

Redacția:

„Ana Aslan“ International Academy of Aging®

Fundația „Ana Aslan International“®
L.S. Enia Publishing House®
Piața Kogălniceanu nr. 1, ap. 17
Sector 5, București, România
Telefon/Fax: (021) 312 46 96
aslan@brainaging.ro
www.brainaging.ro

Secretariat general:
Ligia Hogaș, office@brainaging.ro
Gunilla Johansson,
Gunilla.Johansson@neurotec.ki.se

Redactor:
Dr. Alina Cașcaval, M.D.,
office@brainaging.ro

©L.S. Enia Publishing House®
©„Ana Aslan“ International Academy of Aging®
©Fundația „Ana Aslan International“®

ISSN 1582-8352 (tipărită)
ISSN 1582-8360 (on-line)

Toate drepturile rezervate. Nici o parte a acestei publicații nu poate fi reprodusă, stocată sau transmisă în nici o formă și prin nici un mijloc, electronic, mecanic, fotografic etc. fără permisiunea editorilor.

Brain Aging International Journal®
— ediția în limba română

„Ana Aslan“ International Academy of Aging®

Abrevierea acceptată pentru **Brain Aging International Journal®** — ediția în limba română pentru referințele bibliografice este **Brain Aging RO.**

THE SECOND INTERNATIONAL CONFERENCE OF BRAIN AGING..... 3

Articole originale

Eficacitatea rivastigminei la pacienții cu boală Alzheimer severă: un studiu pilot dublu-orb, randomizat 5

López-Pousa S., Vilalta-Franch J., Hernandez B., Rapatz G.

Activitatea complexului enzimatic II-III al lanțului transportor de electroni este scăzută în mușchiul striat al pacienților cu boala Alzheimer 15

Rolf Wibom, Tor Ansved, Ulla Hamberg, Mari Blomberg, Kristian Borg, Hans Basun, Ulrica von Döbeln, Anita Garlind

Bolile cerebrovasculare stau la baza depresiei pacienților cu afecțiuni neurodegenerative? 23

Carmelle Peisah, Jillian J. Kril, Ian Hickie

Semnalizarea APP-mediată - noi aspecte 32

Klaus Heese, Takashi Yamada, Yasuo Nagai, Tohru Sawada

Utilizarea informațiilor obținute de la aparținători în diagnosticul demenței incipiente 39

Anne Rita Oksengraad, A. Braekhus, K. Engedal, K. Laake

Relația între factorii de risc vascular și caracteristicile plăcilor de aterom carotidiene la pacienții vârstnici 45

Milica Crisby, Jan Nilsson

Prezentare de caz

Tiroidită atrofică autoimună la o pacientă cu demență vasculară 51

Ioana Ioancio, Luiza Spiru, I. Gh. Totoianu

Imagistică - Prezentare de caz

Multiple mici hemoragii în emisferele cerebrale 55

Paul Pătrașcu

„Ana Aslan” International Academy of Aging 56

Scale de diagnostic

Severe Impairment Battery (SIB) 58

Anders Wimo, Bengt Winblad

Recomandări pentru autori 59

Consiliul științific

 **Luiza Spiru** Editor
 **Bengt Winblad** Editor șef
 **Khalid Iqbal** Editor

Sweden 	Agneta Nordberg Jan Hillert Jan Näslund Kaj Blennow	Lars Bäckman Lars Olson Lars-Olof Wahlund Laura Fratiglioni Richard Cowburn	Romania 	Florina Cristescu Ion (Jan) Hurjui Ioan Romoșan Constantin Popa Alexandru Șerbănescu Constantin Bălăceanu Stoilici	Cătălina Tudose Tudor Udristoiu Ovidiu Băjenaru Della Mut Popescu
US 	Eliezer Masileh Steven deKosky Steven Ferris Dave Morgan	John Morley Lon Schneider Peter J. Whitehouse John Hardy	Finland 		Hilkka Solininen Irina Alafuzoff
UK 	Alan Sinclair Emil C Toescu Gordon Wilcock	Martin Rossor Raj Kalaria Simon Lovestone	Canada 		Howard Feldman Remi Quirien Claudio Cuello
Ireland 		Robert Elsner	France 	André Delacourte Bruno Vellas Françoise Forette	Jean-Marc Orgogozo Pierre Jean Cusset
Germany 		Harald Hampel Lutz Frölich	Spain 		Jesús Avila
Switzerland 		Ezio Giacobini Thomas Dierks	Italy 		Sandro Sorbi Patrizia Mecocci Gianluigi Forloni
Denmark 		Gunhild Waldemar	Australia 		Anthony Jorm Colin L Masters Henry Brodaty
Netherlands 		Philip Scheltens	Israel 		Daniel Michaelson Hiliet Pratt Michael Davidson
Poland 		Marja Bercikowska	United Arab Emirates 		Abdu Adem
India 		Vijay Chandra	Japan 		Masatoshi Takeda Akihiko Takashima Takeshi Tabira
Slovakian Republic 		Michal Novak	China 		Jianzhi Wang Li Lin
Singapore 		Barry Halliwell Ng Tze Pin	Thailand 		Prasert Boongird
Greece 		John Mantas Magda Tsolaki	Russia 		Alexej Olovnikov Valeria Strolets
			Ukraine 		Natalia Batchinskaya

THE SECOND INTERNATIONAL TRAINING OF BRAIN AGING - AN INTERNATIONAL JOURNAL

"Mild Cognitive Impairment Versus Depression"

October 15, 2005 - Bucharest

Dragi colegi și prieteni,

În numele "Ana Aslan" International Academy of Aging și European Alzheimers Disease Consortium, ne face o deosebită plăcere să vă invităm la Cel De-al 2-lea Curs Internațional de Brain Aging, ce va avea loc în București, în ziua de 15 octombrie 2005.



Prof. Bengt Winblad, MD, PhD



Prof. Assoc. Dr. Luiza Spiru

Ținta acestei întâlniri este de a pregăti medici din România pentru a diagnostica, a trata din stadii incipiente și a aborda cu profesionalism cazurile de Boală de Memorie și Depresie. Trainingul este creditat cu 10 ore CMEs și organizat la un înalt nivel științific, având ca vorbitori invitați doi profesori recunoscuți internațional în domeniul Brain Aging: Prof. Ezio Giacobini și Prof. Pieter Jelle Visser. Programul științific cuprinde cursuri ce se concentrează pe informații de ultimă oră privind Deficitul Cognitiv Lejer și Depresia în cadrul patologiilor de memorie la vârstnici.

Intenționăm să încurajăm participanții să beneficieze de informațiile oferite în cadrul acestei întâlniri desfășurată la un nivel înalt profesional, ce va reuni geriatri, neurologi, psihiatri, medici generalști, cercetători precum și personal implicat în îngrijirea pacienților diagnosticați cu Depresie, Boală de Memorie sau Demență.

Vom fi onorați de participarea dumneavoastră la această manifestare științifică.

Vă așteptăm la curs în 15 octombrie 2005!

Bengt Winblad, M.D., Ph.D

Luiza Spiru, M.D., Ph.D.

Khalid Iqbal, Ph.D.

Eficacitatea rivastigminei la pacienții cu boală Alzheimer severă: un studiu pilot dublu-orb, randomizat

López-Pousa S., M.D.^{1#}, Vilalta-Franch J., M.D.¹, Hernandez B., Ph.D.², Rapatz G., M.Sc.³

¹Hospital Santa Caterina, Girona, Spain

²Novartis Farmacéutica S.A., Barcelona, Spain

³Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland.

Rezumat

Inhibitorii de colinesterază sunt folosiți pe larg în tratamentul bolii Alzheimer (BA) ușoare sau moderate, dar există puține informații asupra utilizării acestor agenți în stadiile avansate ale bolii. Acest studiu multicentric, randomizat, dublu-orb, placebo-controlat, cu durată de 26 de săptămâni, desfășurat în Spania urmărește evaluarea siguranței și eficacității rivastigminei la pacienții cu boală Alzheimer mai avansată. Pacienții aveau vârsta ≈ 55 ani și erau diagnosticați cu BA moderat-severă spre severă conform scorului Mini-Mental State Examination (valori între 5 și 12) și stadiilor Global Deterioration Scale 5-6. Pacienții cu primit fie placebo, fie rivastigmină 3-12 mg/zi. Au fost utilizați mai mulți parametri de eficacitate, incluzând indicatori ai performanței cognitive, activităților cotidiene, simptomatologiei neuropsihiatrice și impresiei generale de schimbare. Evenimentele adverse au fost monitorizate pe tot parcursul studiului. În total, au fost randomizați 218 pacienți (109 în fiecare grup). Rivastigmina a determinat ameliorare semnificativă statistic, comparativ cu placebo, în ceea ce privește indicatorii performanței cognitive și impresiei globale de schimbare. Au fost raportate de asemenea îmbunătățiri ale indicatorilor activităților cotidiene și parametrilor neuropsihiatrici (însă fără semnificație statistică). Evenimente adverse au fost raportate de 88,1% dintre pacienții din grupul cu rivastigmină și 68,8% dintre cei tratați cu placebo; 9,2% dintre pacienții din grupul cu rivastigmină și 4,6% din grupul placebo s-au retras din cauza evenimentelor adverse. În concluzie, rezultatele acestui studiu pilot mic, dar bine controlat, sugerează că pacienții cu BA moderat-severă sau severă ce primesc tratament cu rivastigmină obțin beneficii semnificative comparativ cu placebo, în conformitate cu indicatorii prognostici clasici ai BA ce evaluează cogniția și funcționarea globală. Rivastigmina nu pare să pună probleme suplimentare de siguranță la acest grup populațional. Ar fi necesare alte studii, mai ample, asupra inhibitorilor de colinesterază în BA avansată.

Cuvinte cheie: rivastigmină, boală Alzheimer severă, tulburare cognitivă, eficacitate, siguranță, tolerabilitate

Introducere

Sistemul colinergic are un rol important în memorie, precum și în reglarea regională a fluxului sanguin cerebral, ce poate ameliora funcțiile corticale¹. Reducerea activității colinergice se corelează cu creșterea metabolismului amiloidogenetic și cu disfuncțiile progresive cognitive și de memorie, precum și cu tulburările de comportament caracteristice bolii Alzheimer (BA)^{2,3}. Această afecțiune neurodegenerativă este caracteriza-

tă printr-o pierdere progresivă a neuronilor colinergici și proiecțiilor lor corticale, din nucleii bazali și ariile proencefalice bazale asociate^{4,6}.

Acetilcolinesteraza (AChE) și butirilcolinesteraza (BuChE) par să fie la fel de active în hidroliza sinaptică a acetilcolinei (ACh), stopând acțiunea sa ca neurotransmițător și co-reglând nivelul ACh pentru a facilita neurotransmisia colinergică⁷. Concentrațiile cerebrale ale AChE scad în paralel cu progresia BA, în timp ce pentru BuChE acestea sunt

cu 30-60% mai mari în creierul afectat de BA, probabil datorită creșterii numărului de celule gliale BuChE- pozitive^{8,9}. În BA, crește de asemenea raportul BuChE / AChE de origine glială în regiunile cerebrale cu susceptibilitate crescută pentru dezvoltarea patologiei caracteristice BA, cum sunt ariile entorinale și cele inferotemporale¹⁰. Întrucât BuChE glială poate co-regla ACh, similar rolului celulelor gliale în neurotransmisia glutaminergică¹¹, creșterea nivelurilor de BuChE în BA avansată

#Adresa pentru corespondență: Secundino López-Pousa MD, Parc Hospitalari Martí i Julià Edifici Santa Caterina, Unitat de Valoració de la Memòria i les Demències C/ Doctor Castany, s/n 17190 SALT Girona, Spain
Tel: +34 972 18 90 00 ext. 1590; Fax: 00 34 972 18 90 15; e-mail: uvamid@ias.scs.es



GRECC
GERIATRIC RESEARCH, EDUCATION
AND CLINICAL CENTER



"Ana Aslan"
International Academy of Aging



„CAROL DAVILA” BUCHAREST
University of Medicine and Pharmacy
Elias University Emergency Hospital
Geriatrics and Geronto-Psychiatrics Dpt.



EADC
European Alzheimer's Disease Association
eadc@alzheimer-europe.org



BRAIN AGING
INTERNATIONAL JOURNAL



alzheimer's association

THE SECOND INTERNATIONAL TRAINING OF BRAIN AGING - AN INTERNATIONAL JOURNAL

"Mild Cognitive Impairment Versus Depression"

Bucharest, October 15, 2005

SCIENTIFIC PROGRAM

- 8.00 – 8.30 Registering
- 8.30 – 10.00 MCI Diagnostic Criteria / P. J. Visser - (1,30h)
- 10.00 – 10.30 Coffee break
- 10.30 – 11.30 Positive Diagnosis of Depression in Elders / L. Spuru (1h)
- 11.30 – 12.30 Does a therapeutic approach of MCI exist? / L. Spuru; P.J.Visser - (1h)
- 12.30 – 13.30 Lunch
- 13.30 – 15.00 Depression Versus MCI / P.J.Visser - (1,30h)
- 15.00 – 16.30 Cholinesterase Inhibitors Are Alive and Well / Ezio Giacobini - (1,30h)
- 16.30 – 18.00 Workshop & Coffee (1,30h)
- 18.00 – 20.00 Industry Symposia and Exhibition - (2h)
- 20.00 Gala Dinner and Awards

CME: 10 hours

Location: Infoturism, Bucharest, B-dul Poligrafiei nr. 3A, Sector 1

Organizing Committee: Luiza Spuru (RO), Bengt Winblad (SE), Ezio Giacobini (CH)

http://www.brainaging.ro • office@brainaging.ro
tel./fax: +40-21-312.46.96

poate exacerba reducerea neurotransmisiei colinergice prin reducerea suplimentară a concentrațiilor ACh. Mai mult, activitatea BuChE în cortexul temporal și diversele alele pentru BuChE au fost corelate cu rata declinului cognitiv la pacienții cu demență^{12,13}. Deși rolul BuChE în patogeneza BA nu este încă stabilit, aceste descoperiri sugerează că această enzimă ar putea fi o țintă importantă, pe lângă AChE, în tratamentul BA, în special la pacienții cu boală avansată.

Inhibitorii de colinesterază (ICH) reduc degradarea ACh și sunt aprobați în tratamentul demenței de tip Alzheimer ușoare sau moderate^{14,15}. Cel mai frecvent utilizați ICH sunt donepezil, rivastigmină și galantamină. Rivastigmina este un inhibitor lent reversibil al AChE și BuChE, în timp ce donepezilul și galantamina sunt inhibitori specifici și rapid reversibili ai AChE¹⁶. Conform „National Institute of Clinical Excellence” (NICE) din Marea Britanie, nu există suficiente date care să susțină utilizarea acestor agenți la pacienții cu boală mai severă (de ex. scor *Mini-Mental State Examination* [MMSE] = 12)¹⁵.

Mai multe studii au demonstrat că rivastigmina este eficientă la pacienții cu BA în stadiile ușor până la moderat-sever¹⁷⁻¹⁹. O meta-analiză recentă a acestor studii a indicat faptul că rivastigmina oferă beneficii cognitive și comportamentale la pacienții cu BA în stadii mai avansate (scor MMSE < 12)²⁰. În plus, există dovezi din alte studii ce sugerează că pacienții cu BA mai avansată ar putea să răspundă la tratamentul cu ICH mai bine decât cei cu forme ușoare. În momentul când a fost conceput studiul de față, opinia generală era că pacienții cu BA severă prezintă neurodegenerare atât de avansată încât nu vor beneficia de ameliorarea simptomatică în urma tratamentului cu ICH observată la cei cu BA ușoară sau moderată. Astfel, nu s-a considerat necesară efectuarea unui studiu complet, de amploare, referitor la efectele ICH asupra acestor pacienți.

Ca urmare, noi am conceput un studiu pilot, ce a evaluat eficiența cognitivă, comportamentală și globală a rivastigminei la pacienții cu BA severă, pentru a determina dacă aceștia încă mai pot să răspundă la tratamentul cu ICH.

Material și metodă

Pacienți

În studiu au fost incluși pacienți de ambele sexe, cu vârsta ≥55 ani, diagnosticați cu demență de tip Alzheimer (criteriile DSM-IV) și BA probabilă (criteriile „National Institute of Neurological and Communicative Disorders” și „Stroke-Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association” sau NINCDS-ADRDA) stadializată între moderat severă și severă (scoruri MMSE 5-12; Stadii GDS 5-6), cu un scor Hachinski modificat ≤4²¹. De asemenea, pacienții incluși în acest studiu aveau contact zilnic cu un îngrijitor ce a fost de acord să contribuie la efectuarea evaluărilor din studiu.

Criteriile de excludere au fost: sensibilitate farmacologică exagerată sau hipersensibilitate la rivastigmină sau alte medicamente colinergice (tacrine, fizostigmină etc); istoric de abuz de medicamente; orice diagnostic de boală medicală severă (inclusiv afecțiuni neurologice și/sau psihiatrice primare) sau alte boli dacă investigatorul consideră că ar putea împiedica evaluările clinice sau ar afecta starea mentală a pacientului; boală cardiovasculară severă și instabilă; disfuncție de nod sinusal prezentă sau tulburări de conducere (bloc sinoatrial, bloc atrioventricular gradul II sau III); instituționalizare; ingestia altor inhibitori de ChE, administrarea de medicamente sau substanțe de contrast cunoscute ca toxice asupra principalelor organe, în ultimele 4 săptămâni anterioare includerii în studiu.

Design-ul studiului

Acest studiu pilot multicentric, randomizat, dublu-orb, placebo-controlat, cu o durată de 26 de săptămâni

s-a desfășurat în 21 de unități de Neurologie, Psihiatrie și Geriatrie din Spania. Pacienții eligibili, identificați printr-o vizită inițială de evaluare, au primit la a doua vizită un număr de identificare, conform planului de randomizare computerizată pregătit anterior. Randomizarea a fost făcută de către CRO, „Clinical Data Care AB (CDC) din Lund, Suedia. Schema de randomizare a fost revizuită de „Quality Management Biostatistics Group” din cadrul Novartis, „Statistics and Medical Information Processing Department”, Basel, Elveția. Pentru randomizare au fost folosite blocuri de randomizare cu mărimea de 4.

Medicația de studiu (rivastigmină sau placebo) a fost eliberată în fiecare centru și pacienții au primit tratamentul pentru 26 săptămâni. Supraveghetorii medicali, personalul centrelor, pacienții și îngrijitorii nu au cunoscut tratamentul. Datele de randomizare nu au fost disponibile decât după finalizarea studiului și închiderea bazei de date a fost închisă. Capsulele de rivastigmină și placebo au avut aspect identic în această fază dublu-orb. Pacienții au primit inițial doza de nivel 1 (rivastigmină 1,5 mg b.i.d sau placebo b.i.d.) timp de 4 săptămâni și, dacă această doză a fost bine tolerată, au primit doza de nivel 2 (rivastigmină 3 mg b.i.d. sau placebo b.i.d.) alte 4 săptămâni. Dacă nu au apărut probleme de tolerabilitate, s-a făcut titrarea la doze de nivel 3 (rivastigmină 4,5 mg b.i.d sau placebo b.i.d.) și 4 (rivastigmină 6 mg b.i.d. sau placebo b.i.d.) la intervale de 4 săptămâni. În cazul apariției reacțiilor adverse, doza a fost scăzută la cea corespunzătoare nivelului anterior bine tolerat.

Consimțământul scris a fost primit de la toți pacienții (sau de la reprezentanții legali ai acestora dacă subiecții nu erau în deplinătatea facultăților mintale) la vizita inițială de evaluare, înainte de înrolare. Acest studiu a primit aprobarea comisiei de etică și a fost condus în acord cu regulile de bună practică clinică și Declarația de la Helsinki.

Parametri de eficacitate

În acest studiu, performanța cognitivă și simptomele comportamentale și psihiatrice au fost evaluate la momentul inițial (vizita de screening) și după 26 săptămâni de tratament folosind „Severe Impairment Battery” (SIB)²² și „10-item Neuropsychiatric Inventory” (NPI-10)²³, ca principali indicatori de eficacitate. SIB a fost conceput pentru a evalua pe grade performanța cognitivă la pacienții cu handicap sever incapabili de a finaliza teste neuropsihologice convenționale. Scorul SIB are valori între 0 (mai slab) și 100 (mai bine)²². NPI este conceput ca un interviu structurat pentru îngrijitori ce evaluează comportamentul și alte simptome psihiatrice la pacienții demenți și face distincție între frecvența și severitatea simptomelor psihiatrice²². NPI este măsurat pe o scală de la 0 la 144, cu valorile mai mari reprezentând un nivel crescut al tulburărilor comportamentale/psihiatrice. NPI-10 acoperă 10 domenii: iluzii, halucinații, agitație/agresiune, depresie/disforie, anxietate, exaltare/euforie, apatie/in-diferență, dezinhibiție, iritabilitate/labilitate și comportament motor aberant²². Atunci când a fost posibil, pentru a asigura soliditatea datelor, evaluările pentru eficacitate au fost făcute de către aceeași persoană în fiecare centru.

Indicatorii prognostici secundari au fost MMSE²⁴, „Alzheimer’s Disease Cooperative Study-Clinical Global Impression of Change” (ADCS-CGIC)²⁵, „Global Deterioration Scale” (GDS)²⁶, „Blessed Scale”²⁷, „Alzheimer’s Disease Cooperative Study-Activities of Daily Living Inventory” (ADCS-ADL)²⁸ și „4-item NPI” (NPI-4)²². MMSE cuprinde o serie de întrebări concepute pentru a evalua orientarea, atenția, memorie imediată și de scurtă durată, limbajul și capacitatea de a executa comenzi simple verbale și scrise, și oferă rezultatul pe o scală cu 30 de puncte²⁴. Scoruri MMSE între 5 și 12 indică disfuncție cognitivă moderată sau severă. ADCS-CGIC este o scală cu 7

puncte (unde 1 = ameliorare marcată și 7 = deteriorare marcată) ce recoltează informațiile clinice necesare atât de la îngrijitor cât și de la pacient pentru a evalua impresia clinică globală de schimbare comparativ cu vizita inițială²⁵. GDS este o altă scală cu 7 puncte ce evaluează stadializarea clinică a evoluției naturale a BA, cu valori de la 1 (ușoară) până la 7 (severă)²⁶.

„Blessed Scale” este o scală de performanță multidimensională cu trei mari secțiuni, fiecare împărțită în subsecțiuni cu scoruri de 0, 0,5 sau 1, pentru un total între 0 și 28²⁷. Scala ADCS-ADL este o evaluare în 23 de puncte a activităților cotidiene, cu scoruri între 0 (cea mai mare disfuncție) și 78²⁸. NPI-4 acoperă 4 domenii ale comportamentului: iluzii, halucinații, depresie și apatie²².

Siguranță și tolerabilitate

Siguranța clinică generală a fost evaluată prin monitorizarea apariției evenimentelor adverse, modificărilor analizelor de laborator (hematologie; biochimie, inclusiv teste ale funcției hepatice [cum sunt alanin aminotransferaza; aspartat aminotransferaza]), monitorizarea semnelor vitale, greutății corporale, electrocardiogramului și examenului fizic. Tolerabilitatea a fost evaluată prin înregistrarea tuturor efectelor adverse raportate.

Analiza statistică

Pentru a determina dimensiunea eșantionului a fost utilizat scorul global NPI-10, folosind programul Nquery (Windows 95). Nouăzeci și doi de pacienți pentru fiecare grup de tratament (184 în total) au fost considerați suficienți pentru a atinge o putere statistică de 80% și semnificație de 5% într-un test cu două limite, presupunând o deviație standard de 12 și o diferență de 5 puncte între mediile grupurilor de tratament. Astfel, presupunând o rată de abandon de 15%, în fiecare grup de tratament trebuie incluși 109 pacienți (în total 218) pentru a garanta numărul necesar de 184 pacienți în total.

Analizele de eficacitate s-au efectuat pe lotul „intention-to-treat” (ITT) – „last observation carried forward” (LOCF) ce a cuprins toți pacienții randomizați ce au primit cel puțin o doză din medicația de studiu și aveau cel puțin o evaluare a eficacității inițiale și una post tratament pentru unul dintre parametrii de eficacitate primari. Modificările simptomelor cognitive și/sau comportamentale între momentul inițial și vizita de la 26 de săptămâni între grupurile de tratament au fost determinate prin analiza covarianței sau ANCOVA (scoruri SIB; scoruri NPI-10) cu ajustare în funcție de centru, tratament, valoare inițială și, dacă era semnificativ statistic, tratament per valoare inițială. Pentru exprimarea diferențelor între cele două grupuri de tratament s-au calculat intervalele de încredere (CI) 95% asociate cu valorile-p. Testul Wilcoxon a fost folosit pentru a evalua modificările între grupurile de tratament în ceea ce privește scorurile medii MMSE, ADCS-CGIC, GDS, NPI-4 și ADCS-ADL de la momentul inițial la 26 de săptămâni.

Rezultate

Distribuție și date demografice

Primul pacient a fost recrutat în septembrie 2000, iar ultimul pacient a terminat studiul în octombrie 2002. Din 238 pacienți evaluați inițial, 218 (109 per grup de tratament) au fost randomizați pentru a primi rivastigmină 6-12 mg/zi sau placebo. În total, 91 (83,5%) pacienți ce au primit rivastigmină și 96 (88,1%) din grupul placebo au finalizat studiul, restul abandonând după ce au primit cel puțin o doză din medicația de studiu (Figura 1). Cinci pacienți din grupul rivastigmină și trei din grupul placebo nu au fost evaluați post-tratament prin SIB sau NPI și au fost deci excluși din analiza eficacității. Populația ITT a cuprins 104 pacienți în grupul rivastigmină și 106 în grupul placebo.

Grupurile de tratament aveau la momentul inițial caracteristici

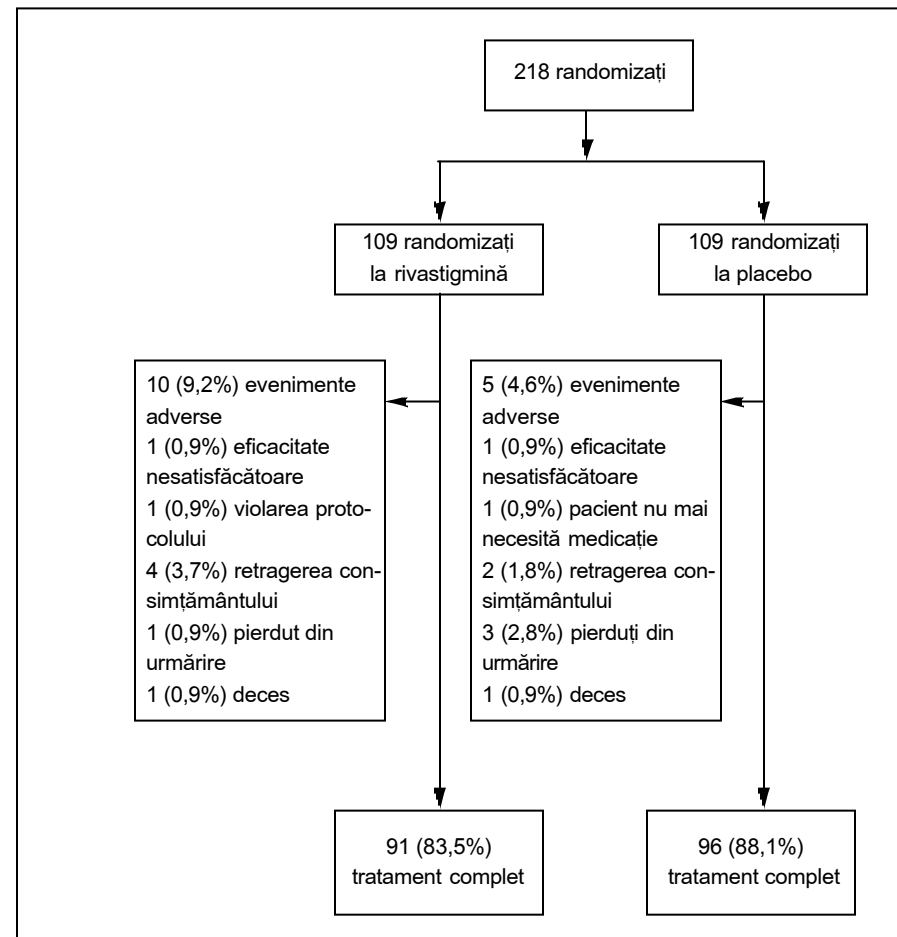


Figura 1. Diagrama studiului.

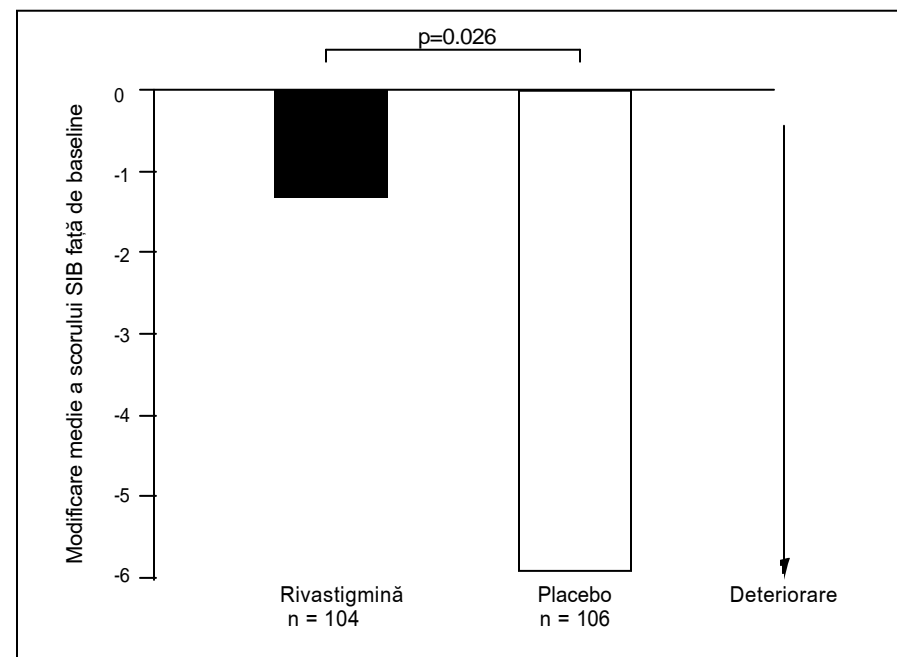


Figura 2. Modificările medii ale scorului SIB (Severe Impairment Battery) la 26 de săptămâni de tratament cu rivastigmină sau placebo, față de valorile la includere, la pacienții cu BA moderată până la severă.

demografice și de tratament similare (vezi Tabelul 1). În ansamblu, proporția de pacienți ce au primit concomitent antipsihotice și anxiolitice la început și/sau în timpul studiului a fost similară pentru cele două grupuri. Totuși, proporția pacienților ce primeau antipsihotice sau antidepressive la momentul inițial a fost aproximativ dublă în grupul rivastigmină, comparativ cu grupul placebo (Tabelul 1). Durata medie (SD) de expunere la medicația de studiu a fost de 168,2 (47,2) de zile pentru pacienții ce au primit rivastigmină și 172,9 (39,0) pentru cei care au primit placebo. Doza medie (SD) primită de cei din grupul rivastigmină la sfârșitul studiului a fost de 9,8 (2,8) mg/zi.

Performanța cognitivă

Declinul scorului SIB mediu la sfârșitul perioadei de studiu de 26 săptămâni comparativ cu momentul inițial a fost semnificativ mai mare pentru grupul placebo comparativ cu grupul rivastigmină (diferența de tratament 4,0 puncte, $p = 0,026$) (Figura 2). Diferența ponderată între medii (95% CI) a fost 3,83 (0,46, 7,21).

La finalul studiului, modificările medii ale scorului MMSE după tratamentul cu rivastigmină au arătat o ameliorare cu 0,6 față de valorile inițiale, comparativ cu un declin de 1,0 în grupul placebo. Aceasta reprezintă o diferență de tratament semnificativă statistic de 1,6 ($p < 0,001$) (Figura 3).

Simptome comportamentale

La pacienții care au primit tratament cu rivastigmină s-a remarcat o ameliorare a scorului NPI-10 mediu de 0,1 puncte pentru cele 26 de săptămâni, comparativ cu o deteriorare de 1,7 puncte la cei care au primit placebo (Tabelul 2). Diferența ponderată între medii a fost de 0,92 puncte ($p = 0,64$).

NPI-4 a arătat de asemenea o tendință de ameliorare a simptomelor comportamentale sub tratament cu rivastigmină comparativ cu placebo. După 26 de săptămâni, pacienții

Tabelul 1. Datele demografice și caracteristicile inițiale ale pacienților (toți pacienții randomizați, $n = 218$).

Date demografice/caracteristici inițiale	Rivastigmină 6–12 mg zilnic (n = 109)	Placebo (n = 109)
Vârsta medie, ani (limite)	78,0 (60-89)	77,2 (57-92)
Sex (% femei : bărbați)	78,0 : 22,0	76,1 : 23,9
Scorul MMSE mediu	9,0 (2,2)	8,7 (2,2)
Pacienți ce primeau antipsihotice, n (%)	27 (24,8)	23 (21,1)
Pacienți ce primeau anxiolitice, n (%)	14 (12,8)	15 (13,8)
Pacienți ce primeau antidepressive, n (%)	15 (13,8)	7 (6,4)
Pacienți ce primeau hipnotice, n (%)	10 (9,2)	6 (5,5)

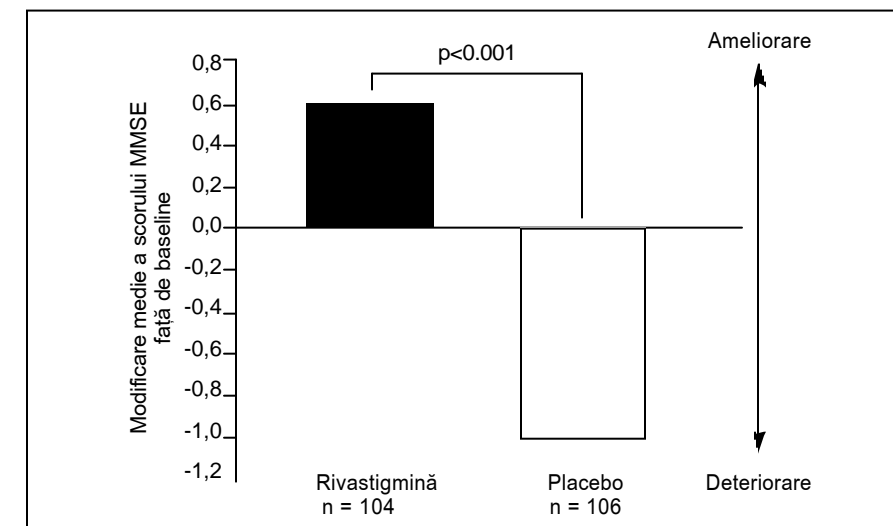


Figura 3. Modificările medii ale scorului MMSE la 26 de săptămâni de tratament cu rivastigmină sau placebo, față de valorile la includere, la pacienții cu BA moderată până la severă.

tratați cu rivastigmină au prezentat o ameliorare de 0,3 puncte, comparativ cu o deteriorare de 2,0 puncte în cazul celor care au primit placebo. Diferența ponderată între medii a fost de 1,56 puncte ($p = 0,11$).

Impresia globală de schimbare

Rezultatele ADCS-CGIC demonstrează de asemenea beneficiile globale semnificative ale rivastigmină, cu ameliorarea simptomatologiei pentru 22,1% ($n = 23$) dintre pacienții, comparativ cu ameliorare la doar 9,6% ($n = 10$) din cei care au primit placebo. Beneficiile globale

ale rivastigmină au fost semnificativ mai mari comparativ cu placebo la sfârșitul perioadei de tratament de 26 săptămâni ($p = 0,024$).

La momentul inițial, ambele grupuri aveau un scor GDS mediu de 5,5, traducând BA severă. La sfârșitul studiului, pacienții tratați cu placebo se deterioraseră până la un scor mediu de 5,8 (modificare față de momentul inițial de 0,3), în timp ce grupul rivastigmină avea un scor mediu de 5,6 (modificare față de momentul inițial de 0,1). Totuși, diferența între grupuri conform scalei GDS nu a fost semnificativă statistic ($p = 0,065$). Diferența între tratamente pentru scala Blessed a fost de asemenea statistic nesemnificativă ($p = 0,63$).

Activitățile cotidiene

În medie, pacienții care au primit rivastigmină s-au deteriorat cu 3,9 puncte pe scala ADCS-ADL, comparativ cu 5,6 puncte (diferența medie ponderată: 1,7 puncte) în cazul celor care au primit placebo ($p = 0,23$).

Siguranță și tolerabilitate

Incidența globală a evenimentelor adverse a fost de 88,1% la grupul rivastigmină și 68,8% la grupul placebo (Tabelul 3). În ansamblu, 9,2% dintre pacienții din grupul rivastigmină și 4,6% din grupul placebo s-au retras datorită eveni-

Tabelul 2. Eficacitatea asupra simptomatologiei comportamentale, evaluată prin NPI-10: studiu prospectiv, placebo-controlat (populație ITT).

	Rivastigmină 6-12 mg pe zi (n = 104)	Placebo (n = 106)
Momentul inițial (săpt. 0) scorul NPI-10 mediu (SD)	21,5 (15,3)	19,8 (17,1)
Final (săpt. 26) scorul NPI-10 mediu (SD)	21,4 (17,2)	21,5 (17,5)
Modificarea medie a scorului NPI-10 față de momentul inițial (SD)*	-0,1 (15,2)	1,7 (17,5)

*O modificare medie negativă față de momentul inițial reprezintă ameliorarea simptomelor comportamentale. Nu au fost diferențe semnificative între grupurile de tratament. NPI-10: Inventarul Neuropsihiatric în 10 puncte (10-item Neuropsychiatric Inventory).

Tabelul 3. Incidentele evenimentelor adverse.

Evenimente adverse*	Rivastigmină 6-12 mg pe zi (n = 109)	Placebo (n = 109)
Total evenimente adverse, n (%)	96 (88,1)	75 (68,8)
Total evenimente adverse gastrointestinale, n (%)	54 (49,5)	21 (19,3)
Total evenimente adverse psihiatrice, n (%)	32 (29,4)	20 (18,3)
Total evenimente adverse neurologice, n (%)	27 (24,8)	18 (16,5)
Cele mai frecvente evenimente adverse (³ 10%)		
Greută, n (%)	28 (25,7)	2 (1,8)
Vărsături, n (%)	23 (21,1)	4 (3,7)
Anorexie, n (%)	11 (10,1)	2 (1,8)

*Pacienții ce au prezentat mai multe evenimente adverse din oricare categorie de mai sus au fost înregistrați doar o singură dată.

mentelor adverse, majoritatea fiind de severitate ușoară sau moderată. S-au înregistrat două decese în timpul perioadei de studiu, câte unul în fiecare grup de tratament. Decesul din grupul rivastigmină a fost suspectat a fi legat de tratament. Șapte evenimente adverse grave non-fatale au fost raportate la 6 pacienți ce au primit rivastigmină (durere abdominală moderată, un atac ischemic tranzitor ușor, un cancer al cavității nazale, un infarct miocardic, o hernie abdominală strangulată, un traumatism facial și o sincopă). Două dintre aceste evenimente adverse serioase (traumatismul facial și sincopa) au fost suspectate de către investigator ca fiind legate de tratament. În grupul cu placebo, la 9 pacienți au fost raportate alte evenimente adverse serioase non-fatale. Majoritatea evenimentelor adverse au fost probleme gastrointestinale, neurologice sau psihiatrice (Tabelul 3). Cele mai frecvente reacții adverse au constat în greață, vărsături, amețeli, insomnie, diaree și anorexie. Incidentele raportate pentru greață, vărsături și anorexie au fost superioare la grupul tratat cu rivastigmină comparativ cu lotul tratat cu placebo (Tabelul 3).

Nu au fost înregistrate, pe parcursul studiului, modificări clinic semnificative ale tensiunii arteriale medii sistolice și diastolice sau ale pulsului. În fiecare grup a existat un deces prin infarct miocardic. În săp-

tămâna 26, doi pacienți (1,8%) ce au primit rivastigmină și doi (1,8%) pacienți din grupul placebo aveau anomalii EKG semnificative clinic. Totuși, anomalia semnificativă clinic era deja prezentă la momentul inițial la unul dintre pacienții din grupul rivastigmină. În plus, incidența apariției unor noi anomalii semnificative clinic ale testelor de laborator la sfârșitul studiului a fost scăzută la ambele grupuri de tratament. Patru (4,1%) din grupul rivastigmină au prezentat hiperglicemie, comparativ cu cinci (4,8%) în grupul placebo. Hematocrit scăzut anormal a fost observat la doi (1,9%) pacienți care au primit rivastigmină, comparativ cu cinci (4,7%) pacienți care au primit placebo. Creșteri anormale ale testelor funcționale hepatice (AST) au fost observate doar la un singur (0,9%) pacient din grupul rivastigmină.

Discuții

Studiul nostru a fost un studiu pilot prospectiv mic, deși bine controlat, în care doze recomandate de rivastigmină (6-12 mg/zi) au realizat ameliorare cognitivă și globală semnificativă comparativ cu placebo la pacienți cu boală Alzheimer moderat severă sau severă. Rivastigmina a avut un efect stabilizator, pacienții tratați prezentând un declin cognitiv semnificativ mai redus față de momentul inițial pentru o perioadă de tratament de 26 de săptămâni, comparativ cu cei care au primit

placebo. Stadializarea bolii, evaluată prin GDS, a fost relativ stabilă pe parcursul studiului. Aceste descoperiri susțin utilizarea IChE la pacienții cu BA avansată. Deși la pacienții care au primit rivastigmină s-a observat de asemenea o ameliorare a simptomelor comportamentale după 26 de săptămâni, în timp ce simptomatologia comportamentală a celor care au primit placebo s-a agravat, aceste diferențe nu au fost semnificative statistic în acest studiu pilot mic, „care simulează contextul clinic”. Similar, deși la pacienții care au primit rivastigmină s-a observat o afectare mai redusă a AC în comparație cu cei care au primit placebo, această diferență nu a fost semnificativă statistic în acest mic studiu pilot.

Descoperirile actuale sunt în concordanță cu informațiile desprinse din studii de caz, analize post-hoc și studii clinice controlate, ce susțin eficacitatea asupra funcției cognitive a IChE la pacienții cu BA moderat-severă și severă²⁹⁻³³. Într-o analiză post-hoc, date de eficacitate pentru galantamină referitoare la un subset de BA „moderat avansată” au fost derivate din două studii de durată și comparate cu placebo la pacienți similari dintr-un studiu diferit. În total, 51% dintre pacienții care au primit galantamină și-au menținut sau ameliorat performanța cognitivă pentru perioada de tratament de 52 de săptămâni comparativ cu doar 13% în grupul placebo (originar din alt studiu)³². Donepezil s-a dovedit de asemenea eficient în ceea ce privește performanța cognitivă în studii clinice pe pacienți cu BA non-instituționalizați cu simptome moderate sau moderat-severe (scor MMSE ³⁵⁻¹²), chiar dacă nu la pacienți din instituții de îngrijire³⁰.

Eficiența IChE, inclusiv rivastigmină, asupra simptomelor comportamentale, a fost demonstrată în mai multe studii clinice la pacienți cu BA mai severă^{20,33}. Similar, IChE inclusiv rivastigmină s-au dovedit benefice asupra AC în mai multe studii privind BA³⁴. În micul nostru studiu pilot ameliorarea simptomelor comporta-

mentale și reducerea disfuncțiilor în domeniul AC pentru rivastigmină față de placebo, deși fără semnificație statistică, concordă cu aceste observații publicate anterior. Totuși, descoperirile ne semnificative statistice ale acestui studiu „care simulează contextul clinic”, pentru a obține semnificație statistică, necesită eșantioane mai mari și reguli mai restrictive asupra utilizării și schimbării medicației concomitente. De exemplu, proporția mai mare de pacienți cu BA din grupul rivastigmină ce primeau concomitent anti-depresive și/sau hipnotice la momentul inițial, ce a fost aproximativ dublă față de grupul placebo, poate să fi afectat rezultatele NPI-10.

Acest studiu a fost efectuat pe un lot populațional din Spania. Am realizat recent un studiu epidemiologic pe o cohortă cu vârsta de cel puțin 75 de ani (n = 1990), ce a arătat că ratele incidenței la 1000 de persoane cu risc au fost de 23,2 (95% CI = 19,1-27,3) pentru demență și, respectiv, de 10,8 (95% CI = 7,8-13,7) pentru BA.³⁵ Aceste rate ale incidenței reprezintă o povară considerabilă asupra sistemului sanitar spaniol, deși asigurarea unui tratament eficient ar putea avea potențialul de a reduce multe costuri indirecte ale acestei boli. În particular, într-un studiu separat, am arătat că prețul per pacient per lună crește dramatic cu severitatea bolii: 419,3 Euro pentru pacienții cu scoruri MMSE peste 19, 641,9 Euro pentru cei cu scoruri între 11 și 19 și 1150,6 Euro pentru cei cu scoruri mai mici de 11³⁶. Pacienții incluși în studiul de față aveau scoruri mai mici de 12, și, ca urmare, se încadrau în cea mai costisitoare categorie de pacienți. Tratamentul eficient al acestor pacienți ar putea avea beneficii sociale considerabile, și justifică cercetări aprofundate.

Este important de notat că multe dintre studiile și analizele ce evaluează eficacitatea IChE la pacienți cu BA mai severă au fost realizate pe subiecți non-instituționalizați, și pot, ca urmare, să nu reflecte populația din instituțiile de îngrijire în

general. Totuși, există anumite date preliminare din studii deschise ce sugerează că rivastigmina ameliorează simptomele cognitive și comportamentale la pacienții instituționalizați cu BA moderat-severă^{37,38}, inclusiv asocierea unei reduceri a utilizării medicamentelor psihotropice³⁹. Totuși, vor fi necesare studii dublu-orb pentru a confirma eficacitatea IChE, precum rivastigmina la pacienții instituționalizați cu BA mai severă.

La pacienții cu BA mai severă, eficacitatea rivastigminei observată în studiile disponibile ar putea fi legată de capacitatea sa de a inhiba BuChE, în afara AChE, precum și selectivității sale pentru ariile cerebrale (cum sunt hipocampusul și cortexul) în care deficitul colinergic sunt mai pronunțate în BA^{40,41}. Aceste regiuni unde patologia asociată BA este mai avansată sunt totodată zonele cu cea mai importantă creștere a activității BuChE (>100 de depozite de Aβ per mm³ de creier). Mai mult, pacienții cu BA severă ar putea avea un potențial mai mare de ameliorare sub tratament cu IChE pe baza faptului că au un deficit colinergic mai mare decât pacienții cu simptome mai ușoare⁴². Totuși, rolul BuChE în etiologia BA și implicarea sa în eficacitatea rivastigminei rămân de clarificat.

În actualul studiu pilot, prospectiv, placebo controlat, de mică amploare, rivastigmina a fost relativ bine tolerată de pacienții cu BA moderat-severă sau severă, reacțiile gastrointestinale fiind cel mai frecvent raportate evenimente adverse. Incidența retragerii secundare evenimentelor adverse în cazul pacienților tratați cu rivastigmină a fost aproximativ dublă față de grupul placebo. Evenimentele adverse gastrointestinale sunt frecvente la cei tratați cu IChE și sunt în mare parte raportate în timpul fazei de creștere a dozelor, în special în studii cu titrare rapidă forțată. Studiul pilot actual, asemenea majorității studiilor clinice cu rivastigmină și practicii clinice de rutină, a folosit un program lent de creștere a dozelor, flexibil, cu

un interval de minim 4 săptămâni între creșterile de doze, condusă ce a arătat că reduce marcat incidența evenimentelor gastrointestinale precum greața și vărsăturile⁴³. Se explică astfel rata scăzută de abandon din cauza evenimentelor adverse (9,2%) și incidențele scăzute, globale și individuale ale evenimentelor adverse GI asociate cu rivastigmina observate în acest studiu (Tabelele 1 și 3).

Burns și colab.²⁰ au raportat anterior că frecvența și tipul evenimentelor adverse sunt similare la pacienții cu BA moderat-severă și la cei cu simptome ușoare. Burns și colab.²⁰ au descoperit de asemenea că riscul relativ de retragere din cauza evenimentelor adverse calculat pentru pacienții cu BA moderat-severă ce primesc rivastigmină față de cei care primesc placebo (2,0 [95% CI: 0,9-4,6]) a fost mai mic decât cel al pacienților cu BA ușoară (3,6 [95% CI: 2,4-5,4; pentru pacienți cu scoruri MMSE 22-26]). Aceasta sugerează că riscul relativ de retragere este legat de nivelul inițial al tulburii cognitive și că nu există probleme suplimentare de tolerabilitate asociate tratamentului cu rivastigmină în cazul pacienților cu BA mai severă comparativ cu cei cu stadii mai precoce de BA.

Recomandările NICE nu susțin utilizarea IChE la pacienții cu scoruri MMSE sub 12. Totuși, observațiile actuale și cele ale altor studii clinice susțin eficacitatea rivastigminei și a altor IChE²⁹⁻³³ la pacienții cu BA mai severă, sugerând că o limită arbitrară de 12 puncte pe scala MMSE ar putea să nu fie un motiv potrivit pentru a respinge tratamentul pacienților cu IChE. Actualul studiu prospectiv placebo-controlat evaluează pacienți cu valori MMSE chiar și de 5. În consecință, cum limita actuală NICE de 12 ar putea împiedica pacienții cu simptome mai severe să beneficieze de terapia cu IChE, vor fi necesare mai multe studii controlate pentru a determina cea mai potrivită limită inferioară de eligibilitate pentru introducerea tratamentului cu IChE.

Rezultatele acestui studiu pilot mic, dar bine controlat, sugerează că pacienții cu BA moderat-severă sau severă ce primesc tratament cu rivastigmină obțin beneficii semnificative față de placebo, conform indicatorilor prognostici clasici pentru funcția cognitivă și globală folosiți în BA. Rivastigmina a avut un efect stabilizator întârziind deteriorarea stării cognitive la pacienții cu BA mai severă comparativ cu administrarea de placebo. Tendința statistic nesemnificativă de ameliorare a simptomelor comportamentale și de reducere a disfuncției în domeniul AC pentru rivastigmină comparativ cu placebo subliniază nevoia ca viitoarele studii privind BA, „care simulează contextul clinic” să fie mai ample și cu putere statistică maximă.

Lista investigatorilor principali ai acestui studiu:

L. Agüera (Madrid); M. Aguilar (Barcelona); E. Balaguer (Barcelona); M. Berthier (Málaga); R. Blesa (Barcelona); M. Boada (Barcelona); M. Franco (Zamora); A. Frank (Madrid); P. Gil (Madrid); L.M. Iriarte (Sevilla); J.M. Lainez (Valencia); S. López-Pousa (Girona) Lead investigator; R. Mateos (La Coruña); J. Matías-Guiu (Alicante); E. Muñoz (Tarragona); J. Peña (Barcelona); R. Reñé (Barcelona); A. Robles (La Coruña); I. Sánchez (Toledo); C. Sevilla (Madrid); J. Vilchez (Valencia).

Bibliografie

1. Toda N., Okamura T., The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels. *Pharmacol Rev* 2003; 55:271–324.
2. Grutzendler J., Morris J.C., Cholinesterase inhibitors for AD. *Drugs* 2001; 61:41–52.
3. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 2003; 28:515–22.
4. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 1976; 2:1403.
5. Bartus R.T., Dean R.L. 3rd, Beer B., Lippa A.S., The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 1982; 217:408–14.
6. Shinotoh H., Namba H., Fukushi K., Nagatsuka S., Tanaka A., Ota T., Tanada S., Irie T., Progressive loss of cortical acetylcholinesterase activity in association with cognitive

decline in Alzheimer's disease: a positron emission tomography study. *Ann Neurol* 2000; 48:194–200.

7. Mesulam M.M., Butyrylcholinesterase in the normal and Alzheimer brain. In: Giacobini E (ed) *Butyrylcholinesterase. Its function and inhibitors*. London: Martin Dunitz, 2003.
8. Perry E.K., Perry R.H., Blessed G., Tomlinson B.E., Changes in brain cholinesterase in senile dementia of Alzheimer's type. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 1978; 4:273–77.
9. Atack J.R., Perry E.K., Bonham J.R., Candy J.M., Perry R.H., Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development—a study of molecular forms. *Neurochemistry International* 1986; 21:381–96.
10. Wright C.I., Geula C., Mesulam M.M., Neurological cholinesterases in the normal brain and in Alzheimer's disease: Relationship to plaques, tangles and patterns on selective vulnerability. *Ann Neurol* 1993; 34:373–84.
11. Rao T.S., Lariosa-Willingham K.D., Yu N., Glutamate-dependent glutamine, aspartate, and serine release from rat cortical glial cell cultures. *Brain Res* 2003; 978:213–22.
12. Butyrylcholinesterase and progression of cognitive deficits in dementia with Lewy bodies. *Neurology* 2003; 60:1852–53.
13. O'Brien K.K., Saxby B.K., Ballard G.G., Grace J., Harrington F., Ford G.A., O'Brien J.T., Swan A.G., Fairbairn A.F., Wesnes K., del Ser T., Edwardson J.A., Morris C.M., McKeith I.G., Regulation of attention and response to therapy in dementia by butyrylcholinesterase. *Pharmacogenetics* 2003; 13:231–9.
14. Doody R.S., Stevens J.C., Beck C., Dubinsky R.M., Kaye J.A., Gwyther L., Mohs R.C., Thal L.J., Whitehouse P.J., DeKosky S.T., Cummings J.L., Practice parameter: management of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2001; 56:1154–66.
15. Bryant J., Clegg A., Nicholson T., McIntyre L., de Broe S., Gerard K., Waugh N., Clinical and cost-effectiveness of donepezil, rivastigmine and galantamine for Alzheimer's disease: a rapid and systematic review. *Health Technol Assess* 2001; 5:1–137.
16. The new cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, Part 1: their similarities are different. *J Clin Psychiatry* 2000; 61:710–11.
17. Corey-Bloom J., Anand R., Veach J., A randomized trial evaluating the efficacy and safety of ENA 713 (rivastigmine tartrate), a new acetylcholinesterase inhibitor, in patients with mild to moderately severe Alzheimer's disease. *Int J Ger Psychopharmacol* 1998; 1:55–65.
18. Schneider L., Anand R., Farlow M., Systematic review of the efficacy of rivastigmine for patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychopharmacol* 1998; 1:S26–34.
19. Rösler M., Anand R., Cicin-Sain A., Gauthier S., Agid Y., Dal-Bianco P., Stahelin H.B., Hartman R., Gharabawi M., Efficacy and safety of rivastigmine in patients with AD: international randomised controlled trial. *BMJ* 1999; 318:633–38.

20. Burns A., Spiegel R., Quarg P., Efficacy of rivastigmine in subjects with moderately severe Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 2004; 19:243–49.

21. Hachinski V.C., Iliff L.D., Zilhka E., DuBoulay G.H., McAllister V.L., Marshall J., Russell R.W., Symon L., Cerebral blood flow in dementia. *Arch Neurol* 1975; 32:632–7.
22. Panisset M., Roudier M., Saxton J., et al., Severe impairment battery. A neurological test for severely demented patients. *Arch Neurol* 1994; 51:41–5.
23. Cummings J.L., Mega M., Gray K., Rosenberg-Thompson S., Carusi D.A., Gornbein J., The neuropsychiatric inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia. *Neurology* 1994; 44:2308–14.
24. Folstein M.F., Folstein S.E., McHugh P.R., 'Mini-Mental State': a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatric Res* 1975; 12:189–98.
25. Dahlke F., Lohaus A., Gutzmann H., Reliability and clinical concepts underlying global judgments in dementia: implications for clinical research. *Psychopharmacol Bull* 1992; 28:425–32.
26. Reisberg B., Ferris S.H., de Leon M.J., Crook T., The global deterioration scale for assessment of primary degenerative dementia. *Am J Psychiatry* 1982; 139:1136–1139.
27. Blessed G., Tomlinson B.E., Roth M., The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br J Psychiatry* 1968; 114:797–811.
28. Galasko D., Bennett D., Sano M., Ernesto C., Thomas R., Grundman M., Ferris S., An inventory to assess activities of daily living for clinical trials in Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1997; 11(Suppl 2): 533–9.
29. Kurz A., Farlow M., Quarg P., Spiegel R., Disease stage in Alzheimer's disease and treatment effects of rivastigmine. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2004; 18:123–8.
30. Donepezil use for advanced Alzheimer's disease—a case study from a long-term care facility. *J Am Med Dir Assoc* 2003; 4:216–9.
31. Doraiswamy P.M., Krishnan K.R., Anand R., Sohn H., Danyluk J., Hartman R.D., Veach J., Long-term effects of rivastigmine in moderately severe Alzheimer's disease: does early initiation of therapy offer sustained benefits? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002; 26(4):705–12.
32. Blesa R., Davidson M., Kurz R.A., Reichman W., van Baelen B., Schwalen S., Galantamine provides sustained benefits in patients with 'advanced moderate' Alzheimer's disease for at least 12 months. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2003; 15:79–87.
33. Gauthier S., Feldman H., Hecker J., Vellas B., Ames D., Subbiah P., Whalen E., Emir B. 2002. Efficacy of donepezil on behavioral symptoms in patients with moderate to severe Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr* 14:389–404.
34. Potkin S.G., The ABC of Alzheimer's disease: ADL and improving day-to-day functioning of patients. *Int Psychogeriatr* 2002; 14 (Suppl 1):7–26.

35. Lopez-Pousa S., Vilalta-Franch J., Llinas-Regla J., Garre-Olmo J., Roman G.C., Incidence of dementia in a rural community in Spain: the Girona cohort study. *Neuroepidemiology* 2004; 23:170–7.
36. Lopez-Pousa S., Garre-Olmo J., Turon-Estrada A., Hernandez F., Exposito L., Lozano-Gallego M., Hernandez-Ferrandiz M., Gelada-Battle E., Pericot-Nierga I., Vilalta-Franch J., Cost relation between severity of Alzheimer's disease and cognitive and functional impairment. *Med Clin (Barc)* 2004; 122:767–72 (In Spanish).
37. Cummings J., Anand R., Koumaras B., Hartman R., Rivastigmine provides behaviour-

al benefits to AD patients residing in a nursing home: findings from a 26-week trial. *Neurology* 2000; 54:A468.

38. Bullock R., Moulias R., Steinwachs K-C., Cicin-Sain A., Spiegel R., Effects of rivastigmine treatment on behavioural symptoms in nursing home patients with Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr* 2001; 13:242S.
39. Farlow M.R., Update on rivastigmine. *Neurologist* 2003; 9:230–4.
40. Enz A., Amstutz R., Boddeke H., Gmelin G., Malanowski J., Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for AD. *Prog Brain Res* 1993; 98:431–38.

41. Arendt T., Bruckner M., Lange M., Bigl V., Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development: a study of molecular forms. *Neurochem Int* 1992; 21:381–96.
42. Davis K.L., Mohs R.C., Marin D., Purohit D.P., Perl D.P., Lantz M., Austin G., Haroutunian V., Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer disease. *JAMA* 1999; 281:1401–06.
43. Inglis F., The tolerability and safety of cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia. *Int J Clin Pract* 2002; 127:45–63

Activitatea complexului enzimatic II-III al lanțului transportor de electroni este scăzută în mușchiul striat al pacienților cu boala Alzheimer

Rolf Wibom, PhD¹, Tor Ansved, MD, PhD², Ulla Hamberg, MD³, Mari Blomberg MD⁴, Kristian Borg, MD, PhD⁵, Hans Basun, MD, PhD⁶, Ulrica von Döbeln, MD, PhD¹, Anita Garlind MD, PhD^{4#}

¹Department of Laboratory Medicine, Karolinska Institute, Karolinska University Hospital (Huddinge), S-141 86 Stockholm, Sweden.

²Department of Clinical Neuroscience, Division of Neurology & Division of Clinical Neurophysiology, Karolinska Institute, Karolinska University Hospital, S-171 76 Stockholm, Sweden.

³Department of Psychiatry, Växjö Hospital, Box 1223, S-351 12 Växjö, Sweden.

⁴Neurotec Department, Division of Clinical Geriatrics, Karolinska Institute, Karolinska University Hospital (Huddinge), S-141 86 Huddinge, Sweden.

⁵Department of Clinical Neuroscience, Division of Neurology, Karolinska Institute, Karolinska University Hospital (Solna), S-171 76 Stockholm, Sweden.

⁶Department of Public Health/Geriatrics, Uppsala University Hospital, Box 609, S-751 25 Uppsala, Sweden

Rezumat

Un număr din ce în ce mai mare de studii indică implicarea unei disfuncții mitocondriale în patogeneza bolii Alzheimer (BA). Mitocondriile conțin un lanț transportor de electroni format din patru complexe enzimatice diferite: complexul I, II, III și IV. În studiul de față au fost efectuate cercetări biochimice asupra activității complexelor I+II, II+III și IV, corelate cu activitatea markerului enzimatic mitocondrial citrat sintetază (CS), în paralel cu studii morfologice mitocondriale și histochimice asupra unor eșantioane de țesut muscular striat provenite de la 10 pacienți cu BA și 9 subiecți martor. Modificările neurogenice au fost prezente atât pe biopsiile pacienților cu BA cât și la martori, ca rezultat al unui proces de denervare-reinervare legat de vârstă, ce părea ușor mai pronunțat în grupul BA. Nu au putut fi observate diferențe intergrup convingătoare utilizând colorațiile histochimice enzimatice mitocondriale. În contrast, cu ocazia studiilor biochimice, am descoperit că activitatea complexului II+III a fost scăzută în mușchiul scheletic al subiecților cu BA comparativ cu martorii (0,49±0,03 unități/unitate CS [media±SEM] față de 0,59±0,03 unități/unitate CS, p<0,05). Nu au existat diferențe semnificative în activitatea complexelor I+III sau IV. Aceste rezultate indică o afectare mitocondrială în mușchiul scheletic din BA și subliniază că BA nu este o afecțiune strict limitată la creier.

Cuvinte cheie: lanț transportor de electroni, mitocondrie, mușchi scheletic, boala Alzheimer, succinat-citocrom c reductază.

Introducere

Degenerescenta mitocondrială este o componentă importantă a neuropatologiei din boala Alzheimer (BA)^{6,19,22,24,35,50,59} ce survine precoce în evoluția bolii, anterior formării neurofibrilelor²¹. Disfuncția mitocondrială poate avea ca rezultat creșterea producției de radicali liberi, afectarea homeostaziei calciului

intracelular și creșterea vulnerabilității la excitotoxine^{31,39}, toate aceste mecanisme fiind implicate în patogeneza BA^{36,46,52}.

Mitocondria este principala sursă de energie celulară și conține lanțul transportor de electroni implicat în fosforilarea oxidativă. Lanțul transportor de electroni este localizat pe membrana mitocondrială internă și

cuprinde patru complexe enzimatice diferite: Complexul I (NADH: ubiquinonă oxidoreductaza), complexul II (succinat: ubiquinonă oxidoreductaza), complexul III (ubiquinol: citocrom c reductaza) și complexul IV (citocrom c oxidaza, COX). Aceste complexe, împreună cu un al cincilea complex enzimatic (complexul V [ATP-sintetaza]) sunt toate

#Adresa pentru corespondență: Anita Garlind MD, PhD, Neurotec Department, Division of Clinical Geriatrics, Karolinska Institute, Karolinska University Hospital (Huddinge), S-141 86 Stockholm, Sweden.
Tel.: +46 8 686 51 00, +46 70 30 31 107; Fax: +46 8 686 5645,
E-mail: Anita.Garlind@neurotec.ki.se

implicate în fosforilarea oxidativă celulară, adică transferul electronilor la oxigen cuplat cu sinteza ATP.

Au fost raportate disfuncții ale lanțului mitocondrial transportor de electroni, modificările complexului IV fiind găsite cel mai constant. Astfel, s-a observat scăderea activității COX și a nivelurilor ARNm pentru subunitățile COX encodate mitocondrial, precum și modificări ale comportamentului cinetic și concentrațiilor COX^{8-9,12,25,33,38,51}. În țesuturile periferice s-a descoperit o scădere a activității COX pe culturi de fibroblaști provenite de la pacienți cu BA sporadică¹⁶ și plachete^{9,42-43}. Pentru liniile celulare la care ADN-ul mitocondrial endogen a fost extras și înlocuit cu ADN mitocondrial plachetar de la pacienți cu boală Alzheimer, realizând astfel un model celular al bolii prin așa numiții „hibridi celulari”²⁸, activitatea COX a fost redusă semnificativ⁵⁴. Disfuncții ale complexelor II+III și I au fost de asemenea raportate, activități scăzute fiind observate pe preparate mitocondriale din cortexul temporal²⁰ și cel occipital al indivizilor cu BA³⁸, precum și o scădere a subunităților FeS din complexul III în hipocamp⁸.

O scădere a expresiei genice a ND4, o subunitate a complexului I, encodat prin ADN mitocondrial, a fost raportată în cortexul temporal al bolnavilor de BA¹⁸.

Mai mult, funcțiile mitocondriale ar putea fi afectate de prezența peptidului amiloid β ($A\beta$)^{1,11,44-45,49}. $A\beta$ este un fragment proteolitic rezultat din proteina precursoră a amiloidului β (β APP) și se acumulează anormal în cortexul cerebral și pereții vaselor sanguine din creierul afectat de BA. $A\beta$ a fost de asemenea identificat în fibrele musculare în *miozita cu incluzii citoplasmice* (MIC)³ și, recent, în mușchiul temporal în BA, găsindu-se concentrații ridicate ale peptidelor amiloidogenetice $A\beta$ 1-40 și $A\beta$ 1-42 comparativ cu țesutul muscular al martorilor²⁷. Deși semnele și simptomele clinice sunt diferite, a fost sugerat că BA și MIC au aceleași mecanisme patogenice⁴, ambele fiind afecțiuni lent progresive

legate de vârstă, cu o asemănare remarcabilă a fenotipurilor moleculare, incluzând acumularea de $A\beta$ și proteină tau fosforilată, inflamația și semnele de disfuncție mitocondrială și stres oxidativ, deși în organe diferite³. Creierul și mușchiul scheletic sunt țesuturi ce depind puternic de metabolismul oxidativ normal și funcționarea mitocondrii, și sunt singurele țesuturi umane afectate de acumularea de $A\beta$.

Ținând cont de aceste observații și căutând un posibil marker pentru BA, am cercetat funcția mitocondrială în țesutul muscular scheletic al pacienților cu BA studiind activitatea complexelor mitocondriale I+III, II+III și IV în paralel cu evaluarea caracteristicilor morfologice și histologice ale mitocondriilor în țesutul muscular striat al pacienților cu BA.

Materiale și metodă

Materiale

Toți reactivii au fost obținuți de la *Sigma Chemical Co.*, St Louis, Mo, USA.

Selectia subiecților și prelevarea mostrelor tisulare

După aprobarea Comisiei locale de Etică și obținerea acordului informat de la subiecții martor și pacienți sau rudele acestora, au fost prelevate percutanat 50-100 mg țesut muscular din mușchiul tibial anterior, utilizând tehnica de biopsie percutană Radner⁴⁷ de la 10 pacienți cu BA (8 femei și 2 bărbați, vârsta medie \pm DS 81 \pm 1,6 ani, limite 70-86) și 9 subiecți martor (2 femei și 7 bărbați, vârsta medie \pm DS 75 \pm 1,7 ani, limite 68-82). Toți pacienții aveau un diagnostic clinic de boală Alzheimer probabilă conform NINCDS/ADRDA³⁴.

Persoanele martor fără antecedente heredo-colaterale de demență au fost evaluate prin investigații complexe incluzând RMN, SPECT, EEG și teste neuropsihologice și de laborator, fără să se descopere antecedente sau semne și simptome ale unor afecțiuni neurologice sau psihiatrice.

Subiecții ce prezentau infecții, consum excesiv de alcool, diabet, boli renale sau musculare sau orice altă afecțiune gravă au fost excluși. Toți subiecții aveau o stare de sănătate somatică bună, iar nivelul de activitate fizică a fost estimat ca fiind egal între cele două grupuri.

Analizele histochemice și morfologice

Tehnica biopsiei musculare

Materialul biptic necesar examinării la microscopul optic, incluzând analize morfologice și histochemice, a fost înghețat rapid în freon-22, răcit cu azot lichid (-190 °C) și apoi depozitat în congelator la -75°C până la procesarea ulterioară. Secțiuni de 10-15 μ m au fost tăiate la criostat la -20°C și colorate cu hematoxilină-eozină, tehnica tricrom Gomori modificată¹⁷, dar și cu tehnici speciale pentru miozin-adenozin-trifosfatază (miozin-ATPază)^{10,40}, NADH-TR⁴⁸, COX, succinat dehidrogenază (SDH) și pentru evidențierea conținutului de lipide (ulei roșu O, negru de Sudan) și glicogen (PAS).

Nomenclatura fibrelor musculare a avut la bază colorabilitatea pentru miozin-ATPază. Astfel, fibrele cu conținut ridicat de miozin-ATPază stabilă în mediu acid și conținut redus de miozin-ATPază stabilă în mediu alcalin au fost denumite „tip I”, în timp ce fibrele cu caracteristici de colorabilitate inverse au fost denumite „tip II”¹⁰. Au fost clasificate toate fibrele dintr-o secțiune transversală din fragmentul de țesut muscular, estimându-se numărul total din fiecare tip.

Evaluarea morfologică a fost efectuată de doi specialiști în miologie (TA și KB), conform procedurilor de rutină, fără a cunoaște proveniența eșantioanelor.

Analizele biochimice

Mitocondriile au fost izolate din țesut muscular proaspăt utilizând tehnici și proceduri deja descrise⁵⁸. Activitatea enzimelor mitocondriale a fost determinată spectrofotometric la

25°C. O fracțiune din mitocondriile izolate a fost înghețată-dezghetată în mediu hipoton⁵, și activitatea NADH-citocrom c reductazei (NCR) și a succinat-citocrom c reductazei (SCR) au fost determinate conform tehnicilor lui Sottocasa și colab.⁵³ și respectiv Cooperstein și colab.¹⁴ Pentru determinarea activității COCS, izolatele mitocondriale au fost înghețate-dezghetate o dată, apoi tratate cu digitoxină 2 mg/ml imediat înainte de determinarea COX¹⁵.

Activitatea citrat sintetazei (CS) a fost determinat (a) pe mușchi total după omogenizare în mediu cu Triton X 100 0,05%, K₂HPO₄ 50 mmol/l și (b) pe mitocondrii izolate permeabilizate în același mediu².

Toate activitățile enzimice (cu excepția activității CS în mușchiul total) au fost exprimate ca mmol /min/ml de suspensie mitocondrială.

Datele au fost analizate folosind testul U Mann-Whitney. Analiza regresivă a fost folosită pentru a cerceta posibile corelații între vârstă și activitatea enzimatică.

Rezultate

La 9 dintre pacienții cu BA și 8 dintre martori au fost realizate analizele morfologice și histochemice enzimice descrise (Tabelul 1). În grupul Alzheimer, biopsiile musculare au prezentat o ușoară variație a dimensiunilor fibrelor la 7 pacienți și variație moderată la 2 pacienți. Trei dintre biopsiile musculare conțineau nuclei centrali. Fibre musculare atrofice, fie izolate, fie în grupuri, au fost observate la 8 pacienți (Figura 1), iar grupare în funcție de tip (definită ca apariția de grupuri formate atât din fibre de tip I cât și de tip II, în care fibrele de un tip histochemic sunt înconjurate doar de fibre de același tip) s-a observat la 5 pacienți.

La toți pacienții s-a remarcat o predominanță a fibrelor musculare de tip I. Colorația NADH-TR a fost normală cu excepția a doar 2 biopsii, în care unele fibre musculare aveau un aspect „mâncat de molii”, ca

semn al modificărilor structurale din interiorul fibrelor. Două biopsii au conținut rare fibre roșii neregulate, observate prin colorația tricrom Gomori și cea pentru SDH. Specimenele colorate COX au avut aspect normal cu excepția unui pacient la care s-a observat o pierdere de colorație la nivelul câtor-

definită mai sus, a fost observată pe 2 eșantioane musculare. Pentru toate biopsiile martor s-a remarcat o predominanță a fibrelor de tip I. Colorațiile pentru NADH-TR și pentru lipide și glicogen au fost normale la toți martorii. La unul dintre martori au fost observate puține fibre COX negative și fibre roșii neregulate.

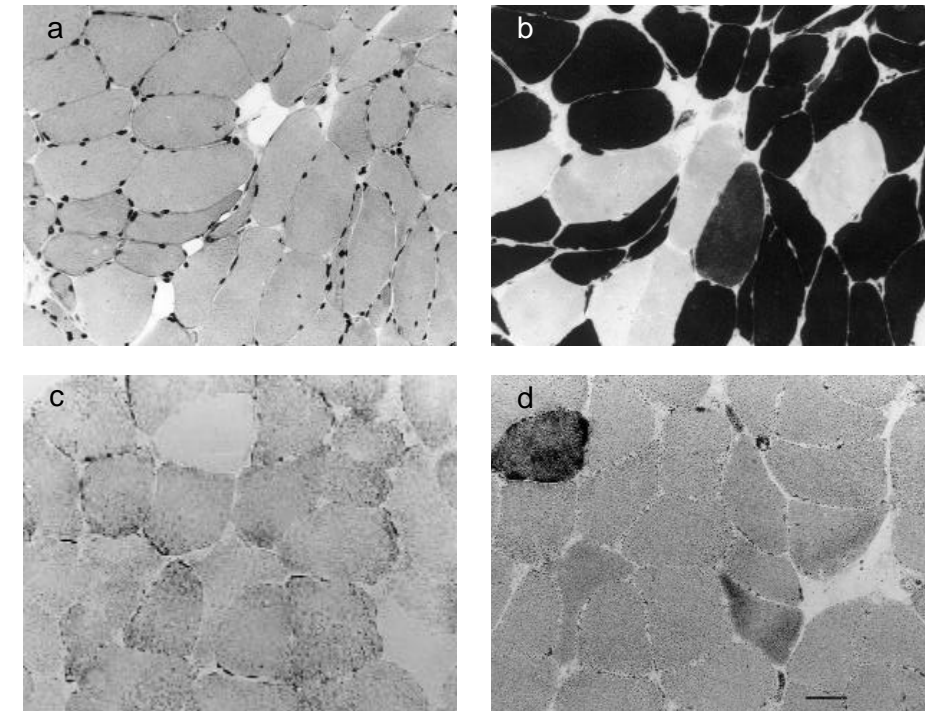


Figura 1. Biopsie musculară din m. tibial anterior de la un pacient cu boală Alzheimer. Secțiunile au fost colorate cu hematoxilină-eozină (a), pentru ATPază miofibrilară după preincubare la pH 4,6 (b), și pentru COX (c) și SDH (d). În (a) și (b) există mici grupuri de fibre atrofice angulate de același tip histochemic (tip I). În (c), se observă două fibre cu absența colorației pentru COX. Aceste fibre corespund fibrelor cu colorație crescută pentru SDH (d). Bara de scală = 0,05 μ m.

va fibre musculare, ce a corespuns cu creșterea intensității colorației SDH (Figura 1). Intensitate crescută a colorației SDH a fost de asemenea observată pentru câteva fibre musculare izolate în biopsiile tuturor pacienților, cu excepția unuia. Nu au fost modificări la colorațiile pentru lipide sau glicogen în nici una dintre biopsiile musculare.

La martori, o variație ușoară a dimensiunilor fibrelor musculare a fost observată în 5 cazuri, nuclei centrali în 2 cazuri și fibre atrofice izolate sau în grupuri, pe 3 biopsii. Gruparea pe tipuri, după cum a fost

Colorația SDH a avut intensitate crescută pentru fibre musculare izolate la patru dintre martori.

Figura 2 prezintă activitatea enzimelor lanțului respirator pe unitate de activitate CS în suspensie de mitocondrii izolate. O scădere semnificativă a activității complexului II+III a fost observată la pacienții cu BA (n=10), cu o reducere medie de 21,1% comparativ cu martorii (n=9). Activitatea SCR a fost de 0,48 \pm 0,03 (media \pm DS) și respectiv 0,59 \pm 0,03 unități/unități CS, $p < 0,05$ (Figura 2). Considerând o valoare-prag de 0,58 sau mai puțin, sensibilitatea este

90% (9/10), specificitatea 77,8% (7/9) iar valoarea predictivă pozitivă 81,8%.

Nu au fost diferențe semnificative între cele două grupuri în ceea ce privește activitatea enzimatică a complexelor I+III (NCR: $0,56 \pm 0,06$ și, respectiv, $0,57 \pm 0,03$ unități/unități CS, la pacienții cu BA și martori) și IV (COX: $1,42 \pm 0,10$ și, respectiv, $1,65 \pm 0,07$ unități/unități CS) sau activitatea enzimatică corelată 2 câte 2 (Figura 2).

Activitatea enzimei matricei mitocondriale citrat sintetază a fost de asemenea determinată pe mușchi total, fără a se descoperi diferențe semnificative între pacienții cu BA și martori ($17,7 \pm 1,5$ mmol/min/kg de țesut muscular și, respectiv, $16,8 \pm 1,1$ mmol/min/kg țesut muscular).

Deși pacienții cu BA și martorii aveau vârste similare, analiza statistică a arătat o diferență de vârstă semnificativă între cele două grupuri ($p < 0,05$). Totuși, aceasta nu a fost considerată o limitare a acestui studiu, deoarece analiza regresivă

pentru activitatea pe unitate de citrat sintetază pentru enzimele NCR, SCR și COX față de vârstă, la pacienții cu BA sau martori, separat sau împreună, nu a evidențiat un efect semnificativ al vârstei asupra acestor loturi ($p > 0,13$). Același lucru este valabil și pentru activitatea citrat sintetazei în mușchi total sau în suspensia mitocondrială ($p > 0,11$).

Discuții

În acest studiu, am cercetat activitatea complexelor enzimatiche I-IV din lanțul mitocondrial transportor de electroni pe mitocondrii izolate, împreună cu morfologia și histologia mitocondriilor din țesutul muscular al pacienților cu BA comparativ cu martorii. S-a descoperit că activitatea SCR (complexul II+III) este semnificativ redusă în țesutul muscular la cei afectați de BA.

La 6 din cei 9 pacienți cu BA dar și la 4 din 8 martori au fost observate anomalii ale fibre musculare de tip neuropatic. Modificări neuronale

degenerative legate de vârstă precum și scăderea numărului de fibre nervoase mielinizate au fost observate în nervii periferici și rădăcinile spinale la multe specii, inclusiv la om²⁹. Modificări neurogenice similare celor observate în acest studiu sunt deci de așteptat ca parte a unui proces de denervare-reinervare legat de vârstă. Nu am studiat în detaliu dacă gradul modificărilor neurogenice în sistemul nervos periferic la pacienții cu BA diferă față de martorii cu vârste similare. În acest studiu, modificările neurogenice par mai frecvente și mai pronunțate în grupul Alzheimer, dar nu se pot desprinde concluzii clare din aceste evaluări calitative din cauza numărului limitat de pacienți și martori.

A fost raportată o asocierie între îmbătrânire și creșterea numărului de fibre musculare COX-deficiente³⁷, ca și o scădere atât a ratei respiratorii cât și a activității enzimatiche a complexelor I și IV în mușchiul scheletic uman⁵³. Analiza enzimatică histochimică efectuată a evidențiat fibre sporadice cu o creștere a colorației SDH atât la pacienții cu BA (8 din 9) cât și la martori (4 din 8). La prima vedere, această constatare ar fi în acord cu observațiile noastre biochimice ce evidențiază o activitate enzimatică anormală a complexului II+III în grupul Alzheimer. Totuși, încă o dată, observațiile histochimice enzimatiche trebuie interpretate cu reținere din cauza numărului limitat de subiecți și deoarece doar foarte puține fibre din fiecare grup au prezentat colorabilitate anormală. Astfel, nu au putut fi stabilite cu certitudine diferențe intergrup în privința colorabilității SDH.

Fibre cu colorabilitate anormală (negativă) pentru COX s-au găsit doar sporadic și doar la un singur individ din fiecare grup. Această descoperire concordă cu datele noastre biochimice ce nu au evidențiat diferențe semnificative statistice între grupuri pentru activitatea enzimatică a complexului IV.

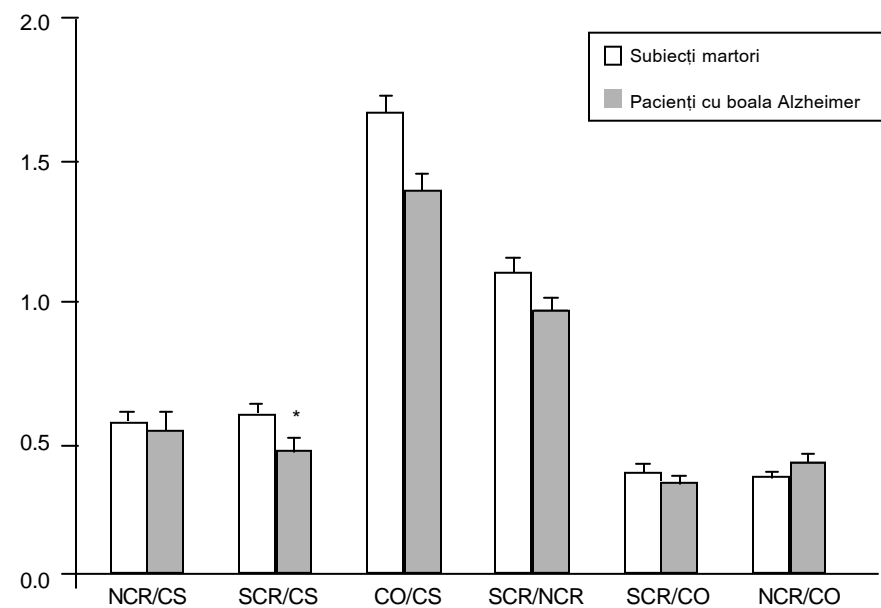


Figura 2. Activitatea enzimatică pe mitocondrii izolate din țesut muscular. Toate activitățile enzimatiche au fost exprimate în mmol/min/l suspensie mitocondrială. Datele sunt media ± DS, n=10 (pacienți cu boală Alzheimer) sau 9 (subiecți martor). * $p < 0,05$, test-U Mann-Whitney.

Tabelul 1. Alterări morfologice la biopsia musculară la pacienți cu boala Alzheimer (n=9) și martori (n=8).

PACIENTI CU BOALĂ ALZHEIMER	Sex	Vârsta	Variație a dimensiunii fibrelor	Atrofie	Hipertrofie	Distribuția tipurilor de fibre	Grupare pe tipuri	Nuclei centrali	Altele	Evaluare globală
2443 (AS-11)	Femeie	86	+	+	0	I > II	nu	0	0	Normal
2442 (MH-17)	Femeie	80	++	+ / ++	0	I > II	da	0	Activitate SDH crescută în 7 fibre; 2 fibre COX-negative	Neuropatie ușoară (+) Semne de disfuncție mit
2444 (HB-20)	Femeie	77	+	+	0	I > II	da	0	Activitate SDH crescută în 7 fibre	Neuropatie ușoară (+) Semne de disfuncție mit
2462 (GA-27)	Femeie	70	+	+	0	I > II	0	0	Activitate SDH crescută în 6 fibre; 1 fibră roșie neregulată în GT; Fibre "mâncate de molii"	Semne de disfuncție mit
2463 (FS-14)	Femeie	83	+	+	0	I > II	0	+	Activitate SDH crescută în 9 fibre	Semne de disfuncție mit
2464 (SH-12)	Femeie	85	++	++	0	I > II	da	0	Activitate SDH crescută în 10 fibre	Neuropatie moderată (++) Semne de disfuncție mit
2559 (AL-13)	Femeie	85	+	++	0	I > II	da	0	Activitate SDH crescută în 1 fibră	Neuropatie moderată (++)
2628 (NS-15)	Bărbat	83	+	+	+	I > II	0	+	Activitate SDH crescută în 6 fibre; 1 fibră roșie neregulată în GT; Fibre "mâncate de molii"	Neuropatie moderată (++) Semne de disfuncție mit
2629 (KE-22)	Bărbat	76	+	0	0	I > II	da	+	Activitate SDH crescută în 1 fibră	Neuropatie ușoară (+)
MARTORI										
2473 (AB-15)	Bărbat	82	+	0	0	I > II	0	0	0	Normal
2474 (SR-29)	Bărbat	68	+	+	0	I = II	0	0	Activitate SDH crescută în 5 fibre; 2 fibre COX-negative; 1 fibră roșie neregulată în GT	Neuropatie ușoară (+) Semne de disfuncție mit
2488 (AA-18)	Bărbat	79	+	+	0	I > II	da	+	Activitate SDH crescută în 7 fibre	Neuropatie ușoară (+) Semne de disfuncție mit
2477 (LG-18)	Bărbat	79	+	0	0	I > II	0	+	Activitate SDH crescută în 1 fibră	Normal
2476 (DO-27)	Bărbat	70	Normal	0	0	I > II	0	0	0	Normal
2479 (AJ-25)	Femeie	72	Normal	0	0	I > II	0	0	0	Normal
2480 (KH-25)	Femeie	72	Normal	0	0	I > II	0	0	0	Normal
2478 (GG-25)	Bărbat	72	+	+	+	I > II	0	0	Activitate SDH crescută în 4 fibre	Neuropatie ușoară (+) Semne de disfuncție mit

SDH = succinat dehidrogenază; COX = citocrom c oxidază; GT = colorație Gomori tricrom modificată, + = ușor, ++ = moderat

Determinările biochimice asupra enzimelor lanțului respirator au fost efectuate într-o suspensie de mitocondrii purificate izolate din țesut muscular proaspăt, iar ulterior au fost raportate la activitatea CS, determinată de asemenea tot în suspensia mitocondrială. Deoarece CS este localizată specific în matricea mitocondrială, am ales această enzimă ca măsură de referință în favoarea conținutului proteic din suspensia mitocondrială ce ar putea conține reziduuri proteice de origine non-mitocondrială. Activitatea CS a fost de asemenea determinată pe țesut muscular proaspăt, fără a se găsi diferențe între pacienții cu BA și martori, așa cum afirmă și alte studii ce au folosit creiere^{9,33,38}, plachete⁹ sau limfocite³⁶. Rezultatele arată că scăderea activității SCR pe unitate de CS la cazurile cu BA observată în acest studiu nu se datorează doar unei pierderi de mitocondrii, ci reflectă o modificare specifică a activității SCR în mușchiul scheletic din BA.

O scădere semnificativă a activității SCR în paralel cu vârsta în țesutul muscular uman a fost raportată de Trouce și colab.⁵⁶, cu toate că noi nu am descoperit nici o corelație. Rezultatele noastre sunt în acord cu alte studii^{7,13}, incluzându-l pe cel condus de Brierley și colab., ce a descoperit o slabă corelare între vârstă și activitatea respiratorie mitocondrială la subiecți cu activitate fizică similară⁷. Selecția subiecților și metodele diferite ar putea sta la baza acestor diferențe, întrucât Trouce și colab. au obținut țesut muscular de la pacienți supuși unor intervenții chirurgicale sau suferind de sindroame de oboseală cronică sau dureri musculare, iar activitățile enzimatice evaluate nu au fost corelate cu activitatea CS în țesut muscular omogenizat. În studiul de față, s-a estimat că toți pacienții efectuau același volum de activitate fizică, inclusiv plimbări zilnice. În studiul lui Brierley și colab., activitatea fizică a afectat complexe I și IV, nu și complexul II și nu s-au găsit diferențe în activitatea lanțului transportor de electroni între sexe⁷. Aceasta indică faptul că

scăderea activității complexului II+III constată în urma cercetărilor noastre nu se datorează doar gradului diferit de activitate fizică sau deosebirilor de sex.

Activitatea SCR scăzută raportată în prezentul studiu concordă cu descoperirile privind cortexul temporal^{20,38} și cel occipital³⁸ din creierul cu BA, unde s-a descoperit scăderea cu 21-30% a activității comPLEXULUI II+III. În contrast, într-un studiu anterior asupra țesutului muscular în BA, Mariani și colab. au arătat o creștere semnificativă a activității mai multor enzime oxidative incluzând SCR [+80%] și COX [+37%] în țesutul muscular în BA³⁰. Totuși, acest lucru nu a fost confirmat convingător de analizele histologice efectuate, când activitatea COX și SDH a fost găsită crescută la trei din zece pacienți cu BA³⁰. Din nou, diferențele metodologice, dar și subgrupurile diferite de pacienți cu BA ar putea explica rezultatele discrepante în ceea ce privește disfuncția lanțului transportor de electroni în BA, după cum au enunțat Kish și colab. într-o analiză privitoare la activitatea COX în creierul cu BA²⁶.

Întrucât nu am descoperit diferențe în activitatea NCR (complexul I+III) și observațiile noastre histochimice evidențiază o posibilă modificare a activității SDH (complexul II) în grupul de pacienți cu BA, am fi tentați să sugerăm că scăderea activității SCR în mușchiul scheletic din BA se datorează unei disfuncții a complexului II și/sau unui transport de electroni deficitar între complexe II și III. Consecințele posibile ale unei disfuncții a complexului II în BA au fost demonstrate de Keller și colab. ce au raportat o creștere a concentrațiilor calciului intracelular, apoptoză și acumularea de specii reactive de oxigen după inhibarea complexului II în celule PC12 ce exprimau presenilină-1 mutantă.²³

Deși nu am găsit dovezi ale unei disfuncții a COX nici în experimentele morfologice, nici în cele biochimice, mai multe studii au raportat activitate COX deficitară în

BA în țesuturi altele decât cel nervos, precum și în creierul cu BA. Totuși, datele sunt totuși contradictorii, deoarece nu toate studiile au reușit să evidențieze o disfuncție și este încă neclar ce regiuni cerebrale sunt implicate. Datele noastre sunt în acord cu cele ale lui Gu și colab. ce au descoperit o scădere a activității complexului II+III dar nu și a complexului IV în cortexul temporal din BA, o zonă de obicei afectată sever în BA²⁰.

Descoperirea, atât în acest studiu cât și în altele a unor activități modificate ale complexelor enzimatice din lanțul respirator din afara creierului sugerează posibilitatea unui defect genetic, moștenit sau dobândit, ca factor determinant al disfuncțiilor mitocondriale din BA. Totuși, până în prezent nu a fost dovedit sau infirmat dacă un defect al ADN mitocondrial contribuie la patogeneza BA (pentru detalii vezi ref. 55). O altă explicație ar putea fi influența peptidelor Aβ. S-a dovedit că Aβ25-35 și Aβ1-40 influențează funcția mitocondrială, găsindu-se o scădere a activității complexelor II+III și IV în culturile de celule PC12^{44,45} și a complexului IV în mitocondriile din creier de șobolan¹¹. Întrucât mușchiul striat din BA conține niveluri semnificativ mai mari de Aβ1-40 și Aβ1-42²⁷, o posibilă explicație pentru descoperirile noastre ar fi aceea că sunt consecința efectului Aβ asupra lanțului transportor de electroni, similar miozitei cu incluzii citoplasmice unde s-a sugerat că anomalii mitocondriale de tipul fibrelor musculare COX negative ar fi induse de Aβ și/sau βAPP⁴. Totuși, spre deosebire de pacienții cu MIC, pacienții cu BA nu suferă de slăbiciune musculară și atrofie, ci rămân relativ neafecțați pe plan musculo-scheletic până în stadiile avansate ale bolii. Un motiv pentru această diferență ar putea fi acela că modificările mușchilor scheletici în BA și ale activității complexului II+III descoperite de prezentul studiu au un grad relativ redus. Pe măsură ce boala progresează în timp, aceste modificări s-ar putea acumula și,

împreună cu o producție crescută de specii de oxigen reactive, în final ar putea să apară simptome clinice.

În concluzie, în acest studiu au fost investigate masa și morfologia mitocondrială, precum și activitatea complexelor enzimatice I+III, II+III și IV din lanțul mitocondrial transportor de electroni în mușchiul scheletic din BA. Am descoperit că activitatea enzimatică a SCR (complexul II+III) este scăzută în BA. Scăderea a fost, totuși, prea mică pentru a putea reprezenta un marker biologic pentru BA. Descoperirile noastre susțin dovezile privind existența unei disfuncții mitocondriale în BA, care nu este o afecțiune strict limitată la creier.

Mulțumiri

Acest studiu a fost susținut prin burse oferite cu generozitate de fundația *Stiftelsen Gamla Tjänarinnor*, *The Swedish Society for Medicine*, *The Swedish Medical Council (prog 3875)*, *Loo and Hans Ostermans Foundation for Medical Research*, *The Clas Groschinsky Foundation*, *The Dementia Foundation*, *Gun and Bertil Stohne's Foundation* și *The Karolinska Institute*.

Abrevieri

Boală Alzheimer	BA
Amiloid β	Aβ
Proteina precursoră a amiloidului β	βAPP
Citrat sintetază	CS
Citocrom c oxidază	COX
Miozită cu incluzii citoplasmice	MIC
NADH-citocrom c reductază	NCR
Succinat-citocrom c reductază	SCR
Succinat dehidrogenază	SDH

Bibliografie

1. Abraham A.Y., Canevari L., Duchon M.R., β-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase. *J Neurosci* 2004; 24: 565-575.

2. Alp P., Newsholme E., Zammit V., Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NAFDP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem J* 1976; 154: 689-700.
3. Askanas V., Engel W.K., Inclusion-body myositis: Newest concepts of pathogenesis and relation to aging and Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60: 1-14.
4. Askanas V., Engel W.K., Inclusion-body myositis and myopathies: different etiologies, possibly similar pathogenic mechanisms. *Curr Opin Neurol* 2002; 15: 525-531.
5. Machin M.A., Briggs H.L., Saborido A.A., Bindoff L.A., Turnbull D.M., An evaluation of the measurement of the activities of complexes I-IV in the respiratory chain of human muscle mitochondria. *Biochem Med Metab Biol* 1994; 51: 35-42.
6. Blass J.P., Sheu R.K.-F., Gibson G.E., Inherent abnormalities in energy metabolism in Alzheimer's disease. Interaction with cerebrovascular compromise. *Ann NY Acad Sci*, 2000, 903, 204-21.
7. Brierley E.J., Johnson M.A., James O.F.W., Turnbull D.M., Effects of physical activity and age on mitochondrial function. *Q J Med.* 89 (1996) 251-258.
8. Bonilla E., Tanji K., Hirano M., Vu T.H., DiMauro S., Schon E.A., Mitochondrial involvement in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1999;1410:171-182.
9. Bosetti F., Brizzi F., Barogi S., Mancuso M., Siciliano G., Tendi E.A., Murri L., Rapoport S.I., Solani G., Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2002; 23: 371-376.
10. Brooke M.H., Kaiser M.M., Muscle fibre types 1970. How many and of what kind? *Arch Neurol* 1970;23:369-370.
11. Casley C.S., Canevari L., Land J.M., Clark J.B., Sharpe M.A., β-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *J Neurochem.* 2002; 80:91-100.
12. Chandrasekaran K., Giordano T., Brady D.R., Stoll J., Martin L.J., Rapoport S.I., Impairment in mitochondrial cytochrome oxidase gene expression in Alzheimer's disease. *Mol Brain Res* 1994;24:336-340.
13. Cooper J.M., Mann V.M., Schapira A.H.V., Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: effect of aging. *J Neurol Sci* 1992; 113:91-98.
14. Cooperstein S.J., Lazarow A., Kurfess N.J., A microspectrophotometric method for the determination of succinic dehydrogenase. *J Biol Chem* 1950;186:129-139.
15. Cooperstein S.J., Lazarow A., A microspectrophotometric method for the determination of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* 1951;189:665-670.
16. Curti D., Rognoni F., Gasparini L., Cattaneo A., Paolillo M., Racchi M., Zani L., Bianchetti A., Trabucchi M., Bergamaschi S., Govoni S., Oxidative metabolism in cultured fibroblasts derived from sporadic Alzheimer's disease (AD) patients. *Neurosci Letts* 1997;236:13-16.

17. Engel W.K. and Cunningham G.C., Rapid examination of muscle tissue: an improved trichrome method for fresh-frozen biopsy sections. *Neurology* 1963;13:919.
18. Fukuyama R., Hatanpää K., Rapoport S.I., Chandrasekaran K., Gene expression of ND4, a subunit of complex I of oxidative phosphorylation in mitochondria, is decreased in temporal cortex of brains of Alzheimer's disease patients. *Brain Res* 1996;713:290-293.
19. Gibson G.E., Zhang H., Sheu K.F., Bogdanovich N., Lindsay J.G., Lannfelt L., Vestling M., Cowburn R.F., α-ketoglutarate dehydrogenase in Alzheimer brains bearing the APP670/671 mutation. *Ann Neurol* 1998;44: 676-81.
20. Gu M., Owen A.D., Toffa S.E., Cooper J.M., Dexter D.T., Jenner P., Marsden C.D., Schapira A.H., Mitochondrial function, GSH and iron in neurodegeneration and Lewy body diseases. *J Neurol Sci* 1998; 158:24-29.
21. Hirai K., Aliev G., Nunomura A., Fujioka H., Russell R.M., Atwood C.S., Johnson A.B., Kress Y., Vinters H.V., Tabaton M., Shimohama S., Cash A.D., Siedlak S.L., Harris P.L., Jones P.K., Petersen P.B., Perry G., Smith M.A., Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2001; 21: 3017-3023.
22. Kalaria R.N., Harik S.I., Carnitine acetyltransferase activity in the human brain and its microvessels is decreased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1992; 32:583-586.
23. Keller J.N., Guo Q., Holtberg F.W., Bruce-Keller A.J., Mattson M.P., Increased sensitivity to mitochondrial toxin-induced apoptosis in neural cells expressing mutant presenilin-1 is linked to perturbed calcium homeostasis and enhanced oxyradical production. *J Neurosci* 1998; 18:4439-4450.
24. Kish S.J., Bergeron C., Rajput A., Dozic S., Mastrogioacomo F., Chang L.J., Wilson J.M., DiStefano L.M., Nobrega J.N., Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1992;59:776-779.
25. Kish S.J., Mastrogioacomo F., Guttman M., Furukawa Y., Taanman J.W., Dozic S., Pandolfo M., Lamarche J., DiStefano L., Chang L.J., Decreased brain protein levels of cytochrome oxidase subunits in Alzheimer's disease and in hereditary spinocerebellar ataxia disorders: α nonspecific change? *J Neurochem* 1999;72:700-707.
26. Kish S.J., Brain energy metabolizing enzymes in Alzheimer's disease:α-ketoglutarate dehydrogenase complex and cytochrome oxidase. *Ann NY Acad Sci* 1997;826:218-228.
27. Kuo Y.-M., Kokjohn T.A., Watson M.D., Woods A.S., Cotter R.J., Sue L.I., Kalback W.M., Emmerling M.R., Beach T.G., Rohrer A.E., Elevated Aβ42 in skeletal muscle from Alzheimer disease patients suggests peripheral alterations of AβPP metabolism. *Am J Pathol* 2000; 156:797-805.
28. Lan Z., Fang L., Jian-Ping P., Lin L., Development of mtDNA-transfused cell model of Alzheimer's disease and application in pharmacological study on chinese herb components. *Brain Aging*, 2003; 3: 29-35.
29. Larsson L. and Ansved T., Effects of ageing on the motor unit. *Progr Neurobiol* 1995;45:397-458.

30. Mariani C., Bresolin N., Farina E., et al. Muscle biopsy in Alzheimer's disease: morphological and biochemical studies. *Clin Neuropathol* 1991;10:171-176.
31. Markesbury W.R., Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Rad Biol Med* 1997; 23: 134-147.
32. Mattson M.P., Mark R.J., Furukawa K., Disruption of brain cell ion homeostasis in Alzheimer's disease by oxyradicals and signaling pathways that protect therefrom. *Chem Res Toxicol* 1997;10:507-17.
33. Maurer I., Zierz S., Möller H.-J., A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer's disease. *Neurobiol Ag* 2000; 21:455-462.
34. McKhann G., Drachmann D., Folstein M., Katzman R., Price D., Stadlan E.M., Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984; 34:939-944.
35. Mecocci P., Cherubini A., Beal M.F., Cecchetti R., Chionne F., Polidori M.C., Romano G., Senin U., Altered mitochondrial membrane fluidity in AD brain. *Neurosci Letts* 1996; 207:129-132.
36. Molina J.A., de Bustos F., Jimenez-Jimenez F.J., Benito-Leon J., Gasalla T., Orti-Pareja M., Vela L., Bermejo F., Martin M.A., Campos Y., Arenas J., Respiratory chain enzyme activities in isolated mitochondria of lymphocytes from patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 1997; 48:636-638
37. Mueller-Hocker J., Cytochrome c oxidase deficient fibres in the limb muscle and diaphragm of man without muscular disease: an age-related alteration. *J Neurol Sci* 1990; 100:14-21.
38. Mutisya E.M., Bowling A.C., Beal M.F., Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1994; 63:2179-2184.
39. Orth M., Schapira A.H., Mitochondria and degenerative disorders. *Am J Med Genet* 2001; 106:27-36.
40. Padykula H.E., Herman E., The specificity of the histochemical method of adenosine triphosphatase. *J Histochem Cytochem* 1955;3:170-183.
41. Parker W.D., Parks J.K., Cytochrome c oxidase in Alzheimer's disease brain. *Neurology* 1995;45:482-486.
42. Parker W.D., Filley C.M., Parks J.K., Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurology* 1990;40:1302-1303.
43. Parker W.D. Jr, Mahr N.J., Filley C.M., Parks J.K., Hughes D., Young D.A., Cullum C.M., Reduced platelet cytochrome c oxidase activity in Alzheimer's disease. *Neurology* 1994;44:1086-1090.
44. Pereira C., Santos S.M., Oliveira C., Mitochondrial function impairment induced by amyloid β -peptide on PC12 cells. *Neuroreport* 1998;9:1749-1755.
45. Pereira C., Agostinho P., Oliveira C.R., Vincopocetine attenuates the metabolic dysfunction induced by amyloid β -peptides in PC12 cells. *Free Rad Res.* 2000; 33:497-506.
46. Perry G., Nunomura A., Hirai K., Zhu X., Perez M., Avila J., Castellani R.J., Atwood C.S., Aliev G., Sayre L.M., Takeda A., Smith M.A., Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases? *Free Rad Biol Med* 2002; 33:1475-79.
47. Radner S., Knappnälsteknik för iterativ muskelbiopsi. *Trans Swed Soc Med Sci* 1962;19:94.
48. Scarpelli D.G., Hess R., Rears A.G.E., The cytochemical localization of oxidative enzymes. *J Biophys Biochem Cytol.* 1958;4:747-752.
49. Shearman M.S., Ragan C.I., Iversen L.L., Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of β -amyloid-mediated cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1470-1474.
50. Sheu K.F.-R., Cooper A.J.L., Koike K., Koike M., Lindsay G., Blass J.P., Abnormality of the a-ketoglutarate dehydrogenase complex in fibroblasts from Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1994; 35:312-318.
51. Simonian N.A., Hyman B.T., Functional alterations in Alzheimer's disease: diminution of cytochrome oxidase in the hippocampal formation. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993;52:580-585.
52. Smith M.A., Sayre L.M., Monnier V.M., Perry G., Radical AGEing in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 1995;18:172-176.
53. Sottocasa G.L., Kuylenstierna B., Ernster L., Bergstrand A., An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. A biochemical and morphological study. *J Cell Biol* 1967;32:415-438.
54. Swerdlow R.H., Parks J.K., Cassarino D.S., Maguire D.J., Maguire R.S., Bennett Jr J.P., Davis R.E., Parker D.W., Cybrids in Alzheimer's disease: a cellular model of the disease? *Neurology* 49 (1997) 918-925.
55. Swerdlow R.H., Kish S.J., Mitochondria in Alzheimer's Disease, *Int Rev Neurobiol* 2002;53:341-85.
56. Trounce I., Byrne E., Marzuki S., Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing. *Lancet* 1989;25:637-639.
57. Van Zeulen A.J., Bosman G.J.C.G.M., Ruitenbeek W., Van Kalmthout P.J.C., De Grip W.J., No evidence for reduced thrombocyte cytochrome oxidase activity in Alzheimer's disease. *Neurology* 1992;42:1246-47.
58. Wibom R., Hultman E., ATP production rate in mitochondria isolated from microsomes of human muscle. *Am J Physiol* 1990;259:E204-209.
59. Yates C.M., Butterworth J., Tennant M.C., Gordon A., Enzyme activities in relation to pH and lactate in postmortem brain in Alzheimer-type and other dementias. *J Neurochem* 1990;55:1624-1630.

Bolile cerebrovasculare stau la baza depresiei pacienților cu afecțiuni neurodegenerative?

Carmelle Peisah¹, Jillian J. Kril^{1,2,#}, Ian Hickie³

¹Centre for Education & Research on Ageing, Concord Hospital, Concord, Australia

²Department of Pathology, University of Sydney, Sydney, Australia

³School of Psychiatry, University of New South Wales, New South Wales, Australia.

Rezumat

Premise: *Deși destul de multe dovezi susțin ipoteza „depresiei vasculare”, datele neuropatologice coroborate sunt limitate. Ipoteza noastră a fost aceea că subiecții cu afecțiuni neurodegenerative și simptomatologie depresivă vor avea mai multe leziuni microvasculare în substanța albă frontală și/sau ganglionii bazali decât subiecții cu afecțiuni neurodegenerative fără depresie și cei ce nu prezintă nici boală neurodegenerativă, nici depresie.*

Metodă: *Leziunile microvasculare din substanța albă frontală și ganglionii bazali au fost studiate în trei grupuri: (i) 17 subiecți vârstnici cu afecțiuni neurodegenerative (boală Parkinson, boala corpilor Lewy, boală Alzheimer și demență vasculară) și depresie; (ii) 16 subiecți martor cu vârstă, sex și boală echivalente dar fără depresie; și (iii) 17 subiecți cu vârstă și sex echivalente însă fără afecțiuni neurologice sau depresie. Au fost evaluate localizarea anatomică și severitatea câtorva indicatori ai afectării vasculare (cum sunt dilatațiile perivasculare („etat crible”), rarefierea substanței albe, prezența infarctelor).*

Rezultate: *Nu s-au observat diferențe semnificative între grupuri în ceea ce privește oricare din indicatorii patologiei vasculare sau modificările globale ale substanței albe. În ansamblu s-a remarcat o asocieră între gradul afectării substanței albe și factorii de risc vascular cum sunt boala cardiacă izolată (semnificativ mai frecventă la martori) și combinația hipertensiune – boală cardiacă.*

Concluzii: *Acest studiu nu a găsit dovezi care să ateste existența afectării microvasculare în depresia vârstnicilor. Totuși, au existat mai multe limitări metodologice, legate în principal de probele obținute retrospectiv și modul de examinare a persoanelor cu boli neurodegenerative. Categoriic, este nevoie de testarea temeinică a modelului fronto-bazal de depresie pe grupuri largi de pacienți studiați prospectiv precum și asocieră investigațiilor neuroimagingice.*

Cuvinte cheie: *afecțiuni cerebrovasculare, depresie, neuropatologie.*

Introducere

În rândul pacienților vârstnici cu depresie pare să existe un grup particular caracterizat prin debut tardiv, tulburare cognitivă și factori de risc pentru boala vasculară. Există dovezi ce susțin afectarea circuitelor funcționale subcortico-bazale ca determinant al multora dintre particularitățile clinice și evolutive ale depresiei la pacienții vârstnici^{1,4}.

Studiile neuroimagingice au demonstrat pierdere de volum preferențială a lobului frontal și ganglionilor bazali prin rezonanță magnetică (IRM)^{1,5-7}. Două regiuni ale lobului frontal au fost asociate cu stări depresive: zona orbito-frontală, unul dintre cele cinci circuite integrate funcțional ce leagă cortexul de ganglionii bazali⁸, și zona prefrontală, implicată în proiecțiile dopaminergice ale ariei tegmentale ventrale⁹. Importanța

acestor regiuni în depresie este susținută de explorări imagingice funcționale atât la pacienți cu depresie primară¹⁰⁻¹³, cât și depresie secundară bolii Parkinson^{9,14}.

Deși pare să existe o oarecare specificitate a distribuției neuroanatomice a leziunilor asociate depresiei, procesele fiziopatologice ce stau la baza acestora sunt insuficient cunoscute. Boala vasculară ar putea juca un rol important. În primul rând,

#Adresa pentru corespondență: Dr. Jillian J. Kril, Centre for Education and Research on Ageing (C25), Concord Hospital, Concord NSW 2139, Australia, Tel: 61-2-9767 7109, Fax: 61-2-9767 5419, E-mail: jilliank@med.usyd.edu.au

depresia apare mai frecvent în demența vasculară (mai ales în boala Binswanger) decât în alte forme de demență, unii autori sugerând chiar că depresia este parte integrantă a bolii¹⁵⁻¹⁷. În al doilea rând, la pacienții vârstnici depresivi se observă prin IRM o prevalență crescută (30-80%) a hiperdensităților în substanța albă subcorticală (mai ales frontotemporal) și ganglionii bazali, comparativ cu martorii cu vârste echivalente⁸⁻²¹. Alături de factorii de risc cerebrovascular²² și pe termen lung cu declinul cognitiv²³, modificările histopatologice ce stau la baza acestor leziuni variază de la așa-numitul „*état crible*” (expansiunea spațiilor perivasculare sau spațiile Virchow-Robin) și glioză, la infarctele cavitare sau non-cavitare, în funcție de tipul și localizarea lor^{22,24-25}. În ceea ce privește tulburările fiziopatologice ce stau la baza acestor leziuni, părerile sunt împărțite, cu excepția rolului hipertensiunii și reglării presiunii sanguine^{26,27}.

Există puține studii neuropatologice asupra depresiei la vârste înaintate. Unul dintre primele studii a observat lărgirea scizurilor, dilatare ventriculară, pierdere de substanță albă și modificări vasculare microscopice de intensitate redusă la patru din șapte pacienți cu depresie²⁸. Un studiu mai recent a evidențiat reducerea marcată a numărului celulelor gliale în cortexul prefrontal subgenual la subiecții cu tulburare depresivă majoră (în special formele familiale) și tulburare bipolară²⁹. Un grup a demonstrat o asocierie semnificativă între depresie și microinfarctele (<15 ml) la subiecții cu demență³⁰, în timp ce la alt grup s-a observat o creștere semnificativă a prevalenței bolii aterotrombotice la nivelul aortei și vaselor cerebrale, nu și a microangiopatiei, la subiecții vârstnici cu depresie³¹.

Astfel, deși există multe date ce indică implicarea bolii cerebrovasculare și întreruperii circuitelor frontobazale atât în depresia primară cât și în cea secundară, în momentul actual sunt disponibile puține dovezi susținute neuropatologic. Scopul

studiului nostru a fost explorarea relațiilor neuropatologice în depresia la vârste înaintate. Ipoteza noastră a fost că pacienții vârstnici cu afecțiuni neurodegenerative și simptomatologie depresivă semnificativă vor avea leziuni microvasculare mai importante în substanța albă frontală și/sau ganglionii bazali, comparativ cu: (i) subiecții cu boală neurodegenerativă fără depresie; și (ii) subiecții fără boală neurodegenerativă sau depresie.

Metodă

Prelevarea probelor

Cazurile au fost identificate inițial pe baza informațiilor clinice înregistrate în baza de date a *Centre for Education and Research on Ageing (CERA)* și banca de creiere *Prince of Wales Medical Research Institute*. În momentul prelevării, banca de creiere, destinată afecțiunilor neurodegenerative și conținând atât mostre cu afecțiuni cât și martori recrutați din clinicile de neurologie și geriatrie dar și din comunitate, avea 317 cazuri. Materialul din baza de date a fost prelucrat pe baza observațiilor clinice originale (vezi mai jos). Au fost astfel identificate cazurile cu boli neurodegenerative și simptomatologie depresivă apărută în decurs de cinci ani de la instalarea bolii sau în timpul acesteia. Au fost excluse cazurile cu boli cerebrale degenerative familiale sau afecțiuni degenerative primare rare documentate, cum sunt paralizia supranucleară progresivă, atrofia multi-sistemică sau degenerescența corticobazală.

Din căutare a rezultat un grup de 17 subiecți ce prezentau atât afecțiuni degenerative (mai exact 14 cu boală Parkinson sau demență cu corpi Lewy, 2 cu boală Alzheimer și unul cu demență vasculară) cât și depresie (DEP-DISEASE). Au fost selectate două grupuri martor: (i) un grup de martori cu vârste echivalente fără afecțiuni neurologice sau depresie (n=17; NORMCON); și (ii) un grup de martori cu vârstă și afecțiune echivalente dar fără depre-

sie (n=16, NONDEP-DISEASE) (Tabelul 1). Ultimul grup a inclus subiecți cu aceleași afecțiuni neurodegenerative într-o distribuție similară grupului cu depresie (adică 11 cu boală Parkinson sau demență cu corpi Lewy, patru cu boală Alzheimer și unul cu demență vasculară). Diagnosticul afecțiunilor degenerative a fost clinicopatologic, adică bazat pe istoricul clinic și semnele neuropatologice folosind protocoale standardizate³²⁻³³. Aprobarea de etică a fost obținută de la *Central Sydney and South Eastern Area Health Services și University of Sydney and New South Wales*.

Evaluarea psihiatrică

Observațiile medicale și cele referitoare la îngrijirea cazurilor, ca și corespondența medicală au fost examinate atent în vederea documentării semnelor și simptomelor depresiei, tratamentului cu antidepresive și consulturilor psihiatrice. Deși observațiile clinice ale subiecților cu afecțiuni neurodegenerative erau mai detaliate decât ale martorilor fără astfel de afecțiuni (pentru care observațiile proveneau adesea de la o singură internare), acestea constau în principal însemnări făcute de neurologi în ambulator. Identificarea depresiei nu a fost subiectul unei cercetări sistematice. Dintre subiecții cu semne de depresie înregistrate, majoritatea aveau notate doar una sau două simptome, făcând utilizarea instrumentelor psihiatrice relevante (cum ar fi Evaluarea diagnostică post-mortem)³⁴ nepotrivită pentru acest grup de pacienți cu afecțiuni medicale. Cei 17 subiecți cu afecțiuni neurodegenerative și depresie au fost evaluați în consens de către CP și IH și au primit diagnostice de depresie probabilă sau certă conform următoarelor criterii:

Depresie certă

Unul dintre:

1. îndeplinirea criteriilor DSM-IV pentru depresie majoră
2. pacientul a fost examinat anterior de un psihiatru ce a diagnosticat

depresia și a inițiat tratamentul anti-depresiv

3. pacientul a prezentat un episod depresiv prelungit (adică peste șase luni cu simptome majore cum ar fi ideea suicidară) și a fost tratat cu antidepresive.

Depresie probabilă

Unul dintre:

1. îndeplinirea unor criterii pentru depresie majoră (cum ar fi tulburările de dispoziție sau diminuarea interesului/plăcerii pentru activități plus >1 dar <5 dintre următoarele: scădere în greutate, insomnie/hipersomnie, agitație psihomotorie sau retardare, anergie, sentimente de inutilitate/vinovăție, scăderea concentrației, idei de moarte sau suicid), sau

2. pacientul a fost examinat de un medic generalist, psiholog sau neurolog ce a pus diagnosticul de depresie și a inițiat tratamentul anti-depresiv.

Deși afecțiunile psihiatrice concomitente au fost frecvente în rândul subiecților cu boli neurodegenerative, au fost excluși din grupul de martori cu boli neurodegenerative cei cu simptome de depresie sau tratament pentru acestea documentate.

Detaliile demografice esențiale și factorii de risc cerebrovascular (cum sunt fumatul, hipertensiunea, afecțiunile cardiace și diabetul zaharat) au fost consemnate pentru toți subiecții. Relația temporală între depresie și boală și cea între depresie și deces au fost de asemenea notate în cazul subiecților cu depresie.

Probele histologice și evaluarea acestora

S-au efectuat secțiuni ale creierelor la distanță de 3 mm în plan coronal, probele fiind prelevate de la niveluri comparabile în toate cazurile. Au fost examinate toate regiunile lobilor frontali potențial candidate (adică: cortexul de asociație prefrontal dorsolateral - aria 9 Brodmann; regiunea orbitofrontală - ariile Brodmann 11 și 12; girusul cingulat - aria 24 Brodmann) precum și ganglionii bazali. Probele au fost prelevate în special din emisfera stângă (187 din

195 secțiuni examinate). Secțiuni din banda motorie frontală (aria Brodmann 4) au fost folosite ca martor pentru comparație internă a afecției vaselor mici. Blocurile tisulare au fost incluse la parafină, secționate la 10 μm și colorate cu hematoxilina-eozină. Secțiunile au fost codificate iar CP a evaluat gradul afecției vaselor mici fără a cunoaște grupul din care face parte subiectul.

În lipsa unei scheme acceptate de cuantificare a patologiei vasculare, s-au folosit atât scalele pentru modificările individuale ale substanței albe (gradul *etat crible*, gradul pierderii de mielină)³⁵ cât și scala compozită pentru modificări globale³⁵⁻³⁷. În acest studiu, scalele individuale pentru substanța albă au utilizat rarefierea (valori între 0-3), creșterea densității gliale (prezentă sau absentă), dilatațiile perivasculare (valori între 0 și 3), îngroșarea peretilor vasculari (prezentă sau absentă), infiltratul perivascular cu macrofage (prezent sau absent), paloarea mielinei (prezentă sau absentă), spongioza (prezentă sau absentă) și infarctele (dimensiune și localizare).

În afara evaluării caracteristicilor individuale în fiecare dintre regiunile examinate, a fost folosit sistemul de clasificare compozit descris de Esiri și colab.³⁶ pentru a obține un grad de afectare a substanței albe între 0 și 3 pentru fiecare regiune. *Scorul total compozit* pentru fiecare caz a fost obținut împărțind suma scorurilor compozite ale regiunilor studiate la scorul maxim pentru numărul de regiuni eșantionate pentru a compensa eventualele date lipsă. În plus, *scorurile de distribuție pentru substanța albă* au fost obținute calculând suma modificărilor substanței albe în regiunile lobului frontal și ganglionilor bazali raportată la modificările substanței albe din banda motorie, după cum urmează:

Frontal dorsal: suma scorurilor compozite ale secțiunilor frontale dorsolaterale, cingulate și din ganglionii bazali împărțită la scorul compozit al benzii motorii,

Frontal orbital: suma scorurilor compozite ale regiunii orbitofrontale

și ganglionilor bazali împărțită la scorul compozit al benzii motorii;

Frontal total: suma scorurilor compozite ale regiunilor frontală dorsolaterală, cingulată, orbitofrontală și ganglionilor bazali împărțită la scorul compozit al benzii motorii;

Doar frontal: suma scorurilor compozite ale regiunilor frontală dorsolaterală, cingulată și orbitofrontală împărțită la scorul compozit ale benzii motorii.

Fiabilitate și validitate

Scalele vasculare au fost repetate pe cazuri pilot până când rezultatele obținute au fost consistente. Abaterile temporale a scalei a fost estimată prin fiabilitate test-retest pe o perioadă lungă de timp. Fiabilitatea test-retest a fost evaluată pe zece secțiuni selectate aleator dar care au cuprins fiecare dintre regiunile și categoriile clinice eșantionate.

Pentru fiecare dintre cele zece secțiuni au fost evaluate cele opt modificări individuale ale substanței albe descrise mai sus. Am obținut o concordanță de 91,3% (Kappa ponderat = 0,83) între evaluările de la momentul inițial și cele ulterioare, de până la 12 luni mai târziu. Nu s-a observat un tipar constant al non-concordanței valabil pentru diferitele caracteristici evaluate.

Consensul inter-evaluator a fost testat pe un grup separat de zece secțiuni, din nou selectate aleator dar incluzând fiecare dintre regiunile și categoriile clinice implicate. Concordanța a fost de 88,8% (Kappa ponderat = 0,78) între Evaluatorul 1 (CP) și Evaluatorul 2 (JK). Nonconcordanța a fost distribuită între diferitele modificări evaluate.

Analiza statistică

Analiza statistică a fost efectuată folosind *Statview 5*³⁸. Analiza variației a fost folosită pentru a evalua diferențele de grup (cum ar fi grupurile de subiecți; prezența/absența factorilor de risc) în ceea ce privește distribuția și scorurile compozite globale pentru substanța albă.

Testul Chi pătrat a fost efectuat pentru a examina diferențele de grup pentru date clasificabile așa cum sunt sexul și prezența factorilor de risc.

Rezultate

Datele demografice și prezența factorilor de risc pentru cele trei grupuri distincte sunt prezentate în Tabelul 1. Nu au fost diferențe semnificative între grupuri în ceea ce privește frecvența modificărilor patologice individuale sau scorurile compozite globale (ce însumează toate modificările). Scorurile compozite globale (\pm DS) pentru cele trei grupuri au fost: (i) DEP-DISEASE $38,73 \pm 21,1$; (ii) NONDEP-DISEASE $39,17 \pm 24,1$; și (iii) NORMCON $43,13 \pm 25,6$ ($df = 2$; $F = 0,17$; $p = 0,85$).

Incidența fiecărei modificări patologice a fost scăzută pentru întreaga populație (Tabelul 2). În particular, frecvența rarefierii moderate sau severe a substanței albe și frecvența dilatațiilor perivasculare au fost scăzute, indicând per ansamblu o sărăcie a patologiei vasculare a substanței albe în această populație. Infiltratele celulare și îngroșarea pereților vaselor au fost mai frecvente, dar acestea nu au fost specifice nici grupului cu boală degenerativă, nici celui cu depresie. Infarctele s-au observat doar pe 9 dintre cele 195 de lame disponibile pentru examinare și au apărut cu aceeași frecvență la indivizii cu depresie și la martori (Tabelul 2).

A fost examinată specificitatea modificărilor vasculare pentru circuitele neuroanatomice particulare; nu s-au găsit diferențe în severitatea

patologiei vasculare care ar fi putut diferenția grupul cu depresie. Mai precis, cele trei grupuri nu au diferit în distribuția scorurilor pentru substanța albă (Tabelul 3).

A fost examinată asocierea între parametrul nostru global de evaluare a patologiei substanței albe, scorul compozit total mediu, și factorii de risc cerebrovascular (Tabelul 4). Întrucât nu au fost diferențe în frecvența modificărilor patologice între cele trei grupuri, asocierea între scorul de afectare și prezența sau absența fiecăruia dintre factorii de risc a fost examinată în toată populația. Scorurile compozite totale medii au fost mai mari în grupul cu boală cardiacă izolată și în asociere cu hipertensiunea (Tabelul 4). Important de notat, boala cardiacă a fost semnificativ mai frecventă în grupul NORMCON.

Tabelul 1. Variabilele demografice și factorii de risc.

	DEP-DISEASE n=17	NONDEP-DISEASE n=16	NORMCON n=17	Evaluare statistică
Femei, Nr. (%)	7 (41)	4 (25)	9(53)	-
Vârsta medie la deces (ani)	76,5 \pm 7,4	75,8 \pm 7,6	73,6 \pm 9,8	df=2; F=0,54; p=0,58
Hipertensiune, Nr. (%)	5 (29,4)	4 (26,7) ^a	8 (47,1)	df=2; $\chi^2=1,78$; p=0,41
Boală cardiacă, Nr. (%)	4 (23,5)	3 (20) ^a	11 (64,7)	df=2; $\chi^2=8,81$; p=0,01
Diabet, Nr. (%)	1 (5,9)	2 (13,3) ^a	2 (11,8)	df=2; $\chi^2=0,55$; p=0,76
Fumat, Nr. (%)	1 (16,7) ^b	4 (44,4) ^c	5 (55,6) ^c	df=2; $\chi^2=2,29$; p=0,32

^an=15; ^bn=6; ^cn=9

Tabelul 2. Incidența modificărilor individuale în toate regiunile (exclusiv banda motorie) pe grup de subiecți, Nr.(%).

	Rarefiere				Dilatație perivasculară				Infiltrat celular	Infarcte	Îngroșare
	Fără	Ușoară	Mod.	Severă	Fără	Ușoară	Mod.	Severă			
DEP-DISEASE (n=67)	41 (61,2)	18 (26,8)	4 (6,0)	4 (6,0)	58 (86,6)	5 (7,5)	3 (4,5)	1 (1,4)	20 (30,3)	4 (6,2)	15 (22,7)
NONDEP-DISEASE (n=63)	42 (66,7)	10 (15,9)	4 (6,3)	7 (11,1)	57 (90,5)	5 (7,9)	1 (1,6)	0	16 (25,4)	1 (1,6)	11 (17,5)
NORMCON (n=65)	35 (53,9)	19 (29,2)	3 (4,6)	8 (12,3)	57 (87,7)	6 (9,2)	2 (3,1)	0	21 (32,3)	4 (6,0)	14 (21,5)

Tabelul 3. Distribuția scorurilor pentru substanța albă pe grupuri.

	DEP-DISEASE n=16	NONDEP-DISEASE n=15	NORMCON n=14	df	F	p
Frontal total	4,61 \pm 2,35	4,14 \pm 1,54	5,35 \pm 2,33	2	1,20	0,31
Frontal superior	3,56 \pm 1,91	3,12 \pm 1,27	4,08 \pm 1,95	2	1,13	0,33
Frontal orbital	2,4 \pm 1,38	2,06 \pm 0,87	2,7 \pm 1,67	2	0,93	0,40
Doar frontal	3,23 \pm 1,60	3,10 \pm 1,21	3,87 \pm 1,58	2	1,12	0,34

* prin ANOVA

Tabelul 4. Scorurile compozite totale medii la subiecții cu și fără factori de risc cerebrovasculari.

Factor de risc	Scorul compozit mediu		df	F	p
	Prezent	Absent			
Hipertensiune	47,75 \pm 23,3	36,24 \pm 22,9	1	2,74	0,10
Boală cardiacă	50,59 \pm 26,0	34,68 \pm 20,2	1	5,54	0,023
Diabet	42,67 \pm 23,9	40,04 \pm 23,7	1	0,06	0,82
HTA/b. cardiacă	58,00 \pm 24,6	35,66 \pm 21,1	1	8,30	0,006
HTA/Diabet	57,78 \pm 15,4	39,15 \pm 23,5	1	1,81	0,19
Diabet/b. cardiacă	50,0 \pm 20,0	38,2 \pm 22,5	1	1,02	0,32

* prin ANOVA

Concluzii

Cercetarea noastră a eșuat în încercarea de a identifica un model al modificărilor neuropatologice asociat cu prezența semnelor clinice de depresie la pacienții cu boli neurodegenerative. Această descoperire poate fi într-adevăr un rezultat nul sau poate fi reflecția limitărilor metodologice ale acestui studiu, majoritatea legate de moniera retrospectivă de selectare a populației de studiu. În primul rând, modificările patologice vasculare au fost întâlnite cu o frecvență atât de mică, încât a fost dificil de demonstrat existența unor diferențe între grupuri. Folosind un grup cu depresie format în principal din subiecți cu tulburări motorii și utilizând drept criteriu de echivalență bolile respective, este posibil să fi polarizat greșit grupurile cu boală similară în sens opus prezentei bolii vasculare. Interesant este că boala cardiacă, ce a fost cel

mai puternic asociată cu modificările substanței albe, a fost semnificativ mai frecventă în grupul martor. Această problemă ar putea fi sancționată de studii viitoare prin folosirea unei metodologii bazate pe risc înalt (cum ar fi examinarea subiecților cu factori de risc vasculari cunoscuți sau leziuni pre-existente precum hiperdensitățile la explorările imagistice cerebrale).

În al doilea rând, valoarea datelor obținute prin cercetări post-mortem depinde foarte mult de acuratețea fișelor medicale. Dificultățile asociate stabilirii retrospective a diagnosticelor psihiatrice, pacientul fiind decedat³⁹⁻⁴⁰, sunt accentuate în cazul unei populații cu afecțiuni medicale deoarece observațiile medicale sunt adesea influențate de înregistrarea simptomelor evident tratabile sau de experiența specialistului. Ca urmare, frecvența redusă a consemnării semnelor și simptomelor de depresie este constantă în Australia⁴¹⁻⁴² și

în alte țări⁴³⁻⁴⁵. Depresia este adesea nedetectată și subdiagnosticată la persoanele cu afecțiuni neurodegenerative. Subestimarea depresiei, în absența cercetării prospective, este posibil să fi contaminat grupul martor cu afecțiuni neurologice cu subiecți cu boală depresivă nerecunoscută.

Mai mult, dată fiind presupusa implicare a circuitelor fronto-bazale, este mai probabil ca tiparul modificărilor patologice prefigurată să fie asociat cu sindroame depresive clare ce includ tulburări psihomotorii și melancolie⁴⁶. Totuși, după cum s-a observat, identificarea retrospectivă pe baza înregistrărilor din fișele medicale a sindroamelor depresive complete la pacienții cu afecțiuni medicale autopsiați este dificilă. Ideal, ipoteza depresiei vasculare ar trebui testată pe un grup de subiecți diagnosticați în timpul vieții cu depresie endogenă sau melancolică. Astfel, în absența programelor specifice de prelevare și stocare a

eșantioanelor cerebrale pentru studierea tulburărilor de dispoziție, explorarea acestui model este limitată la studii limitate doar pe subiecții implicați în programe de donare de creiere. Deși există pentru schizofrenie, în Australia nu au fost inițiate astfel de programe pentru tulburările afective și majoritatea programelor pentru cercetarea țesutului cerebral cuprind subiecți cu boli neurodegenerative sau vârstnici normali, proveniți din comunitate.

Făcând abstracție de limitările metodologice subliniate anterior, inexistența unei asocierilor între depresia la vârste înaintate și patologia microvasculară la acest grup populațional a fost susținută recent de Thomas și colab.³¹ pe o populație non-neurodegenerativă. Thomas și colab. nu au descoperit diferențe în afectarea microvasculară la nivelul creierului în ansamblu sau local în lobul frontal la subiecții cu istoric de depresie majoră comparativ cu mar-torii.

Dovezi consistente indică o contribuție importantă a afecțiunilor cerebrovasculare dar și a întreruperii circuitelor fronto-bazale în patogeniza depresiei la vârste înaintate^{2,4,47-48}. Totuși, această ipoteză a fost insuficient cercetată la nivel histopatologic. În studiul nostru, capacitatea de a testa acest model a fost limitată de compoziția lotului; cu toate acestea, am pus la punct o metodă de evaluare a patologiei microvasculare post-mortem. Am cercetat cea mai mare varietate de modificări microvasculare posibile, incluzând cuantificarea atât a infarctelor cât și a modificărilor substanței albe asociate adesea cu leucoencefalopatia observată prin imagistică cerebrală. Am evaluat gradul afectării vasculare luând în considerare prezența sau absența factorilor de risc cunoscuți pentru boala cerebrovasculară^{22,49} și am descoperit o asociere între acești factori de risc și determinările noastre privind afectarea vaselor mici.

Această metodologie va permite în viitor testarea modelului vascular fronto-bazal al depresiei, preferabil

utilizând și corelații IRM. Deși nici studiul nostru nici cel condus de Thomas și colab.³¹ nu au găsit dovezi privind existența unei afectări microvasculare la subiecții cu depresie studiată retrospectiv, nu știm încă dacă există o disjunție între semnele IRM evidente pentru boala cerebrovasculară și examinarea histopatologică directă, așa cum Breitner⁵⁰ a susținut recent într-un editorial. Mai mult, există un subgrup de pacienți cu depresie, cum sunt cei cu tulburări psihomotorii, pentru care boala microvasculară este mai relevantă ca factor etiologic? În final, aprofundarea înțelegerii proceselor fiziopatologice ce stau la baza depresiei vârstelor înaintate poate oferi potențiale ținte pentru prevenție sau tratament asemănătoare celor specifice altor afecțiuni neurobiologice ale vârstelor înaintate.

Mulțumiri

Autorii sunt recunoscători pentru ajutorul oferit de Heather McCann în pregătirea probelor histologice și Lynette Eggleston în discutarea și evaluarea clinică a subiecților.

Acest studiu a fost susținut printr-o bursă oferită de *NSW Institute of Psychiatry, Research Fund for the Eldery* din cadrul *Academic Department for Old Age Psychiatry, Prince of Wales Hospital Sydney* și un program de suport al *Medical Foundation of the University of Sydney*.

Bibliografie

- Krishnan R.R.K., McDonald W.M., Doraiswamy P.M., Tupler L.A., Husain M., Boyko O.B., Figiel G.S., Ellinwood E.H., Neuroanatomical substrates of depression in the elderly. *European Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1993; 243: 41-46.
- Krishnan R.R.K., Hays J.C., & Blazer D.G., MRI-defined vascular depression. *Am J Psychiatry* 1997; 154: 497-501.
- Simpson S.W., Jackson A., Baldwin R.C., Burns A., Subcortical hyperintensities in late-life depression: acute response to treatment and neuropsychological impairment. *Int Psychogeriatrics* 1997; 9: 257-275.
- Hickie I., & Scott E., Late-onset depressive disorders: a preventable variant of cerebrovascular disease? *Psychological Med* 1998; 28: 1007-1013

- Coffey C.E., Wilkinson W.E., Weiner R.D., Parashos I.A., Djang W.T., Webb M.C., Figiel G.S., Spritzer C.E., Quantitative cerebral anatomy in depression: a controlled magnetic resonance imaging study. *Arch Gen Psychiatry* 1993; 50: 7-16.
- Husain M.M., McDonald W.M., Doraiswamy P.M., Figiel G.S., Na C., Escalona P.R., Boyko O.B., Nemeroff C.B., Krishnan R.K., A magnetic resonance imaging study of putamen nuclei in depression. *Psychiatric Res Neuroimaging* 1991; 40: 95-99.
- Pantel J., Schroder J., Essig M., Popp D., Dech H., Knopp M.V., Schad L.R., Eysenbach K., Backenstrab M., Friedlinger M., Quantitative magnetic resonance imaging in geriatric depression and primary degenerative dementia. *J Affect Disord* 1997; 42: 69-83.
- Alexander G.E., DeLong M.R., Strick P.L., Parallel organisation of functionally segregation circuits linking basal ganglia and cortex. *Ann Rev Neurosci* 1986; 9: 357-381.
- Ring H.A., Bench M.R., Trimble D.J., Brooks D.J., Frackowiak S.J., Dolan R.J., Depression in Parkinson's disease: a positron emission study. *Br J Psychiatry* 1994; 165: 333-339.
- Phelps M.E., Mazziotta J.C., Baxter L.R., Gemer R., Positron emission tomography study of affective disorders; problems and strategies. *Ann Neurol* 1984; 15 (supp): s149-s156.
- Baxter L.R., Schwartz J.M., Phelps M.E., Reduction of prefrontal cortex glucose metabolism common to three types of depression. *Arch Gen Psychiatry* 1989; 46: 243-250.
- Bench C.J., Friston K.J., Brown R.G., Scott L.C., Frackowiak R.S.J., Dolan R.J., The anatomy of melancholia - focal abnormalities of cerebral blood flow in major depression. *Psychological Med*, 1992; 22: 606-615.
- Drevets W.C., Price J.L., Simpson Jr J.R., Todd R.D., Reich T., Vannier M., Raichle M.E., Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. *Nature* 1997; 386: 824-827. Article
- Mayberg H.S., Starkstein S.E., Sadzot B., Preziosi T., Andrezejewski P.L., Dannals R.F., Wagner H.N.J., Robinson R.G., Selective hypometabolism in the inferior frontal lobe in depressed patients with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1990; 28: 57-64.
- Peisah C., Brodaty H., Vascular dementia. *Int Rev Psychiatry* 1993; 5: 381-395.
- Ballard C., Bannister C., Solis M., Oyeboode F., Wilcock G., The prevalence, associations and symptoms of depression amongst dementia sufferers. *J Affective Disorders* 1996; 36: 135-144.
- Newman S.C., The prevalence of depression in Alzheimer's disease and vascular dementia in a population sample. *J Affect Disorders* 1999; 52: 169-176.
- Krishnan R.R.K., Goli V., Ellinwood E.H., France R.D., Blazer D.G., Nemeroff C.B., Leukoencephalopathy in patients diagnosed as major depressive. *Biol Psychiatry* 1988; 23: 519-522.
- Coffey C.E., Figiel G.S., Djang W.T., Saunders W.B., Weiner R.D., Subcortical white matter hyperintensity on magnetic resonance imaging: clinical and neuroanatomical correlates in the depressed elderly. *J*

- Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1989; 1:135-144.
- Hickie I., Scott E., Mitchell P., Wilhelm K., Austin M-P., Bennett B., Subcortical hyperintensities on magnetic resonance imaging : clinical correlates and prognostic significance in patients with severe depression. *Biol Psychiatry* 1995; 37:151-160.
- Greenwald B.S., Kramer-Ginsberg E., Krishnan R.R.K., Ashtari M., Auerbach C., Patel M., Neuroanatomic localisation of magnetic resonance imaging signal hyperintensities in geriatric depression. *Stroke* 1998; 29: 613-617.
- Awad I.A., Johnson P.C., Spetzler R.F., Incidental subcortical lesions identified on magnetic resonance imaging in the elderly: II Post mortem pathological correlations. *Stroke* 1986; 17: 1090-1097.
- Hickie I., Scott E., Wilhelm K., Brodaty, H., Subcortical hyperintensities on magnetic resonance imaging in patients with severe depression - a longitudinal evaluation. *Biol Psychiatry* 1997; 42: 367-374.
- Erkinjuntti T., Clinicopathological study of vascular dementia. In: Prohovnik I., Wade J., Knezevic S., Tatemichi T. and Erkinjuntti T., eds., *Vascular dementia: current concepts*. Chichester, England: John Wiley and Sons, 1996: 82-83.
- Marshall V.G., Bradley W.G., Marshall C.E., Bhoopat T., Rhodes R.H., Deep white matter infarction: correlation of MR imaging and histopathological findings. *Radiology* 1988; 167: 517-522.
- Morris J.H., Vascular dementia. In: Esiri M.M. and Morris J.H. eds., *The neuropathology of dementia*. Cambridge: Cambridge University Press, 1997:157-158.
- Pantoni L., Garcia J.H., Cognitive impairment and cellular/vascular changes in the cerebral white matter. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 826: 92-102.
- Bowen D.M., Najlerahim A., Procter A.W., Francis P.T., Murphy E., Circumscribed changes of the cerebral cortex in neuropsychiatric disorders. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1989; 86: 9504-9508.
- Ongur D., Drevets W.C., Price J.L., Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in

- mood disorders. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95:13290-5.
- Ballard C., McKeith I., O'Brien J.T., Kalaria R., Jaros E., Ince P., Perry R., Neuropathological substrates of dementia and depression in vascular dementia, with a particular focus on cases with small infarct volumes. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2000; 11: 59-65.
- Thomas A.J., Ferrier I.N., Kalaria R.N., Perry R.H., Brown A., O'Brien J.T., A neuropathological study of vascular factors in late-life depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 70: 87-87.
- Harding A.J., Halliday G.M., Simplified neuropathological diagnosis of dementia with Lewy bodies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998; 24: 195-201.
- National Institute on Aging and Reagan Institute Working Group on diagnostic criteria for the neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 1997; 18(4S): S1-S3.
- Salzman S., Endicott J., Clayton P., Winokur G., Diagnostic evaluation after death (DEAD). Rockville, Md: *NIMH Neuroscience Research Branch*, 1983.
- Erkinjuntti T., Benavente O., Eliasziw M., Munoz D.G., Sulkava R., Haltia M., Hachinski V., Diffuse vacuolization (spongiosis) and atherosclerosis in the frontal white matter occurs in vascular dementia. *Arch Neurology* 1996; 53: 325-332.
- Esiri M.M., Wilcock G.K., Morris J.H., Neuropathological assessment of the lesions of significance in vascular dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 63: 749-753.
- Brun A., Englund E., A white matter disorder in dementia of the Alzheimer type: a pathoanatomical study. *Ann Neurol* 1986; 19: 253-262.
- SAS Institute Inc. Statview 5. Cary: NC, 1998.
- Hill, C., Keks, N., Roberts, S., Opekin, K., Dean, B., MacKinnon A., Copolov D., Problem of diagnosis in postmortem brain studies of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1996; 153: 533-537.
- Ames D., Flynn, E., Harrigan, S., Prevalence of psychiatric disorders among in-patients of

- an acute geriatric hospital. *Aust J Ageing* 1994; 13: 8-11.
- Ames D., Tuckwell V., Psychiatric disorders among elderly patients in a general hospital. *Med J Aust* 1994; 160: 671-675.
- Keilp, J.G., Waniek, C., Goldman, R.G., Zemishlany, Z., Alexander, G.E., Gibbon M., Wu A., Susser E., Prohovnik I., Reliability of postmortem chart diagnoses of schizophrenia and dementia. *Schizophr Res* 1995; 17: 221-228.
- Jackson, R., & Baldwin, B., Detecting depression in elderly medically ill patients. The use of the geriatric depression scale compared with medical and nursing observations. *Age and Ageing* 1993; 22: 349-353.
- Koenig, H.G., Meador, K.G., Cohen, H.J., Blazer D.G. Detection and treatment of depression in older medically ill hospitalised patients. *Int J Psychiatry Med* 1988; 8: 17-31.
- Sha A., De T., Documented evidence of depression in medical and nursing case notes and its implications in acutely ill geriatric inpatients. *Int Psychogeriatrics* 1998; 10: 163-172.
- Hickie I., Lloyd A., Dixon G., Halliday G., McRitchie D., Scott E., Mitchell, P., Wakefield D., Utilising molecular biological and histopathological techniques to study the dopaminergic system in patients with melancholia. *Aust NZ J Psychiatry* 1997; 31: 27-35.
- Alexopolous, G.S., Meyers, B.S., Young, R.C., Campbell, S., Silbersweig, D., Charlson M., „Vascular depression hypothesis“. *Arch Gen Psychiatry* 1997; 54: 915-922.
- Rao R. Cerebrovascular disease and late life depression: an old age association revisited. *Int J Ger Psychiatry* 2000; 15: 419-33.
- Breteler M.M.B., van Swieten J.C., Bots M.L., Grobbee D.E., Claus J.J., van den Hout J.H., van Harskamp F., Tanghe H.L., de Jong P.T., van Gijn J., Cerebral white matter lesions, vascular risk factors, and cognitive function in a population-based study: The Rotterdam Study. *Neurology* 1994; 44: 1246-1252.
- Breitner J.C.S. Vascular depression: new light on an established idea? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 70: 3.

EBIXA

EBIXA

Semnalizarea APP-mediată – noi aspecte

Klaus Heese[#], Takashi Yamada, Yasuo Nagai, Tohru Sawada

BF Research Institute, Inc., c/o National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan.

Rezumat

Boala Alzheimer (BA), cea mai frecventă cauză a demenței la bătrâni, este o afecțiune neurodegenerativă progresivă caracterizată prin prezența tulburărilor cognitive și de memorie. Deși la pacienții cu istoric familial de maladie Alzheimer au fost identificate mai multe defecte genetice, majoritatea cazurilor de BA au debut târziu (peste 65 de ani) și interesează indivizi fără o predispoziție genetică cunoscută. Proteina precursoră a amiloidului („amyloid precursor protein” – APP) și produșii săi de catabolism sunt implicați în patogeneza BA. Fragmentele APP, inclusiv b-amiloidul și fragmentele APP-C-terminale (CTF_g), au fost deja raportate ca factori determinanți ai apoptozei. Prezentul studiu urmărește aprofundarea informațiilor referitoare la mecanismele de semnalizare APP și descrie pentru prima dată un nou model celular ce exprimă o proteină de fuziune APP – GFP a receptorului factorului de necroză tumorală (TNFR), potrivită pentru studierea semnalizării APP-mediate într-un sistem clasic „ligand-receptor”. Pe lângă aceasta, am caracterizat exprimarea neuronală a CTF_g57/59. În plus, am descoperit că „Sunday-driver” SYD-2 este o nouă proteină de interacțiune APP ce atrage atenția asupra unei legături esențiale între căile de semnalizare a apoptozei intracelulare și transportul dependent de microtubuli.

Cuvinte cheie: apoptoză, moarte celulară, diferențiere, factor de creștere nervoasă, neurodegenerescență.

Introducere

Tratamentul bolii Alzheimer (BA) rămâne o continuă provocare din cauza înțelegerii incomplete a evenimentelor ce declanșează și întrețin neurodegenerescența selectivă caracteristică creierului afectat de BA. Boala este caracterizată prin prezența depunerilor amiloide, amiloidozei cerebrale și aglomerărilor (plăcilor) neurofibrilare. Procesarea proteolitică a proteinei precursoră a amiloidului APP generează peptidul amiloid-beta (A β), implicat în patogeneza BA¹. Mutațiile genei ce codifică APP precum și presenilina-1 și presenilina-2 (PS-1/2), ce determină apariția BA cu debut precoce, sunt

asociate cu depunerea în exces a A β citotoxic în creierul pacienților cu BA, sugerând că depunerea de A β este principalul eveniment declanșator pentru boală².

Totuși, rolul fiziologic al APP, dacă acest rol este legat de procesarea proteolitică a APP, și locul unde acest proces se desfășoară în neuroni *in vivo* sunt încă neclare. A fost demonstrat anterior că transportul axonal al APP în neuroni este mediat de legarea directă a APP de lanțul ușor al kinezinei, subunitate a kinezinei-1, o proteină microtubulară de transport. Astfel, APP poate funcționa ca receptor membranal pentru kinezina-1, mediind transportul axonal al beta-secretazei

(BACE) și PS-1. Datele existente indică de asemenea un rol al APP ca receptor membranal al kinezinei-1 necesar pentru transportul BACE și PS-1 într-un compartiment membranal axonal ce ar putea de asemenea conține Gap43, sinapsină-1 și receptorul TrkA al neurotrofinei (factorul de creștere nervoasă, NGF). Mai mult, tot aceste date lansează posibilitatea ca leziunile axonale să inducă proteoliza APP pentru a elibera capătul C-terminal, eveniment ce ar putea apoi transmite un semnal de leziune în corpul celular³⁻⁶.

Au fost identificate trei evenimente proteolitice ce au ca rezultat sinteza A β din APP. Clivarea esențială, efectuată de β -secretază,

are loc în zona extracelulară a APP, în secvența A β , făcând imposibilă formarea acestuia. Alternativ, zona extracelulară a A β poate fi clivată la capătul amino-terminal al A β de către β -secretaza BACE.

Capătul carboxi-terminal al APP suferă o proteoliză intramembranară prin activitatea unei γ -secretaze dependentă de presenilină, eliberând A β precum și fragmentele citoplasmice mici ale APP (APP-CTF γ 57 și APP-CTF γ 59), reflectând locul de acțiune predominant al γ -secretazei asupra APP). Clivarea APP de către γ -secretază poate contribui la neurodegenerescența din BA pe două căi: eliberarea A β și expunerea unei zone bioactive C-terminale (CTF γ 57/59) a APP legată de membrană^{2,7}.

Se presupune că fragmentul citoplasmatic predominant generat prin clivarea APP de către γ -secretază este CTF γ 59. A fost emisă ipoteza că eliberarea acestui fragment are ca rezultat emiterea unor semnale nucleare, cu activarea genelor necesare pentru procesele celulare mediate de APP. De exemplu, o consecință a mutațiilor PS ce produc BA familială poate fi creșterea CTF γ 57 alternativ ce acompaniază producerea peptidului A β cu 42 de aminoacizi (1-42), extrem de toxic.

Pentru a cerceta mai departe cauza degenerării neuronale din BA, am început analiza semnalizării APP prin diferite abordări.

Prin analogie cu proteina de fuziune creată de Canossa, Rovelli și colab., (1993/1996)^{8,9} am realizat o proteină de fuziune TAF ce conține zona extracelulară a receptorului TNF uman și porțiunea intracelulară a APP atașată la proteina fluorescentă verde („green fluorescent protein” – GFP). După inserarea informației genetice (transfecție) într-o celulă nervoasă de șobolan, această proteină de fuziune poate fi activată specific de către TNF- α uman, după cum este ilustrat în Figura 1.

În plus, acest model poate fi folosit pentru studiul translocării subcelulare a TAF/CTF prin microscopie cu fluorescență, după cum a fost

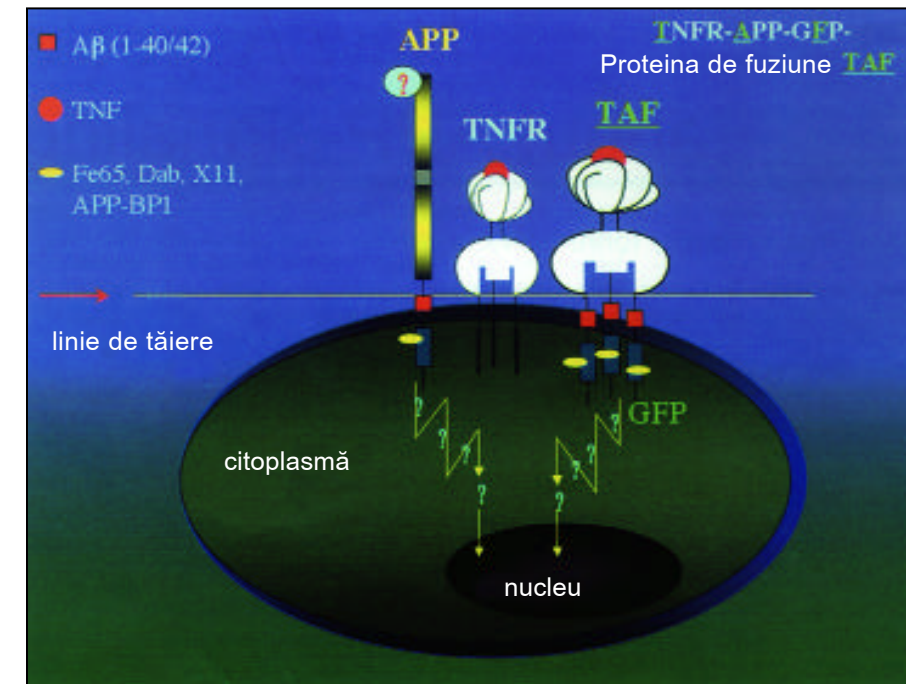


Figura 1. Reprezentare schematică a semnalizării TAF-mediate. Proteina de fuziune TAF constă din partea extracelulară a TNFR, partea transmembranară/intracelulară a APP și este conectată prin intermediul capătului C-terminal la GFP, conform descrierii din *Materiale și metodă*.

descriș recent ca o nouă abordare pentru clasificare vizuală¹⁰.

Mai mult, am exprimat fragmentele C-terminale ale APP, CTF γ 57 și CTF γ 59, după Ebinu și Yanker (2002)⁷, pentru a evidenția efectele diferite ale acestora asupra supraviețuirii neuronale.

În continuare, am utilizat sistemul-hibrid-cu-două-levuri pentru analiza de tip screening - acesta fiind o metodă *in vivo* bazată pe levuri ce identifică interacțiunea între două proteine (X și Y) prin reconstituirea unui factor activ de transcripție – pentru a descoperi noi proteine ce interacționează cu APP și a descrie aici, pentru prima dată, „Sunday-driver” SYD2^{11,12}, ca o nouă proteină ce interacționează cu APP.

Materiale și metodă

Reactivi

În absența altor specificații, toți reactivii folosiți pentru metodele biochimice provin de la Sigma-Aldrich (Tokyo, Japonia).

Culturile celulare

Celulele P12 au fost cultivate în mediu „Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (D-MEM)/F12 (1:1) ce conține supliment de azot și 10% ser fetal de vițel (FCS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) la 37°C în atmosferă umidificată 5% CO₂/95% aer. Pentru stimularea creșterii prelungirilor nervoase, celulele P12 au fost tratate cu NGF 50 ng/ml (Invitrogen, Tokyo, Japan).

Reacția de polimerizare-revers transcripție în lanț (RT-PCR) / sub-clonare

Pentru generarea proteinei de fuziune TAF a fost folosită metoda RT-PCR, conform Rovelli și colab., 1993 și Canossa și colab., 1996^{8,9}. TNFRII uman și APP uman au fost supuse amplificării PCR (25 μ l volum de reacție) după cum a fost descris anterior¹⁰. [APP uman (Nr. acces: A31584): de la nt2013-nt2310=297 nt=99aa; receptorul factorului de necroză tumorală uman II (Nr. acces: M32315): de la nt90-nt860 =771nt=257aa (Invitrogen, Tokyo,

Japonia); Prima reacție P1 plus P2 (pentru TNFR1I-N-terminal) și P4 plus P5 (pentru APP-C-terminal); a doua: P1 plus P3 și P6 plus P5; ultima: P1 plus P5; primeri:

P1: 5'-gccatggcgcccgtcgccgtctggg-3',

P2: 5'-gtgccagtgctcc-

cttcagctgggggctggggccattgg-3',

P3: 5'-ggaattctgcatc/gtcgccagtgctcc-cttcagctgggggct-3',

P4: 5'-gcactggcgac/gatgcagattccgacatgactca-3' („/” indică suprapunere TNFR1I/APP),

P5: 5'-tgttctgcatctgctcaaagaactt-3' (fără codon-stop pentru exprimarea ca proteină de fuziune GFP),

P6: 5'-gccccagctgaaggagcactggcagcatgacagaattccga-3');

proteina de fuziune conține partea extracelulară a TNFR1I uman și partea transmembranară/intracelulară a APP uman incluzând peptidul A β (1-42) ce începe de la: '-DAE-FRHDSGYEVHHQKLVFFAED-VGSNKGAIIGLMVGGVVIA-TVIV-ITLVMLKKKQ... → C - terminal al APP.]. Numărul de cicluri folosit pentru amplificarea fiecărei catene ADN a fost ales astfel încât să permită PCR continuarea într-o zonă liniară conform protocolului „*Elongase™ enzyme mix*” (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). Etapele amplificării au inclus denaturarea la 94°C timp de 1 min., alinierea timp de 15 s la 65°C (AnnT) cu primeri specifici și extensia timp de 0,5 sau 1 min. la 68°C (AnnT: 65°C/24 cicluri). Reacțiile PCR au fost analizate prin electroforeză în geluri de agaroză 1,5%.

În final, structura de expresie a fost generată prin atașarea matricii proteinei de fuziune cu proteina fluorescentă verde (GFP) de pcDNA3.1CT-GFP-TOPO® (Invitrogen, Tokyo, Japonia) la capătul C-terminal al TAF (Fig. 1). Proteina de fuziune a fost confirmată prin analiză completă a secvenței.

Conform Ebinu și Yanker (2002)⁷, CTF γ 57 și CTF γ 59 au fost sub-clonate în pEB6CAGMCS-IRES-EGFP (obținut prin amabilitatea Dr. T. Yokota de la BF Research Institute, Inc., Suita, Osaka, Japonia;

pe baza vectorului de expresie construit de Tanaka și colab., 1999¹³) pentru a co-exprima (co-translație) CTF γ 57 sau CTF γ 59 cu GFP din același ARNm (pCTF γ 57/59-IRES-GFP).

Sistemul dublu-hibrid ProQuest™ cu tehnologie Gateway™

Sistemul dublu-hibrid este un sistem *in vivo* bazat pe levuri ce identifică interacțiunea între două proteine (X = APP și Y = Sunday-driver) prin reconstituirea unui factor de transcripție activă. Factorii de transcripție activă sunt de fapt dimeri între două proteine de fuziune, una dintre ele conținând o zonă de legare a ADN (db) legată de prima proteină de interes (db-X; cunoscută de asemenea ca „momeală”), iar cealaltă o zonă de activare (ad) legată de a doua proteină de interes (ad-Y; cunoscută și ca „prada” sau „proteina țintă”). Interacțiunea db-X:ad-Y reconstituie un factor de transcripție funcțional ce activează gene raportor integrate în cromozomi controlate de promotori ce conțin locusurile de legare db relevante. Atunci când un marker selectabil precum *HIS3* este folosit ca genă raportor, activarea transcripției dublu-hibrid-dependente poate fi monitorizată prin dezvoltarea celulelor pe plăci fără histidină, oferind astfel un mod de detecție genetică a interacțiunii proteină:proteină. Această metodă poate folosi pentru a testa dacă două proteine cunoscute interacționează între ele sau pentru a detecta o proteină necunoscută codificată de o bibliotecă ADNc ce interacționează cu o proteină (APP) de interes¹⁴.

Analiza prin sistemul-dublu-hibrid a fost efectuată conform protocolului fabricantului (Invitrogen, Tokyo, Japonia)¹⁵. Pe scurt, APP umană a fost sub-clonată din pENTR/D-TOPO® în pDEST™32-vector (Invitrogen) conținând zona de legare ADN GAL4. pEXP-AD502 a fost folosit ca vector de exprimare a zonei de activare conținând biblioteca ADNc de creier uman dublu hibrid ProQuest™ (Invitrogen). Tulpina ciu-

percii folosite pentru sistemul ProQuest™ a fost MaV203.

Pentru selecție au fost folosite trei gene raportor: o singură copie a fiecăreia dintre cele trei gene raportor (*HIS3*, *URA3* și *lacZ*) au fost integrate stabil în diferite locusuri din genomul levurii. Regiunile promotor ale *URA3*, *HIS3* și *lacZ* nu sunt înrudite (cu excepția prezenței locusurilor de atașare GAL4). Prin folosirea sistemului dublu-hibrid ProQuest™, față de sistemele dublu-hibrid standard, rezultatele fals pozitive sunt reduse deoarece trebuie să aibă loc, în regiuni cromozomale diferite, trei evenimente de transcripție independente (produse de promotori distincți). Inducția genelor raportor *HIS3* și *URA3* face posibilă monitorizarea activării transcripției dublu-hibrid-dependente prin dezvoltarea celulară pe plăci fără histidină sau, respectiv, uracil. Inducția genei *lacZ* produce o culoare albastră la testarea cu X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranozid). Mai mult, inducția dublu-hibrid-dependente a *URA3* duce la conversia componentei acid 5-fluoroorotic (5FOA) în 5-fluorouracil, care este toxic. Astfel, celulele ce conțin proteine de interacțiune se dezvoltă când sunt cultivate pe mediu fără uracil, dar creșterea este inhibată la cultivarea pe mediu ce conține 5FOA.

Acest sistem reduce deci procentul de rezultate fals pozitive prin furnizarea a patru fenotipuri [*His*⁺ (3AT^R), β -gal, *Ura*⁺ și 5FOA^S] pentru evaluarea interacțiunilor reale și prin utilizarea vectorilor cu număr mic de copii (ARS/CEN) ce reduc nivelul de exprimare și toxicitatea.

Clonele pozitive au fost confirmate prin testul de retransformare: celulele de levură ce conțineau potențiale proteine de interacțiune prezintă atât db-APP umană cât și ad-Y (Y fiind Sunday-driver). Izolatele ADN plasmidice din celulele de levură ce conțin db-APP umană și ad-Y (Y fiind Sunday-driver) au fost introduse în *E. coli* prin electroporație iar transformanții ce conțineau ad-Y (Y fiind Sunday-driver) au

fost selectați folosind ampicilină (sau db-APP umană cu gentamicină). ADN plasmidic ad-Y (Y fiind Sunday-driver) din aceste celule de *E. coli* a fost transformat în MaV203 împreună cu pDBLeu sau db-APP umană și testat pentru inducerea genelor raportor. Probele real pozitive au indus genele raportor cu pdb-APP umană, dar nu și cu vectorii martor pdbLeu singuri.

Transfecția și testul de supraviețuire

Celulele PC12 au fost supuse transfecției rapide cu vectori de expresie TAF, CTF γ 57/59, GFP (Clontech, Tokyo, Japonia) sau plasmide fără conținut (martori) folosind reactiv de transfecție SuperFector (conform protocolului fabricantului; B-Bridge, San Jose, CA, USA) și păstrate în mediu D-MEM/F12 (1:1)/N₂ conținând 10% FCS (Gibco) la 37 °C în atmosferă umidificată 5% CO₂/95% aer¹⁵. În plus, eficiența transfecției (în jur de 50-60%) a fost de fiecare dată confirmată prin cotransfecția raportorului GFP (cu sau fără TAF sau CTF γ 57/59) cu transcriptor p53-/PKC-DsRed1 (Clontech, Tokyo,

Japonia) după cum a fost raportat recent^{16,17}. Supraviețuirea celulelor TAF sau CTF γ 57/59 pozitive a fost evaluată la 48 de ore post transfecție prin microscopie cu fluorescență (Olympus IX70, Olympus, Tokyo, Japonia). În plus, la 24 de ore după transfecție, celulele au fost stimulate cu NGF (NGF murin 2,5 S, 50 ng/ml; Invitrogen) pentru 120 de ore. Apoi, supraviețuirea celulară a fost măsurată folosind Cell-Titer 96® AQ_{ueous} Assay (Promega, Madison, WI) examinată prin microscopie cu fluorescență^{15,17}.

Rezultate

După cum se observă în Figura 1, am sintetizat proteina de fuziune TAF ce este formată din partea extracelulară a receptorului TNF uman, partea transmembranară/intracelulară a APP umană și proteina GFP. Transfecția acestei proteine TAF în celule neuronale de șobolan PC12 rezultă într-o distribuție a proteinei TAF după stimularea cu NGF (Figura 2) similară cu cea demonstrată de Ando și colab. (1999)¹⁸ care au transfectat APP tip sălbatic (*wtAPP*) în celule PC12.

Celulele PC12 ce exprimă CTF γ 57/59 prezintă o rată de proliferare redusă comparativ cu celulele martor (Figura 3) și, după stimularea cu NGF, celulele CTF γ 59- pozitive indică, mai degrabă, un ușor efect inhibitor asupra creșterii neuronale (Figura 4), deoarece GFP prin ea însăși nu afectează dezvoltarea neuronală¹⁵. Mai interesant, CTF γ 57 prezintă un efect inhibitor mai puternic asupra supraviețuirii neuronale decât CTF γ 59 (Figura 3).

Căutând noi structuri asociate interacțiunii APP cu ajutorul sistemului dublu-hibrid, am detectat „Sunday-driver” SYD2 ca o nouă proteină de interacțiune APP (Tabelul 1).

Discuții

Celulele PC12 ce exprimă TAF reprezintă un model fiziologic celular pentru studierea semnalizării APP-mediate, deoarece - similar *wtAPP*¹ - TAF *per se* nu induce apoptoză. Folosind acest model celular, capătul C-terminal al APP poate fi activat specific cu un ligand extracelular iar semnalizarea APP-mediată poate fi caracterizată ca un sistem clasic de

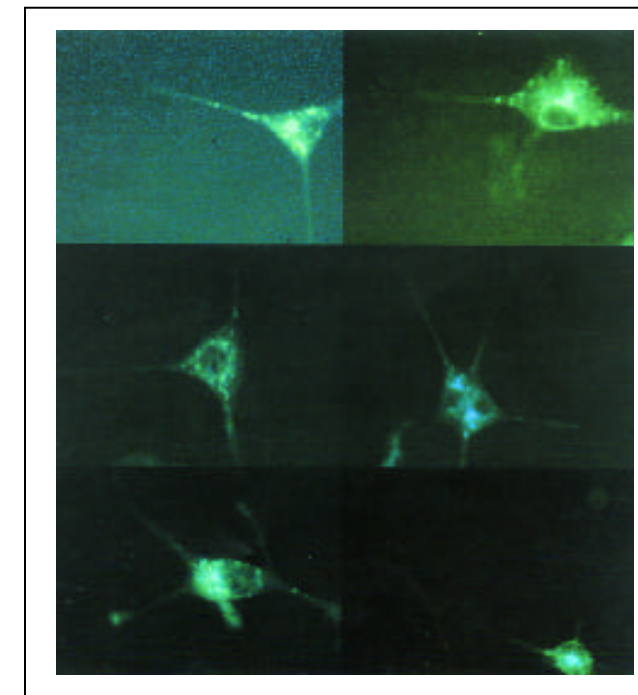


Figura 2. Celule neuronale de șobolan PC12 ce exprimă TAF stimulate cu NGF.

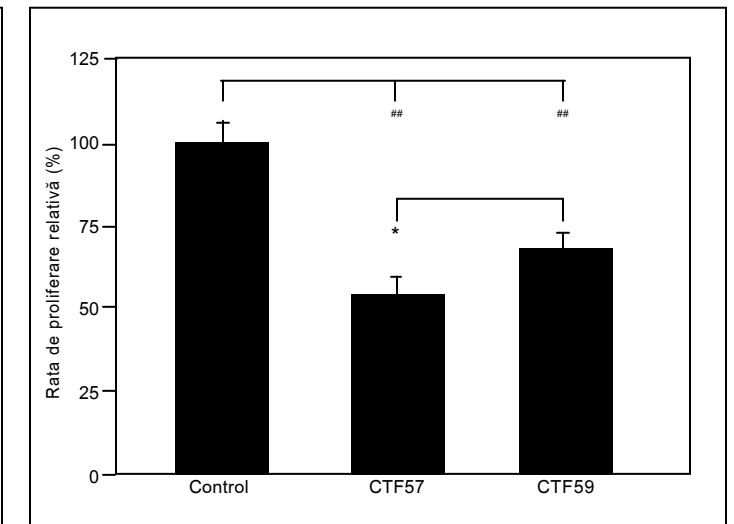


Figura 3. Efectele CTF γ 57 și CTF γ 59 asupra supraviețuirii celulelor PC12. ELISA-Cell-Titer 96® AQ_{ueous} Assay (Promega) la 48 de ore post-transfecție. Celulele au fost incubate după cum a fost descris în secțiunea *Materiale și Metodă*. Datele sunt prezentate ca medie \pm S.E.M. a opt experimente independente, fiecare în duplicat [*P < 0,05, **P < 0,01, (martori = celule cu transfecție de GFP), ANOVA].

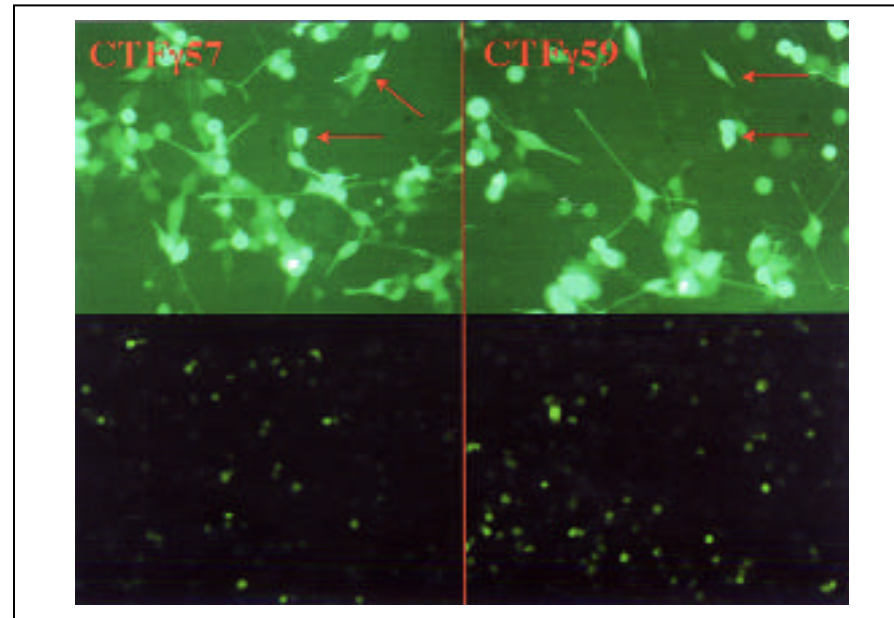


Figura 4. Celule neuronale de șobolan PC12 ce exprimă atât CTF γ 57 sau CTF γ 59 cât și GFP, stimulate cu NGF.

Tabelul 1. Analiza sistemului dublu-hibrid cu levuri a evidențiat „Sunday-driver” ca o nouă proteină de interacțiune APP.

Numele proteinei	ID Locus/Nr. Acces Genă	Activitate beta-gal
Sunday-driver (SYD2)	#23162 / NM_015133	****

* indică intensitatea interacțiunii. Reprodus după Heese și colab., 2002.¹⁵

semnalizare „ligand-receptor”. Astfel, introducând o mutație a APP specifică BA familiale sau efectuând cotransfecția celulelor PC12 ce exprimă TAF cu PS-1/2 mutant (*mu*PS-1/2), acest sistem poate fi un model potrivit pentru studierea semnalizării APP asociate BA familiale și dezvoltării mecanismelor fiziologice și fiziopatologice ale transducției semnalelor APP.

CTF γ 57 derivat din APP, ce a prezentat pe modelul nostru celular trăsături pro-apoptice mai pregnante, ar putea interveni în patologia BA prin semnalizare pro-apoptică sau interferând negativ cu mecanismele normale de semnalizare CTF γ 59. Alternativ, CTF γ 57 ar putea să nu fie procesat eficient - așa cum este CTF γ 59 - în fragmentul mai mic și mai activ CTF γ 50, ce este probabil produsul C-terminal activ final de semnalizare al APP⁷.

Mai multe comunicări sugerează că APP-CTF se poate transloca în nucleu și poate juca un rol în semnalizarea celulară, de exemplu, interacționând cu Fe65 și histona acetiltransferază tip60 pentru a media transactivarea unei gene raportor, sau controlând exprimarea genei responsive la acid retinoic¹⁹⁻²¹. Generarea proteinelor de semnalizare nucleară precum APP-CTF γ 57/59 prin proteoliză intramembranară reglată (RIP) este o nouă paradigmă a transducției semnalelor⁷.

Proteina codificată de gena „Sunday-driver” (SYD), ce face parte dintr-o familie de proteine conservate dintr-o familie de proteine conservate găsite la *C. elegans*, drosophila, șoa-rece și om, este necesară pentru interacțiunea funcțională a kinesinei-1 cu încărcătura conținutul axonal^{11,12,22}. Proteina SYD prezintă o structură tripartită, constând dintr-un

domeniu N-terminal (citoplasmatic) cu două regiuni dublu-spiralate, o zonă centrală transmembranară și un domeniu C-terminal (citoplasmatic). În culturile celulare provenite de la mamifere, SYD a fost localizată în organitele tubulo-veziculare derivate din aparatul Golgi, unde se găsește împreună cu kinesina convențională. Analiza a dezvăluit faptul că SYD nu se asociază direct cu lanțul greu al kinesinei; mai degrabă, capătul N-terminal al SYD interacționează cu zona tetratricopeptidică a lanțului ușor al kinesinei (KLC). Astfel, SYD operează ca receptor asociat membranei pentru transportul axonal al veziculelor post-Golgi și posibil al altor proteine ce se atașează la SYD prin interacțiunea cu domeniul TPR al subunității KLC a kinesinei-1. Per ansamblu, aceste rezultate sugerează că SYD atașează kinesina la organitele exocitice prin intermediul lanțurilor ușoare ale moleculei transportorului.

SYD are probabil o altă funcție dincolo de presupusul său rol de receptor pentru kinesină. SYD a fost recent identificat ca partener de atașare pentru mai multe kinaze MAP implicate în cascada semnalizării activată de stres^{23,24}. Studii pe șoareci sugerează că această proteină ar putea interacționa cu, și regla activitatea a numeroase protein kinaze ale căii de semnalizare JNK din celulele neuronale. Odată ajuns la nivelul sinapsei, SYD poate funcționa ca proteină platformă pentru cascada de semnalizare JNK și poate regla transportul veziculelor sinaptice prin integrarea semnalizării JNK și transportul kinesinei-1^{11,12,22}.

Luând în considerare că APP poate interacționa cu JIP1b/2²⁵, poate prezenta interes faptul că SYD ar putea avea și alte funcții în afara rolului său în transportul axonal, deoarece recent, două grupuri independente au clonat mSYD2, denumindu-l JSAP1²⁶ și JIP3²³, ca proteină neurală de schelet pentru cascada JNK MAPK.

În particular, s-a observat o legare preferențială a SYD2 la grupul JNK3 de MAPK^{23,26} și, întrucât

a fost dovedit că apoptoza neuronală indusă de stres necesită calea de semnalizare JNK3²⁷⁻²⁹, SYD2 pare a fi direct implicat în reglarea semnalizării apoptotice²⁸. Dată fiind legarea SYD2 la proteinele cascadei JNK MAPK, este posibil ca SYD să fie de asemenea necesar pentru transportul acestui grup de proteine de-a lungul prelungirilor neuronale. Această descoperire oferă indicii asupra unei potențiale legături între căile de semnalizare (apoptotică) intracelulare și transportul dependent de microtubuli. Totuși, sunt necesare cercetări suplimentare pentru a stabili dacă kinesina-1 și APP joacă un rol important în cadrul căii de semnalizare JNK și pentru cuantificarea nivelului de intercomunicare între APP, SYD, kinesina-1 și proteinele JNK. Aceste descoperiri sugerează de asemenea că receptorii de încărcătură pentru transportorii microtubulilor, așa cum sunt SYD sau APP, pot fi ei înșiși încărcătură, un mecanism evolutiv eficient.

Relația între legarea APP la SYD și kinesină și celelalte mecanisme de semnalizare JNK-mediate și funcțiile membranare ale sale constituie un subiect interesant pentru cercetări viitoare.

Bibliografie

- Bayer T.A., Wirths O., Majtenyi K., Hartmann T., Multhaup G., Beyreuther K., Czech C., Key factors in Alzheimer's disease: beta-amyloid precursor protein processing, metabolism and intraneuronal transport. *Brain Pathol* 2001; 11: 1-11.
- Selkoe D.J., Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 2001; 81: 741-766.
- Gunawardena S., Goldstein L.S., Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*. *Neuron* 2001; 32: 389-401.
- Kamal A., Almenar-Queralt A., LeBlanc J.F., Roberts E.A., Goldstein L.S., Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* 2001; 414: 643-648.
- Kamal A., Stokin G.B., Yang Z., Xia C.H., Goldstein L.S., Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron* 2000; 28: 449-459.
- Torres L., Chu H., Kotovsky I., White K., Neuronal overexpression of APPL, the *Drosophila* homologue of the amyloid precursor protein (APP), disrupts axonal transport. *Curr Biol* 1999; 9: 489-492.
- Ebinu J.O., Yankner B.A., A RIP tide in neuronal signal transduction. *Neuron* 2002; 34: 499-502.
- Canossa M., Rovelli G., Shooter E.M., Transphosphorylation of the neurotrophin Trk receptors. *J Biol Chem* 1996; 271: 5812-5818.
- Rovelli G., Heller R.A., Canossa M., Shooter E.M., Chimeric tumor necrosis factor-TrkA receptors reveal that ligand-dependent activation of the TrkA tyrosine kinase is sufficient for differentiation and survival of PC12 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8717-8721.
- Heese K., Nakayama T., Hata R., Masumura M., Akatsu H., Li F., Nagai Y., Yamamoto T., Kosaka K., Suemoto T., Sawada T., Characterizing CGI-94 (comparative gene identification-94) which is down-regulated in the hippocampus of early stage Alzheimer's disease brain. *Eur J Neurosci* 2002; 15: 79-86.
- Bowman A.B., Kamal A., Ritchings B.W., Philp A.V., McGrail M., Gindhart J.G., Goldstein L.S.B., Kinesin-dependent axonal transport is mediated by the Sunday Driver (SYD) protein. *Cell* 2000; 103: 583-594.
- Hollenbeck P.J., Kinesin delivers: identifying receptors for motor proteins. *J Cell Biol* 2001; 152: F25-F28.
- Tanaka J., Miwa Y., Miyoshi K., Ueno A., Inoue H., Construction of Epstein-Barr virus-based expression vector containing mini-oriP. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264: 938-943.
- Fields S., Song O., A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989; 340: 245-246.
- Heese K., Nagai Y., Sawada T., Characterizing rat p18 amyloid beta (A β) responsive protein p18A β Pr. *Brain Aging* 2002; 2: 30-38.
- Heese K., Nagai Y., Sawada T., The 3'-untranslated region of the new rat synaptic vesicle protein 2B mRNA transcript inhibits translational efficiency. *Brain Res Mol Brain Res* 2002; 104: 127-131.
- Heese K., Yamada T., Nagai Y., Sawada T., CGI-94 controls neuronal survival. *Brain Aging* 2002; 2: 44-48.
- Kamal A., Oishi M., Takeda S., Iijima K., Isohara T., Naim A.C., Kirino Y., Greengard P., Suzuki T., Role of phosphorylation of Alzheimer's amyloid precursor protein during neuronal differentiation. *J Neurosci* 1999; 19: 4421-4427.
- Baek S.H., Ohgi K.A., Rose D.W., Koo E.H., Glass C.K., Rosenfeld M.G., Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein. *Cell* 2002; 110: 55-67.
- Cao X., Südhof T.C., A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 2001; 293: 115-120.
- Gao Y., Pimplikar S.W., The gamma-secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 14979-14984.
- Klopfenstein D.R., Vale R.D., Rogers S.L., Motor protein receptors: moonlighting on other jobs. *Cell* 2000; 103: 537-540.
- Kelkar N., Gupta S., Dickens M., Davis R.J., Interaction of a mitogenactivated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 1030-C1043.
- Verhey K.J., Meyer D., Deehan R., Blenis J., Schnapp B.J., Rapoport T.A., Margolis B., Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. *J Cell Biol* 2001; 152:959-970.
- Taru H., Iijima K., Hase M., Kirino Y., Yagi Y., Suzuki T., Interaction of Alzheimer's beta-amyloid precursor family proteins with scaffold proteins of the JNK signaling cascade. *J Biol Chem* 2002; 277: 20070-20078.
- Ito M., Yoshioka K., Akechi M., Yamashita S., Takamatsu N., Sugiyama K., Hibi M., Nakabeppu Y., Shiba T., Yamamoto K.I., JSAP1, a novel jun N-terminal protein kinase (JNK) - binding protein that functions as a Scaffold factor in the JNK signaling pathway. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 7539-7548.
- Davis R.J., Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000; 103: 239-252.
- Matsuura H., Nishitoh H., Takeda K., Matsuzawa A., Amagasa T., Ito M., Yoshioka K., Ichijo H., Phosphorylation-dependent scaffolding role of JSAP1/JIP3 in the ASK1-JNK signaling pathway. A new mode of regulation of the MAP kinase cascade. *J Biol Chem* 2002; 277: 40703-40709.
- Yang D.D., Kuan C.Y., Whitmarsh A.J., Rincon M., Zheng T.S., Davis R.J., Rakic P., Flavell R.A., Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* 1997; 389: 865-870.

Utilizarea informațiilor obținute de la aparținători în diagnosticul demenței incipiente

Anne Rita Oksengraad[#], A. Braekhus, K. Engedal, K. Laake
Department of Geriatric Medicine, Ullevål Hospital, Oslo, Norway.

Rezumat

Informații retrospective asupra funcționării, comportamentului și cogniției, evaluate de către îngrijitori, referitoare la 484 de persoane evaluate în cadrul unei clinici specializate în tulburările de memorie au fost asociate variabilei de prognostic „Deficit cognitiv” la subiecți cu un scor MMSE total mai mare sau egal cu 20. 11 dintre cele 78 de puncte evaluate, toate clasificate binar, în relație cu variabila de prognostic „Deficit cognitiv” au avut sensibilitate și specificitate >0,5 și o acuratețe de 75% sau mai mare. Analiza factorială a acestor puncte a demonstrat conturarea unui factor principal unic. Restrângând numărul articolelor la șase, setul cu cea mai bună valoare predictivă pentru evoluție a fost: „Își amintește lista de cumpărături?”, „Își gestionează singur bunurile?”, „Pare confuz?”, „Începe conversații?”, „Este activ?” și „Știe care este data/ora?”. Curbele ROC au arătat că acest set a fost un mai bun indicator al „Deficitului cognitiv” decât scorul MMSE. Considerând o valoare-prag egală cu 4/5 din scorul total, sensibilitatea acestui indicator a fost 0,83, specificitatea 0,81 și RP+ 4,4. Datele furnizate de aparținători referitoare la activități și comportament s-au dovedit astfel informații diagnostice valide pentru evaluarea funcției cognitive a persoanelor în vârstă și ar putea fi folosite în identificarea celor la care ar fi utile investigații diagnostice pentru demență.

Cuvinte cheie: tulburare cognitivă, demență, vârstnici, date obținute de la aparținători, descoperirea cazurilor.

Introducere

Demența este o afecțiune frecventă la bătrâni, prevalența pentru grupul de vârstă 70-74 ani fiind de aproximativ 5%, ajungând la 15% la cei peste 75 de ani și depășind 40% la bătrânii cu vârstă peste 85 de ani^{1,2}. Demența tinde să fie trecută cu vederea de către medici și este frecvent diagnosticată în stadiile avansate^{3,4}. Mulți dintre bătrâni nu sunt conștienți de apariția simptomelor de demență, iar dacă sunt încearcă să le ascundă. În astfel de cazuri, responsabilitatea pentru inițierea procedurilor diagnostice aparține adesea celor care îi îngrijesc.

Testările pentru demență nu par încă justificate⁵, dar totuși, detecția precoce este importantă la pacienții cu tulburări cognitive ce sunt potențial reversibile, cum ar fi cele produse de deficiențe vitaminice, efecte adverse ale unor medicamente, leziuni cerebrale înlocuitoare de spațiu, depresie sau hipotirodism⁶. Evaluarea în stadii precoce este de asemenea de importanță vitală pentru utilizarea adecvată a tratamentului non-farmacologic și farmacologic⁷. Persoanele care se ocupă cu îngrijirea par să aibă un rol important în stabilirea momentului în care ar trebui începută evaluarea vârstnicilor suspecți de dez-

voltarea unei demențe. O strategie pentru facilitarea diagnosticului precoce ar fi bazată deci pe conceperea și aprecierea viabilității unor instrumente de culegere a informațiilor de la îngrijitori ce ar putea fi folosite pentru selecția bătrânilor cu indicație pentru investigații diagnostice specifice pentru demență, efectuate de medicul de familie sau într-o clinică specializată în tulburări de memorie.

O cerință pentru diagnosticul de demență este diminuarea clară a capacității cognitive și reducerea funcționalității în raport cu activitățile cotidiene (AC – *activities of daily living, ADL*)⁸⁻¹². Un aparținător poate să observe ușor astfel de abilități. În

#Adresa pentru corespondență: Anne Rita Oksengraad, M.D., Research fellow University Unit, Department of Geriatric Medicine and Rehabilitation, Ullevaal Hospital, N-0407 Oslo, Norway.
Tel.: +47 22 1 18717/18703; Fax: +47 22 118701; E-mail: a.r.h.oksengard@ioks.uio.no

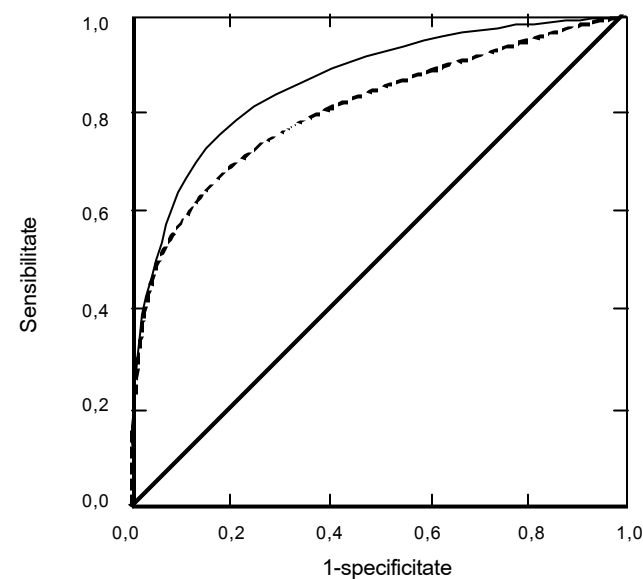


Figura 2. Curbele ROC pentru scorul total al setului de șase articole comparativ cu scorul total MMSE (linia întreruptă).

mit nivel²⁸. Studiul Oslo asupra prevalenței demenței condus de Engedal și Haugen a arătat că 60% dintre cei afectați de demență locuiesc în propria casă²⁹. Bateriile de teste neuropsihologice sunt recunoscute ca având capacitatea de a diferenția cazurile cu și fără demență cu o mare RP+, mai exact între 8 și 13^{30,31}. În studiul bine conceput de Tierny și colab.³¹, pacienții au fost urmăriti de medicii de familie ce au căutat semne de apariție a demenței, în timp ce în studiul condus de Incalzi și colab.³⁰ lotul nu a fost într-un total natural, întrucât unii

dintre participanți au fost pacienți spitalizați. O problemă majoră a bateriilor de teste neuropsihologice este că necesită personal special instruit și mult timp. Grut și colab. au arătat că MMSE, un instrument ușor de aplicat, are calități diagnostice convenabile pentru subiecții neselectați în vârstă de 75 de ani sau mai mult, atunci când valoarea-prag este stabilită la 23/24, obținând o eficacitate diagnostică similară setului nostru de șase articole, adică o RP+ de 4,4. Ritchie și colab.³³ au obținut o RP+ mai mare pentru MMSE cu valoarea-prag 23/24 (8,4) dar această

valoare pare influențată de modelul diagnostic, ei recrutând cazurile din instituții, unde prevalența demenței moderate sau severe este ridicată, comparându-le apoi cu persoane fără demență ce locuiau în comunitate. Mai mult, MMSE presupune un deficit de învățare semnificativ³⁴, testarea putând fi ofensatoare pentru subiecți. De aceea, ar trebui folosit doar de către persoane instruite, fiind astfel inadecvat pentru aparținătorii ce vor să evalueze cogniția bătrânilor.

Studiul de față a identificat șase articole din domeniul AC, comportamentului și cogniției, toate desprinse din instrumente anterior validate, ce au potențialul de a se constitui într-un instrument îndreptat spre identificarea bătrânilor cu probabilitate semnificativă de a fi diagnosticați cu deficit cognitiv într-o clinică specializată pentru tulburări de memorie. Spre deosebire de „Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly” (IQ-CODE)³⁵, ce notează de asemenea estimările unor intermediari privind modificările cognitive pe o durată de 10 ani, dar necesită cunoașterea îndelungată a persoanei, aceste șase articole pot fi completate de orice îngrijitor ce a observat subiectul în diferite situații ale activităților cotidiene. Am folosit date de la o clinică de memorie unde diagnosticul de deficit cognitiv se bazează pe consens clinic și criterii bine stabilite. Totuși, cei care au pus diagnosticul final nu au fost complet lipsiți de informațiile oferite de îngrijitorii în legătură cu scalele ce evaluează AC și comportamentul, existând astfel posibilitatea unui pleonasm diagnostic, cu influențarea valorilor sensibilității și specificității. Cu toate acestea, informațiile privind AC și comportamentului oferite de îngrijitorii sunt folosite doar într-o mică măsură atunci când diagnosticul este discutat de specialiștii clinicii destinate problemelor de memorie, și credem că influența lor este redusă. Pe de altă parte, nu am inclus datele colectate de la pacienții cu un scor total MMSE de ≤ 19 , excluzând astfel în mare măsură

Tabelul 2. Matricea de corelare pentru cele șase articole.

Articole	Reține lista de cumpărături	Își gestionează bunurile	Pare confuz	Inițiază conversații	Este activ
Își gestionează bunurile	0,60				
Pare confuz	0,52	0,80			
Inițiază conversații	0,44	0,66	0,70		
Este activ	0,63	0,85	0,80	0,67	
Știe care este data (zi/dată/lună/an)	0,46	0,73	0,62	0,55	0,73

Tabelul 3. Procentul de rezultate fals pozitive pentru scorul total al setului de șase articole, la o valoare-prag de la 4/5, pentru diferite rate ale prevalenței.

	Rata prevalenței					
	5%	10%	15%	20%	40%	60%
Fals pozitive	81%	67%	56%	48%	26%	13%

subiecții cu deficit moderat sau sever pentru care diagnosticul de demență este de obicei clar. Dacă ar fi fost incluse aceste cazuri, valorile pentru sensibilitate, specificitate și RP+ ar fi părut mai bune, dar valorile ar fi fost nerealiste în ceea ce privește deficitul cognitiv lejer, modalitatea uzuală de prezentare a cazurilor de demență incipientă în fața familiei și altor îngrijitori.

Calitățile unui test diagnostic depind în mare măsură de populația pe care este aplicat. Persoanele ce se adresează clinicilor destinate problemelor de memorie fără îndoială că nu sunt reprezentative pentru populația vârstnică generală, în ceea ce privește afecțiunile psihiatrice și medicale concomitente. S-a descoperit că problemele fizice, precum insuficiența cardiacă cronică, bronhopneumopatia cronică obstructivă, neoplaziile, diabetul zaharat și osteoporoza apar mai frecvent la persoanele cu status mental normal, ce primesc și mai multe medicamente decât bătrânii cu tulburări cognitive, dar fără probleme fizice³⁶. În contrast, în studiul încrucișat al lui Doraiswamy și colab.³⁷ prevalența afecțiunilor medicale concomitente la 679 pacienți cu boală Alzheimer cu demență moderată sau severă (MMSE mediu 11,8) a fost ridicată (61%), concluzionând că, în cazul pacienților cu BA, comorbiditățile și cogniția sunt strâns corelate. Setul de șase articole simple identificate de acest studiu se poate constitui într-un instrument diagnostic doar după validarea încrucișată pe un lot mai realist, adică bătrâni ce locuiesc în propria locuință, și un studiu de urmărire privind modificările încrederii și sensibilității.

Mulțumiri

Această lucrare a fost susținută printr-o bursă a *Norwegian Research Council*.

Bibliografie

- Ott A., Breteler M.M.B., van Harskamp F., Claus J.J., van der Cammen T.J.M., Grobbee D.E., Hoffman A., Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study. *BMJ* 1995; 310:970-73.
- Evans D.A., Funkenstein H.H., Albert M.S., Scherr P.A., Cook N.R., Chown M.J., Hebert L.E., Hennekens CH, Taylor JO. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA* 1989; 262: 2551-6.
- O'Connor D.W., P olitt P.A., Hyde J.B., Reiss B.B., Roth M., Do general practitioners miss dementia in elderly patients? *BMJ* 1988; 297:1107-10.
- Eefsting J.A., Boersma F., Van den Brink W., Van Tilburg W., Differences in prevalence of dementia based on community survey and general practitioner recognition. *Psychol Med* 1996; 26:1223-30.
- Peterson R.C., Stevens J.C., Ganguli M., Tangalos E.G., Cummings J.L., DeKosky S.T., Practice parameter: early detection of dementia: mild cognitive impairment (an evidence-based review). Report of the quality standards subcommittee of the American academy of neurology. *Neurology* 2001; 56: 1133-42.
- Wahlund L.O., Basun H., Waldemar N., in *Evidenced based dementia practice*, Quizilbash et al, pp.330-32, Blackwell Science Ltd, Oxford, 2000.
- Cummings J.L., Frank J.C., Cherr y D., Kohatsu N.D., Kemp B., Hewett L. et al., Guidelines for managing Alzheimer's disease. Part II. Treatment. *Am Fam Physician* 2002; 65: 2525-34.
- The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders. *Diagnostic criteria for research*. Geneva: WHO, 1999.
- The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders. *Clinical descriptions and diagnostic guidelines*. Geneva: WHO, 1992.
- Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 3rd ed rev: DSMIII- R. Washington, DC.: *American Psychiatric Association*, 1987.
- International Classification of Impairments, Disabilities and Handicaps. Geneva: WHO, 1980.

- Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition. *American Psychiatric Association*, Washington DC, 1994.
- Applegate W.B., Blass J.P., Williams T.F., Instruments for the functional assessment of older patients. *N Eng J Med* 1990; 322: 1207-14.
- Gauthier S. in *Evidenced based dementia practice*, Quizilbash et al, pp.101-5, Blackwell Science Ltd, Oxford, 2000.
- Pfeffer R.I., Kurosaki T.T., Harrah C.H., Chance J.M., Filos S., Measurements of functional activities in older adults in the community. *J Gerontology* 1982; 37: 323-29.
- Oksengaard A.R., Braekhus A., Engedal K., Laake K., The Set test as a diagnostic tool in elderly outpatients with suspected dementia. *Aging Clin Exp Res* 1995; 7: 398-401.
- Braekhus A., Oksengaard A.R., Engedal K., Laake K., Social and depressive stress suffered by spouses of patients with mild dementia. *Scand J Prim Health Care* 1998; 16: 242-6.
- Folstein M.F., Folstein S.E., McHugh P.R., „Mini-Mental State“. A practical method for grading cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975; 12: 189-98.
- Palmer K., Wang H.L.,Bäckman L., Winblad B., Fratiglioni L., Differential evolution of cognitive impairment in non-demented older persons: results from the Kungsholmen project. *Am J Psychiatry* 2002; 159: 436-442.
- Snaith R.P., Harrop F.M., Newby D.A., Teale C., Grade scores of the Montgomery- Usberg depression and clinical anxiety scales. *Br J Psychiat* 1986; 148: 599-601.
- Montgomery S.A., Usberg M., A new depression scale designed to be sensitive to change. *Br J Psychiatry* 1979; 134: 382-89.
- Linn M.W., Linn B.S., The rapid disability rating scale-2. RDRS-2. *J Am Geriatr Soc* 1982; 30: 378-82.
- Greene J.G., Smith R., Gardiner M., Timbury G.C., Measuring behavioural disturbance of the elderly demented patients in the community and its effects on the relatives: a factor analytic study. *Age Ageing* 1982; 11: 121-26.
- Roth M., Tym E., Mountjoy C.Q., Huppert F.A., Hendrie H., Verma S., Goddard R., CAMDEX. A standardised instrument for the diagnosis of mental disorder in the elderly with special reference to the early detection of dementia. *Br J Psychiatry* 1986; 149: 698-709.
- Kim J.O., Mueller C.W., *Factor analysis. Statistical methods and practical issues*. Series: Quantitative applications in the social sciences. 1978. Sage publications; Inc., California, USA.
- Everitt B.S., *Statistical methods for medical investigations*. 2. Rev.ed, 1994. Halsted Press, New York.
- Hosmer D., Lemeshow S., *Applied logistic regression*. Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics, John Wiley & Sons, 1989, USA.
- Matthews F.E., Dening T., Prevalence of dementia in institutional care. *Lancet* 2002; 360: 225-6.

29. Engedal K., Haugen P.K., The prevalence of dementia in a sample of elderly Norwegians. *Int J Ger Psychiatry* 1993; 40: 1139-45.
30. Incalzi R.A., Capparella O., Gemma A., Marra C., Carbonin P., Effects of aging and of Alzheimer's disease on verbal memory. *J Clin Exp Neuropsychol* 1995; 17: 580-9.
31. Tierny M.C., Szalai J.P., Snow W.G. et al., Prediction of probable Alzheimer's disease in memory impaired patients: a prospective longitudinal study. *Neurology* 1996; 46: 661-65.
32. Grut M., Fratiglioni L., Viitanen M., et al., Accuracy of the Mini- Mental Status Examination as a screening test for dementia in a Swedish elderly population. *Acta Neurol Scand* 1993; 87: 312-17.
33. Ritchie K., Fuhrer R., A comparative study of the performance of screening tests for senile dementia using operating characteristics analysis. *J Clinical Epidemiology* 1992; 45: 627-37.
34. Unger J.M., van Belle G., Heyman A., Cross-sectional versus longitudinal estimates of cognitive change in nondemented older people: a CERAD study. Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc* 1999; 47: 559-63.
35. Jorm A.F., Korten A.E., Assessment of cognitive decline in the elderly by informant interview. *Br J Psychiatry* 1988; 152:209-13.
36. Landi F., Onder G., Cattel C., Gambassi G., Lattanzio F., Cesari M. et al., Functional status and clinical correlates in cognitively impaired community-living older people. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2001; 14: 21-7.
37. Doraiswamy P.M., Leon J., Cummings J.L., Marin D., Neumann P., Prevalence and impact of medical comorbidity in Alzheimer's disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002; 57: M173-7.

Relația între factorii de risc vascular și caracteristicile plăcilor de aterom carotidiene la pacienții vârstnici

Milica Crisby^{1,2,#}, Jan Nilsson³

¹Department of Neurology, Huddinge University Hospital, Huddinge, Sweden

²Alzheimer Research Unit/Division of Experimental Geriatrics, Neurotec, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

³Department of Medicine, Malmo University Hospital, University of Lund, Sweden.

Rezumat

Obiective: Stenoza carotidiană este o cauză importantă a AVC-ului ischemic. Studii recente sugerează că unul dintre cele mai importante efecte ale statinelor hipolipemiante este stabilizarea plăcilor de aterom instabile. Totuși, rămâne de stabilit dacă acest efect este secundar scăderii concentrației plasmatice a colesterolului sau se datorează unui efect direct al statinelor asupra stabilității plăcilor de aterom.

Design și principalii parametri de eficacitate: În acest studiu am analizat dacă structura celulară a plăcii de aterom și frecvența fragmentării apoptotice a ADN sunt legate de nivelul colesterolului sau de principalii factori de risc pentru boala vasculară. Grupul de studiu a constat din 49 de pacienți supuși unei endarterectomii. Plăcile au fost colorate prin tehnici imunohistochimice și TUNEL și evaluate semicantitativ de către un observator ce nu cunoștea cazurile.

Rezultate: Locurile de fisură au conținut semnificativ mai multe celule TUNEL- pozitive și limfocite T, dar mai puține celule musculare netede decât zonele intacte ale învelișului fibros al plăcii. Ateroamele pacienților hipercolesterolemici s-au dovedit a avea mai puține celule TUNEL- pozitive, dar altfel, hipercolesterolemia, HLD-colesterolul scăzut, hipertensiunea arterială, diabetul zaharat și fumatul nu au influențat compoziția celulară a plăcii ateromatoase sau incidența celulelor TUNEL- pozitive.

Concluzii: Observațiile noastre sugerează că nu există asocieri între principalii factori de risc vascular și compoziția celulară a plăcii de aterom. În consecință, rezultatele acestui studiu susțin ideea că efectele statinelor se datorează unei acțiuni directe asupra structurii plăcii de aterom, mai degrabă decât a fi doar secundare scăderii nivelului colesterolului plasmatic.

Cuvinte cheie: ateroscleroză, fisura plăcii de aterom, hipercolesterolemie, inflamație, hipertensiune arterială, vârstnici

Introducere

Din analiza studiilor de intervenție cu hipolipemiante se desprinde concluzia că reducerea frecvenței evenimentelor cardiovasculare este mai mare decât efectul asupra dimensiunilor plăcii de aterom. Înseamnă că principalul efect al scăderii lipidelor serice interesează stabilitatea plăcii, mai mult decât regresia acesteia¹⁻³. Plăcile aterosclerotice instabile și fisurate sunt caracterizate de creșterea infiltratului celular bogat în

macrofage, prezența enzimelor ce degradează matricea și rare fibre musculare netede (FMN) în zona învelișului fibros⁴⁻⁶. Studii ce au utilizat tehnici TUNEL pentru marcarea celulelor cu fragmentare ADN sugerează că moartea celulară are loc prin apoptoză la nivelul celulelor din plăcile aterosclerotice umane⁷⁻¹⁰. Factorii responsabili pentru inducerea leziunilor ADN și activității inflamatorii în leziunile aterosclerotice rămân incomplet elucidați. În culturi celulare, FMN expuse la INF- γ ,

TNF- α și IL- β suferă moarte celulară prin apoptoză¹¹. Lipoproteinele cu densitate mică (LDL) oxidate și produșii generați în timpul alterărilor oxidative ale LDL, cum sunt oxisterolii, au fost de asemenea implicați în apoptoza FMN¹²⁻¹⁴.

Inducerea hipercolesterolemiei la animale produce activarea exprimării moleculelor de adeziune endoteliale și infiltrat leucocitar intimal¹⁵. Dacă lipidele influențează activitatea inflamatorie și în leziunile mai avansate, și în particular în

#Adresa pentru corespondență: Milica Crisby MD, PhD, Alzheimer Research Unit/Division of Experimental Geriatrics, B 56, Huddinge University Hospital, Neurotec, Karolinska Institute, 141 86 Stockholm, Sweden, Tel: +46 8 58586437, Fax: + 46 8 58585410, Email: Milica.Crisby@neurotec.ki.se

degradarea inflamatorie a învelișului fibros ce precede ruptura plăcii, rămâne de stabilit. Dovezi experimentale sugerează că particulele de LDL ce suferă modificări oxidative în matricea extracelulară vasculară pot fi implicate în inflamația vasculară indusă de lipide¹⁶⁻¹⁸. LDL oxidate sunt citotoxice pentru celulele endoteliale și FMN în cultură¹⁹, cresc interacțiunile endotelio-leucocit^{20,21} și influențează producția de citokine²¹.

Am arătat recent că tratamentul cu pravastatin scade activitatea inflamatorie și crește viabilitatea celulară și conținutul de collagen în plăcile aterosclerotice umane²². Scopul acestui studiu a fost să determine dacă există o asocieră între factorii de risc vascular precum LDL-colesterolul crescut, HDL-colesterolul scăzut, fumatul, diabetul zaharat și hipertensiunea arterială și markerii inflamatori și ai leziunilor celulare din placă. Studiul a inclus evaluarea factorilor de risc precum și analiză imunohistochimică și TUNEL a plăcilor aterosclerotice de la 49 de pacienți supuși intervenției chirurgicale pentru stenoza carotidiană de grad înalt simptomatică.

Metodă

Subiecții

În acest studiu au fost incluși patruzeci și nouă de pacienți cu stenoza de arteră carotidă simptomatică (AIT emisferice, amauroză fugace sau AVC minor în ultimele 6 luni) cu reducere $\geq 70\%$ a diametrului lumenului vascular conform măsurătorilor prin angiografie carotidiană (criteriile NASCET)²³ supuși endarterectomiei carotidiene la 3-6 luni după evenimentul acut. Factorii de risc analizați au fost hipertensiunea arterială (folosirea curentă sau anterioară a medicamentelor antihipertensive și/sau TA $\geq 160/95$ mmHg), diabetul zaharat (tratată cu antidiabetice orale și/sau insulină sau sub regim de diabet) și istoricul referitor la fumat (nefumător, fost fumător sau actual fumător).

Prepararea pieselor

O porțiune din fiecare specimen rezultat din endarterectomie a fost imediat congelată rapid în azot lichid și depozitată la -70°C . Partea rămasă a fost fixată în formaldehidă 4%/1 μM EDTA. Piesele au fost tăiate în secțiuni de 14 μm grosime la criostat și depozitate la -20°C . Secțiunile tisulare proaspăt congelate au fost fixate în acetona timp de 20 minute înainte de depozitare.

Probele de sânge și analizele de laborator

Probele de sânge au fost prelevate după 12 ore de post. Sângele venos a fost recoltat în tuburi de tip vacutainer, lăsat 30 min. la temperatura camerei și centrifugat la 1400x g timp de 20 min. la temperatura camerei. Concentrațiile de colesterol și trigliceride *à jeun* au fost măsurate prin tehnici enzimatică (metoda enzimatică Fully; Hitachi 917, Naka Japonia). HDL-colesterolul a fost de asemenea măsurat prin tehnica enzimatică directă (Hitachi 917, Naka Japonia). LDL-colesterolul a fost calculat folosind formula lui Friedewald.

TUNEL

Analiza TUNEL s-a efectuat folosind kit-ul de detecție *in situ* Apoptag (Oncor) pe specimene atât fixate în formaldehidă cât și înghețate. Secțiunile au fost pretratate în 20 $\mu\text{g/ml}$ proteinkinază K timp de 20 min., spălate în 1 μM EDTA în PBS timp de 5 min. și apoi incubate în soluția TdT-enzimă timp de 2 ore la 37°C . Reacția a fost detectată cu anti-digoxigenină conjugată cu peroxidază (la temperatura camerei, 20 minute) și vizualizată cu DAB (diaminobenzidină) urmată de contracolorarea cu hematoxilina-eozină. Secțiunile martor au fost incubate doar în PBS.

Imunohistochimie

Secțiunile proaspete înghețate și/sau fixate în formaldehidă au fost spălate timp de 2x5 minute în PBS. Peroxidaza endogenă a fost neutra-

lizată cu H_2O_2 în metanol timp de 30 min. urmată de clătire în PBS timp de 20 minute. Secțiunile au fost apoi introduse în ser normal de cal timp de 20 minute și clătite cu PBS timp de 10 minute. Secțiunile au fost ulterior acoperite cu următorii anticorpi primari: CD6 și CD3 pentru limfocite T (Dako, 1:50), CD68 pentru macrofage (Dako, 1:50) și HHF-35 pentru FMN (Dako, 1:50-1:100). Secțiunile martor au fost incubate doar cu un anticorp primar irelevant sau PBS. Secțiunile au fost apoi incubate cu IgG biotilate anti-soarece ca anticorp secundar timp de 30 minute, spălate cu PBS 10 minute și colorate cu avidin-biotină timp de 30 minute. Secțiunile au fost expuse la DAB timp de 2 minute și contracolorate în verde metil și/sau hematoxilina-eozină.

Incidența celulelor ce prezentau imunoreactivitate pozitivă pentru TUNEL, limfocitelor T, macrofagelor și FMN a fost evaluată de către un observator ce nu cunoștea originea probelor conform unei versiuni modificate a tehnicii descrise de Galis și colab.²⁴ Colorația pozitivă constantă ce cuprindea peste 50% din celulele din placă a fost notată cu (4), colorația pozitivă a 20-50% din celule cu (3), colorația pozitivă a 5-20% din celule cu (2), colorația pozitivă a 1-5% din celule cu (1) și colorația a mai puțin de 1% din celule cu (0). Pentru analiză a fost folosită o singură secțiune de la fiecare pacient.

Analiza statistică

Testele statistice au fost efectuate utilizând programul JMP (SAS Institute Inc.). Valorile sunt exprimate ca medie și deviație standard. Au fost folosite testul-t Student sau ANOVA pentru a studia diferențele pentru variabile continue între grupuri.

Rezultate

Au fost analizate plăci carotidiene provenite de la 49 pacienți supuși endarterectomiei datorită stenozei ipsilaterale simptomatice de grad înalt; am urmărit prezența fragmen-

tării ADN evaluată prin TUNEL și conținutul de macrofage, limfocite T și FMN evaluat prin imunohistochimie. Înainte de endarterectomie au fost determinate trigliceridele, LDL- și HDL-colesterolul. Vârsta medie a pacienților a fost de $70,9 \pm 7,1$ ani. Valorile medii pentru colesterol, LDL-colesterol, HDL-colesterol și trigliceride serice au fost de $6,39 \pm 0,97$ mmol/L, $4,25 \pm 0,96$ mmol/L, $1,27 \pm 0,41$ și, respectiv, $1,96 \pm 0,70$ mmol/L.

Caracteristicile morfologice și imunohistochemice ale plăcilor de aterom

Trombi organizați au putut fi observați macroscopic la nivelul tuturor specimenelor de endarterectomie. Suprafața plăcilor era fisurată și foarte neregulată. Plăcile conțineau zone de depozit lipidic, calcificări și detritus necrotic. Examinarea histologică a plăcilor a relevat depozite de calciu, hemoragii în placă, necroză și ruptura plăcii ca trăsături proeminente ale majorității plăcilor.

Celule ce conțineau fragmentare ADN evaluată prin colorație TUNEL au fost identificate la 45 dintre cele 49 de specimene. Scorul TUNEL mediu pentru toate leziunile a fost $1,85 \pm 1,1$. Celulele TUNEL pozitive au fost găsite în toate zonele plăcilor, dar incidența lor maximă a fost regiunea umărului capsulei fibroase și zona adiacentă ariilor necrotice. În arii similare au fost adesea observate semne de fisură a plăcii, cu tromb organizat. Toate plăcile conțineau celule pozitive pentru α -actină FMN (HHF 35) cu un scor mediu de $2,35 \pm 0,93$. Secțiuni paralele colorate pentru FMN α -actină și TUNEL sugerau că majoritatea celulelor cu leziuni ale ADN au fost FMN. Totuși, prezența pozitivității pentru TUNEL a fost conservată de asemenea și la macrofage și ariile bogate în limfocite T. Limfocitele prezente în trombi organizați erau în general TUNEL- pozitive. Scorurile medii pentru colorația pentru limfocite T și macrofage au fost de $1,94 \pm 0,97$ și, respectiv, $1,94 \pm 0,92$. După cum a fost raportat și anterior,

tesutul arterial normal nu conținea celule TUNEL- pozitive⁹.

Diferențe în fragmentarea ADN și compoziția celulară între regiunile fisurate și cele intacte ale învelișului fibros

În 26 dintre cele 49 de leziuni au putut fi identificate regiuni cu fisuri (rupturi) distincte. Aceste leziuni erau formate din material trombotic acoperit de resturi de înveliș rupte (rupturile) sau un înveliș fibros foarte subțire (fisurile). Scorurile TUNEL și de imunoreactivitate celulară specifică în zonele cu ruptură comparativ cu cele morfologic intacte au demonstrat că celulele TUNEL- pozitive și limfocitele T sunt mai frecvente în locurile cu fisură/ruptură decât în țesutul intact (Figura 1). În contrast, erau mai puține celule pozitive pentru α -actină în locurile cu fisură/ruptură decât în țesutul intact (Figura 1), sugerând că ruptura este asociată cu o scădere a numărului de FMN. Mai multe studii anterioare au arătat că rata infiltrării cu macrofage este crescută în zonele cu ruptură^{5,25}. O

tendență similară a fost observată și în acest studiu, dar în baza sistemului de evaluare folosit nu a atins niveluri care să-i confere semnificație.

Relația între fragmentarea ADN în celulele din placă, compoziția celulară, nivelul lipoproteinelor serice și alți factori de risc cardiovascular

Plăcile provenite de la pacienții cu o concentrație a colesterolului plasmatic total peste 6,5 mmol/L sau un LDL-colesterol peste 4,5 mmol/L s-au dovedit a conține mai puține celule TUNEL- pozitive decât ateroamele de la pacienții cu niveluri mai scăzute ale colesterolului, în timp ce între HDL-colesterol și numărul celulelor TUNEL- pozitive din placă nu s-a descoperit nici o asociație (Tabelul 1). Nivelurile colesterolului plasmatic total, LDL-colesterolului și HDL-colesterolului nu au influențat conținutul de macrofage, limfocite T și fibre musculare netede din placă, evaluat imunohistochimic. Mai mult, compoziția celulară a plăcii și viabilitatea

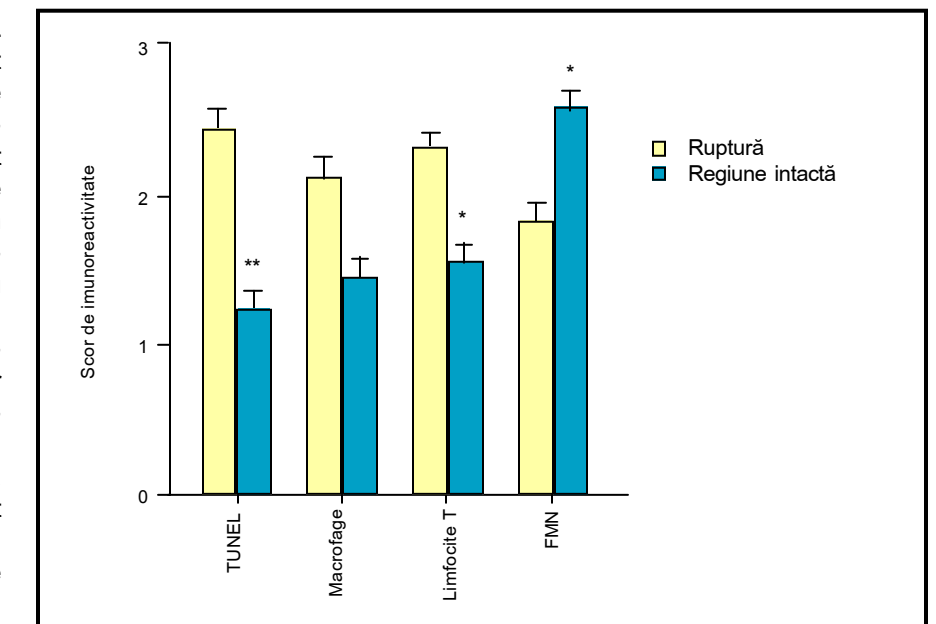


Figura 1. Comparatie a coloratiilor TUNEL, macrofage, limfocitelor T și FMN în regiuni fisurate și intacte ale învelișului fibros. Incidența celulelor ce prezentau colorație pozitivă a fost evaluată conform unei versiuni modificate a tehnicii descrise de Galis și colab.²² Colorația pozitivă constantă ce cuprindea peste 50% din celulele din placă a fost notată cu (4), colorația pozitivă a 20-50% din celule cu (3), colorația pozitivă a 5-20% din celule cu (2), colorația pozitivă a 1-5% din celule cu (1) și colorația a mai puțin de 1% din celule cu (0). * $p < 0,05$, ** $p < 0,0001$.

Tabelul 1. Efectele colesterolului plasmatic total, LDL- și HDL-colesterolului asupra compoziției celulare a plăcii de aterom și fragmentării ADN (TUNEL).

	TUNEL	FMN	Limfocite T	Macrofage
Colesterol plasmatic total				
=6,5 mmol/L (n=20)	1,35±0,18	2,25±0,16	2,10±0,23	1,95±0,20
<6,5 mmol/L (n=29)	2,21±0,21*	2,42±0,20	1,83±0,17	1,93±0,18
LDL-colesterol				
=4,5 mmol/L (n=17)	1,29±0,21	2,29±0,19	2,06±0,28	2,18±0,17
<4,5 mmol/L (n=25)	2,22±0,23*	2,57±0,22	2,00±0,15	1,74±0,21
HDL-colesterol				
=1,3 mmol/L (n=18)	1,78±0,29	2,28±0,21	2,17±0,20	1,78±0,21
<1,3 mmol/L (n=24)	1,92±0,22	2,50±0,20	1,83±0,21	1,92±0,19

Incidența celulelor imunoreactivitate pozitiv pentru TUNEL sau a limfocitelor T, macrofagelor și a FMN a fost evaluată de un observator ce nu cunoștea proveniența probelor, conform unei versiuni modificate a tehnicii descrise de Galis și colab.²² Colorația pozitivă constantă ce cuprindea peste 50% din celulele din placă a fost notată cu (4), colorația pozitivă a 20-50% din celule cu (3), colorația pozitivă a 5-20% din celule cu (2), colorația pozitivă a 1-5% din celule cu (1) și colorația a mai puțin de 1% din celule cu (0). Valorile LDL- și HDL-colesterolului au fost disponibile pentru 42 dintre pacienți. Rezultatele sunt prezentate ca scor mediu ± eroare standard. *p<0,01.

acestor celule nu au fost afectate de prezența hipertensiunii arteriale, diabetului zaharat sau fumăturii (Tabelul 2).

Din cei 49 pacienți incluși în prezentul studiu, 6 erau sub tratament cu simvastatin. Anterior s-a arătat că tratamentul cu pravastatin crește viabilitatea celulelor plăcii de aterom și conținutul său de collagen și reduce intensitatea procesului inflamator de la nivelul plăcii²². Tendințe similare au fost observate și în acest studiu, obținând colorații

mai scăzute pentru celule TUNEL- pozitive (1,33±0,45 față de 1,93±0,17), macrofage (1,50±0,37 față de 2,00±0,14) și limfocite T (1,67±0,40 față de 1,98±0,15) pentru plăcile provenite de la pacienți tratați cu statine.

Discuții

Compoziția celulară a plăcilor aterosclerotice în diferite stadii de dezvoltare a fost caracterizată cu acuratețe. Aceste studii au demon-

strat, de asemenea, că destabilizarea capsulei fibroase ce precede ruptura plăcilor de aterom coronariene este asociată cu o intensificare a morții celulare și creșterea infiltrării cu celule inflamatorii^{4,25}. Rezultatele studiilor actuale referitoare la plăcile de aterom carotidiene la om sunt concordante cu aceste studii. Totuși, există puține informații despre modul în care diverși factori de risc afectează compoziția celulară, activitatea inflamatorie și viabilitatea celulelor de la nivelul plăcilor aterosclerotice umane la pacienții vârstnici. Observațiile noastre demonstrează că plăcile aterosclerotice rupte de la subiecți cu diferiți factori de risc au o compoziție celulară și structură foarte asemănătoare. Prezența diabetului zaharat, hipertensiunii arteriale și fumăturii nu au influențat activitatea inflamatorie din placă sau viabilitatea celulară evaluată prin tehnica TUNEL.

Plăcile ateromatoase provenite de la pacienți cu hipercolesterolemie prezentau semne de activitate inflamatorie similare plăcilor de la subiecți cu nivel al colesterolului total sau LDL scăzut sau moderat crescut. Nici HDL-colesterolul nu a influențat activitatea inflamatorie la nivelul plăcii. Absența unei relații între nivelul LDL-colesterolului plasmatic și activitatea inflamatorie în placă este interesantă raportat la studii recente ce au demonstrat că tratamentul cu statine hipolipemice are ca rezultat reducerea conținutului de celule inflamatorii în placă și creșterea exprimării inhibitorilor matrix-proteinazelor²².

Dovezi independente sugerează că efectul benefic al statinelor în bolile cardiovasculare se datorează mai degrabă stabilizării plăcii de aterom decât regresiei acesteia²⁶. Totuși, rămâne de elucidat dacă efectul asupra stabilității plăcii se datorează unei acțiuni directe asupra plăcii sau este secundar scăderii nivelurilor plasmatice de colesterol. Studii experimentale ce au demonstrat că statinele inhibă răspunsul limfocitelor T²⁷, reduc exprimarea receptorilor HLA-DR pe

celulele prezentatoare de antigen²⁸ și reduc sinteza chemokinelor în celulele mononucleare din sângele periferic²⁹ sugerează că statinele au și un efect antiinflamator direct. Efectele antiinflamatorii ale statinelor sunt mediate primar printr-o inhibiție a sintezei mevalonatului²⁷⁻²⁹ dar studii recente au identificat și o integrină de atașare a statinelor ce mediază inhibiția antigenului funcțional leucocitar-1³⁰. Nivelurile plasmatice crescute ale markerilor inflamatori, precum proteina-C reactivă (PCR) sunt predictorii independenți pentru riscul de apariție a bolilor cardiovasculare³¹. S-a arătat că terapia cu statine reduce nivelul PCR iar această reducere este independentă de efectul asupra nivelului LDL-colesterolului³². Mai mult, statinele reduc riscul de apariție a evenimentelor cardiovasculare în special la subiecții cu semne de activitate inflamatorie crescută³³. Privite în ansamblu, aceste date sugerează că statinele au un efect antiinflamator asupra plăcilor aterosclerotice ce este independent de efectul asupra nivelului LDL-colesterolului. Datele de față oferă de asemenea și o oarecare susținere indirectă a acestei teorii. Dacă scăderea activității inflamatorii în placă este secundară reducerii nivelurilor plasmatice de colesterol, ar fi de asemenea de așteptat o asociere între LDL-colesterol și cantitatea de celule inflamatorii din placă. Studiile noastre nu susțin existența unei astfel de asocieri. În contrast, semne de scădere a activității inflamatorii au fost găsite la micul subgrup de pacienți tratați cu statine prezent în studiu.

Prezența semnelor de intensificare a morții celulare, evaluate prin colorație TUNEL, la pacienții cu niveluri scăzute de colesterol a fost singura asociere semnificativă între factorii de risc vascular și caracteristicile plăcii observată în prezentul studiu. Această descoperire a fost neașteptată deoarece mai multe studii experimentale sugerează că acumularea de lipide este o cauză importantă de moarte celulară în

placa aterosclerotică^{13,19}. Doar doi pacienți din grupul cu nivel scăzut de colesterol erau sub tratament cu statine, sugerând că rata scăzută de moarte celulară în placă în acest grup nu a fost un efect al statinelor.

Mulțumiri

Acest studiu a fost susținut prin burse din partea *Swedish Medical Research Council (8311), The Swedish Heart and Lung Foundation, King Gustaf V Birthday Fund, Professor Nanna Svartz' Fund, King Gustaf V and Queen Victoria Foundation, Council for Medical Tobacco Research, Swedish Match, Loo and Osterman Foundation, Swedish Stroke Foundation, Swedish Hjärnfonden and SALUS 60th Jubileum Fund.*

Bibliografie

- Ericsson C.G., Hamsten A., Nilsson J., Grip L., Svane B., de Faire U., Angiographic assessment of the effects of bezafibrate on progression of coronary artery disease in young male postinfarction patients. *Lancet*. 1996; 347: 849-853.
- Kinlay S., Selwyn A.P., Delagrang D., Creager M.A., Libby P., Ganz P., Biological mechanisms for the clinical success of lipid-lowering in coronary artery disease and the use of surrogate end-points. *Curr Opin Lipidol*. 1996; 7: 389-97.
- Watts G., Burke V., Lipid-lowering trials in the primary and secondary prevention of coronary heart disease: new evidence, implications and outstanding issues. *Current opinion in Lipidology*. 1996; 7: 341-355.
- Falk A., Why do plaques rupture? *Circulation*. 1992; 86: III30-III42.
- van der Wal A.C., Becker A.E., van der Loos C.M., Das P.K., Site of intimal rupture or erosion of thrombotic coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*. 1994; 89: 36-44.
- Libby P., Geng Y.J., Aikawa M., Schoenbeck U., Mach F., Clinton S.K., et al., Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol*. 1996; 7: 330-5.
- Isner M.J., Kearney M., Bortman S., Passeri J., Apoptosis in Human Atherosclerosis and Restenosis. *Circulation*. 1995; 91: 2703-2711.
- Bennett R., Martin G., Evan I., Schwartz M.S., Apoptosis in human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *Journal of Clinical Investigation*. 1995; 95: 2266-2274.
- Crisby M., Kallin B., Thyberg J., Zhivotovsky B., Orrenius S., Kostulas V., Nilsson J., Cell death in atherosclerotic plaques involves both oncosis and apoptosis. *Atherosclerosis*. 1997; 130: 17-27.

- Kockx M., De Meyer G., Muhring J., Jacob W., Bult H., Herman A., Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1998; 97: 2307-2315.
- Geng Y.J., Wu Q., Muszynski M., Hansson G.K., Libby P., Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 1996; 16: 19-27.
- Björkerud B., Björkerud S., Contrary effects of lightly and strongly oxidized LDL with potent promotion of growth versus apoptosis on arterial smooth muscle cells, macrophages and fibroblasts. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 1996; 16: 416-424.
- Jovinge S., Crisby M., Thyberg J., Nilsson J., DNA fragmentation and ultrastructural changes of degenerating cells in atherosclerotic lesions and smooth muscle cells exposed to oxidized LDL in vitro. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 1997; 17: 2225-2231.
- Ares M., Pörn-Ares I., Thyberg J., Juntti-Berggren L., Berggren P.O., Diczfalusy U., et al., Ca²⁺ channel blockers verapamil and nifedipine inhibit apoptosis induced by 25-hydroxycholesterol in human aortic smooth muscle cells. *Journal of Lipid Research*. 1997; 38: 2049-2061.
- Cybalsky M., Gimbrone M., Endothelial expression of a mononuclear adhesion molecule during atherogenesis. *Science*. 1991; 251: 788-791.
- Regnström J., Nilsson J., Lipid oxidation and inflammation-induced intimal fibrosis in coronary heart disease. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1994; 124: 162-168.
- Berliner J., Navab M., Fogelman A., Frank J., Demer L., Edwards P., et al., Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation and genetics. *Journal of Clinical Investigation*. 1995; 91: 2488-2496.
- Glass C.K., Witztum J.L., Atherosclerosis: The Road Ahead. *Cell*. 2001; 104: 503-516.
- Chisholm G., Cytotoxicity of oxidized lipoproteins. *Current Opinion in Lipidology*. 1991; 2:311-316.
- Berliner J.A., Territo M.C., Sevanian A., Ramin S., Kim J.A., Bamshad B., et al., Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *Journal of Clinical Investigation*. 1990; 85: 1260-1266.
- Frostegård J., Haegerstrand A., Gidlund M., Nilsson J., Biologically modified LDL increases the adhesive properties of endothelial cells. *Atherosclerosis*. 1991; 90: 119-126.
- Crisby M., Nordin-Fredriksson G., Shah P.K., Yano J., Zhu J., Nilsson J., Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation*. 2001; 103: 926-33.
- COLLABORATORS NASCET. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high grade carotid stenosis. *New England Journal of Medicine*. 1991; 325: 445-453.

24. Galis Z.S., Sukhova G.K., Lark M.W., Libby P., Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *Journal of Clinical Investigation*. 1994; 94: 2493-2503.
25. Libby P., Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 1995; 91: 2844-50.
26. Libby P., Aikawa M., New insights into plaque stabilisation by lipid lowering. *Drugs*. 1998; 56: 9-13; discussion 33.
27. Kurakata S., Kada M., Shimada Y., Komai T., Nomoto K., Effects of different inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMGCoA) reductase, pravastatin sodium and simvastatin, on sterol synthesis and immunological functions in human lymphocytes in vitro. *Immunopharmacology*. 1996; 34: 51-61.
28. Kwak B., Mulhaupt F., Myit S., Mach F., Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med*. 2000; 6: 1399-402.
29. Romano M., Diomedede L., Sironi M., Massimiliano L., Sottocorno M., Polentarutti N., et al., Inhibition of monocyte chemotactic protein-1 synthesis by statins. *Lab Invest*. 2000; 80: 1095-100.
30. Weitz-Schmidt G., Welzenbach K., Brinkmann V., Kamata T., Kallen J., Bruns C., et al., Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med*. 2001; 7: 687-92.
31. Rifai N., Ridker P.M., High-sensitivity C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease. *Clin Chem*. 2001; 47: 403-11.
32. Albert M.A., Danielson E., Rifai N., Ridker P.M., Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *JAMA*. 2001; 286: 64-70.
33. Ridker P., Cushman M., Stampfer M., Tracy R., Hennekens C., Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *New England Journal of Medicine*. 1997; 336: 973-979.

Tiroidită atrofică autoimună la o pacientă cu demență vasculară

Ioana Ioancio¹, Luiza Spiru¹, I. Gh. Totoianu²

¹Spitalul Clinic de Urgență ELIAS București

²Facultatea de Medicină „Victor Papiian” Sibiu.

Rezumat

Scopul prezentării acestui caz de către autori a fost determinat de raritatea publicării în literatura de specialitate a rolului patologiei tiroidiene în determinismul bolilor de memorie. Este prezentat cazul unei paciente vârstnice cu antecedente de boala tiroidiană autoimună care a dezvoltat în timp o demență probabilă de tip mixt - vasculară și degenerativă. Diagnosticul geriatric complet a permis conduita terapeutică a pacientei studiate.

Cuvinte cheie: tiroidita atrofică autoimună, demență, evaluare gerontoneuropsihiatrică.

Introducere

În Europa, aproximativ 3,5 milioane de oameni suferă de demență și în jur de 850 000 vor dezvolta demență în decurs de un an. Cea mai frecventă cauză de demență - 60% - este reprezentată de boala Alzheimer^{10,11,12}. Afecțiunile tiroidiene, și în mod special hipotiroidismul pot culmina cu forme de demență reversibilă în condițiile depistării precoce și a unui tratament de substituție aplicat adecvat. Întrepătrunderea unei patologii tiroidiene cu o demență probabilă de tip Alzheimer deschide calea evoluției spre o demență mai degrabă de tip mixt - degenerativă și vasculară - dat fiind asocierea frecventă a fenomenelor de ateromatoza sistemică la bolnavii cu suferințe vechi ale tiroidei. Bolnavii cu demență mixtă pot beneficia de un tratament combinat în vederea recuperării deficitului cognitiv.

Prezentare de caz

În stabilirea diagnosticului pozitiv al demenței, autorii au aplicat următorul **ALGORITM:**

1. Anamneză și istoric

Pacienta M.F., 77 ani, din mediul urban, s-a prezentat la Clinica de Geriatrie și Gerontologie din cadrul Spitalului Clinic de Urgență Elias pentru tulburări de memorie de aproximativ un an, dezorientare tempor-spațială, allo și autopsihică, căderi repetate, mers dificil, dispnee la eforturi mici, oscilații mari ale valorilor tensionale, constipație, fatigabilitate marcată, un episod de halucinații vizuale, agresivitate verbală față de cei din anturaj.

Antecedente personale fiziologice - prima menstruație la 15 ani, nașteri 2, avorturi 30.

Antecedente personale patologice - stres familial cronic, episoade depresive repetate (1985), histerectomie subtotală pentru fibrom uterin (1970), hipertensiune arterială esențială tratată (1990), zona Zoster oftalmic și nevralgie de nerv trigemen drept (1997), accident ischemic tranzitor (2002), accident vascular cerebral ischemic parietal drept profund cu hemipareză stângă (2003), abuz de medicamente: Tramal, Lexotanil, Stilnox, alergie la Carbamazepină.

Istoricul bolii

Boala a debutat insidios, cu o evoluție progresivă a tulburărilor de memorie remarcate de aparținătorii în ultimul an, cu afectare a calcului, a judecății. După accidentul vascular cerebral ischemic din 2003 recuperat din punct de vedere al deficitului motor, bolnava a prezentat căderi repetate fără pierderea conștienței, ultima în urmă cu o lună, amețeli posturale, mers dificil, inversarea ritmului somn - veghe 50%, insomnie de adormire. Bolnava și-a restrâns activitățile gospodărești, ne mai ieșind din casă de 6 luni. A prezentat în ultima lună un episod de halucinații vizuale. Aparținătorii relatează existența unei agresivități verbale față de una dintre fiice, idei delirante legate de hoți. Valorile tensionale au prezentat oscilații mari în ultimele luni, în ciuda triplei asocieri medicamentoase. Fără documente medicale de susținere, aparținătorii descriu existența unei afecțiuni tiroidiene în antecedentele bolnavei pentru care primește tratament de substituție hormonală. Nu are dozări recente ale hormonilor tiroidiene.

2. Examinare clinică / somatică

Facies plâns, depresiv. Tegumente palide, uscate, descumate. Troficitate bună, turgor lenș, edeme palpebrale bilaterale dreapta > stânga, edeme discrete pretibiale. Dureri în articulația scapulo - humerală dreaptă la mobilizare activă și pasivă. Hipertonie musculară segmentară. Normotroficitate musculară. Dispnee la eforturi mici și nocturnă, TA: 180/ 100 mmHg, AV: 68 / min, ritmic, fără sufluri, puls diminuat la ambele artere pedioase. Torace în butoi, expir prelungit, fără raluri. Limbă uscată, depapilată, edentație totală. Abdomen suplu, elastic, de asupra planului xifopubian, neduros la palpare, cicatrice suplă mediană inferioară. Incontinență urinară la stress post ruptură veche de perineu.

Examenul neurologic: ptoză palpebrală dreaptă, fantă palpabilă îngustă, nevralgie de nerv trigemen drept, ROT abolite global, proba indice - nas pozitivă bilateral. Deficit auditiv bilateral. Deficit vizual. AO - glaucom cu unghi deschis și cataractă senilă incipientă. OD - keratită virală, ulceratie tegumentară în unghiul supero-intern.

Tiroidă: la inspecția regiunii cervicale anterioare inferioare nu se decelează modificări patologice. La palpare glandă tiroidă de formă și consistență normală, mobilizabilă cranio-caudal la mișcările de deglutiție, contur regulat, nedureroasă, fără noduli limfatici palpabili, fără sufluri auscultatorice.

3. Evaluare geriatrică standardizată

MMSE (*Mini Mental Status Examination*) (variante GRECO) = 13/27 (deficit motor - prin luxație scapulo-humerală)
Testul orologiului = 0/10^{3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13}
Evaluarea activității vieții cotidiene^{3,4,5,6,7,10,11,12}

Activities of Daily Living = 6/6.

Instrumental Activities of Daily Living = 2/8

Scara Depresiei Geriatrice Yesavage (GDS) versiune prescurtată = 9/15^{3,4,5,6,7,10,11,12}

Evaluarea echilibrului static și dinamic în timpul mersului^{3,4,5,6,7,10,11,12}

Tinetti static = 33,

Tinetti dinamic = 18

Evaluarea stării nutriționale (*Mini Nutritional Assessment*) = 17,5/30^{3,4,5,6,7,10,11,12}

Risc de escare (Norton) <14 riscant^{3,4,5,6,7,10,11,12}

Evaluarea greutatei: Greutate = 90 kg, înălțime = 1,50 m, IMC: 41 kg/m².

Riscul insuficienței renale acute - calculat prin clearance-ul creatininei = 120 ml/min^{3,4,5,6,7,10,11,12}.

Tabelul 1. Rezumat al evaluării gerontologice standardizate.^{10,11,12}

Motivul spitalizării	Tulburări de memorie de 1 an, căderi repetate, ameteli posturale, dezorientare temporo-spațială, halucinații, agresivitate verbală
Mod de viață anterior	La domiciliu
Funcții sfincteriene	Păstrate, incontinență urinară la stres
Status nutrițional M.N.A. >17 malnutriție M.N.A. de la 17 la 23,5 riscant M.N.A. >23,3 normal	Aport alimentar: Albumina: 54,2% Greutate: 66 kg M.N.A.: 17,5 / 30
Căderi	Repetate f.p.c.
Capacitatea de a păstra poziția unipodală	Nu are
Tulburări de mers	Da, cu ameteli posturale
Dureri	Articulația scapulo-humerală dreaptă
Tulburări de comportament	Agresivitate verbală față de fiică
Evaluarea umorului	Nu are, depresivă
Autonomie A.D.L. A.D.L. 6/6 - autonomie	A.D.L. 6 /6 I.A.D.L. 2 /8
Funcții cognitive (măsurate prin M.M.S.E 27 până la 30 este normal)	M.M.S.E. 13 / 27
Bilanț biologic	Din buletinul de analize
Risc de escare (Norton) >14 risc scăzut <14 riscant	< 14
Evaluare senzorială	Dentară: proteză dentară Optică: AO glaucom, cataractă Auditivă: hipoacuzie

4. Psihometrie

MMSE, testul orologiului, ADAS-cog (a se vedea mai jos).

5. Analize de laborator

Hemoleucogramă cu frotiu-normală VSH-normal

Teste functionale tiroidiene - hTSH = 47,483 uIU/ml, anticorpi antimicrosomali AcM și anticorpi antitireoglobulinici AcTg intens pozitivi

Ionogramă serică: normală

Glucoză serică: 180 mg/dl

Creatinină: 0,4 mg/dl

Teste de disproteinemie - albumina: 54,2%. TGO, TGP - normale.

Testul HIV - negativ.

Alte analize de laborator realizate pentru excluderea altor boli ce pot asocia demențe: hipotiroidism, hipercalcemia, hipoglicemia, deficiențe nutriționale (acid folic și vitamina B₁₂), afecțiuni hepatice și renale, boli infecțioase.

Teste suplimentare cu indicații precise: test serologic pentru sifilis, HIV (nu au fost necesare în acest caz), EEG - fără modificări, dozarea foliaților eritrocitari - neefectuat din motive tehnice.

7. Evaluarea neuro-imagistică

Tomodensitometrie cerebrală - atrofie corticală (aprilie 2004)

8. Evaluarea activităților instrumentale

IADL = 2/8, ADL = 6/6.

9. Evaluarea tulburărilor comportamentale

NPI = 170^{10,11,12}

10. Evaluarea cognitivă complexă

AD-ADAS-cog: 25/70^{10,11,12}

11. Evaluarea îngrijitorului

Scor Zarit: 76^{10,11,12}

12. Medicația curentă

Blocant de enzimă de conversie, diuretic de ansă, beta-blocant, substituție hormonală tiroidiană.

Diagnosticul gerontologic

Demență probabilă mixtă (vasculară și degenerativă) forma moderată cu debut tardiv (Scala Deteriorării Globale Reisberg stadiul 5) (Evaluarea Clinică a Demențelor CDR 2) (scorul de ischemie Hatchinski 6).

Hipertensiune arterială esențială grad 2 grup risc C.

Diabet zaharat tip II echilibrat prin dietă.

Tiroidită atrofică cu hipotiroidie francă (stadiul V).

Nevralgie trigemen drept.

Cataractă senilă incipientă ambii ochi.

Glaucom cu unghi deschis ambii ochi.

Diagnosticul pozitiv de demență mixtă presupune existența semnelor și simptomelor datorate atât demenței de tip Alzheimer cât și ale

demenței vasculare. Pentru diagnosticul probabil de demență Alzheimer s-au aplicat criteriile DSM IV, ICD 10, NINCDS - ADRDA (readaptat 1999, 2000).

Diagnosticul diferențial al demențelor se realizează cu: (3,4,5,6)

- Depresia

- Delirium

- Droguri (medicamente)

- Diferite tipuri de demență

Demență de tip Alzheimer

Demențele Non-Alzheimer:

- Demență vasculară

- (demență multi - infarct)

- Demență cu corpi Lewy

- Demență lobului frontal

- (boala Pick)

- Demențe subcorticale

- (Boala Parkinson, Boala Huntington, Demență progresivă supranucleară)

- Demență corticală focală

- progresivă (afazia primară)

- Demențe metabolico-toxice

- (Hipotiroidismul sau deficitul de Vitamină B₁₂)

Tabelul 2. Particularități clinico-biologie și evoluția tiroiditei atrofice.⁹

Tablou clinic	Stadiu	AcTg /AcM	TSH	TSH	TSH	TSH
			T ₃	T ₄	bazal	După TRH
ASIMPTOMATIC	I	+	N	N	N	N
	II	+	N	N	N	↑
	III	++(+)	N	↓	↑	↑
HIPOTIROIDIE						
subclinică	IV	+++	↓	↓	↑↑	↑↑
manifestă	V	+++	↓	↓↓	↑↑	↑↑↑
gravă	VI	++(-)	↓	↓↓↓	↑↑↑	↑↑↑

- Infecțiile (sifilis, HIV, meningita cronică)

Discuții

Pe parcursul internării, se inițiază tratamentul în dubla asocieră între un inhibitor de butiril-colinesterază și

acetilcolinesterază - Rivastigmină și un inhibitor NMDA-N-metil-D-aspartat - Memantină. Rivastigmina s-a administrat în doze mici de 1,5 mg timp de o săptămână, crescând dozele la fiecare săptămână până la 3 mg de 2 ori pe zi. Memantina a fost inițiată cu doza de 5 mg crescându-se progresiv dozele timp de o lună la 10 mg de 2 ori pe zi.

Pe baza anamnezei, a examenului local al tiroidei, al valorilor testelor hormonale, suferința tiroidiană a fost diagnosticată ca tiroidită atrofică cu hipotiroidie francă. Hipotiroidia clinică manifestă este precedată de stadiile asimptomatice ale tiroiditei autoimune, caracterizate prin prezența anticorpilor antitiroidieni și valori normale ale T₃ și T₄. În aceste cazuri, TSH-ul seric are valori crescute și crește anormal după stimulare cu TRH. Evoluția din stadiile asimptomatice, spre stadiile clinice manifeste se face în câteva luni, uneori 3-4 ani. Nu toți pacienții care prezintă anticorpi (stadiile I și II) evoluează spre forme clinice, ci doar 10-12%. 1/3 din cei care prezintă anticorpi și TSH

crescut (stadiile III și IV) evoluează spre hipotiroidie clinică manifestă.

Pacienta studiată se încadrează în stadiul V clinic (valori intens pozitive ale AcM și AcTg, T₃ și T₄ scăzute și TSH bazal intens crescut). Tratamentul tiroiditei atrofice s-a efectuat cu hormoni tiroidieni, în

doze moderate de 25 µg pe zi, luând în considerare riscul crescut aterosclerotic al pacientei.

S-a păstrat tripla asociere medicamentoasă antihipertensivă, respectiv beta-blocant, inhibitor de enzimă de conversie, diuretic.

Sub tratament, evoluția pacientei a fost favorabilă. Pacienta va reveni la control peste o lună pentru evaluare psihogeriatrică. Testele hormonale tiroidiene vor fi reevaluate peste 3 luni.

Concluzii

Testele funcționale tiroidiene se impun în algoritmul diagnosticului pozitiv al demențelor. Un diagnostic precoce de boală tiroidiană autoimună în cazul pacientei prezentate ar fi putut încetini apariția complicațiilor ateromatoase. Literatura medicală certifică legătura dintre demența familială de tip Alzheimer și tiroidi-

ta autoimună prin existența unei gene a cromozomului 21 comună atât demenței cât și tiroiditei.

Bibliografie

1. Brodaty H, Moore CM - The Clock Drawing Test for dementia of the Alzheimer type: a comparison of three scoring methods in a memory disorders clinic. *International Journal of Geriatric Psychiatry* 12: 619 - 27,1997.
2. Ewins DL, Rossor MN, Butler J, Roques PK, Mullan MJ, McGregor AM- Association between autoimmune thyroid disease and familial Alzheimer's disease, *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1991 Jul; 35(1): 93 - 6.
3. Romoșan I., Spiru Luiza - *Tratat de geriatrie: Aspecte neuropsihiatrice la vârstnici*, Editura Academiei Ana Aslan Internațional, București, 2004, 16: 463 -546.
4. Luiza Spiru, Romoșan I - *Geriatric*, vol. I, Editura Solness, Timișoara, 2002.
5. Luiza Spiru, Romoșan I - *Geriatric*, vol. I, Editura Solness, Timișoara, 2002.
6. Romoșan I., Spiru Luiza - *Tratat de geriatrie: Aspecte neuropsihiatrice la vârstnici*, Editura Academiei Ana Aslan Internațional, București, 2004, 16: 463 -546.
7. Shulman K, Shedletsky R, Silver I -The challenge of time Clock drawing and cognitive function in the elderly. *International Journal of Geriatric Psychiatry* 1: 135 - 40, 1986.
8. Sunderland T, Hill JL, Mellow AM, Lawlor BA, Gunderscheimer J, Newhouse PA, Grafman JH - Clock drawing in Alzheimer disease. *Journal of the American Geriatrics Society* 37:725-9,1989.
9. Totoianu I. Gh., Vasilescu Gh. - *Bolile tiroidei la adult și copil*, Casa de editură „ Lumina Transilvaniei ”, Târgu - Mureș, 1993, vol. 2, 8: 107 - 136.
10. Luiza Spiru, Vellas B., Ousset P.J. - *Caiet de observație pentru pacienții cu demență tip Alzheimer*, Editura Universitară „Carol Davila”, București, 2000.
11. Luiza Spiru, Vellas B., Ousset P.J. - *Caiet de observație pentru pacienții cu demență tip Alzheimer*, Ediția II, Editura Universitară „Carol Davila”, București, 2000.
12. Luiza Spiru, Vellas B., Ousset P.J. - *Teste clinice pentru diagnosticul demenței de tip Alzheimer*, Editura Universitară „Carol Davila”, București, 2001.
13. Wolf-Klein GP, Silverstone FA, Levy AP, Brod MS, Breuer J - Screening for Alzheimer disease by clock drawing. *Journal of the American Geriatrics Society* 37: 730-4, 1989.

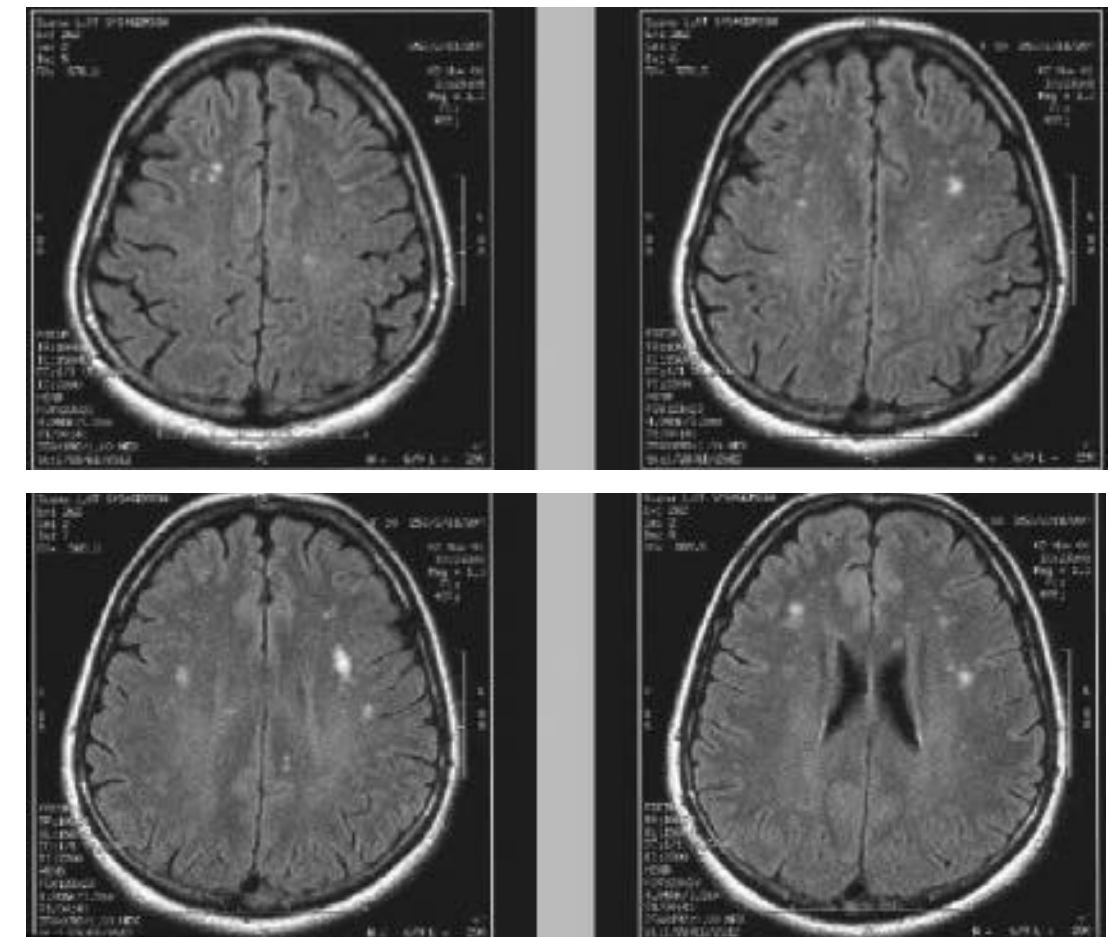
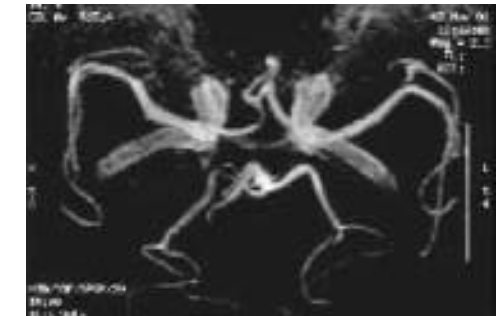
Multiple mici hemoragii în emisferele cerebrale

Paul Pătrașcu[#]

Clinica de Neurochirurgie, Spitalul Universitar de Urgență București, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” București, România.

Pacientul D.R., de sex masculin, în vârstă de 50 de ani, se prezintă pentru cefalee, fotofobie, rigiditate a cefei, simptome instalate într-o manieră acută.

Angiografia prin RMN arată absența vreunei malformații arteriovenoase.



#Adresa pentru corespondență: Paul Pătrașcu MD, Spitalul Universitar de Urgență București, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, Splaiul Independenței nr. 159, sector 5, București, România. Tel.: +40 1 6372190



Profilul organizației

Sub îngrijirea *Fundației „Ana Aslan International”* următoarea academie, denumită „Ana Aslan” *International Academy of Aging* se înființează, organizează și își desfășoară activitatea sub forma unui înalt for științific și cultural, unind personalități de valoare deosebită din domeniul științei, tehnicii, educației, culturii și artei, personalități recunoscute pe plan național și/sau internațional.

Scopul „Ana Aslan” *International Academy of Aging* este acela de a fi un înalt for științific și cultural, un centru de excelență care să organizeze și să susțină proiecte și programe pentru oamenii în vârstă în domeniile științific, cultural, educațional și de comunicare.

„Ana Aslan” *International Academy of Aging* își va putea constitui și organiza filiale în România, Suedia, Grecia, Israel, Tailanda, Germania precum și în alte țări, filiale stabilite prin decizia Comitetului de Conducere al *Fundației „Ana Aslan International”*.

„Ana Aslan” *International Academy of Aging* va promova cooperarea între forurile academice, universități, instituții și structuri similare din alte țări, prin păstrarea relațiilor directe cu acestea, precum și cu organizațiile internaționale ale persoanelor vârstnice.

Normele privind organizarea și activitatea Academiei, incluzând comitetele de specialitate și competențele acestora vor fi stabilite prin Regulile de Organizare și Funcționare aprobate de către consiliul de conducere al *Fundației „Ana Aslan International”*, în calitate de *Consiliu Științific* în cadrul Academiei, păstrând structura Consiliului de Conducere al *Fundației*. *Consiliul Științific* al „Ana Aslan” *International Academy of Aging* stabilește strategia generală și programele acestui for științific și cultural, condițiile pentru acceptarea membrilor precum și modalitățile prin care Academia va contribui la atingerea scopurilor și obiectivelor *Fundației „Ana Aslan International”*.

Consiliul academic

Consiliul de conducere:

Președinte: Bengt Winblad
Vice-președinti:
Vice-președinte executiv: Luiza Spiru
Vice-președinte științific: Khalid Iqbal

Membri: Mario Impallomeni
 Nicolae Cristescu
 Agneta Nordberg
 Inge Grundke-Iqbal
 Kajit Habanananda
 Pracha Hetrakul
 Frederick Fenech
 Alain Sinclair
 Ezio Jacobini
 Nicolae Cajal
 Ioan Romosan
 Athanase Dakas

Președinte onorific: Prof. Dr. Ana Aslan
Secretar: Gunilla Johansson



Sarcinile și prioritățile noastre

Scopul „Ana Aslan” *International Academy of Aging*, o academie științifică și culturală organizată de către „*Fundația Ana Aslan Internațională*”, este să inițieze, organizeze și să susțină proiecte și programe privind aspectele medicale, culturale, educaționale și comunicaționale ale îmbătrânirii.

„Ana Aslan” *International Academy of Aging* se concentrează pe îngrijire medicală, instruire, cercetare și inovații în sistemul de servicii care vor asigura o îmbătrânire sănătoasă. Acestea presupun să:

- **Îmbunătățească și extindă instruirea medicilor, asistenților, lucrătorilor sociali și a celorlalte categorii profesionale care îngrijesc persoanele în vârstă.**
- **Promoveze inovații în domeniul integrării și furnizării de servicii pentru toți bătrânii.**
- **Încurajeze și ajute formarea de noi lideri în domeniul îmbătrânirii, atât în plan clinic cât și în domeniul cercetării fundamentale.**
- **Extindă cercetarea medicală despre îmbătrânire prin concentrarea pe biologia îmbătrânirii, bolile și inabilitățile vârstei a treia și problemele de management clinic.**

ARII DE ACTIVITATE

- Cercetarea clinică a îmbătrânirii
- Cercetarea epidemiologică a îmbătrânirii
- Îngrijirea geriatrică
- Fizioterapia și terapia educațională
- Demența și tulburările cognitive
- Neuroștiințele, cu accent pe cercetarea moleculară
- Farmacologia
- Științele sociale
- Economia sănătății
- Studii terapeutice
- Gerontoprofilaxia

„Ana Aslan” *International Academy of Aging* va oferi acces către o rețea de cercetare în domeniul îmbătrânirii. Fiind un activ centru de cercetare, va oferi de asemenea un mediu propice în care doctoranzii și studenții la masterat pot învăța de la cercetători cu experiență cu o paletă largă de perspective academice. Cercetătorii din numeroase instituții și departamente se vor reuni în cadrul „Ana Aslan” *Academy of Aging* și Centrelor de Cercetare și Educație pentru întâlniri, cursuri, ateliere științifice și seminarii, pentru susținere și stimulare.

ACȚIUNI

Publicarea, susținerea și promovarea de lucrări științifice și materiale tipărite, inclusiv revista internațională „*Brain Aging*” editată de „Ana Aslan” *International Academy of Aging*.

Organizarea și conducerea de centre de cercetare medicală și centre de excelență care să ofere servicii medicale și de investigare științifică în diferite domenii, cu scopul de a furniza un nivel înalt de asistență de natură medicală și socio-medicală pentru persoanele în vârstă.

Inițierea, organizarea și susținerea de proiecte și programe educaționale, de cercetare și științifice pentru personalul medical (medici, asistenți, asistenți sociali).

Severe Impairment Battery (SIB)

Timpul necesar: 30-40 de minute (estimarea examenatorului)

Principalele indicații

Evaluarea funcției cognitive în special în demența severă

Comentarii

Severe Impairment Battery (SIB) are puterea de a evalua funcția cognitivă la pacienții cu demență moderată spre severă. Item-urile sunt cuvinte simple sau comenzi simple combinate cu gesturi. Sunt evaluate 9 arii (vezi mai jos) și scorul este între 0 și 100. Pare sensibilă la schimbare. Panisset și colab. (1994) au examinat 69 de pacienți cu demență severă folosind SIB și au găsit că reprezintă o măsură neuropsihologică de ajutor la persoanele cu demență severă.

Domeniile SIB

Domeniu	Întrebări
Orientare	Nume Loc (oraș) Timp (lună și timp din zi)
Atenție	Măsurarea cu degetele Număratoarea stimulilor vizuali și auditivi

Bibliografie

1. Saxton J, McGonigle-Gibson K, Swihart A, Miller M, Boller F (1990) - Evaluarea pacienților sever afectați: descrierea și validarea unor baterii de teste neuropsihologice noi. *Evaluarea Psihologică* 2:298-303.

2. Panisset M, Roudier M, Saxton J și colaboratori (1994)- Severe Impairment Battery: o baterie neuropsihologică pentru pacienții afectați sever. *Archives of Neurology* 51:41-5.
3. Albert M. Cohen C (1992) Testul Pentru Afectarea Severă, un instrument pentru

evaluarea pacienților cu disfuncție cognitivă severă. *Journal of American Geriatric Society* 40:449-53.

4. Panisset M, Roudier M, Saxton J și colaboratori (1994) Severe Impairment Battery: un test neuropsihologic pentru pacienții sever afectați. *Archives of Neurology* 51:41-5.

Limbaaj	Înțelegerea auditivă și citirea Fluența verbală (alimente și lunile anului) Nume din descriere, imagini de obiecte, obiecte, culori și forme Repetare Citire Scriere Copierea materialului scris
Praxie	Cum să folosească un pahar, o lingură
Vizuospațial	Discriminarea culorilor și formelor
Construcție	Desen spontan, copierea și trasarea unei figuri
Memorie	Amintirea imediată, pe termen lung și scurt a numelui examenatorului, a diferitelor obiecte, culori, forme și propoziții scurte.
Orientarea după nume	Când pacientul este strigat pe nume din spatele său.
Interacțiuni sociale	Strânsul mâinii, urmarea indicațiilor generale.

Recomandări pentru autori

Vă rugăm să specificați în colțul din dreapta sus al paginii titlu dacă lucrarea dvs. este un „studiu original” sau o „recenzie” (*review*). Toate articolele vor fi atent revizuite înainte de acceptare și publicare.

Aveți posibilitatea de a expedia prin poștă trei exemplare ale articolului împreună cu toate fișierele pentru text și imagini pe floppy disk sau CD, sau de a trimite articolul utilizând poșta electronică, la următoarea adresă:

Mail/Courier Service:

Prof. Dr. Luiza Spiru
Brain Aging International Journal
“Ana Aslan” International Academy of Aging
Piața M. Kogălniceanu nr. 1, Sect. 5
Bucharest, Romania

Electronic Submission:

Trimiteti fișiere în format PDF care să nu depășească 2 MB la următoarea adresă de mail: office@brainaging.ro

Manuscrisele trebuie să fie în format MS Word 6.0 sau superior.

Prima pagină va conține titlul articolului, numele complet al autorilor, cel mai important grad academic relevant, instituțiile la care fiecare dintre autori este afiliat și adresa completă a fiecărui autor, autorul însărcinat cu corespondența, adresa de e-mail, numerele de telefon și fax și, dacă manuscrisul a fost prezentat oral sau sub formă de poster în cadrul unei întruniri, numele organizației, locul și data când a fost prezentat.

Prima folosire a unei abrevieri neconvenționale trebuie precedată de numele complet. Sunt preferate denumirile generice ale medicamentelor. Dacă se folosește o denumire comercială, aceasta trebuie scrisă între paranteze după numele generic, iar în subsolul paginii va apărea o notă cu numele și adresa furnizorului.

La intervale potrivite trebuie inserate subtitluri.

Fișierele MS Word *nu* trebuie să conțină fotografii, figuri sau grafice; acestea trebuie expediate ca fișiere separate, indicând în fișierul MS Word locul unde trebuie inserate. Figurile sau graficele nu sunt acceptate în format MS Word.

Nu folosiți rând liber între paragrafe. Nu folosiți indentare („tabs”) sau spațiu suplimentar la începutul paragrafelor sau pentru elementele unei liste. Nu indentați rândurile suplimentare la bibliografie. Dezactivați spațiul dintre rânduri. Dezactivați despărțirea în silabe. Nu specificați împărțirea paginilor, numerotarea sau notele din partea superioară a paginii. Nu specificați formatarea caracterelor. Este necesară atenție la introducerea corectă a cifrei „unu” (1) și literei „el” mic (l), precum și la „zero” (0) și „o” litera mare (O).

Caracterele non-standard (litere grecești, simboluri matematice etc.) trebuie codificate corespunzător de-a lungul textului. Sunteți rugați să faceți o listă cu aceste caractere împreună cu codul folosit.

Figuri și tabele

Este încurajată folosirea figurilor color. Graficele trebuie intitulate și numerotate crescător conform referirilor din text. Tabelele trebuie să fie explicate în text. Pe o pagină separată trebuie furnizate scurte legende descriptive. Legenda figurilor publicate anterior trebuie să includă informații complete referitoare la publicația originală, cu precizarea dreptului de autor. În acest sens, vă rugăm să ne anexați copii după permisiunea editorului și autorului pentru folosirea figurilor.

Tabelele, fotografiile și figurile trebuie expediate în unul din următoarele formate: TIF, EPS sau AI. Nu sunt acceptate fișiere JPEG sau GIF. Tabelele pot fi trimise și ca fișiere MS Word sau MS Excell. Acceptăm de asemenea și fișiere Corel Draw.

Rezoluția ilustrațiilor, graficelor și fotografiilor trebuie să fie de cel puțin 300 dpi.

Revizuirea manuscriselor

Toate lucrările sunt pasibile de revizuire editorială. Editorii vor decide dacă lucrarea este potrivită pentru profilul editorial al Revistei.

Articolele conținând material original sunt acceptate pentru analiză cu presupunerea implicită că au fost trimise doar acestei reviste. Autorii trebuie să obțină toate accepturile și aprobările necesare înainte să expedieze articolele.

Revista își rezervă dreptul de a opera revizuirii de natură editorială înainte de publicare.

Toate manuscrisele sunt luate la cunoștință imediat și nu se va precupeți nici un efort pentru a informa autorii despre situația lor în maxim 60 de zile.

Cuvintele cheie

Pentru a putea realiza un index, este esențială includerea unei liste de 3-10 cuvinte cheie.

Rezumatul

Autorii trebuie să furnizeze un rezumat constând dintr-un paragraf (100-150 de cuvinte) ce concentrează principalele idei din articol. În rezumat trebuie punctate clar obiectivele, metodele folosite, rezultatele principale și concluziile studiului.

Bibliografia

Referințele bibliografice trebuie citate în text în ordine crescătoare, prin numere arabe superscript. Fiecare referire trebuie să conțină numele tuturor autorilor. Numele revistelor trebuie abreviate conform „*Index Medicus*”.

Nr., numele autorilor, titlul articolului. *Revista*, Anul; ediția: paginile. [pentru articolele din reviste]

Nr., numele autorilor, titlul articolului. În: numele editorilor, *titlul cărții*. Locul unde a fost publicată: Editura, Anul: paginile. [pentru cărți editate]

Nr., numele autorilor, *titlul cărții*. Locul unde a fost publicată: Editura, Anul. [pentru monografii]

Exemple:

5. Bierer L.M., Hof P.R., Purohit D.P., Carlin L., Schmeidler J., Davis K.L., Perl D.P., Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 1995; 52: 81-8. [pentru articole din reviste]

6. Benton A., Tranel D., Visuo-perceptual, Visuospatial, and Visuoconstructive Disorders. In: Heilman K.M. and Valenstein E., eds., *Clinical Neuropsychology*. Oxford University Press, 1993: 195-212 [pentru cărți editate]

7. Luria A., *The Working Brain*. New York: Basic Books, 1973.[pentru monografii]

Drepturile de autor

Autorii ce trimit lucrări o fac înțelegând că dacă manuscrisul este acceptat pentru publicare drepturile de autor pentru articol, inclusiv dreptul de a reproduce articolul sub orice formă și pe orice suport, va aparține exclusiv Editurii. Trimiterea articolului de către autor implică acordul automat al acestuia pentru atribuirea exclusivă a drepturilor de autor Editurii LSEnia dacă și când manuscrisul este acceptat pentru publicare. Lucrarea nu va fi publicată în altă parte, indiferent de limbă, fără acceptul scris al Editurii. Nici un fel de material publicat în revistă nu poate fi stocat pe microfilm sau casete video sau baze de date electronice fără acceptul prealabil, în scris, al Editurii.

Varia

Este necesar ca Revista să primească manuscrisele cu cât mai mult timp înainte de termenul limită. Este nevoie de timp pentru ca manuscrisele să fie revizuite, returnate editorului, corectate, tehnoredactate și tipărite. Toate manuscrisele vor fi trimise cât mai curând posibil. Vom informa autorul asupra datei de publicare a articolului.

Revista se așteaptă ca autorii să dezvăluie orice asociere comercială sau financiară ce ar putea cauza un conflict de interese legat de articolul publicat. Toate resursele financiare folosite pentru susținerea lucrării trebuie menționate în pagina titlul.