

Serúlóplasmín og járn. Tengsl við Alzheimersjúkdóm og Parkinsonsjúkdóm

Porkell Jóhannesson¹ prófessor úr embætti, Jakob Kristinsson¹ lyfjafræðingur, Guðlaug Þórsdóttir² læknir, Jón Snædal² læknir

ÁGRIP

Serúlóplasmín (Cp) er svokallaður multi-kopar oxídasi, sem in vivo oxar Fe^{2+} í Fe^{3+} og afoxar jafnframt súrefni að fullu í vatn. Cp tryggir að Fe^{3+} geti bundist transferríni og að magn hvarfgjárns Fe^{2+} haldist í lágmarki. Í miðtaugakerfinu er það einkum bundið örmum stírnufumna með glýkósýlfosfatidýlinósítól-tengi í námunda við æðar. Í Cp eru fjögur virk koparatóm og er festing þeirra óskytt ferli myndunar próteinhluta ensímsins. Í Cp-þurrð í blóði (aserúlóplasmínemía) er alger vöntun á Cp og áberandi járnaskanir í miðtaugakerfinu og utan þess. Í Parkinsonsjúkdómi (PD) er bæði Cp-þéttni og oxunarvirgni í sermi minnkuð, samfara áberandi járnsofnun í svartsviðið í miðheila. Cp gæti hamlað uppkomu PD með því að binda

járn í neurómelaníni og varna oxunarskemmdum í orkukornum taugunga í svartsviði. Ríkur erfðabáttur er í PD og breytingar í Cp-genum gætu tengst erfðamynstrinu. Í Alzheimersjúkdómi (AD) er oxunarvirgni Cp minnkuð í sermi, en ekki þéttni þess. Breytingar í Cp-genum virðast ekki tengjast AD. Við AD eru bæði járnaskanir og vöntun á kopar í heilanum. Koparskortur gæti valdið truflun á myndun virks Cp auk annarra koparensíma í heila. Ætla má að trufluð Cp-virgni, og þar með raskaður járnþúskaþur, skipti máli við PD og við AD ásamt hugsanlega truflunum á öðrum koparensímum.

Inngangur

¹Rannsóknastofu í lyfja- og eiturefnafræði Háskóla Íslands, ²öldrunarlækningadeild Landspítala Landakoti.

Fyrirspurnir: Jón Snædal

jsnaedal@landspitali.is

Árið 2003 birtu þrír höfundanna (PJ, JK og JS) yfirlitsgrein í *Læknablaðinu* um rannsóknir á þremur oxavarnarensímum (serúlóplasmíni (Cp) í sermi, súperoxíðdismútasa (SOD1) í rauðum blóðkornum og glútatíonperoxídasa (GPX) í blóði) í hrönnunarsjúkdómum í miðtaugakerfi í mönnum og sauðfé.¹ Í mönnum var leitast við að rannsaka Alzheimersjúkdóm (AD) og Parkinsonsjúkdóm (PD), en auk þess hreyftaugungahrönnun (*amyotrophic lateral sclerosis*), Downsheilkenni og Wilsonsjúkdóm og til samanburðar fór fram rannsókn á einhverfu.

Rannsóknir á SOD1 og GPX gáfu ekki einhlítar niðurstöður. Greina mátti hins vegar ákveðin mynstur minnkaðrar Cp-oxíðsávirgni og þéttni í AD og PD. Þetta varð endanlega ljóst þegar fyrir lágu niðurstöðutölur úr tvennum tvenndarrannsóknum (*age- and gender-matched studies*) á Alzheimersjúklingum annars vegar og tveimur tvenndarrannsóknum á Parkinsonsjúklingum hins vegar.²⁻⁵ Rannsóknir á sjaldgæfum arfbundnum sjúkdómi, Cp-þurrð í blóði (*aceruloplasminemia*), sýna að Cp er nauðsynlegt fyrir rétta stýringu á járnþúskaþur í líkamanum, og bæði við AD og PD eru þekktar járnútfellingar og/eða truflanir á járnþúskaþur í heila. Á grundvelli þessara rannsókna og annarra nýlegra sem síðar greinir, var því ályktað að röskun á járnþúskaþur í heila og minnkuð virgni, með eða án minnkaðrar þéttni Cp, dæmt út frá gildum í sermi, gætu verið marktækir þættir í meingerð þessara sjúkdóma.

Leitast er við að gefa stutt yfirlit yfir serúlóplasmín, Cp-þurrð og gildi Cp fyrir járnþúskaþur, röskun á járnþúskaþur í heila við AD og PD og Cp-þéttni og virgni (oxíðsávirgni; oxunarvirgni) í sermi við AD og PD. Í lokaorðum eru settar fram nokkrar fyllri ályktanir og

spáð í frekari rannsóknir. Yfirlitið er miðað við árslok 2011.

Serúlóplasmín (Cp): Gerð, verkun og myndun

Tveir sænskir vísindamenn lýstu því árin 1947-1948 að þeir hefðu einangrað α -glóbúlín í plasma, sem við venjulegar aðstæður hefur að geyma um og yfir 90% af öllum kopar í plasma/sermi og ber bláan lit. Þeir gerðu einnig grein fyrir öðru glóbúlíni í plasma, sem inniheldur járn en ekki kopar. Fyrri próteinið nefndu þeir *serúlóplasmín* (*ceruloplasmin*; Cp) eftir bláa litnum („hið himinbláa prótein í plasma“), en hið síðara *transferrín* (Tf) vegna járninnihalds og getu til þess að flytja járn.^{6,7} Síðari rannsóknir hafa svo sýnt að þessi tvö prótein eru að miklu leyti samtengd að verkunum. Árið 1966 birtust þannig grundvallarrannsóknir sem sýndu, að Cp væri oxídasi og skipti meginmáli fyrir rétta oxun á ferrójárn í ferríjárn, sem binst transferríni.^{7,8}

Hjá mönnum eru 1046 amínósýrur í einum streng í sameind Cp og sameindapunginn er 132 kDa. Gen Cp er staðsett á litningi 3 (3q23-25). Gensvæði Tf og transferrínviðtækja (Tfr) eru þar mjög nærri. Þetta hefur fætt af sér hugmyndir um að á litningi 3 gæti verið setur fyrir einhvers konar „járnstýristöð“.^{7,9}

Í sameind Cp eru alls 6 koparatóm sem hnitúð (*coordinated*) eru með nokkuð mismunandi hætti við atóm í sameindinni. Fjögur þessara atóma mynda svokölluð virk sæti þar sem koparatómin oxast og afoxast á víxl. Sameind Cp fær við þetta eiginleika oxíðasa. Eitt þessara koparatóma er staksett og gefur efninu bláan lit. Hin þrjú koparatómin eru saman í hnapp (*tricluster*). Blálitaða atómið er talið taka við rafeindum frá áverk-

Greinin barst: 12 apríl 2012, samþykkt til birtingar 12. sept. 2012.

Engin hagsmunatengsl gefin upp.

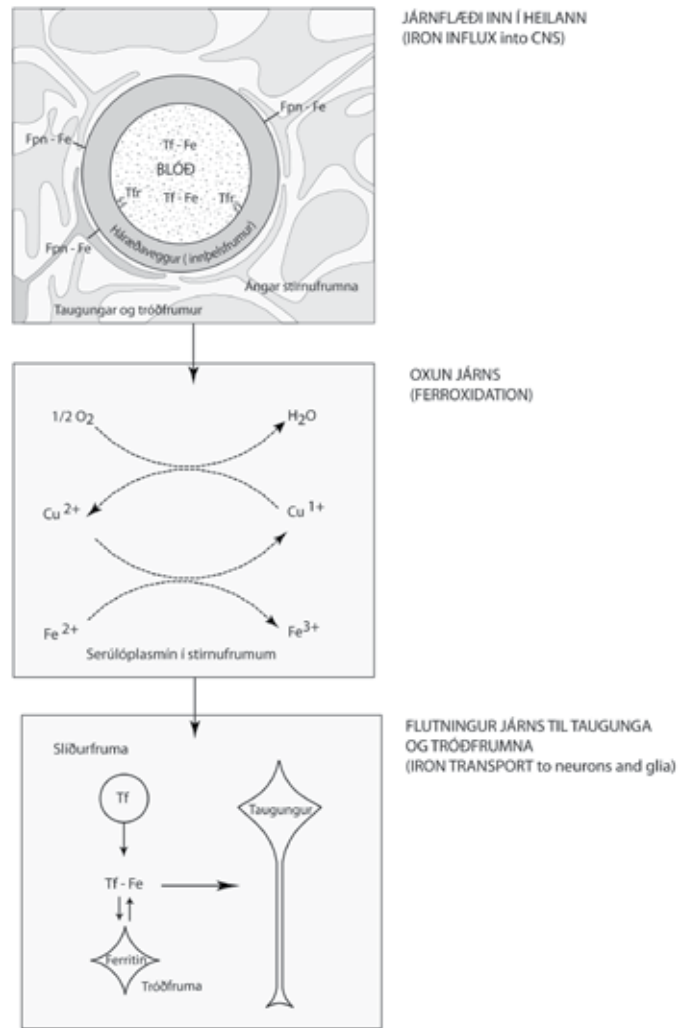
unarefninu, sem í fyrstu röð er ferrójárn, og flytur rafeindir yfir á hnappsettu koparatómin. Samtímis oxast ferrójárn í ferríjárn, sem er forsenda fyrir bindingu járns í transferrín. Súrefni afoxast því næst að fullu í vatn fyrir tilstilli hnappsettu atómanna. Vegna þess hve oxun á járni er ríkjandi í verkun Cp er það oft nefnt ferroxídasí (sjá mynd 1) og er talið til svokallaðra multi-kopar-oxídasá. Meðal multi-kopar-oxídasá er hephaestín, sem verkar mjög hliðstætt við Cp og skiptir meginmáli við frásog á járni frá meltingarvegi. Það er einnig í miðtaugakerfinu, en mest í heilaberki og þar á meðal í taugungum þar sem Cp er einkum í stirnufrumum (*astrocytes*) og mest í svartsviðinu (*substantia nigra*). Samþætting þessara ensíma er óljós, en tilraunir benda til þess að þau hafi samverkandi verkun.¹⁰ Annar þekktur oxídasí í þessum flokki er askorbínsýru-oxídasí.^{7,9}

Við súrefnisríkar aðstæður *in vivo* oxast ferrójárn (Fe^{2+}) greiðlega í ferríjárn (Fe^{3+}). Þessi sjálfsprottnu efnahvörf eru samt hvorki öll á einn veg né „hrein“. Ein slík hvörf eru svokölluð Fenton-hvörf: $Fe^{2+} + H_2O_2 \Rightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + OH^-$. Í slíkum tilvikum myndast stak-eind, hýdroxýlfríhópur ($\bullet OH$), sem veldur umtalsverðum vefja-skemmdum þar nærri sem hún myndast. Rökrétt er að ætla að hætta á Fenton-hvörfum aukist eftir því sem ferroxídasavirkni Cp er minni. Allar líkur eru þess vegna á því að megingildi Cp við oxun á járni sé að tryggja að járnatómin komist sem minnst í samband við oxandi efni í umhverfinu (í dæminu að ofan H_2O_2). Auk þess að hafa beina ferroxídasavirkni hefur Cp áhrif á stöðugleika ferróportíns (Fpn), sem ber tvígilt járn út um himnur ýmissa frumna (*carrier*).^{9,10}

Þótt ferrójárn sé án efa aðaláverkunarefni Cp, er vel hugsanlegt að það geti einnig oxað fleiri efni í líkamanum. Hér má nefna kopar, sem getur hvarfast eins og járn í Fenton-hvörfum. Hverfandi lítið er hins vegar af fríum kopar í líkamanum við venjulegar aðstæður. Mun meiri athygli vekur að Cp getur sennilega oxað katekólámín (dópamín, noradrenalín) og stuðlað að myndun dópamín-melaníns (neurómelaníns).⁹ Um þetta ræðir nánar í kafla-num um PD.

Cp er svokallað bráðafasaprótein (*acute phase reactant*) og þéttni þess og/eða virkni í sermi eykst því við sýkingar, bólgur og meiðsl, en einnig á meðgöngu, við öldrun og jafnvel vegna lyfja. Í samræmi við þetta eru það svokallaðir frumuhvatar (*cytokines*), sem ráða mestu um tjáningu á Cp-geninu (á litningi þrjú). Cp-geníð er ríkulega tjáð í frumum í lifur, en einnig í mörgum öðrum líffærum, meðal annars í miðtaugakerfi. Kopar er ekki ákvarðandi efni við tjáningu á Cp-geninu, en við koparskort er hætt við að oxunarvirkni Cp minnki.^{7,11,12}

Koparatómin eru fest inn í apóserúlóplasmín (próteinhlutá sameindarinnar) af sérstöku ensímkerfi (P-týpu ATP-asa; ATP7B) sem staðsett er í útfærslugöngum (seytugöngum) frumna, einkum í lifur en einnig í öðrum frumum. Í lifur ræður ensímkerfi þetta einnig útskilnaði á kopar í galli. Gen þessa ensíms er á litningi 13 (13q14,3). Ferð kopars inn í lifrarfrumur (eða aðrar frumur) og festing kopars í apóserúlóplasmím til hins fullmótaða ensíms hó-lóserúlóplasmíns er flókið ferli.¹³ Af þessu og framansögðu má því enn fremur álykta að myndun apóserúlóplasmíns annars vegar og festing kopars í það hins vegar, séu tveir svo aðskildir ferlar að við ákvarðanir á Cp í sermi skuli ætíð ákvarða bæði þéttni og oxunarvirkni þess. Hluti af seyttu Cp í sermi (10-20%) er kopar-laust (óvirkt apóserúlóplasmín).⁷ Þéttni Cp var í rannsóknum höf-

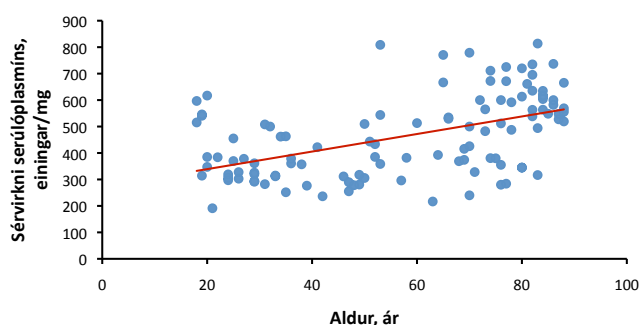


Mynd 1. Stílfærð mynd sem sýnir innferð járns í miðtaugakerfið (efst), oxun járns (ferroxidation) af völdum serúlóplasmíns (Cp) í stirnufrumum (astrocytes) (í miðju) og flutning járns til taugunga (neurons) og tróðfrumna (glia) (neðst). – Járnhláðið (Fe^{3+}) transferrín (Tf-Fe) í blóði binst við transferrínviðtæki (Tfr) í innþeli háráða í heila. Járníð losnar þar frá Tf, er afoxað (Fe^{2+}) og binst við hinnuþrótein (Fpn-Fe), sem ber tvígilt járn hinna frumna. Cp fest við anga stirnufrumna (astrocytal end feet) stöðus-tillir Fe^{2+} á Fpn og oxar það í Fe^{3+} , sem bundið Tf flyst til taugunga og í ferrítínbirgðir í tróðfrumum.

unda ákvörðuð með mótefna-mælingu, sem af hálfu framleiðanda er talin sérhæf.

Cp-sérvirkni er reiknuð stærð yfir oxunarvirkni Cp í hlutfalli við massa og er vísbending um gæði ensímsins. Í sermi 112 einstaklinga af báðum kynjum í viðmiðunarhópum við rannsóknir höfunda 2, 3, 5 fór sérvirkni Cp hækkandi með aldri. Hækkandi aldur gæti því hjá venjulegu fólki leitt til aukinnar festingar á kopar í Cp og aukinnar virkni (mynd 2).

Wilsonsjúkdómur er víkjandi arfbundinn sjúkdómur þar sem breytingar eru á áður nefndu geni á litningi 13. Mjög margar breytingar eru þekktar í þessu geni, sem allar leiða til Wilsonsjúkdóms. Þar á meðal er ein genbreyting sem telst vera séríslensk (*7-bp deletion in exon 7*).¹⁴ Í Wilsonsjúkdómi er útskilnaður á kopar minnk-aður með eftirfarandi útfellingum á kopar í vefjum, meðal annars í miðtaugakerfi. Þéttni Cp í sermi er einnig verulega minnkuð, en nokkuð Cp myndast utan lifrar.¹⁴



Mynd 2. Sérvirkni serúloplasmíns (Cp-specific activity) eftir aldri í sermi 112 heilbrigðra einstaklinga (konur 51, karlar 61). Aðhvarfslínan sýnir að sérvirknin eykst marktækt með aldri (línuleg aðhvarfsgreining: $P < 0,001$).

Cp kemst ekki úr blóði og inn í miðtaugakerfið. Cp í heila er því myndað þar og er seytt í einhverjum mæli frá þekjufrumum í heilahvelum og æðabeðum (*plexus choroideus*) í heilahvelunum. Mest af Cp í heila myndast í stirnufrumum (*astrocytes*), en það eru stærstu tróðfrumurnar í heilanum (*glia*). Þessar frumur hafa marga arma sem liggja víða um taugavefinn. Í mynd 1 er stílfært sýnt hvernig armarnir tengjast þekjufrumum (í háráðum í heila). Cp, sem myndast í stirnufrumunum, er bundið við yfirborð þeirra (við enda armanna) með glýkósýlfosfatíðlínósítól-tengi, GPI-tengi. Cp-GPI virðist vera sömu gerðar og seytt Cp.^{10, 15, 16}

Cp-þurrð í blóði (*aceruloplasminemia*) og gildi Cp fyrir járnþúska

Árið 1987 greindu japanskir vísindamenn frá athyglisverðri sjúkdómsmynd í 52 ára gamalli japanskri konu sem hafði einkenni frá miðtaugakerfi (frá djúphnoðum; *basal ganglia*), sykursýki og hrörnarbreytingar í nethimnu augna, samfara útfellingum á járn – og algera vöntun á Cp í sermi. Erfðafræðileg greining á þessum sjúklingi, og litlu síðar víðar um heim á sjúklingum með sams konar einkenni, leiddi í ljós að orsökinn myndi vera arfbundnar breytingar (*loss of function mutations*) í Cp-geninu. Þessi sjúkdómur fékk því heitið *aceruloplasminemia*, sem hér er nefnt Cp-þurrð í blóði.^{8, 16} Sjúkdómurinn er víkjandi arfbundinn sjúkdómur sem hefur verið greindur víða, en þó ekki á Íslandi svo höfundum sé kunnugt. Margháttaðar breytingar á Cp-geninu geta leitt til sjúkdómsins.¹⁶

Einkenni um Cp-þurrð í blóði koma fyrst fram á fullorðinsaldri. Auk sykursýki og sjónskerðingar eru einkenni frá miðtaugakerfi áberandi, ekki aðeins frá djúphnoðum, heldur einnig frá heilaberki með vitrænni skerðingu sem leiðir til heilabilunar. Járn er minnkað í sermi og Tf-mettun er lítil, en ferrítín er mjög aukið, sem bendir á minni hreyfanleika járn. Jafnframt þessu er járn magn aukið í átfrumum í lifur og víðar. Blóðskortur er tiltölulega vægur vegna þess hve járn oxast greiðlega af sjálfu sér (sbr. að framan). Engin merkjanleg truflun er á koparþúska við Cp-prot í blóði. Er því talið að Cp skipti ekki máli við stýringu á kopar. Cp-þurrð í blóði beindi hins vegar sjónum manna að tengslum Cp og járn í líkamanum.^{7, 16-18}

Búið hefur verið til „dýramódel“ af Cp-þurrð í blóði. Eru það svokallaðar Cp-núllmýs eða Cp^{-/-} mýs þar sem Cp-geníð á litningi þrjú hefur verið fjarlæggt. Tilraunir með slíkar mýs sýna að járn safnast í líkamsvefi þeirra og er afleiðing af stöðnun járn í frumum sem greiðlega eiga að gefa það frá sér. Frásog járn frá meltingarvegi

er hins vegar óbreytt í þessum músum.¹⁸ Enn greinilegar má sýna fram á þennan galla þegar gerðar eru tilraunir með einangraðar stirnufrumur úr Cp^{-/-} músum: Járn losnar margfalt seinna (eða ekki) úr stirnufrumum frá þessum músum en úr stirnufrumum frá venjulegum músum (Cp^{+/+} músum).^{18, 19} Samstaða er um að mjög lítið Cp þurfi að vera til staðar til þess að hringrás járn haldist eðlileg. Þetta virðist vera skýringin á því að greinilegar truflanir á járnþúska sjást ekki í Wilsonsjúkdómi.

Ferróportín (Fpn) er eins og áður er nefnt í himnu ýmissa frumna. Það ber tvígilt járn gegnum himnur og út úr frumunum (*iron efflux*). Ferróportín er prótein sem að verulegu leyti er undir stjórn hormóns (*hepsídíns*) er myndast í lifur, svo og járn í lifrinni. Cp kemur hér einnig við sögu. Ef Cp skortir er hætta á að Fpn innfrumist (*endocytosis*) og brotni sundur í innanfrumuhöllum (*lysosomes*) þannig að járn verði eftir í frumunum.^{19, 20} Vísbendingar eru um að Cp hamli niðurbroti á Fpn, sérstaklega í miðtaugakerfinu. Ef þetta er rétt er stýring Cp á járnþúska í miðtaugakerfinu nákvæmari en í öðrum líffærum.²⁰

Í megindrattum flytur transferrín (eftir tengingu við transferrínviðtæki, Tf) þrígilt járn úr blóðinu yfir í þekjufrumur í veggjum háráða í miðtaugakerfinu. Þar rofnar tengið milli járn og transferríns og járn afoxast í ferrójárn. Ferróportín ber ferrójárn út yfir himnu þekjufrumnanna. Í námunda við himnu þekjufrumnanna eru armar stirnufrumna með Cp-GPI bundið við enda armanna. Cp-GPI stýrir því næst færslu á Fe²⁺ úr ferróportíni og oxar það um leið í Fe³⁺, sem binst transferríni og flyst þannig um millifrumurýmið í heila til taugunga eða annarra frumna er hafa Tf (mynd 1). Talið er og að járn komist úr blóðinu inn í miðtaugakerfið óháð transferríni.^{19, 21}

Ferrítín er stórt holulaga prótein gert úr tveimur mismunandi hlutum, H (*heavy*) og L (*light*). Járn í ferrítíni má skoða sem óhvarfgjarnt en hreyfanlegt birgðajárn. L-hlutinn sér um að binda járn en H-hlutinn hefur ferroxídasavirkni og stuðlar að því að losa járn úr sameindinni. Ferrítín er mest í tróðfrumum, en er einnig í taugafrumum (mynd 1).²¹

Röskun á járn í heila og Cp í sermi við Parkinsonsjúkdóm

Járn í miðtaugakerfinu er misskipt eftir tegundum frumna og svæðum. Slíðurfrumur tauga (*oligodendrocytes*) eru járnríkastar allra frumna í miðtaugakerfinu. Þar er og talið að Tf myndist að mestu (mynd 1). Ferrítín er einnig meira í þessum frumum og tróðlingum (*microglia*) en í öðrum frumum í miðtaugakerfinu. Þetta hefur leitt til kenninga um að járn sé sérstaklega mikilvægt við myndun taugasliðurs.^{21, 23}

Meira járn er í utanstrýtusvæði heilans (*extrapyramidal regions*), það er í svartsviðinu í miðheila (*substantia nigra*) og djúphnoðum, en er í öðrum svæðum heilans. Við fæðingu er þarna lítið járn en járn vex línulega í svartsviðinu með hækkandi aldri. Ferrítín er og meira í þessu svæði en annars staðar í heilanum. Í svartsviðinu er sömuleiðis sérstakur fjölefnungur úr dópamíni (neurómelanín; sjá hér á eftir) sem geymir járn í sjálfum taugungunum og tekur lit af járninu (svartbrúna lit). Af því er svo heitið svartsvið dregið.²¹⁻²³ Ekki er vitað hvers vegna meira járn er í þessum hlutum heilans en öðrum. Nærtækt er samt að ætla að það endurspegli mikla virkni.

Við Parkinsonsjúkdóm safnast oft sjúklega mikið járn í taugunga í svartsviðinu. Frumurnar missa jafnframt svartbrúna litinn,

hrörna og deyja, og inni í deyjandi taugungum margra þeirra myndast svokallaðar Lewys-agnir (*Lewy's bodies*). Lewys-agnir eru myildislikar próteinútfellingar sem binda járn (sjá einnig næsta kafla). Við Parkinsonsjúkdóm virðist vera skortur á ferritíni. Ef það er rétt, gæti járn sem hægst safnast óskipulega í taugavefinn (þar á meðal Lewys-agnir) og valdið vefjaskemmdum.^{21, 22}

Rannsókn höfunda á 40 PD-sjúklingum sýndi að Cp-þéttni og Cp-oxunarvirkni í sermi var marktækt minni í sjúklingahópnum en í viðmiðunahópnum.² Fimm árum síðar var gerð framhaldsrannsókn á 28 sjúklingum er þá lifðu úr upphaflega hópnum. Niðurstöður urðu hinar sömu.³ Cp-sérvirkni (oxunarvirkni miðað við magn) var sömuleiðis marktækt minnkuð í báðum rannsóknnum. Bendir það á minni gæði ensímsins og má best skýra með minni innbyggingu á kopar í Cp í PD sjúklingunum.^{2, 3}

Í þessu sambandi ber að nefna að við rannsókn Arnals og félagar²⁴ fannst að Cp-þéttni í sermi fór hækkandi með versnandi sjúkdómsástandi PD-sjúklinga. Samtímis fór frír kopar (ekki bundinn Cp) einnig hækkandi. Ekki var ákvörðuð Cp-virkni. Aukin þéttni óbundins kopars í plasma/sermi gæti bent til minni innbyggingar á kopar í Cp og þar með minni virkni (sjá einnig næsta kafla).

Í rannsókn Bharucha og félagar²⁵ var ákvörðuð Cp-þéttni í sermi PD-sjúklinga. Niðurstöður sýndu að Cp-þéttin var marktækt lægri hjá sjúklingunum en var í samanburðarhópnum. Cp-þéttin var enn fremur marktækt lægri í ungum sjúklingum (yngri en 60 ára) en í eldri sjúklingum. Í eldri sjúklingunum, teknum sér, var Cp-þéttin ekki marktækt lægri en í samanburðarhópnum. Höfundar töldu því að Cp gæti skipt máli fyrir uppkomu PD á yngri árum, en ekki á efri árum. Hvorki í þessari rannsókn né í fyrrnefndum rannsóknnum^{2, 3} eru vísbendingar um að lyf við PD hafi haft áhrif á niðurstöðutölur.

Tvær mjög nýlegar rannsóknir beinast að sambandinu milli járnns í svartsviði og þéttni Cp eða oxunarvirkni í sermi. Í fyrri rannsókninni²⁶ var járn mælt með segulómun í 7 heilasvæðum hjá PD-sjúklingum. Marktækt aukið járn magn var einungis að finna í svartsviðinu hjá þessum sjúklingum en þó því aðeins að Cp-þéttni í sermi væri jafnframt lækkuð. Hjá þeim sjúklingum þar sem járn magn var ekki aukið í svartsviðinu, var Cp-þéttni í sermi ekki heldur minnkuð. Höfundarnir ályktuðu því að PD gæti að minnsta kosti verið tvenns konar: a) með lágri Cp-þéttni í sermi og miklu járn í svartsviði og b) með eðlilegri Cp-þéttni í sermi og eðlilega miklu járn í svartsviðinu. Í síðari rannsókninni²⁷ var því lýst að í PD væri neikvæð fylgni milli Cp-oxunarvirkni í sermi og járn magns í svartsviði. Aukið járn var í svartsviðinu hjá öllum PD-sjúklingum og Hoehn- og Yahr-gildi voru nær hin sömu og í fyrri PD-rannsókn höfunda (meðaltöl: 2,45 og 2,40).

Í annarri rannsókn var talið að í meira en 90% tilvika væri járn magn í svartsviðinu sjúklega aukið í PD. Hjá mörgum nákomnum ættingjum PD-sjúklinga var sömuleiðis að finna aukið járn magn í svartsviðinu, enda þótt fæstir þeirra greindust með Parkinsonsjúkdóm. Þá er það enn að í hlutfallslega fáum einstaklingum sem óskyldir voru PD-sjúklingum og heilbrigðir voru, mældist mikið járn í svartsviðinu.²⁸ Járn söfnun ein og sér í svartsviði er því samkvæmt þessu ekki nóg til þess að koma Parkinsonsjúkdómi af stað. Með tilliti til þessa er áhugavert að lýst hefur verið Cp-genbreytingum sem tengjast járn söfnun í svartsviði og uppkomu PD.²⁹ Fyllri rannsókn er augljóslega þörf til þess að kanna hvort

og í hve miklum mæli Cp-genbreytingar kunna að tengjast uppkomu PD.

Cp gæti hugsanlega varnað uppkomu Parkinsonsjúkdóms með því að stuðla að oxun og fjölefningu á dópamíni í dópamínvirkum taugungum í svartsviði í dópamín-melanín, sem áður er nefnt.⁹ Svipaður fjölefnungur myndast í noradrenvirkum taugungum í blásviðinu í heilastofni (*locus coeruleus*). Samheiti á þessum fjölefnungum er neurómelanín og þeir binda járn. Með því að binda járn getur neurómelanín komið í veg fyrir Fenton-hvörf og hamlað um leið myndun vefjaskemmandi dópamínkínóna. Við hrörnun og dauða taugunga í svartsviðinu losnar neurómelanín, sem tróðlingar sundra. Losnar þá járn samfara stórauðnum líkum á Fenton-hvörfum.³⁰

Rótenón er lífrænt efni sem unnið er úr plöntum. Það var áður notað í garðyrkju. Rótenón fer greiðlega inn í miðtaugakerfið og er eitt allmargra efna með sambærilega verkun sem notuð hafa verið í dýratilraunum (mýs, rottur) til þess að framkalla ástand sem minnir í öllum aðalatriðum á PD. Rótenón er það þessara efna sem hefur sértækasta verkun á orkukorn dópamínvirkra taugunga. Er verkun þess þannig að mestu bundin við dópamínvirka taugunga í svartsviðinu.³¹

Athyglisvert er hve tilraunadýr eru misnæg fyrir áverkun rótenóns.^{31, 32} Ekki er vitað í hverju þetta mismunandi næmi er folgið, en það er lyklatríði að upplýsa. Ekki er þetta síst vegna þess að nýlega hefur verið lýst músatilraun þar sem ætla mátti að Cp mótverkaði verkun rótenóns á dýrin.³³

Samantekt: Minnkuð Cp-þéttni og oxunarvirkni í sermi, ásamt auknu járn í dópamínvirkum taugungum í svartsviðinu, fer oftast saman við PD. Röskun á orkumyndun í þessum taugungum gæti verið meginatriði við uppkomu PD og Cp varnar hugsanlega því ferli.

Röskun á járn í heila og Cp í sermi við Alzheimersjúkdóm

Alzheimersjúkdómur er algengastur svokallaðra heilabilunarjúkdóma sem rekja má til rýrnunar og frumudauða í heilaberki. Snemma í sjúkdómnum hrörna taugungar sem eiga upphaf sitt í kjörnum neðanvert á ennisblaði heilans (*lobus frontalis*), einkum Meynert-kjarnanum (*Nucleus Basalis of Meynert*). Þessir taugungar hafa asetýlkólín að boðefni og mynda brautir sem liggja til dregans (*hippocampus*) og dregasvæðisins (*hippocampal regions*) í gagnaugablaði heilans (*lobus temporalis*). Bilun í þessum brautum veldur minnstruflunum, sem áberandi eru við AD. Síðar hrörna taugungar í hvirfilblaði heilans (*lobus parietalis*) og víðar í ennisblaðinu. Erú ýmis sjúkleg einkenni til þessa að rekja.^{1, 34}

Áberandi í meingerð AD eru svokallaðar heilaskellur (*cerebral/neuritic plaques*) og taugaþráðlingar (*neurofibrillary tangles*). Heilaskellur og þráðlingar þekkjast við aðra sjúkdóma en AD, en eru samt talin sérkennandi kennileiti í meingerð AD. Heilaskellurnar eru utan við taugafrumurnar (taugunga) og eru venjulega í námunda við taugungamót (*synapses*). Þráðlingarnir eru aftur á móti innan frumnanna. Þeir hafa meira forspárgildi um ástand og framrás sjúkdómsins en heilaskellurnar.^{1, 22, 34}

Í himnu nær allra frumna í líkamanum er stórt forstigsprótein (*precursor protein*). Af því klofna peptíðbútar (einkum utan við frumuhimnuna) fyrir tilstilli þriggja sérstakra ensímkerfa (sekretasa). Þetta prótein kallast *APP*, sem er stytting úr ensku:

amyloid precursor protein. Gildi þess próteins og afurða þess gæti falist í endurnýjun frumna eða hluta þeirra og í miðtaugakerfinu sérstaklega að viðhalda taugungamótum. Mest af APP klofnar í auðleyst peptíð sem aldrei falla út í vefi. Lítill hluti APP klofnar hins vegar í vatnsfælin β -peptíð, sem í AD geta safnast saman og myndað strenglaga útfellingar, mýildi (*amyloid*). Eru þessi peptíð því nefnd *amýlóíð β -peptíð* eða stytt A β . Sú klofningsafurð úr APP sem mesta tilhneigingu hefur til þess að mynda mýildi inniheldur 42 amínósýrur, A β , (1-42), og myndar kjarnann í heilaskellunum.^{1, 22, 34}

Í taugungum er prótein sem nefnist *tau*. Það binst við frumupíplurnar (*microtubuli*) í sköftum (*axons*) taugunga. Það gerir píplurnar stöðugar þannig að flutningur á boðefnum, forstigum boðefna eða næringarefna helst greiður. Í tau-próteininu eru margar amínósýrur sem geta fosfórást (fosfórýlerast). Í AD eru amínósýrurnar í próteininu af einhverjum sökum offosfóraðar (*hyperphosphorylated*) og snúa próteiníð sundur í flóka sem smám saman mynda þráðlinga eins og áður ræðir. Við það falla píplurnar saman og flutningur um þær truflast eða stöðvast.^{22, 34} Skemmdir í taugasköftum eru því ríkjandi í AD.

Járn safnast (ásamt kopar og sinki sem losna við taugaboð) í heilaskellurnar og A β fellur þar ekki út nema málmjónir, ekki síst járn, sé einnig til staðar. Ferríjárn (Fe³⁺) binst jafnframt ofurfosfóruðu tau-próteini í AD. Sú binding virðist sömuleiðis vera undanfari myndunar á taugaþráðlingum. Járn virðist því vera nauðsynlegur liður í myndun beggja þeirra tveggja kennileita sem öðru fremur einkenna meingerð AD. Því má svo við bæta að járn er einnig nauðsynlegt til þess að fella prótein, α -sýnnúklein, út í mýildislíka myndun í kjarna Lewys-agna í PD.²¹⁻²³

Snemma á 10. áratug liðinnar aldar voru rannsökuð heilasýni úr nýlátnum AD-sjúklingum.³⁵ Í þessum sýnum var transferrín dreift kringum heilaskellur og stirnufrumur í stað þess að vera einkum í slíðurfrumum eins og venjulegt er. Sömu höfundar lýstu því síðar að transferrín væri í minna magni í heila við AD, en magn járns og ferrítíns væri breytilegt.³⁶ Í annarri rannsókn³⁷ var sömuleiðis unnið með sýni úr heila nýlátinna AD-sjúklinga. Niðurstöður þeirrar rannsóknar sýndu að járn sem bundið var í heilaskellunum og þráðlingunum væri hvarfgjarnt. Járn binst próteinum á Fe³⁺ formi, en getur afoxast í Fe²⁺ samtímis því sem H₂O₂ myndast. Súrvatn (H₂O₂) sem þannig myndast getur því næst enduroxað Fe²⁺ í Fe³⁺ samfara myndun á vefjaskemmandi hýdroxýlfrihópi (•OH). Þetta eru einmitt Fenton-hvörf sem fyrir ræðir. Í þessu sambandi er athyglisvert að þrátt fyrir verulegar raskanir á járn í heila AD-sjúklinga virðist járn ekki verið aukið í heilanum (samanber lokaorð).

Röskun á járnþúskaþ með líkum á Fenton-hvörfum má greina snemma á sjúkdómsferlinum eða þegar á forstigum sjúkdómsins, við væga vitræna skerðingu (*mild cognitive impairment*). Í þessu sambandi er jafnframt athyglisvert að myndun heilaskellna virðist vera samfara minnkandi oxunarskemmdum í heilanum.^{38, 39} Myndun heilaskellna gæti því í raun verið liður í að binda járn sem við sjúklegt ástand í heilanum við AD yrði ekki bundið öðruvísi. Þetta er í samræmi við þá staðreynd að skellurnar verða að því er virðist ekki til án járns, með eða án annarra málmjóna.

Höfundar ákvörðuðu Cp-þéttni og oxunarvirkni í sermi AD-sjúklinga með fremur vægan sjúkdóm (MMSE-gildi að meðaltali 15,9). Cp-virkni og sérvirkni var marktækt minni en í viðmiðun-

arhópnum. Cp-þéttin var hins vegar sú sama í báðum hópum, svo og þéttin kopars í plasma.⁴ Sams konar rannsókn var gerð 12 árum síðar á AD-sjúklingum með heldur vægari sjúkdóm en áður (MMSE-gildi að meðaltali 18,0). Niðurstöður urðu á sama veg og í fyrri rannsókninni.⁵ Á grundvelli þessara endurteknu rannsókna er það mat höfunda að Cp-oxunarvirkni í sermi sé minni í AD, en ekki Cp-þéttin. Líkleg skýring á þessum niðurstöðum er því að í AD sé truflun á festingu kopars í sameind Cp ríkjandi, en myndun á apóserúlóplasmíni sé óbreytt. Rannsóknir höfunda náðu að vísu ekki til sjúklinga með langt genginn AD.

Í rannsóknum höfunda var eins og áður segir rík áhersla á að ákvarða bæði oxunarvirkni Cp og þéttin. Lækkuð Cp-virkni í sermi getur leitt til aukinnar Cp-þéttin til uppbótar þverrandi virkni. Í slíkum tilvikum leiðir ákvörðun á Cp-þéttin til misvísandi eða villandi upplýsinga ef þess er ekki einnig gætt að ákvarða virkni Cp. Þetta gæti því vel skýrt hvers vegna aukin Cp-þéttin í sermi hefur stundum verið talin vera skilmerki um AD. Sama á einnig við um rannsóknir á Cp í PD.⁴⁰

Í rannsókn Arnals²⁴ var ákvörðuð Cp-þéttin í AD á þremur stigum sjúkdómsins (*mild, intermediate* og *severe*; MMSE-gildi að meðaltali 22,2, 15,9 og 11,6). Cp-þéttin í sermi var marktækt minni í veikasta hópnum en í viðmiðunarhópnum. Marktækur munur var ekki á hinum hópnum. Frír kopar í plasma (ekki bundinn Cp) fór hækkandi með versnandi sjúkdómsástandi og óx í línulegu samhengi við minnkandi MMSE-gildi. Niðurstöður nýlegra rannsókna Brewers og félagar⁴¹ eru á sömu lund og höfunda.^{4, 5} Cp-þéttin í sermi var þannig óbreytt í AD, en Cp-virknin marktækt minnkuð. Í þessum rannsóknum var frír kopar enn fremur marktækt aukinn í plasma AD sjúklinganna. Brewer⁴¹ skýrði þetta á þann veg að kopar hefði vantað í Cp („(it) lacks at least some of its coppers“). Í þessu sambandi ber að hafa í huga að veikustu sjúklingarnir í rannsókn Arnals voru mun veikari (höfðu að meðaltali lægri MMSE-gildi) en sjúklingar í rannsóknum Brewers⁴¹ eða höfunda.^{4, 5} Sá möguleiki er því greinilega til staðar að við langt genginn Alzheimersjúkdóm sé Cp-þéttin í sermi einnig marktækt minnkuð.

Squitti og félagar^{42, 43} hafa á síðustu árum haldið því fram að magn frís kopars í plasma AD-sjúklinga gefi vísbendingu um sjúkdómsferilinn. Höfundum er ekki kunnugt um að Squitti hafi ákvarðað Cp-virkni ásamt Cp-þéttin. Af þeim sökum er því erfitt á grundvelli þeirra rannsókna að álykta hvort frír kopar í plasma sé óháð stærð breytingum í Cp-virkni. Rannsóknir Brewers⁴¹ sem að framan greinir benda til þess að samband sé milli þessara tveggja þátta. Aukning á fríum kopar í rannsóknum Squittis gæti því hafa verið afleiðing af minni Cp-virkni í sermi. Í þessu sambandi er athyglisvert að samkvæmt nýlegri stórgreiningu (*meta-analysis*) er kopar stórlega minnkaður í heila við AD.⁴⁴ Öfugt við járn fer kopar að líkindum einkum úr blóðinu og inn í miðtaugakerfið á jónuðu formi.⁴⁵ Engin vöntun er á kopar í sermi eða heila-mænuvökva í AD.^{4, 42} Því gæti innferð kopars í miðtaugakerfið verið minnkuð í AD og það bitnað á virkni fleiri koparensíma en Cp.

Samantekt: Röskun á járnþúskaþ í heila við AD markast af oxunarskemmdum af völdum járns, járnsöfnun í heilaskellur og taugaþráðlinga og af hugsanlegum járnskorti. Cp-oxunarvirkni í sermi er minnkuð. Hömlun á festingu kopars í Cp, auk skorts á ensímkopar í heila, gæti stuðlað að AD.

Lokaorð

Við Cp-þurrð í blóði er alger vöntun á Cp og ótvíráð merki um járnaskanir í miðtaugakerfinu og utan þess. Í PD er nokkuð gott samhengi milli járnsofnunar í svartsviðið annars vegar og minnk- aðrar Cp-þéttni og oxunarvirkni í sermi hins vegar. Breytingar í Cp-geni tengjast einnig að ætla má járnsofnun í svartsviðið. Járn- raskanir eru litlar eða engar utan miðtaugakerfisins við PD² (sjá þó ⁴⁶). Ef þéttni og virkni Cp er á móta skert í svartsviði og er í sermi, hljóta sérstakar aðstæður að valda því að járnaskanir við PD eru nær eingöngu bundnar við miðtaugakerfið.

Minnkuð Cp-virkni gæti ein sér skipt verulegu máli við upp- komu AD, en meðal margháttaðra greindra genbreytinga í síð- komnum Alzheimersjúkdómi (langflest tilfelli AD) eru ekki stað- festar breytingar á Cp-geninu;⁴⁷ rannsóknin tók einnig til íslensks efniviðar). Járn er ekki aukið í heilanum við AD með nokkurri vissu.⁴⁴ Því er rökrétt að ætla að járnaskanir í heila AD-sjúklinga séu til orðnar vegna þess að járn og járnprótein hafi farið afvega af réttum stöðum í heilanum og við það valdið þeim sjúklegu breyt- ingum sem einkenna meingerð AD. Þá er á það að líta að kopar- skortur í heila AD-sjúklinga getur valdið skerðingu á starfi margra

koparensíma annarra en serúlóplasmíns. Þetta er mikilvægt rann- sóknarefni að kanna.

Skyldleikatengsl PD-sjúklinga eru mikil, meðal annars sam- kvæmt íslenskri rannsókn.⁴⁸ Því er mikilvægt að kanna hvort og hvernig breytingar á Cp-geni kunna að tengjast þessu erfða- mynstri. Enn fremur er nauðsynlegt að kanna hvern þátt aðrir þekktir oxíðasir í miðtaugakerfinu, sem að framan eru nefndir, gætu átt í uppkomu AD og PD. Að síðustu skal bent á að með nú- tímastofnfrumutækni ætti að vera unnt að greina hvort eða að hve miklu leyti truflun í starfi Cp er meðfædd í AD og PD.⁴⁹

Hvað er helst: Truflun í starfi Cp virðist tengjast uppkomu PD og gæti verið liður í viðtækari truflunum á starfi koparensíma í AD.

Þakkarorð

Sigurlaugu Sveinbjörnsdóttur taugasjúkdómalækni er þakkað ára- langt samstarf. Kristínu Björgu Guðmundsdóttur dýralækni eru þökkuð góð ráð og aðstoð við samningu handrits.

ENGLISH SUMMARY

Ceruloplasmin (Cp) and iron in connection with Parkinson's disease (PD) and Alzheimer's disease (AD)

Johannesson T¹, Kristinsson J¹, Torsdottir G², Snaedal J²

Ceruloplasmin, a multi-copper oxidase with four active copper atoms, oxidizes Fe²⁺ to Fe³⁺ and concomitantly fully reduces oxygen to water. The oxygenation of iron is a requisite for transferrin transport of iron and keeping noxious Fe²⁺ low. In the central nervous system (CNS) Cp is mostly localized in end feet of astrocytes surrounding capillaries and attached by a glycosylphosphatidylinositol-anchor. In aceruloplasmi- naemia, a rare recessive hereditary disease, complete loss of Cp is accompanied by disorders of iron metabolism and lesions in CNS and outside. In PD Cp concentration and oxidative activity in serum are significantly lowered with iron deposits and lesions in substantia nigra

and basal ganglia. Changes in Cp-genes might be causative in these disorders. By inducing neuromelanin synthesis Cp may protect neurons in substantia nigra. In AD Cp activity in serum, but not concentration, is significantly lowered. Changes in Cp-genes have not been verified in AD. Total amounts of iron are not increased in AD brains although iron deposits and cortical lesions are numerous. Total copper is significantly lowered in AD brains. This may result in defective synthesis of Cp and other copper enzymes. – In conclusion, the defective Cp activity, asso- ciated with iron disorders, is seemingly of importance in PD and also in AD with other copper enzyme defects possibly involved.

Key words: Copper, ceruloplasmin, iron, aceruloplasminaemia, Alzheimer's disease, Parkinson's disease.

Correspondence: Jón Snædal, jsnaedal@landspitali.is

¹The Department of Pharmacology and Toxicology, Medical Faculty, The University of Iceland, Reykjavík, ²Department of Geriatrics, Landspítali - The University Hospital of Iceland, Reykjavík.

Heimildir

1. Jóhannesson Þ, Kristinsson J, Snaedal J. Hrörnunarsjúkdómar í heila – oxavarnarensím og kopar. *Kynning á rannsóknnum. Læknablaðið* 2003; 89: 659-71.
2. Torsdóttir G, Kristinsson J, Sveinbjörnsdóttir S, Snaedal J, Jóhannesson T. Copper, ceruloplasmin, superoxide dismutase and iron parameters in Parkinson's disease. *Pharmacol Toxicol* 1999; 85: 239-43.
3. Torsdóttir G, Sveinbjörnsdóttir S, Kristinsson J, Snaedal J, Jóhannesson T. Ceruloplasmin and superoxide dismutase (SOD1) in Parkinson's disease: A follow-up study. *J Neurol Sci* 2006; 241: 53-8.
4. Snaedal J, Kristinsson J, Gunnarsdóttir S, Olafsdóttir A, Baldvinsson M, Jóhannesson T. Copper, ceruloplasmin and superoxide dismutase in patients with Alzheimer's disease. A case-control study. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1998; 9: 239-42. (Cp-sérvírki í þessari rannsókn, sem nefnd er í meginmáli, var fyrst reiknuð út síðar.)
5. Torsdóttir G, Kristinsson J, Snaedal J, Jóhannesson T. Ceruloplasmin and iron proteins in the serum of patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord Extra* 2011; 1: 366-71.
6. Holmberg CG, Laurell CB. Investigations in serum copper I. Nature of serum copper and its relation to the iron-binding protein in human serum. *Acta Chem Scand* 1947; 1: 944-50.
7. Harris ZL, Morita H, Gitlin JD. The biology of human ceruloplasmin. In: Messerschmidt A, ed. *Multi-Copper Oxidases* (chapter 10). World Scientific, Singapore 1997: 285-305.
8. Harris ZL, Takahashi Y, Miyajima H, Serizawa M, MacGillivray RTA, Gitlin JD. Aceruloplasminemia: Molecular characterization of this disorder of iron metabolism. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 22: 2539-43.
9. Vassiliev V, Harris ZL, Zatta P. Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 2005; 49: 633-40.
10. Texel SJ, Xu X, Harris ZL. Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans* 2008; 36: 1277-81.
11. Barber EF, Cousins RJ. Interleukin-1-stimulated induction of ceruloplasmin synthesis in normal and copper-deficient rats. *J Nutr* 1988; 118: 375-81.
12. Barber EF, Cousins RJ. Induction of ceruloplasmin synthesis by retinoic acid in rats: Influence of dietary copper and vitamin A status. *J Nutr* 1987; 117: 1615-22.
13. Roberts EA, Sarkar B. Liver as a key organ in the supply, storage, and excretion of copper. *Am J Clin Nutr* 2008; 88 (suppl): 851S-854S.
14. Torsdóttir G, Gudmundsson G, Kristinsson J, Snaedal J, Jóhannesson T. Ceruloplasmin and superoxide dismutase (SOD1) in heterozygotes for Wilson disease: A case control study. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2009; 5: 55-9.
15. Patel BN, David S. A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes. *J Biol Chem* 1997; 272: 20185-90.
16. Hellman NE, Gitlin JD. Ceruloplasmin metabolism and function. *Ann Rev Nutr* 2002; 22: 439-58.
17. Harris ZL, Klomp LW, Gitlin JD. Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis. *Am J Clin Nutr* 1998; 67 (Suppl): 972S-977S.
18. Harris ZL, Durlley AP, Man TK, Gitlin JD. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 10812-7.
19. Jeong SY, David S. Glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is required for iron efflux from cells in the central nervous system. *J Biol Chem* 2003; 278: 27144-8.
20. De Domenico I, Ward DM, di Patti MCB, Jeong SY, David S, Musci G, Kaplan J. Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *EMBO J* 2007; 26: 2823-31.
21. Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 863-73.
22. Altamura S, Muckenthaler MU. Iron toxicity in diseases of aging: Alzheimer's disease, Parkinson's disease and atherosclerosis. *J Alzheimer's Dis* 2009; 16: 879-95.
23. Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 205-14.
24. Arnal N, Cristalli DO, de Alaniz MJT, Marra CA. Clinical utility of copper, ceruloplasmin, and metallothionein plasma determinations in human neurodegenerative patients and their first-degree relatives. *Brain Res* 2010; 1319: 118-30.
25. Bharucha KJ, Friedman JK, Vincent AS, Ross ED. Lower serum ceruloplasmin levels correlate with younger age of onset in Parkinson's disease. *J Neurol* 2008; 255: 1957-62.
26. Jin L, Wang J, Zhao L, Jin H, Fei G, Zhang Y, et al. Decreased serum ceruloplasmin levels characteristically aggravate nigral iron deposition in Parkinson's disease. *Brain* 2011; 134: 50-8.
27. Martinez-Hernandez R, Montes S, Higuera-Calleja J, Yescas P, Boll MC, Diaz-Ruiz A, et al. Plasma ceruloplasmin ferroxidase activity correlates with the nigral sonographic area in Parkinson's disease patients: A pilot study. *Neurochem Res* 2011; 36: 2111-5.
28. Berg D, Hochstrasser H, Schweitzer KJ, Riess O. Disturbance of iron metabolism in Parkinson's disease - ultrasonography as a biomarker. *Neurotox Res* 2006; 9: 1-13.
29. Hochstrasser H, Bauer P, Walter U, Behnke S, Spiegel J, Csoti I, et al. Ceruloplasmin gene variations and substantia nigra hyperechogenicity in Parkinson disease. *Neurology* 2004; 63: 1912-7.
30. Zecca L, Casella L, Albertini A, Bellei C, Zucca FA, Engelen M, et al. Neuromelanin can protect against iron-mediated oxidative damage in system modeling iron overload of brain aging and Parkinson's disease. *J Neurochem* 2008; 106: 1866-75.
31. Uversky VN. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. *Cell Tissue Res* 2004; 318: 225-41.
32. Inden M, Kitamura Y, Abe M, Tamaki A, Takata K, Taniguchi T. Parkinsonian rotenone mouse model: Reevaluation of long-term administration of rotenone in C57BL/6 mice. *Biol Pharm Bull* 2011; 34: 92-6.
33. Hinenio A, Kaneko K, Yoshida K, Ikeda S. Ceruloplasmin protects against rotenone-induced oxidative stress and neurotoxicity. *Neurochem Res* 2011; 36: 2127-35.
34. Blennow K. Alzheimers sykdom – patofysiologi. Information från Läkemedelsverket 2002; 7/8: 21-34.
35. Connor JR, Menzies SL, St Martin SM, Mufson EJ. A histochemical study of iron, transferrin, and ferritin in Alzheimer's diseased brains. *J Neurosci Res* 1992; 31: 75-83.
36. Connor JR, Snyder BS, Beard JL, Fine RE, Mufson EJ. Regional distribution of iron and iron-regulatory proteins in the brain in aging and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 1992; 31: 327-35.
37. Smith MA, Harris PLK, Sayre LM, Perry G. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 9866-8.
38. Smith MA, Zhu X, Tabaton M, Liu G, McKeel DW, Cohen ML, et al. Increased iron and free radical generation in preclinical Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis* 2010; 19: 363-72.
39. Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, et al. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60: 759-67.
40. Torsdóttir G, Kristinsson J, Snaedal J, Sveinbjörnsdóttir S, Gudmundsson G, Hreidarsson S, et al. Case-control studies on ceruloplasmin and superoxide dismutase (SOD1) in neurodegenerative diseases: A short review. *J Neurol Sci* 2010; 299: 51-4.
41. Brewer GJ, Kanzer SH, Zimmerman EA, Celmins DF, Heckman SM, Dick R. Copper and ceruloplasmin abnormalities in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Dement* 2010; 25: 490-7.
42. Bucossi S, Ventriglia M, Panetta V, Salustri C, Pasqualetti P, Mariani S, et al. Copper in Alzheimer's disease: A meta-analysis of serum, plasma, and cerebrospinal fluid studies. *J Alzheimers Dis* 2011; 24: 175-85.
43. Squitti R, Ghidoni R, Scarscia F, Benussi L, Panetta V, Pasqualetti P, et al. Free copper distinguishes mild cognitive impairment subjects from healthy elderly individuals. *J Alzheimers Dis* 2011; 23: 239-48.
44. Schrag M, Mueller C, Oyoyo U, Smith MA, Kirsch WM. Iron, zinc and copper in the Alzheimer's disease brain: A quantitative meta-analysis. Some insight on the influence of citation bias on scientific opinion. *Prog Neurobiol* 2011; 94: 296-306.
45. Choi BS, Zheng W. Copper transport to the brain by the blood-brain barrier and blood-CSF barrier. *Brain Res* 2009; 1248: 14-21.
46. Logroscino G, Marder K, Graziano J, Freyer G, Slavkovich V, Lofacono N, et al. Altered systemic iron metabolism in Parkinson's disease. *Neurology* 1997; 49: 714-7.
47. Hollingworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert JC, Carrasquillo MM, et al. Common variants at *ABCA7*, *MS4A6A/MS4A4E*, *EPHA1*, *CD33* and *CD2AP* are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 2011; 43: 429-36.
48. Sveinbjörnsdóttir S, Hicks AA, Jonsson T, Petursson H, Gudmundsson G, Frigge, et al. Familial aggregation of Parkinson's disease in Iceland. *N Engl J Med* 2000; 343: 1765-70.
49. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008; 321: 1218-21.