9 \times 10^6$	
Lecitín	$5,0 \times 10^8$		–	
Manitol	$2,2 \times 10^9$ (7,0)		–	
Ribonukleáza	$1,9 \times 10^{10}$		–	
Sérový albumín	$2,3 \times 10^{10}$		–	

## 2. Neurodegeneratívne ochorenia

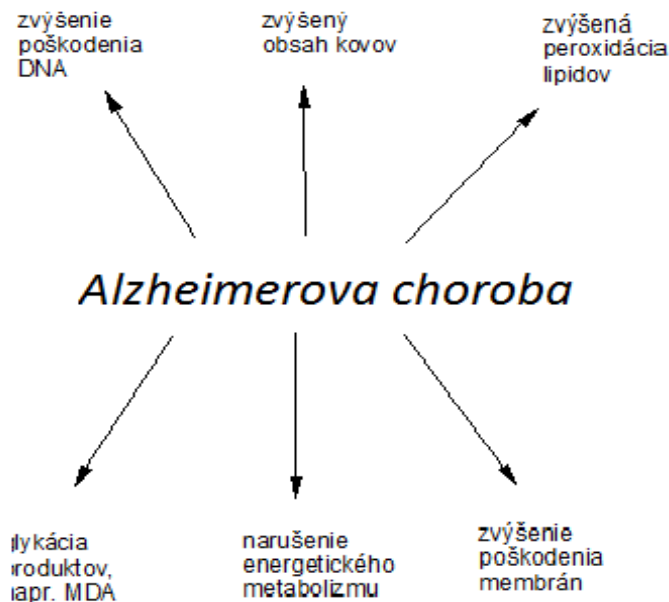
Mozog je obzvlášť citlivý na oxidačné pôsobenie, z dôvodu vysokej využiteľnosti kyslíka, vzhľadom na vysoký obsah oxidovateľných polynenasýtených mastných kyselín a prítomnosti oxidačno-redukčných kovov ako je meď alebo železo [22]. Vzhľadom k tomu, že sa hladina oxidačného stresu sa s vekom zvyšuje, môžeme ho považovať za významný faktor niektorých neurodegeneratívnych ochorení, typických pre starších jedincov, ako napríklad Alzheimerová choroba (AD) alebo Parkinsonová choroba (PD).

## 2.1 Med' a neurodegeneratívne ochorenia

Med' je neoddeliteľnou súčasťou mnohých proteínov, ktoré sú potrebné pre fungovanie neurónov či celej nervovej sústavy. Práve úloha medi v oxidačnom strese pri neurodegeneratívnych ochoreniach bola intenzívne študovaná a následne bolo zistené, že med' v organizme môže spôsobovať rôzne závažné poruchy, ako je Alzheimerova choroba (AD), Parkinsonová choroba (PD) alebo amyotropická laterálna skleróza (ALS) [22].

Priamy dôkaz preukazujúci zvýšený oxidačný stres pri etiológii Alzheimerovej choroby sú (Obr. 6.):

1. zvýšený obsah kovov v mozgu: med', železo, hliník, ortuť, ktoré sú schopné stimulovať tvorbu voľných radikálov.
2. zvýšená peroxidácia lipidov a znížené polynenasýtené mastné kyseliny v mozgu AD, zvýšený 4-hydroxynonenal, aldehydové produkty lipidovej oxidácie v komorovej tekutine.
3. zvýšená oxidácie proteínov a DNA v mozgu AD.
4. znížený energetický metabolizmus a znížený obsah cytochrómu c oxidázy v mozgu AD.
5. pokročilá glykácia konečných produktov, napríklad malondialedehydu, peroxinitrátu, hém-oxygenázy-1, SOD-1 v neurofibrilárnych spletiach.



Obr. 6. Alzheimerova choroba a jej sprievodné prejavy

Veľmi dôležitým aspektom Alzheimerovej choroby je proteín amyloid  $\beta$  [23-28]. Bielkoviny amyloidu  $\beta$  tvoria dôležitú úlohu pri patogenéze Alzheimerovej choroby prostredníctvom generácie voľných radikálov. Zvýšená produkcia amyloidu  $\beta$ , ako preventívneho antioxidantu mozgu pod zvýšeným oxidačným stresom a neurotoxicitou stárnutia, je postulovaná ako významný faktor v etiológii Alzheimerovej choroby. Nulová hypotéza v štúdiách Alzheimerovej choroby bola zameraná prevažne na Amyloid-beta.

Ako už bolo spomínané, amyloid-beta pôsobí ako preventívny antioxidant v mozgu a pri zvýšenej hladine oxidačného stresu a neurotoxicite pri starnutí organizmu sa predpokladá, že zohráva dôležitú úlohu v rozvoji AD [25].

Úloha redoxných kovov v spojitosti s amyloidom-beta sa ukázala ako veľmi dôležitá po kvantifikácii redoxných kovov v mozgových tkanivách. Kombináciou troch techník, skenovacou transmisnou mikroskopiou, Rutherfordovou rozptylovou spektroskopiou a indukovanou emisiou rtg lúčov sa ukázalo, že nárast koncentrácie redoxných kovov v beta-amyloidových plakoch v porovnaní s okolitým tkanivom je nasledovný: železo (85 ppm v porovnaní s 42 ppm), meď (16 ppm v porovnaní s 6 ppm) a zinok (87 ppm v porovnaní s 34 ppm) [29].

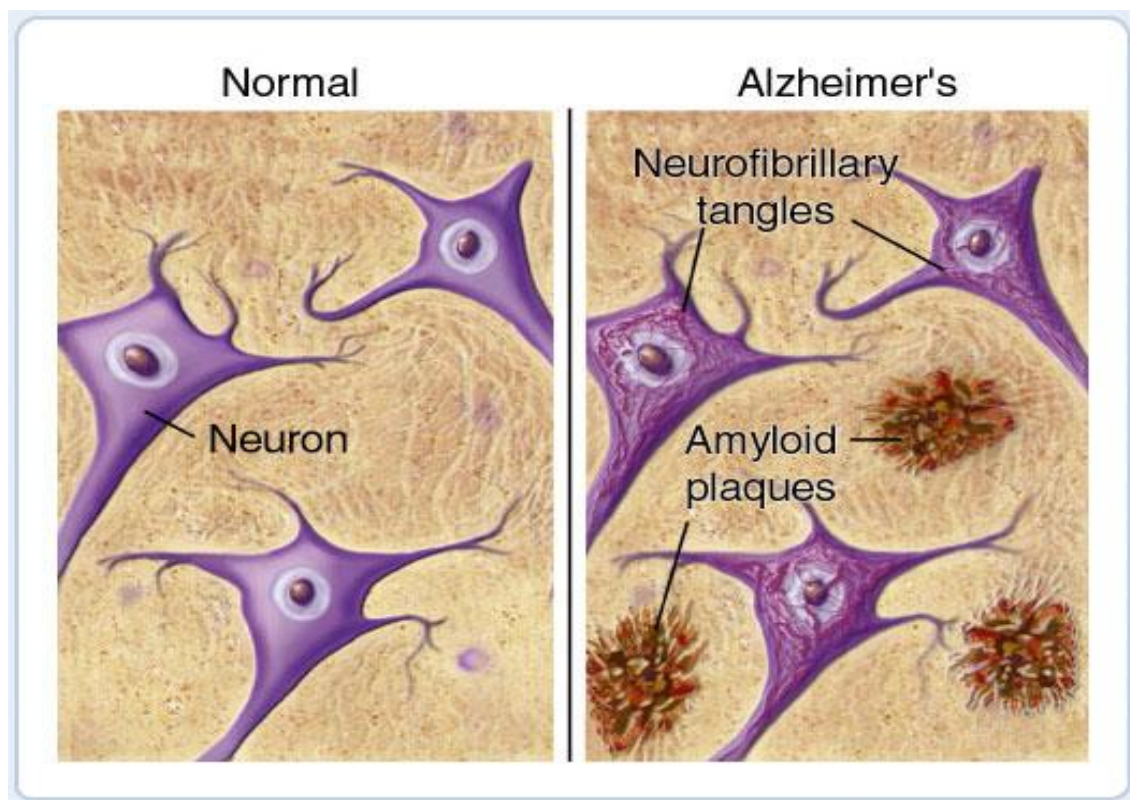
Toxicita amyloidu-beta závisí od jeho konformačného stavu a dĺžke peptide [30]. Je známe, že ageruje v dvoch rôznych stavoch a to v nie-beta-skladanom liste, ktorý je benígny. Druhá konformácia amyloidu beta je vysoko usporiadaná, fibrilárna a táto konformácia je toxická. Stav agregácie a štruktúra peptidu je ovplyvnená koncentráciou peptidu, pH, koncentráciou iónov Cu, Zn a Fe [31]. Neurotoxicita amyloidu-beta závisí od dĺžky peptidu. Peptid Ab(1–42) je toxickejší ako peptid Ab(1–40). Ab1–42 je najzastúpenejší v amyloidových plakoch a je najpravdepodobnejší kandidát na tvorby peroxidu vodíka a ďalších reaktívnych foriem kyslíka. Nárast pomeru Ab(1–42) ku Ab(1–40) koreluje s progresiou Alzheimerovej choroby. Afinity k medi, neurotoxicita a schopnosť agregácie Amyloidu-Beta je väčšia pre Ab(1–42) ako pre Ab(1–40).

Meď sa viaže na amyloid- $\beta$  s vysokou afinitou prostredníctvom aminokyselín histidínu (His13, His14, His6) a zvyšku tyrozínu (Tyr10), čo koreluje, s vysokými množstvami medi zistené v amyloidových plakoch [21]. Okrem medi, amyloid  $\beta$  tiež viaže zinok -Zn(II) a železo -Fe(III) in vitro, pričom množstvá týchto kovov sú tiež zastúpené v neokortexe a hlavne v amyloidných plakoch u jedincov s Alzheimerovou chorobou ( Obr. 7. a Obr. 8.).

Úloha samotného zinku je v etiológii Alzheimerovej choroby veľmi otázná. Výsledky výskumu ukázali, že zinok v mikromolárnej koncentrácii zamedzuje toxicite

amyloidu- $\beta$  [32]. Presný mechanizmus tohto pôsobenia zinku nie známy, predpokladá sa však blokovanie membránových vápnikových kanálov tvorených amyloidom- $\beta$ . Zinok má v procese etiológie oxidačného stresu pri Alzheimerovej chorobe jednoznačnú spojitosť s meďou. Ochranný účinok zinku sa vysvetľuje izoštruktúrnymi vlastnosťami zinku a medi. Predpokladá sa, že zinok, ktorý nemá schopnosť generovať voľné radikály môže kompetitívne nahradiť meď v amyloide-beta. Okrem toho Zn(II) spôsobuje zrážanie amyloidu-beta za in vitro podmienok a interakcia Cu(II) s amyloidom-beta zvyšuje jeho toxicitu, čo súvisí s redukciami Cu(II) na Cu(I) a tvorbou peroxidu vodíka.

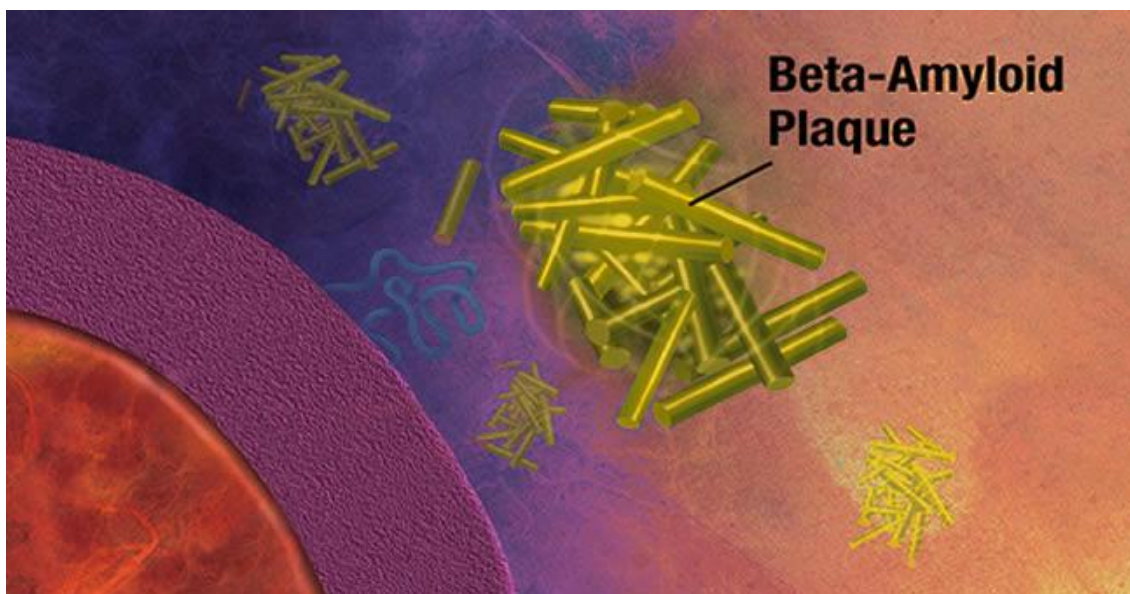
Viacere laboratória potvrdili, že donedávna platné tvrdenie, že amyloid-beta je sám o sebe toxický bolo prehodnotené. Ukazuje sa totiž, že amyloid-b v neprítomnosti



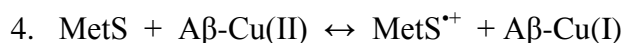
Obr.7.Ukážka neurofibrilárnych klobiek a amyloidových plakov v tkanive mozgu s Alzheimerovou chorobou. V ľavej časti obrázka vidieť normálne tkanivo.

kovov je veľmi málo, resp. takmer netoxický. Teda oxidačné poškodenie amyloidu beta je priamo spojené s prítomnosťou reodoxných kovov, hlavne medi a železa. Amyloid-beta, ako už bolo spomenuté, má veľkú afinitu k reodoxne aktívnym kovom, hlavne k železu a medi. Spektroskopicky bolo dokázané, že N-koncové zvyšky Histidínu, His13, His14,

His6 a Tyr10 amyloidu  $\beta$  sú zapojené do komplexácie s Cu [33]. Predpokladá sa, že N-terminálne viazaná Cu(II) je redukovaná elektrónmi, ktoré pochádzajú z C-koncového metionínového zvyšku (Met35) podľa reakcie, ktorou sa tvorí sulfidový radikál  $\text{MetS}^{\bullet+}$  a redukuje sa meď podľa rovnice [34]



Obr. 8. Ukážka štruktúry amyloidových plakov.



Rovnica vyžaduje jedno-elektronovú oxidáciu metionínu na radikálový kation. Tento radikálový kation  $\text{MetS}^{\bullet+}$  zohráva dôležitú úlohu v neurotoxícite amyloidu-beta.

Kým termodynamické výpočty založené na redukčnom potenciále párov Cu(II)/Cu(I) a Met/MetS $\bullet+$  ukazujú, že reakcia uvedená hore je skôr nepriaznivá, avšak prenos elektrónu medzi MetS a A $\beta$ -CuII môže byť urýchlený exorgenickou reakciou deprotonizácie  $\text{MetS}^{\bullet+}$ , zanechávajúc 4-metylbenzylový radikál, čím sa reakcia stáva realizovateľnou v podmienkach in vivo.

Sulfidový radikál  $\text{MetS}^{\bullet+}$ , môže podstúpiť veľmi rýchlu reakciu so superoxidovým radikálovým aniónom, podľa nasledujúcej reakcie:



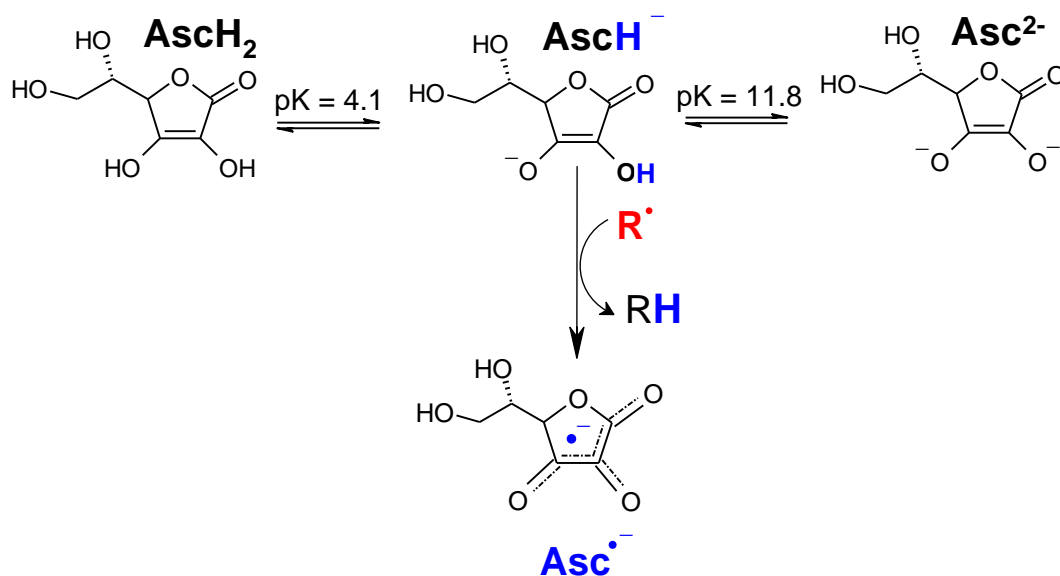
Táto reakcia vedie k vzniku Met-sulfoxidu (MetO), ktorý bol izolovaný z AD senilných plakov.

Výsledky naznačujú, že metionín 35 úzko súvisí s patogenézou Alzheimerovej choroby, pretože predstavuje časť amyloidu- $\beta$  najviac náchylnú na oxidáciu za in vivo podmienok. Predpokladá sa, že oxidácia Met35 na Met-sulfoxid znižuje toxické účinky fragmentu proteínu amyloidu beta na izolovanej mitochondrii.

## 2.2 Alzheimerova choroba a antioxidanty

Viacere štúdie naznačujú, že antioxidanty môžu spomaliť resp. zmierniť priebeh Alzheimerovej choroby [35].

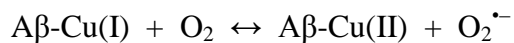
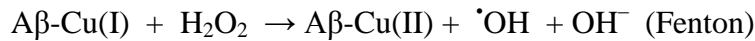
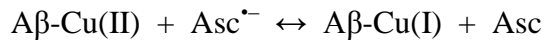
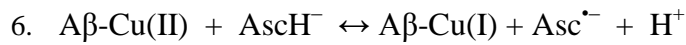
Vitámín C (kyselina askorbová) je vo vodných roztokoch pri fyziologickom pH prítomný vo forme askorbátového aniónu  $\text{AscH}^-$  (Obr. 9.)



Obr. 9. Formy vitamínu C pri rôznych hodnotách pH.

Neurotoxické formy amyloidu  $\beta$ ,  $\text{A}\beta(1-40)$ ,  $\text{A}\beta(1-42)$  a  $\text{A}\beta(25-35)$  stimulujú med'ou sprostredkovanú oxidáciu askorbátu, naopak netoxické  $\text{A}\beta(40-1)$  túto oxidáciu nesprostredkujú. Na základe tejto štúdie sa dospelo k záveru, že toxické  $\text{A}\beta$  peptidy stimulujú med'ou sprostredkovanú oxidáciu askorbátu ( $\text{AscH}^-$ ) a následne tvorbu

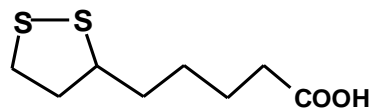
hydroxylových radikálov prostredníctvom Fentonovej reakcie. Tento proces môže byť vyjadrený nasledovnými rovnicami [36]:



Hladina askorbátu u pacientov s Alzheimerovou chorobou bola znížená vzhľadom ku kontrole. Podobne hladina vitamínu E u pacientov s Alzheimerovou chorobou bola znížená oproti kontrole. Keďže Alzheimerova choroba má komponenty oxidačného stresu, dostatočný prísun oboch týchto vitamínov môže zmierniť priebeh choroby, resp. pôsobiť preventívne ešte pred vypuknutím jej príznakov.

Glutatión je jedným z najúčinnějších antioxidantov v bunke. Hladina glutatiónu u pacientov s Alzheimerovou chorobou bola výrazne znížená, predovšetkým v synaptozomálnej frakcie [37]. Tieto poznatky korelujú s výskytom oxidačného stresu u Alzheimerovej choroby.

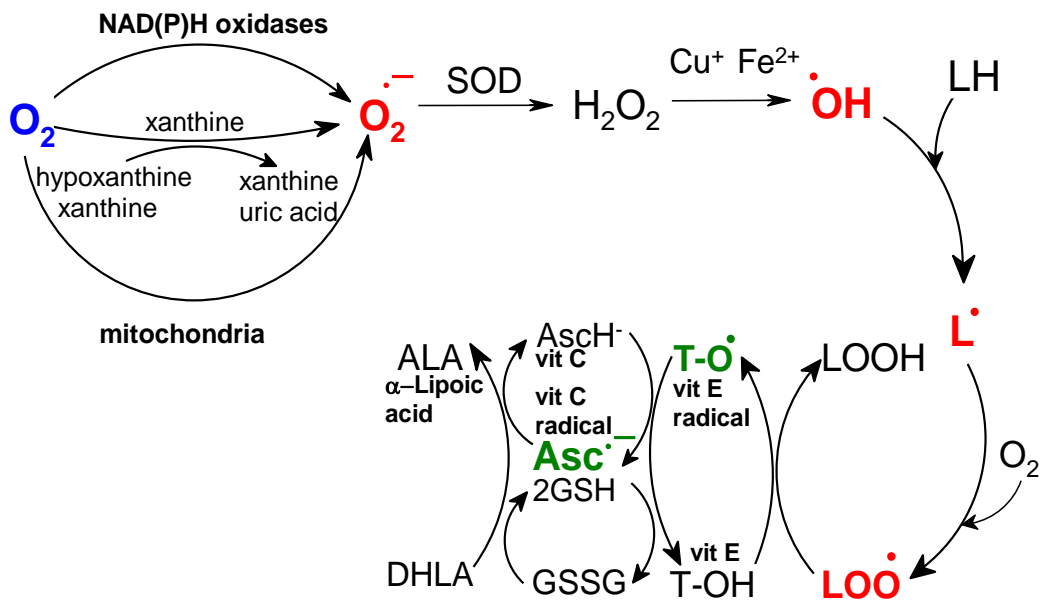
Kyselina  $\alpha$ -lipová (Obr. 10) má okrem antioxidantných vlastností aj chelatačné vlastnosti redoxných kovov [38]. Pôsobenie kyseliny lipovej zlepšuje kognitívne funkcie u pacientov s Alzheimerovou chorobou.



Kyselina  $\alpha$ -lipová

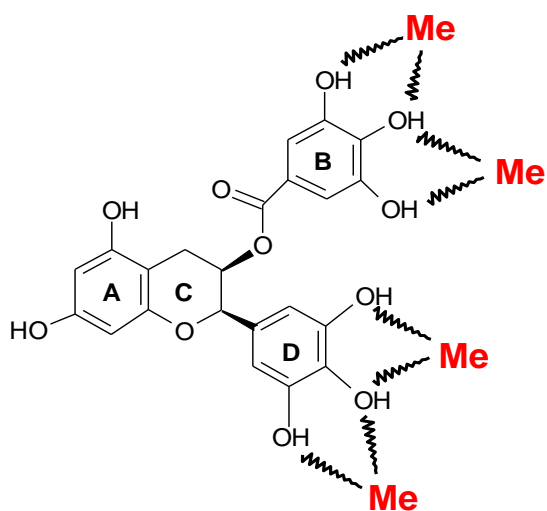
Obr. 10. Štruktúra kyseliny  $\alpha$ -lipovej

Tvorba ROS u Alzheimerovej choroby a mechanizmy eliminácie ROS antioxidantami sú naznačené na Obr. 11.



Obr. 11: Antioxidačné mechanizmy v manažmente oxidačného stresu.

Flavonoidy sú veľká skupinu látok, ktorá má pozitívne terapeutické účinky pri liečbe rôznych ochorení [39]. Flavonoidy majú okrem antioxidačného účinku aj chelatačný účinok na rôzne kovy. Jeden z najúčinnějších flavonoidov je epigallocatechin gallate (EGCG), fytochemická zlúčenina prítomná v zelenom čaji (Obr. 12).



Obr. 12: Miesta väzby s kovmi na Epigallocatechin gallate (EGCG).

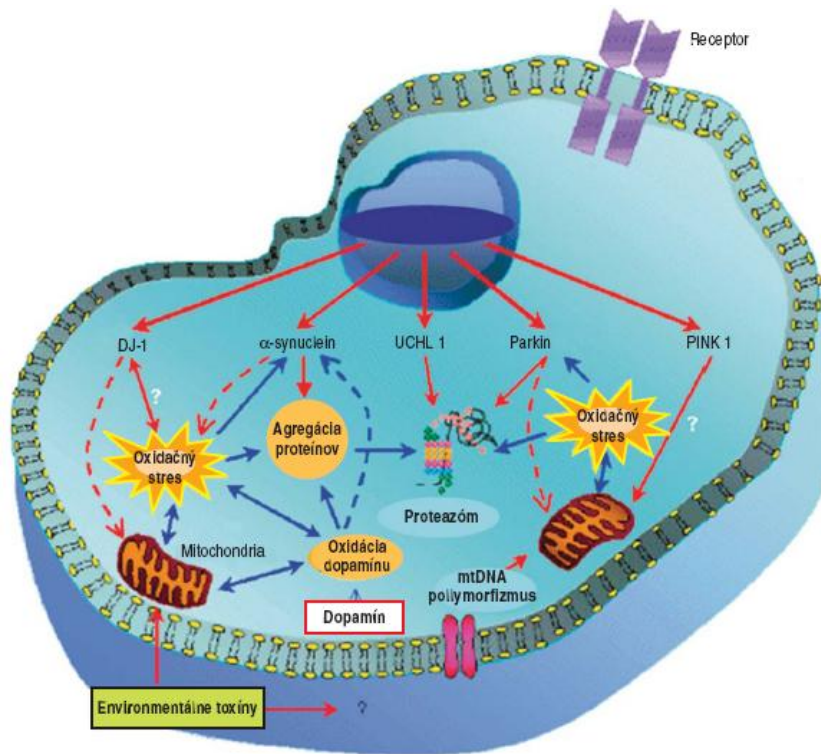


EGCG má schopnosť nielen zhášať voľné radikály v mozgu pacientov s Alzheimerovou chorobou, ale taktiež chelátovať redoxné kovy (meď a železo) a tým zmenšovať pôsobenie oxidačného stresu pacientov.

### 2.3 Parkinsonová choroba

Parkinsonová choroba bola prvý krát popísaná v roku 1817 Jamesom Parkinsonom. Parkinsonova choroba postihuje približne 1 % populácie ľudí vo veku 65 rokov. Riziko choroby rastie s vekom.

Klinické prejavy choroby zahŕňajú postupnú stratu motorických a pohybových schopností pacientov [40, 41]. Choroba zahŕňa selektívnu stratu neurónov v oblasti stredného mozgu, nazývaná substantia nigra. Bunky v substantii nigra využívajú dopamín (chemický posol medzi mozgom a nervovými bunkami) na komunikáciu s bunkami v inej oblasti mozgu, nazývanej striatum. Preto zníženie nigralného dopamínu vedie následne k zníženiu striatálneho dopamínu, čo spôsobuje príznaky Parkinsonovej choroby [42] (Obr. 13).



Obr. 13. Oxidačný stress a genetický pôvod Parkinsonovej choroby [prevzaté z ref.42].

Hlavný patologicko-anatomický prejav choroby je tvorba resp.prítomnosť intracelulárnych inklúzií s obsahom  $\alpha$ -synukleínu, ktorý je súčasťou Lewyho teliesok [43]. Choroba je sprevádzaná postupným úbytkom dopaminergných neurónov v pars compacta substantia nigra. Toxický účinok  $\alpha$ -synukleínu zahŕňa poškodenie endoplazmatického retikula, fragmentáciu Golgiho aparátu.

$\alpha$ -synukleín je presynaptický proteín, jeho funkcia nie je presne známa. Vie sa však, že ovplyvňuje presynaptické uvoľňovanie dopaminu. Pri nadmernej expresii  $\alpha$ -synukleínu dochádza k jeho agregácii spoločne s ďalšími proteínmi vo forme Lewyho teliesok. Agregácia proteínu má za následok zvýšený oxidačný stress, čo sa prejaví vo forme konformačných zmien proteínu.

Oxidačný stress pri Parkinsonovej chorobe je spojený hlavne s dysfunkciou mitochondriálneho komplexu I a zvýšenou tvorbou voľných radikálov [43]. Počiatočná fáza choroby je sprevádzaná značným znížením hladiny glutatiónu v substantia nigra. Hladina glutatiónu je znížená oxidáciou kritických tiolových reziduí.

Úloha redoxne aktívnych kovov, predovšetkým homeostáza týchto kovov pri Parkinsonovej chorobe sa ukazuje ako významný faktor neurogenerácie. Mnohé liečiva na báze chelatacie redoxne aktívnych kovov sa ukazujú ako schodný terapeutický prístup.

Clioquinol je liečivo, ktoré má schopnosť chelátovať železo, resp. med' u pacientov s Parkinsonovou chorobou [44]. Chelatácia železa spôsobuje potlačenie katalytickú schopnosť železa pôsobiť ako katalyzátor vo Fentonovej reakcii a tým zníženú tvorbu reaktívneho hydroxylového radikálu.

### **3. Záver**

V bakalárskej práci sme diskutovali o úlohe oxidačného stresu v etiológii Alzheimerovej choroby a Parkinsonovej choroby. Oxidačný stress je podmienený narušenou homeostázou redoxne aktívnych kovov, ako sú železo a meď. Tieto kovy majú schopnosť katalyzovať tvorbu voľných radikálov, ktoré sa podieľajú na poškodení tkanív. Viaceré antioxidanty, ako sú napríklad vitamín C, vitamín E, flavonoidy, kyselina lipová majú schopnosť zmierniť priebeh choroby a zlepšiť kognitívne funkcie pacientov. Priaznivý terapeutický účinok antioxidantov potvrdzuje prítomnosť komponenty oxidačného stresu v neurologických ochoreniach.

#### 4. Literatúra

- [1] Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin ,MTD., Mazur, M., Telser, J. 2007. *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. 2000, Int J Biochem Cell Biol, vol.39, p.44-84.
- [2] Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, CJ., Telser, J. 2004. *Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence*. Mol Cell Biochem, vol.266 ,p.37-56.
- [3] Jomova, K., Valko, M. 2011. *Advances in metal-induced oxidative stress and human disease*. Toxicology, vol.283,p.65-87.
- [4] Cotton, F.A., Wilkinson, G. *Advanced Inorganic Chemistry*, Wiley, 1999.
- [5] Valko, M., Morris, H., Cronin, MTD. 2005. *Metals, toxicity and oxidative stress*. Curr Med Chem, vol. 11,p.1161-1208.
- [6] Waddell, C.A., Elvehjem, H., Steenbock, H., Hart, E.B. 1928. *Iron in nutrition*. J Biol Chem, vol.77,p.777-795.
- [7] Cordano, A., Baertl,J.M., Graham,G.G. 1964.*Copper deficiency in infancy*. Pediatrics, vol.34,p. 214-226.
- [8] Jomova, K., Valko, M. 2011. *Importance of iron chelation in free radical-induced oxidative stress and human disease*. Curr Pharm Des, vol.17,p.3460-3473.
- [9] Gaetke, LM., Chow, CK. 2003. *Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients*. Toxicology, vol.189,p.147-163.
- [10] Zheng ,W., Monnot ,AD. 2012 *Regulation of brain iron and copper homeostasis by brain barrier systems: implication in neurodegenerative diseases*. Pharmacol Ther, vol.133.p.177-188.
- [11] Robinson, NJ., Winge, DR. 2010. *Copper metallochaperones*. Annu Rev Biochem. Vol.79:p.537-562.
- [12] Valko, M.; Morris, H., Mazur, M.; Telser, J.; McInnes, E.J.L.; Mabbs, F.E. 1999. *High affinity binding site for copper(II) in human and dog serum albumins.(An EPR study)*. J. Phys. Chem,B,vol. 103: p.5591-5597.
- [13] Andrews, N.C. 2001. *Mining copper transport genes*. Proc. Natl. Acad. Sci, USA, vol.98: p.6543-6545.
- [14] Kuo, Y.M., Zhou, B., Cosco, D., Gitschier, J. 2001. *The copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development*. Proc. Natl. Acad. Sci.,USA ,vol. 98, p. 6836-6541.

- [15] Jomová, K., Valko, M. 2011. *Free radicals, signal transduction, and human disease. Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspects of Cell Signaling*. Editors T. Farooqui, A. A. Farooqui, Wiley-Blackwell, New York, 2011, p. 17-32.
- [16] Prousek, J. 2007. *Fenton chemistry in biology and medicine*. Pure and Applied Chemistry, vol. 79, p. 2325-2338.
- [17] Sorenson, JR. 2002. *Cu, Fe, Mn, and Zn chelates offer a medicinal chemistry approach to overcoming radiation injury*. Curr Med Chem, vol. 9, p. 639-662.
- [18] Mukhopadhyay, CK., Fox, PL. 1998 *Ceruloplasmin copper induces oxidant damage by a redox process utilizing cell-derived superoxide as reductant*. Biochemistry, vol. 37, p. 14222-14229.
- [19] Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. 1999. *Free radicals in biology and medicine (3rd ed.)*. Oxford University Press.
- [20] Rae, TD., Schmidt, PJ., Pufahl, RA., Culotta, VC., O'Halloran, TV. 1999. *Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase*. Science, vol. 284, p. 805-808.
- [21] Jomova, K., Vondrakova, D., Lawson, M., Valko, M. 2010. *Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders*. Mol Cell Biochem, vol. 345, p. 91-104.
- [22] Jiménez, JS. 2010. *Protein-DNA interaction at the origin of neurological diseases: a hypothesis*. J Alzheimers Dis, vol. 22, p. 375-391.
- [23] Selkoe, DJ. 2001. *Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy*. Physiological Reviews, vol. 81, p. 741-766.
- [24] Barnham, KJ., Masters, CL., Bush, AI. 2004. *Neurodegenerative diseases and oxidative stress*. Nature Reviews Drug Discovery, vol. 3, p. 205-214.
- [25] Bush, AI. 2003. *The metallobiology of Alzheimer's disease*. Trends Neurosci, vol. 26, p. 207-214.
- [26] Sayre, LM., Smith, MA., Perry, G. 2001. *Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease*. Current Medicinal Chemistry, vol. 8, p. 721-738.
- [27] Varadarajan, S., Yatin, S., Aksenova, M., Butterfield, DA. 2000. *Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity*. J. Struct. Biol, vol. 130, p. 184-208.
- [28] Lee, HG., Zhu, XW., Castellani, RJ., Nunomura, A., Perry, G., Smith, MA. 2007. *Amyloid-beta in Alzheimer disease: The null versus the alternate hypotheses*. J Pharm Exp Therap, vol. 321, p. 823-829.
- [29] Rajendran, R., Ren, MQ., Ynsa, MD. et al. 2009. *A novel approach to the identification and quantitative elemental analysis of amyloid deposits-insights into the pathology of Alzheimer's disease*. Biochem Biophys Res Commun, vol. 382, p. 91-95.

- [30] Pimplikar, SW. 2009. *Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease*. Int J Biochem Cell Biol, vol. 41, p.1261-1268.
- [31] Bush ,AI., Curtain, CC. 2008. *Twenty years of metallo-neurobiology: where to now?* European Biophysics Journal with Biophysics Letters ,vol.37,p.241-245.
- [32]Cuanjungco, MP., Goldstein, LE., Nunomura, A. et al. 2000. *J Biol Chem*, vol. 275, p. 19439-19442.
- [33] Curtain ,CC., Ali, F., Volitakis, I., Cherny, RA., Norton, RS., Beyreuther ,K., Barrow, CJ., Masters, CL., Bush ,AI., Barnham, KJ. 2001. *Alzheimer's disease amyloid-beta binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits.* ,vol. 276,p.20466-20473.
- [34] Butterfield, DA., Sultana, R. 2011. *Methionine-35 of a $\beta$ (1-42): importance for oxidative stress in Alzheimer disease*. J Amino Acids. Art, vol. 198430.
- [35] Mecocci, P., Polidori, MC. 2012. *Antioxidant clinical trials in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease*. Biochim Biophys Acta, vol.1822,p.631-638.
- [36] Dikalov ,SI., Vitek, MP., Mason, RP. 2004. *Cupric-amyloid beta peptide complex stimulates oxidation of ascorbate and generation of hydroxyl radical*. Free Radic Biol Med, vol. 36,p.340-347.
- [37] Ansari, MA., Scheff, SW. 2010. *Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex*. J Neuropathol Exp Neurol, vol. 69,p.155–167.
- [38] Maczurek ,A., Hagera, K., Kenkliesa, K. et al. 2008. *Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease*. Adv Drug Deliv Rev, vol.60,p.1463–1470.
- [39] Bieschke, J., Russ ,J., Friedrich, RP., Ehrnhoefer, DE., Wobst, H., Neugebauer, K. 2010. *EGCG remodels mature alpha-synuclein and amyloid-beta fibrils and reduces cellular toxicity*. Proc Natl Acad Sci., USA, vol. 107,p.7710–7715.
- [40] Jenner ,P., Olanow, CW. 1998. *Understanding cell death in Parkinson's disease*. Annals of Neurology, vol. 44,p.72-S84.
- [41] Dawson, TM., Dawson, VL. 2003. *Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease*. Science, vol. 302,p.819-822.
- [42] Gwin-Hardy, K. 2002. *Genetics of Parkinsonism*. Mov. Disord, vol.17, p. 645–656.
- [43] Devi, L., Anandatheerthavarada, HK. 2010. *Mitochondrial trafficking of APP and alpha synuclein: Relevance to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's and Parkinson's diseases*. Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease, vol. 1802,p.11-19.

[44] Kaur, D., Yantiri, F., Rajagopalan, S. et al. 2003. *Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity in vivo: a novel therapy for Parkinson's disease*. Neuron, vol. 37, p.899–909.