ANNA SARNOWSKA

MECHANIZMY DZIAŁANIA WYBRANYCH ZWIĄZKÓW NEUROPROTEKCYJNYCH W USZKODZENIU ISCHEMICZNYM NEURONÓW SEKTORA CA1 HIPOKAMPA

ROZPRAWA DOKTORSKA



Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN
BIBLIOTEKA
ZS 274
H 4075

Promotor:
Prof. dr hab. n. med. Krystyna Domańska-Janik

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
im. M.J. Mossakowskiego

Warszawa, 2006

http://rcin.org.pl

„Przeciętny nauczyciel mówi. Dobry wyjaśnia. Znakomity nauczyciel daje przykład, ale ten wielki - inspiruje." (William Arthur Ward)

Za cierpliwość i wyrozumiałość, a nade wszystko za ciągłe pobudzanie do myślenia i stawiania pytań, składam najserdeczniejsze podziękowania promotorowi mojej pracy

Prof. dr hab. n. med. Krystynie Domańskiej-Janik

Dziękuję również prof. dr hab. n. med. Barbarze Łukomskiej za cenne wskazówki i wnikliwe uwagi dotyczące zredagowanego tekstu.

Szczególnie pragnę podziękować dr hab. n. med. Barbarze Zabłockiej za niezwykłą rzeczowość i zaangażowanie oraz okazaną mi życzliwość sprawiły, że nasza współpraca była dla mnie prawdziwą przyjemnością.

Dziękuję również Wszystkim, którzy na różnych etapach powstawania tej pracy służyli mi radą i pomocą.

http://rcin.org.pl

„Bez względu na to, jak bardzo rozgrzany jest niedopałek, wyjęty z ognia, szybko gaśnie. Bez względu na to, jak bardzo mądry może być człowiek, będąc daleko od swoich bliskich, nigdy nie zdoła zachować swojego ciepła i płomienia swojej miłości."

(Paulo Coelho)

Rodzinie

http://rcin.org.pl

Część opisanych w niniejszej pracy wyników dotyczących metody prowadzenia hodowli organotypowej skrawków z hipokampa szczura, neuroprotekcyjnego działania cyklosporyny A, FK 506 i IGF-1 została wykorzystana w następujących publikacjach:

1. Sarnowska A. Application of organotypic hippocampal culture for study of selective neuronal death. Folia Neuropathol. 2002;40(2):101-6.
2. Domańska-Janik K, Bużańska L, Dłużniewska J, Kozłowska H, Sarnowska A, Zabłocka B. Neuroprotection by cyclosporin A following transient brain ischemia correlates with the inhibition of the early efflux of cytochrome C to cytoplasm. Brain Res Mol Brain Res. 2004 Feb 5;121(1-2):50-9.
3. Dłużniewska J, Sarnowska A, Beręsewicz M, Johnson I, Srai SK, Ramesh B, Goldspink G, Górecki DC, Zabłocka B. A strong neuroprotective effect of the autonomous C-terminal peptide of IGF-1 Ec (MGF) in brain ischemia. FASEB J. 2005 Nov;19(13):1896-8.

Badania, których wyniki przedstawiono w tej pracy były częściowo finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach promotorskiego projektu badawczego nr 2P05A00927.

http://rcin.org.pl

SPIS TREŚCI

SKRÓTY UŻYWANE W PRACY 4

I. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA 6

I.A. EPIDEMIOLOGIA CHOROBY NIEDOKRWIENNEJ MÓZGU 6

I.B. PATOFIZJOLOGIA NIEDOKRWIENIA MÓZGU 7

I.C. MECHANIZMY KOMÓRKOWE USZKODZENIA ISCHEMICZNEGO NEURONÓW 8

I.C.1. Mechanizm ekscytotoksyczny uszkodzenia neuronów 8
I.C.2. Procesy wolnorodnikowe prowadzące do uszkodzenia neuronów 10
I.C.3. Inne mechanizmy molekularne determinujące los neuronów po ischemii 11
I.C.4. Morfologiczne cechy śmierci neuronów w ischemii mózgu 13
I.C.5. Mitochondria jako struktura integrująca sygnały promujące przeżycie lub śmierć komórki 14

I.D. CZYNNIKI OGÓLNOUSTROJOWE O ZNACZENIU PROTEKCYJNYM W ISCHEMII 16

I.D.1. Wzbudzona tolerancja (hartowanie) mózgu na niedokrwienie 17
I.D.2. Hipotermia 18

I.E. KRYTERIA WYBORU MODELI BADAWCZYCH, ORAZ TESTOWANYCH ZWIĄZKÓW 19

I.E.1. Ogólna ocena trudności modelowania badań przedklinicznych w ischemii mózgu 19
I.E.2. Charakterystyka wybranych do doświadczeń modeli badawczych 20
I.E.3. Kryteria wyboru związków do przeprowadzanych badań 22

II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY 26

III. MATERIAŁ DOŚWIADCZALNY 28

IV. METODYKA BADAŃ 29

IV.A. METODYKA BADAŃ W MODELU ORGANOTYPOWEJ HODOWLI SKRAWKÓW Z HIPOKAMPA SZCZURA 29

IV.A.1. Hodowla skrawków 29
IV.A.2. Metoda wywoływania uszkodzenia wolnorodnikowego lub ekscytotoksycznego neuronów rejonu CA1 hipokampa 30
IV.A.3. Schemat badania neuroprotekcji farmakologicznej 30
IV.A.4. Metoda badania przeżycia komórek rejonu CA1 hipokampa z użyciem IP oraz sposób opracowania danych 31
IV.A.5. Izolacja frakcji mitochondrialnej i cytozolowej z komórek skrawka hipokampa 32
IV.A.6. Oznaczanie stężenia białka 33

http://rcin.org.pl

IV.A.7. Oznaczanie przemieszczeń cytochromu c i aktywności kaspazy 3 metodą Western blot ... 33
IV.A.8. Oznaczanie przemieszczeń cytochromu c i aktywności kaspazy 3 metodami immunohistochemicznymi w skrawkach *in situ* ... 34
IV.A.9. Oznaczanie przemieszczeń cytochromu c i aktywności kaspazy 3 metodami immunoenzymatycznymi (ELISA) ... 36

IV.B. METODYKA BADAŃ NA ZWIERZĘTACH *IN VIVO* ... 38

IV.B.1. Model przejściowej ischemii przodomózgowia u myszoskoczka mongolskiego ... 38
IV.B.2. Schemat zastosowanej neuroprotekcji farmakologicznej *in vivo* ... 38
IV.B.3. Doświadczalne modulowanie temperatury ciała myszoskoczka mongolskiego w czasie i po ischemii ... 39
IV.B.4. Barwienie histochemiczne i morfometria neuronów rejonu CA1 w skrawkach parafinowych hipokampa ... 39
IV.B.5. Oznaczenie rodzaju śmierci neuronów (apoptozy) w rejonie CA1 hipokampa na skrawkach parafinowych mózgu metodą TUNEL ... 40

IV.C. METODYKA BADAŃ NA IZOLOWANEJ FRAKCJI MITOCHONDRIALNEJ MÓZGU SZCZURA ... 40

IV.C.1. Izolacja mitochondriów ... 40
IV.C.2. Schemat uszkodzenia wolnorodnikowego i zastosowanej protekcji mitochondriów *in vitro* ... 41
IV.C.3. Oznaczenie dynamiki wypływu cytochromu c z wyizolowanych mitochondriów metodą immunoenzymatyczną (ELISA) ... 41

IV.D. OBLICZENIA STATYSTYCZNE ... 42

V. WYNIKI BADAŃ ... 43

V.A. BADANIA PRZEPROWADZONE NA ORGANOTYPOWEJ HODOWLI HIPOKAMPALNEJ ... 43

V.A.1. Identyfikacja struktur anatomicznych hipokampa ... 43
V.A.2. Określenie stopnia uszkodzenia wolnorodniowego neuronów rejonu CA1 w zależności od dawki TBH i czasu ekspozycji ... 44
V.A.3. Określenie stopnia uszkodzenia ekscytotoksycznego neuronów rejonu CA1 w zależności od dawki NMDA i czasu ekspozycji ... 47
V.A.4. Neuroprotekcyjne działanie wybranych związków w modelu wolnorodnikowego uszkodzenia neuronów rejonu CA1 hipokampa ... 50
V.A.5. Zbiorcze zestawienie działania badanych związków w ich optymalnej dawce na przeżycie komórek rejonu CA1 w modelu uszkodzenia wolnorodnikowego ... 57
V.A.6. Weryfikacja działania wybranych związków w modelu uszkodzenia ekscytotoksycznego ... 59
V.A.7. Zależność efektu ochronnego badanych związków od czasu zastosowania neuroprotekcji ... 62
V.A.8. Zmiana przepuszczalności błony mitochondrialnej dla cytochromu c i aktywacji kaspazy 3 w modelu uszkodzenia neuronów rejonu CA1 ... 66

http://rcin.org.pl

V.B. BADANIA PRZEPROWADZONE NA ZWIERZĘTACH *IN VIVO* 80

V.B.1. Neuroprotekcyjne działanie CsA, FK506, Diazepamu i Minocykliny oraz morfometryczna ocena neuronów rejonu CA1 hipokampa 81
V.B.2. Określenie udziału hipotermii w neuroprotekcyjnym działaniu Diazepamu 88

V.C. BADANIA *IN VITRO* W IZOLOWANYCH MITOCHONDRIACH SZCZURA 92

V.C.1. Zmiana przepuszczalności błony mitochondrialnej dla cytochromu c w modelu uszkodzenia wolnorodnikowego oraz po podaniu Diazepamu 92
V.C.2. Zmiana przepuszczalności błony mitochondrialnej dla cytochromu c w modelu uszkodzenia wolnorodnikowego oraz po podaniu CsA 94
V.C.3. Zmiana przepuszczalności błony mitochondrialnej dla cytochromu c w modelu uszkodzenia wolnorodnikowego oraz po podaniu Minocykliny 96

VI. DYSKUSJA 98

VI.A. ANALIZA ZASTOSOWANEJ METODYKI DOŚWIADCZEŃ 98

VI.A.1. Analiza metody hodowli organotypowej skrawków hipokampa 98
VI.A.2. Analiza zastosowanych modeli uszkodzenia neuronów wywołanych podaniem TBH i NMDA 99
VI.A.3. Analiza zastosowanego modelu ischemii *in vivo* 101

VI.B. OCENA DZIAŁANIA NEUROPROTEKCYJNEGO WYBRANYCH ZWIĄZKÓW W ASPEKCIE USZKODZENIA ISCHEMICZNEGO MÓZGU 102

VI.B.1. Ocena działania protekcyjnego IGF-1 po uszkodzeniu wolnorodnikowym i ekscytotoksycznym w badaniach *in vitro i in vivo* 102
VI.B.2. Ocena działania protekcyjnego CsA i możliwości jej zastosowania w niedokrwieniu mózgu 103
VI.B.3. Ocena działania protekcyjnego Minocykliny i możliwości jej zastosowania w niedokrwieniu mózgu 109
VI.B.4. Ocena działania protekcyjnego Diazepamu i możliwości jego zastosowania w niedokrwieniu mózgu 113

VII. WNIOSKI 120

VIII. PIŚMIENNICTWO 121

IX. STRESZCZENIE 136

http://rcin.org.pl

SKRÓTY UŻYWANE W PRACY

AIF – (ang. apoptosis inducing factor) czynnik indukujący apoptozę

AKT - kinaza serynowo/treoninowa

ALS – (ang. amyotrophic lateral sclerosis) stwardnienie zanikowe boczne

ANT – (ang. adenine nucleotide translocase) translokaza nukleotydów adeninowych

ATP – (ang. adenosine triphosphate) adenozynotrójfosforan

BBB – (ang. blood-brain barrier) bariera krew-mózg

Bcl-2 - białko antyapoptotyczne z rodziny białek Bcl-2

Bid – białko proapoptotyczne z rodziny białek Bcl-2

BSA – albumina surowicy bydlęcej

BZD - benzodiazepiny

CA – (łac. Cornu Ammonis) warstwa neuronów piramidowych hipokampa

CBR – (ang. central benzodiazepine receptor) – ośrodkowy receptor dla benzodiazepin

COX-2 – cyklooksygenaza 2

CsA – cyklosporyna A

CyPA/CyPD – cyklofiliny A/D

DAB – 3,3' -diaminobenzydyna

DG – (ang. dentate gyrus) zakręt zębaty

DMEM – Dulbecco Modified Eagle Medium

FKBP12 – (ang. FK binding protein) białko wiążące FK506

FKHRL-1 – forkhead target genes

GABA A – receptor GABA A

HBSS – Hank's Balance Salt Solution

HD - (ang. Huntington disease) choroba Huntingtona

HOC – (ang. hippocampal organotypic slice culture) organotypowa hodowla skrawkowa z hipokampa szczura

i.a. – (łac. *intraarterial*) sposób podania leku dotętniczo

i.c. – (łac. *intracranial*) sposób podania leku domózgowo

i.p. – (łac. *intraperitoneal*) dootrzewnowo

i.v. – (łac. *intra venosus*) dożylnie

IBP – (ang. isoquinoline bainding protein) białko wiążące izochinolinę

IGF-1 – (ang. insulin-like growth factor 1) insulino-podobny czynnik wzrostowy 1

iNOS – indukowalna forma syntazy tlenku azotu

http://rcin.org.pl

IP – (ang. propidium iodide) jodek propidyny

MCAo – (ang. medial cerebral artery occlusion) model udaru mózgu

MPTP - 1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyna

MTP – (ang. mitochondrial transition pore) megakanał mitochondrialny

MtPTP – mitochondrial permeability transient pore

NFκB - (ang. nuclear factor κB) czynnik jądrowy κB

NMDA – (ang. N-metyl-D-aspartic acid) kwas N-metylo-D-asparaginowy

NO – (ang. nitric oxide) tlenek azotu

OGD – (ang. oxygen–glucose deprivation) deprywacja tlenowa w warunkach hipoglikemii

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PBR – (ang. peripheral benzodiazepine receptor) – obwodowy receptor dla benzodiazepin

PBS – roztwór soli fizjologicznej w buforze fosforanowym

PD – (ang. Parkinson disease) choroba Parkinsona

PDK-1 - fosfatydyloinozytolozależna kinaza 1

PGE2 – prostaglandyna E2

PI3K - fosfatydyloinozytolo-3-kinaza

PP2B – kalcyneuryna

s.c. – (łac. *subcutaneous*) sposób podania leku podskórnie

SPECT – (ang. single photon emission computed tomography) tomografia emisyjna pojedynczego fotonu

TBH – (ang. tert-butylhydroperoxide) tert-butyl-hydroksytlenek

TBST – roztwór soli fizjologicznej w buforze Tris-HCl i Tween-20

TIA – (ang. transient ischemic attack) przemijające niedokrwienie mózgu

TUNEL – terminal transferase dUTP nick end-labeling

VDAC – (ang. voltage dependent anion channel) napięciozależny kanał anionowy

http://rcin.org.pl

I. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA

I.A. EPIDEMIOLOGIA CHOROBY NIEDOKRWIENNEJ MÓZGU

Niedokrwienie mózgu (udar) jest obecnie jedną z głównych przyczyn umieralności, a także jednym z najcięższych i najczęściej występujących czynników uszkadzających ośrodkowy układ nerwowy (OUN) w krajach Europy. Według dostępnych statystyk, co 10 człowiek w Europie po 50 roku życia umiera z powodu udaru. W pierwszych czterech tygodniach po udarze mózgu umiera co czwarty chory. Ponad 30% pacjentów przeżywających pierwszy miesiąc choroby pozostaje w wysokim stopniu niesprawna. Statystyki polskie są jeszcze bardziej niepokojące. Polska zajmuje jedno z czołowych miejsc w Europie pod względem zachorowalności i umieralności w związku z chorobami naczyniowymi OUN. Niedokrwienie to problem nie tylko udarów. Każda patologia prowadząca do powstania ucisku na sąsiednie struktury (np. guz, krwiak, stłuczenie mózgu z następowym obrzękiem), powikłania dużych operacji w tym kardiologicznych, operacje w krążeniu pozaustrojowym, długotrwała narkoza, mogą również skutkować niedokrwieniem mózgu.

Ze względu na rozległość problemu, jak również epidemiologię udaru, od wielu lat prowadzone są liczne badania na całym świecie nad patofizjologią i podłożem molekularnym zmian zachodzących podczas ostrej niewydolności krążenia mózgowego w tkance nerwowej OUN. W minionej dekadzie, nazwanej "dekadą mózgu" zgromadzono olbrzymią wiedzę dotyczącą patomechanizmów ischemicznego uszkodzenia OUN. Niestety zdobyte informacje do dnia dzisiejszego nie doprowadziły do opracowania skutecznych metod leczenia udaru niedokrwiennego (Lee i wsp. 1999). W ostatnich latach wiele substancji wykazało znaczące działanie neuroprotekcyjne w badaniach *in vitro*. Niestety wyniki te nie znalazły swojego odzwierciedlenia w doświadczeniach *in vivo*. Obecnie prowadzonych jest ok. 70 międzynarodowych, dużych badań klinicznych mających na celu ocenę działania neuroprotekcyjnego różnych związków w udarze mózgu. Do trzeciej fazy badań klinicznych zakwalifikowano tylko trzy związki. Dotychczas żaden z tych leków nie został zatwierdzony jako skuteczny neuroprotektant. Jedynymi lekami, jakie doczekały się pozytywnych wyników w randomizowanych, kontrolowanych badaniach klinicznych są leki antyagregacyjne (hamujące agregację płytek t.j. kwas acetylosalicylowy) i trombolityczne (rozpuszczające skrzeplinę t.j. rTPA), najbardziej skuteczne w polepszeniu reperfuzji tkanki, ale obwarowane bardzo rygorystycznymi warunkami, dyskwalifikującymi większość chorych z udarem

http://rcin.org.pl

niedokrwiennym (Lees 2002). Ich podawanie ma na celu jak najszybsze przywrócenie przepływu krwi w naczyniach zaopatrujących mózg (reperfuzję), nie zaś przeciwdziałanie zaburzeniom na poziomie komórkowym, powstałym w wyniku niedokrwienia mózgu, czyli właściwą neuroprotekcję. Ta sytuacja wskazuje na duży rozdźwięk pomiędzy wiedzą o mechanizmach śmierci neuronów, możliwościami modulowania ich na poziomie (sub)komórkowym, a praktycznymi osiągnięciami klinicznymi.

I.B. PATOFIZJOLOGIA NIEDOKRWIENIA MÓZGU

Na podstawie danych doświadczalnych i spostrzeżeń klinicznych przyjmuje się, że zatrzymanie krążenia krwi na okres dłuższy niż 4-5 minut prowadzi do szybkiego narastania zaburzeń czynnościowych układu nerwowego, a następnie do nieodwracalnej utraty integralności strukturalnej mózgu. Spadek przepływu mózgowego (CBF) poniżej poziomu krytycznego doprowadza w bardzo krótkim czasie do deficytu energetycznego w komórce. W ognisku niedokrwienia narasta kwasica na skutek nagromadzenia się mleczanów i wzrostu stężenia parcjalnego CO_2. W miarę przedłużania się czasu trwania niedokrwienia, zdolność do autoregulacji przepływu krwi spada prowadząc do porażenia naczyń. W przypadkach nieterminalnych, samoistnie lub po zastosowaniu leczenia farmakologicznego, może dojść do przywrócenia krążenia - reperfuzji. Czasami procesowi temu może towarzyszyć jeszcze większe uszkodzenie tkanki, gdyż dostarczony do niedokrwionej tkanki tlen indukuje powstanie reaktywnych produktów utleniania, w tym wolnych rodników. Prawdopodobnie z tych powodów, pomimo częstej spontanicznej reperfuzji (42%), ocenianej za pomocą SPECT (tomografii emisyjnej pojedynczego fotonu), kliniczna poprawa występuje jedynie u 2% chorych. Ponadto dobra reperfuzja po ciężkim epizodzie ischemicznym, może wiązać się z ryzykiem wystąpienia obrzęku mózgu.

W OUN występują rejony szczególnie wrażliwe na niedokrwienie. Do grupy neuronów najbardziej podatnych należą: neurony piramidowe hipokampa (głównie rejon CA 1), oraz II i IV warstwa kory mózgowej, komórki prążkowia, oraz komórki Purkinjego w móżdżku. Jak już wspomniano, pierwsza, ostra faza uszkodzenia ischemicznego spowodowana jest głębokim niedoborem energetycznym. Konsekwencją tego niedoboru jest cały szereg zmian wtórnych (takich jak depolaryzacja błon, uwolnienie neuroprzekaźników z zakończeń presynaptycznych, w tym aminokwasów pobudzających, zaburzenie homeostazy jonowej, obniżenie wewnątrzkomórkowego pH, zahamowanie zależnych od energii szlaków syntezy

http://rcin.org.pl

związków makromolekularnych), z których każdy może przyczynić się do ograniczenia przeżywalności komórek nerwowych i ostatecznie do ich szybkiej śmierci.

Niedokrwienie mózgu poza bezpośrednią, związaną z ostrą fazą uszkodzenia poischemicznego martwicą tkanki, może indukować w określonych okolicach mózgu, po okresie pozornego powrotu funkcji tzw. opóźnioną śmierć komórek nerwowych, w ciągu kilku dni po przywróceniu krążenia. Do obszarów, w których można zaobserwować opóźnioną śmierć komórek należą: wspomniane już rejony szczególnie wrażliwe na ischemię, oraz tak zwany obszar "półcienia" (ischemic penumbra) o upośledzonym przepływie krwi, graniczący z ogniskiem. Komórki nerwowe w tych obszarach wykazują pierwotnie odwracalne zaburzenia funkcjonalne. Jeśli krążenie krwi w obszarze "półcienia" pojawi się w ciągu kilku godzin od niedokrwienia (tzw. okno terapeutyczne), to istnieje realna szansa na ponowne podjęcie funkcji przez znajdujące się tam komórki nerwowe.
Głównym celem leczenia farmakologicznego udarów mózgu jest neuroprotekcja w omawianych powyżej obszarach. Występowanie zjawiska opóźnionej śmierci w opisanych strefach szczególnego zagrożenia stwarza realne szanse skutecznej ingerencji farmakologicznej przywracającej czynność znacznej liczbie neuronów.

I.C.MECHANIZMY KOMÓRKOWE USZKODZENIA ISCHEMICZNEGO NEURONÓW

Wydaje się, ze mechanizm powstawania opóźnionych, selektywnych uszkodzeń poniedokrwiennych jest wysoce specyficzny i znacznie odbiegający od tego, co obserwuje się w ostrej fazie patologii niedokrwiennej. Późne uszkodzenia neuronów powstają prawdopodobnie w wyniku wtórnych zaburzeń biochemicznych i molekularnych na poziomie komórkowym i subkomórkowym. Poznanie molekularnego podłoża leżącego u podstaw tych procesów prowadzących do opóźnionej śmierci neuronów jest szczególnie istotne dla wypracowania efektywnych schematów terapeutycznych.

I.C.1. Mechanizm ekscytotoksyczny uszkodzenia neuronów

W uszkodzeniu ischemicznym neuronów można wyróżnić trzy podstawowe procesy:

- zależne od kryzysu energetycznego komórek przemieszczenie jonów jednowartościowych (Na^+, Cl^-) i wody, odpowiadające za depolaryzację i obrzęk wewnątrzkomórkowy (faza ostra niedokrwienia)

http://rcin.org.pl

- pozakomórkowy wzrost stężenia glutaminianu zachodzący za pośrednictwem pobudzenia receptorów glutamatergicznych, głównie NMDA, napływ jonów Ca^{2+} i przeładowanie neuronów tym jonem oraz powstanie tzw. "pętli glutamatergicznej", odpowiedzialnej za potęgowanie procesów neurodegeneracyjnych w czasie dalszej reperfuzji

Opisując kolejno wymienione procesy należy zacząć od czynników inicjujących stres niedokrwienny w komórkach: obniżenie stężenia parcjalnego O_2 i poziomu glukozy. W związku z niedoborem tych substratów w komórce dochodzi do obniżenia poziomu ATP. W ognisku zawału w ciągu 1-2 minut poziom ATP spada do poziomu krytycznego, podczas gdy w obszarze penumbry ATP pozostaje na poziomie niskim, lecz nie krytycznym. Obniżenie ATP prowadzi do zahamowania Na^+/K^+ ATP-azy, a więc zaburzenia stężenia jonów Na^+/K^+ i potencjału błonowego. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Na^+ niesie za sobą poważne następstwa. Prowadzi między innymi do zahamowania wychwytu glutaminianu przez astrocyty i nadmiernego jego uwalniania z zakończeń synaptycznych. Najnowsze dane sugerują, że głównym źródłem wysokiego stężenia glutaminianu w niedokrwieniu mózgu jest odwrócenie działania jego neuronalnego i glejowego transportera wychwytu zwrotnego, dla którego siłą napędową jest gradient Na^+ (Erecińska, Silver 1990), w wyniku czego glutaminian zamiast być wychwytywany z synapsy, jest do niej uwalniany. Presynaptyczne stężenie glutaminianu może osiągać bardzo wysokie wartości również w wyniku zaburzenia dopęcherzykowego transportu glutaminianu zależnego również od ATP. Glutaminian uaktywnia kanały/receptory NMDA i kainianowe o wysokiej przepuszczalności dla wapnia.

Wysokie stężenie wewnątrzkomórkowe sodu powoduje również zahamowanie, a nawet odwrócenie kierunku pracy wymiennika Na^+/Ca^{2+}, odpowiedzialnego za usuwanie Ca^{2+} z neuronów. Efektem spadku gradientu Na^+ i upośledzenia działania pompy protonowej z jednoczesnym przestawieniem metabolizmu na tor anaerobowy jest zakwaszenie środowiska wewnątrzkomórkowego. Jednocześnie deficyt energii i spadek produkcji ATP w mitochondriach powoduje hipopolaryzację neuronów i zwolnienie bloku magnezowego receptora NMDA. Dochodzi do dalszego przemieszczania zewnątrzkomórkowego wapnia do neuronów. Wzrost stężenia tego jonu w cytozolu prowadzi m.in. do aktywacji syntazy tlenku azotu, endonukleaz, proteaz i fosfolipazy A2. Pobudzenie fosfolipazy A2 powoduje m.in. uwolnienie wolnych kwasów tłuszczowych, a w wyniku ich peroksydacji powstanie wolnych rodników tlenowych, które uszkadzają funkcję mitochondriów, a zwłaszcza zaburzają działanie łańcucha oddechowego. Produkty aktywacji fosfolipazy oraz NOS, a mianowicie NO i wolne nienasycone kwasy tłuszczowe mogą być uwalniane z neuronów modulując

http://rcin.org.pl

zwrotnie transmisję synaptyczną (Łazarewicz 2000).

Na hodowlach komórkowych wykazano, że charakter zmian zachodzących po uszkodzeniu ekscytotoksycznym zależy od stopnia pobudzenia komórek przez glutaminian. W przypadku bardzo silnego pobudzenia receptorów NMDA dochodzi do napływu jonów wapnia, sodu i potasu oraz opisanego wcześniej pęcznienia i lizy komórek. Śmierć ma wówczas charakter nekrotyczny, a zmianom w mózgu obserwowanym w doświadczeniach *in vivo* towarzyszy stan zapalny otaczającej tkanki. Jeżeli bodziec aktywujący był słabszy i nie doszło do tak drastycznych zaburzeń jonowych komórka wchodzi w proces apoptozy bez indukcji stanu zapalnego. Potwierdzeniem kluczowej roli receptorów NMDA w uszkodzeniu ekscytotoksycznym jest większa wrażliwość na uszkodzenie rejonów bogatych w ten typ receptorów np. komórek rejonu CA 1 hipokampa. Obszar CA3, gdzie receptorów NMDA jest wyraźnie mniej jest również mniej wrażliwy na uszkodzenie ekscytotoksyczne (Rothman, Olney 1995).

I.C.2. Procesy wolnorodnikowe prowadzące do uszkodzenia neuronów

Drugim ważnym procesem indukowanym podczas niedokrwienia jest stres oksydacyjny. Reaktywne formy tlenu (ROS) są ubocznym produktem wielu reakcji redox zachodzących w mózgu. Do najważniejszych produktów redukcji tlenu należą: anionorodnik ponadtlenkowy ($0_2^{\cdot}$-), nadtlenek wodoru (H_20_2), rodnik hydroksylowy ($OH^{\cdot}$), a także produkty reakcji tych rodników z białkami i lipidami (Kontos 2001). Peroksydacja lipidów zwłaszcza błonowych, może zaburzać strukturę i funkcję błon biologicznych tak ważnych struktur jak mitochondria, retikulum endoplazmatyczne czy błony plazmatyczne neuronów. Modyfikacja wolnorodnikowa białek błonowych może doprowadzić bezpośrednio do ich denaturacji lub do zmiany aktywności. Niezwykle niebezpiecznym skutkiem stresu oksydacyjnego jest uszkodzenie nici DNA (Bai, Konat 2003). W normalnych warunkach produkcja wolnych rodników jest kontrolowana przez wyłapywacze wolnych rodników i antyutleniacze t.j. dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydaza glutationowa, czy katalaza (Pias, Aw 2002). W przebiegu stresu oksydacyjnego dochodzi do zaburzeń równowagi pomiędzy produkcją wolnych rodników a mechanizmami obronnymi. Mitochondria stają się obfitym źródłem produkcji wolnych rodników. W wyniku ich spęcznienia, spadku potencjału transbłonowego i uwolnienia wolnych rodników generowanych w nadmiarze w źle funkcjonującym łańcuchu oddechowym, dochodzi do otwarcia megakanałów MPT i wypływu mitochondrialnych aktywatorów apoptozy, białek, które w normalnych warunkach nie są obecne w cytoplazmie

http://rcin.org.pl

(Christophe, Nicolas 2006). Poziom stresu oksydacyjnego uważany jest za molekularny czujnik możliwości przeżycia lub śmierci neuronów po niedokrwieniu. Wolne rodniki działają jednocześnie na metaboliczne procesy mitochondrialne, enzymy naprawy DNA i terminalny szlak apoptotyczny zależny bądź niezależny od kaspaz.

Podsumowując, poziom aktywacji receptorów glutamatergicznych i stres oksydacyjny są samonapędzającymi się procesami inicjowanymi przez ischemię i przyczyniającymi się do opóźnionej śmierci neuronów.

I.C.3. Inne mechanizmy molekularne determinujące los neuronów po ischemii

W czasie reperfuzji, w zależności od charakteru i stopnia niedokrwienia, wzbudzone przez stres metaboliczny sygnały mogą nie tylko przyczyniać się do pogłębiania pierwotnych uszkodzeń ischemicznych, ale również wzmacniać szanse ich przeżycia i pełnego powrotu funkcjonalnego.

W związku z inicjacją dwóch tak przeciwstawnych procesów zachodzących w okresie poischemicznym została wysunięta hipoteza istnienia w każdej komórce zarówno aktywnego programu śmierci (ACD), prowadzącego do apoptozy, jak i programu przeżycia (LP) (Domańska-Janik 2001). Do czynników promujących przeżycie komórki należą białka z rodziny Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL i Bag). Mechanizm molekularny ich działania nie został w pełni wyjaśniony, ale przypuszcza się, że polega na uszczelnieniu błony mitochondrialnej poprzez wiązanie się z białkiem Bax i zabezpieczeniu przed wyciekiem z mitochondriów proapoptotycznych białek. Zdefosforylowane podczas ostrej fazy ischemicznej białko Bax agreguje i tworzy kanał, przez który przedostają się opisane poniżej białka proapoptotyczne. Dodatkowo w okolicach mózgu, w których po przebyciu ostrego epizodu ischemicznego nie dochodzi do trwałych uszkodzeń neuronów (np. w DG) obserwuje się zwiększoną w porównaniu z rejonami wrażliwymi (sektor CA1 hipokampa) ekspresję całego zestawu genów IEG (immediate early genes) włącznie z genami białek "stresowych" (HSP-70, GRP-78) i czynników transkrypcyjnych AP1 i NFκB. Aktywacja IEG wpływa na indukcję dalszych genów i na pozytywny profil wytwarzanych czynników troficznych (Domańska-Janik 1999, 2001).

Natomiast w realizacji programu aktywnej śmierci komórek (ACD) biorą udział dwa kompleksy białkowe - kompleks DISC (Nagata 1997) i tzw. apoptosom (Chinnaiyan 1999). Kompleks DISC, składający się z transbłonowego receptora typu CD95/FAS, jego liganda, białek FADD, CAP3 oraz pro-kaspazy 8, odpowiedzialny jest za odbiór sygnałów z zewnątrz

http://rcin.org.pl

komórki i ulokowany jest na błonie cytoplazmatycznej, natomiast apoptosom poprzez cytochrom c związany z mitochondriami reaguje na sygnały świadczące o uszkodzeniu komórki, płynące z jej wnętrza. W tym szlaku bierze udział uwolniony do cytoplazmy cytochrom c i kaspaza 3, jak również białka proapoptotyczne AIF, czy endonukleaza G, działające niezależnie od kaspaz (Nagata 1997).

Dwa wymienione wcześniej kompleksy białkowe (DISC i apoptosom) indukujące apoptozę prowadzą do aktywacji białek z rodziny proteaz cysteinowych, zwanych kaspazami. Aktywne kaspazy uczestniczą w modyfikacjach proteolitycznych szeregu białek sygnałowych takich jak: kinazy białkowe PAK, FAK, polimeraza poli[ADP-rybozy] (PARP), czy laminy jądrowe. Proteoliza tych białek prowadzi do zaburzeń ich funkcji np. braku naprawy DNA, czy do aktywacji endonukleaz. Niektóre kaspazy tzw. inicjujące, występują w komórce w formie nieaktywnych proenzymów, które po proteolizie są aktywowane, a następnie aktywują siebie nawzajem, uruchamiając kaskadę sekwencyjnie uruchamianych proteaz. Oprócz kaspaz, w regulacji apoptozy mogą uczestniczyć także inne proteazy, do których zaliczamy kalpainy. Kalpainy ulegają aktywacji po znacznym wzroście stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie. Wśród substratów kalpain wymienia się szereg białek cytoszkieletowych i błonowych oraz białka regulatorowe t.j. kinaza C, fosfolipaza C, receptor rianodynowy i NMDA. Podanie inhibitorów zarówno kaspaz jak i kalpain znacznie hamuje śmierć komórek po ischemii i ogranicza uszkodzenie mózgu (Domańska-Janik i wsp. 1998; Benjamins i wsp. 2003)

Do sygnałów zwiększających podatność neuronów na poischemiczną apoptozę należy również degradacja proteolityczna białek cytoszkieletu, o której wiadomo, że stanowi jedno z pierwszych ogniw uszkodzeń prowadzących do apoptozy. Zmiana sygnałów zewnątrzkomórkowych, związana z aktywacją metaloproteaz i degradacją białek macierzy, przyczynia się do osłabienia i zaburzenia auto- i parakrynnej interakcji pomiędzy komórkami. Zaburzenia te pogłębiają się pod wpływem procesów aktywowanych w tzw. reaktywnym gleju i jego oddziaływaniu na komórki nerwowe (Zalewska i wsp. 2002).

Podsumowując mechanizmy śmierci neuronów po przebytym uszkodzeniu ischemicznym jeszcze raz warto podkreślić, że mieszczą się one w szerokim kontinuum sięgającym od nekrozy występującej bezpośrednio po ischemii, do opóźnionej śmierci posiadającej molekularne cechy apoptozy, Jednak poischemiczna reakcja apoptotyczna neuronów różni się zasadniczo od "klasycznej" apoptozy obserwowanej w czasie rozwoju mózgu jak i tej, która występuje w licznych, przeważnie uwarunkowanych genetycznie, zespołach neurodegeneracyjnych. Ischemiczna, opóźniona śmierć neuronów nie wykazuje

http://rcin.org.pl

prawie nigdy typowych morfologicznych cech apoptozy takich jak fragmentacja jądra czy też rozpad komórek na tzw. ciałka apoptotyczne, a niektórzy autorzy wyróżniają ją opisując jako osobną grupę o cechach morfologicznych tzw. aponekrozy (Formigli i wsp. 2000).

I.C.4. Morfologiczne cechy śmierci neuronów w ischemii mózgu

Klasyczna apoptoza, inaczej nazywana programowaną śmiercią komórki, oprócz zmian obserwowanych na poziomie molekularnym, cechuje się charakterystycznymi zmianami widocznymi na poziomie komórkowym w mikroskopie świetlnym lub elektronowym. W mikroskopie świetlnym pierwszą zauważalną zmianą jest pofałdowanie błony komórkowej (*zeiozis*), obkurczenie komórki na skutek utraty wody, zagęszczenie cytoplazmy (pyknosis), fragmentacja jądra (*karyorrhexis*), kondensacja chromatyny jądrowej w jedno lub kilka skupisk w pobliżu błony komórkowej i zagęszczenie organelli cytoplazmatycznych. Następuje utrata struktur mikrotubularnych i reorganizacja cytoszkieletu. Aparat Golgiego i siateczka śródplazmatyczna niekiedy ulegają nieznacznemu poszerzeniu. W końcowym etapie struktury komórkowe zostają zamknięte we fragmentach błony komórkowej tzw. ciałkach apoptotycznych. Fagocytoza ciałek apoptotycznych przez komórki otaczające zapobiega przedostaniu się macierzy komórkowej do środowiska zewnętrznego nie dopuszczając do rekcji zapalnej.

W odróżnieniu od apoptozy, śmierć nekrotycza (martwica) w mikroskopie elektronowym daje w obrazie przerwanie ciągłości błony cytoplazmatycznej i/lub jądrowej, obrzmienie i dezintegrację organelli cytoplazmatycznych, w tym mitochondriów, rozproszenie rybosomów szorstkiej siateczki śródplazmatycznej i poszerzenie oraz fragmentację kanałów RER i cystern aparatu Golgiego, co prowadzi do rozrzedzenia cytoplazmy. W mikroskopie świetlnym obserwujemy obrzmienie komórki, rozproszenie chromatyny jądrowej (*kariolyosis*) lub jej zagęszczenie, niekiedy rozerwanie jądra, oraz rozproszenie substancji Nissla. Zmiany te są skutkiem utraty przez komórkę zdolności do zachowania równowagi wodno-elektrolitowej (woda wraz z jonami sodu wnika do wnętrza komórki). Śmierć martwicza, w doświadczeniach *in vivo* prowadzi do pojawienia się stanu zapalnego, pobudzenia komórek zapalnych i żernych, które skupiają się wokół uszkodzonej komórki.

W procesie ischemii zmiany morfologiczne zależą od stopnia i długotrwałości obniżenia przepływu krwi w określonym obszarze i pojawiają się w określonej kolejności. W komórkach wykazujących nieodwracalne uszkodzenie ischemiczne obserwowano pyknozę jądra, mikrowakuolizację, rozpad błon cytoplazmatycznych. Komórki mają obkurczoną, silnie

http://rcin.org.pl

barwiącą się hematoksyliną-eozyną cytoplazmę. Zasadochłonne ziarnistości mogą pokrywać perikarion oraz dendryty.

Oprócz zmian świadczących o nieodwracalnym uszkodzeniu neuronów typu nekrotycznego, można również zaobserwować obrzmiałe komórki o jasnej cytoplazmie z jądrem o zamazanym zarysie, zsuniętym na obrzeże komórki, z rozproszoną chromatyną, zachowaną błoną komórkową i otoczką jądrową. Taki obraz sugeruje zmiany chromatolityczne. W części neuronów występujące zmiany morfologiczne nie są jednoznaczne i przedstawiają raczej obraz współistniejących zmian apoptotycznych i nekrotycznych. Coraz częściej takie cechy morfologiczne opisuje się jako stan aponekrozy (komórki w kontinuum nekrotyczno- apoptotycznym).

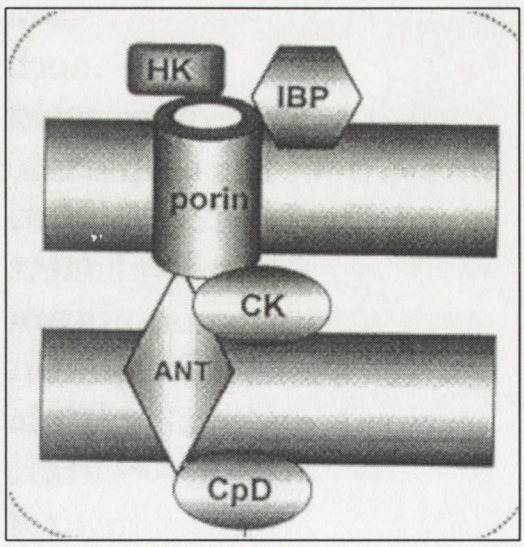
I.C.5. Mitochondria jako struktura integrująca sygnały promujące przeżycie lub śmierć komórki

Podczas ischemii aktywowane są liczne drogi sygnałowe prowadzące do śmierci neuronów. W większości z nich biorą udział mitochondria. Ponieważ z doświadczeń wynika, że działając na poszczególne ogniwa różnorodnych ścieżek apoptotycznych nie uzyskuje się satysfakcjonującej protekcji, integrująca rola mitochondriów dała nadzieję na jednoczasowe zahamowanie zbiegających się tutaj szlaków sygnałowych. Pośrednio może przemawiać za tym skuteczność wczesnego stosowania penetrujących do mitochondriów "wyłapywaczy" wolnych rodników oraz związków obniżających przepuszczalność błon mitochondrialnych (megakanałów) i hamujących wypływ cytochromu c. Niezależnie od tego, czy uszkodzenie ischemiczne ma charakter ogniskowy z komponentem nekrotycznym i zapalnym, czy też ma charakter wybiórczej, opóźnionej śmierci typu apoptotycznego, wcześnie zastosowana protekcja mitochondriów powoduje znaczącą poprawę.

Mitochondria są owalnymi organellami o typowej długości ok. 2μm i średnicy 0,5μm otoczonymi systemem dwóch błon: zewnętrznej przepuszczalnej dla większości cząsteczek i wewnętrznej o wybiórczej przepuszczalności kontrolowanej przez system transporterów. Przestrzeń zamkniętą błoną wewnętrzną określa się jako matriks (matriks mitochondrialis). W matriks zachodzą procesy utleniania w cyklu kwasu cytrynowego, natomiast w pofałdowanej błonie wewnętrznej umiejscowiona jest fosforylacja oksydacyjna. W matriks w cyklu kwasu cytrynowego następuje redukcja NAD(P)H i $FADH_2$, oraz przeniesienie elektronów na kolejne ogniwa łańcucha oddechowego, generujące potencjał oksydoredukcyjny. Proces syntezy ATP, zachodzący w miarę przepływu elektronów z NAD(P)H lub $FADH_2$ na O_2 przez

http://rcin.org.pl

zespół przenośników elektronów jest głównym źródłem ATP. Wewnętrzna błona mitochondrialna jest w normalnych warunkach nieprzepuszczalna dla jonów, dzięki czemu możliwe jest utrzymanie na niej potencjału, co z kolei pozwala na prawidłowe funkcjonowanie łańcucha oddechowego i syntezę ATP. Również ATP i ADP nie mogą swobodnie dyfundować przez wewnętrzną błonę mitochondrialną. Istnieje specyficzny przenośnik - translokaza nukleotydów adeninowych (ANT), umożliwiająca tym cząsteczkom pokonanie bariery przepuszczalności. W procesie wymiany jakikolwiek "przeciek" przez błonę skutkowałby spadkiem potencjału błonowego i dysfunkcją mitochondriów prowadzącą do apoptozy. Przyczynę tego zjawiska upatruje się w otwarciu megakanału (MPT), który w warunkach fizjologicznych jest przepuszczalny dla cząsteczek o limicie do 1,5 kDa. Pomiędzy błonami znajduje się przestrzeń międzybłonowa. Wykazano, że czynniki takie jak nadmierny wzrost stężenia wapnia w macierzy mitochondriów, ich deenergizacja, czy stres oksydacyjny, prowadzą do powiększenia/otwarcia megakanałów, które stają się przepuszczalne dla białek o masie większej niż 1,5 kDa. Megakanał jest kompleksem kilku białek zlokalizowanych zarówno w błonie zewnętrznej mitochondriów (poryna, tworząca kanał VDAC, oraz IBP), jak i wewnętrznej (ANT). Ponadto w skład megakanału wchodzą: heksokinaza, mitochondrialna kinaza kreatyninowa, kinaza glicerolowa, cyklofilina D oraz szereg pro- i anty-apoptotycznych białek z rodziny Bcl-2. Dimer poryny tworzy główny kanał, natomiast inne składniki tego kompleksu uczestniczą w regulacji MPT (Szewczyk, Wojtczak 2002).



Ryc.1 Schemat budowy kanału MTP. ANT- translokaza nukleotydów adeninowych, HK - heksokinaza, CpD – cyklofilina D, CK - mitochondrialna kinaza kreatyninowa, IBP – miejsce wiążące izochinolinę, poryna (inaczej zwana VDAC – voltage anion channel) (w/g pracy Szewczyk, Wojtczak 2002).

http://rcin.org.pl

Istnieje hipoteza, że otwarcie megakanału jest czynnikiem warunkującym nie tylko śmierć komórki, ale również rodzaj tej śmierci, tzn. czy komórka ulegnie nekrozie (-ATP), czy wejdzie w apoptozę (+ATP). Ciężki i długotrwały epizod niedokrwienia prowadzący do długotrwałego otwarcia MPT i zatrzymania produkcji ATP prowadzi do nekrozy. Krótkotrwała ischemia, z przejściowym otwarciem MPT, pozwala na czasowe lub stałe odnowienie puli mitochondrialnego ATP warunkując wystąpienie apoptozy lub umożliwiając przetrwanie (Formigli i wsp. 2000). W obu sytuacjach zaburzenie przepuszczalności błony mitochondrialnej prowadzi do aktywacji czynników proapoptotycznych, które można podzielić na trzy grupy.

Pierwszą grupę stanowi kompleks apoptotyczny składający się z białek: cyt-c, APAF-1 i kaspazy 9. Cytochrom c, który jest uwalniany przez mitochondria, wiąże się z białkiem APAF-1 zmieniając jego konformację. Następnie w procesie zależnym od dATP powstaje kompleks białka APAF-1 z kaspazą 9. Powstanie kompleksu APAF-1, cyt-c i kaspaza 9 pozwala na indukcję proteolitycznych właściwości kaspazy 9 i poprzez kaspazę 3, translokuje mitochondrialną endonukleazę G, która jest odpowiedzialna za typową dla apoptozy, oligonukleosomalną fragmentację jądrowego DNA. Kompleks wymienionych białek regulowany jest przez przepuszczalność błony mitochondrialnej i anty-apoptotyczne białka z rodziny Bcl-2 oraz pro-apoptotyczne białka z rodziny Bax.

Drugą grupę stanowi kompleks białek Smac/Diablo, hamowany przez białko Bcl-2. Powyższe białka mogą hamować aktywność cytozolowych inhibitorów apoptozy z rodziny IAP, których rolą jest zahamowanie kaspaz (3,9 i może 8).

Trzecim z proapoptycznych białek uwalnianych z mitochondriów jest czynnik AlF, biorący udział w indukcji szlaku prowadzącego do apoptozy niezależnej od kaspazy 3 (Kroemer, Reed 2000).

I.D. CZYNNIKI OGÓLNOUSTROJOWE O ZNACZENIU PROTEKCYJNYM W ISCHEMII

Na przebieg i progresję niedokrwienia może wpłynąć wiele czynników zewnętrznych o działaniu ogólnoustrojowym t.j. wentylacja tlenem, spadek ciśnienia krwi, wystąpienie obrzęku mózgu, czy wcześniej dyskutowana reperfuzja. Coraz więcej doniesień pojawia się również na temat dodatkowych czynników ogólnoustrojowych mogących zmniejszać skutki niedokrwienia. Należą do nich m.in. wzbudzona tolerancja mózgu na niedokrwienie, warunkowana czynnikami endogennymi t.j. neurogeneza i hipotermia. Jak dotąd nie było

http://rcin.org.pl

jednak żadnych randomizowanych badań przemawiających na korzyść neuroprotekcyjnego działania wymienionych procesów w sytuacjach klinicznych.

I.D.1. Wzbudzona tolerancja (hartowanie) mózgu na niedokrwienie

Działając na mózg czynnikami szkodliwymi, ale o niewielkim stopniu natężenia, można wyindukować częściową odporność tkanki na znacznie silniejszy bodziec, w tym niedokrwienie, co może przypominać proces hartowania (stąd propozycja nazwy). W OUN indukcja tolerancji na niedokrwienie została opisana dość niedawno. Zaobserwowano, że pod wpływem krótkotrwałego niedokrwienia dochodzi do rozwoju tolerancji mózgu na kolejne, następujące po nim, znacznie dłuższe epizody niedokrwienia (Duszczyk i wsp. 2005, Kitagawa i wsp. 1990). Tego typu odporność można wyindukować w dowolnie wybranym rejonie mózgu (korze, wzgórzu, jądrach podstawy). Bardzo ważnym spostrzeżeniem, była informacja, że sposób wyindukowania tolerancji może być odmienny od następującego po nim epizodu uszkadzającego np. tolerancja rozwinięta podczas niedokrwienia globalnego chroni również przed ischemią ogniskową (Matsushima, Hakim 1995).

Ta informacja może posłużyć do przygotowania pacjentów obciążonych dużym ryzykiem udaru np. do dużych operacji, podczas których może zostać wyindukowane egzogennie niedokrwienie mózgu, np. poprzez zbyt długie zaciśnięcie dużych tętnic, czy powstanie zatoru, w wyniku długiego unieruchomienia pooperacyjnego. Warunkiem protekcyjnego działania wzbudzonej tolerancji musi być jednak taka sama lokalizacja występującego po niej niedokrwienia. Innymi słowy, po wzbudzeniu tolerancji na ischemię w obszarze lewej półkuli protekcja nie obejmie półkuli prawej. Można wyróżnić dwie formy hartowania: wczesną (klasyczną) i opóźnioną. Tolerancja wczesna rozpoczyna się kilka minut od zadziałania czynnika hartującego i trwa do kilku godzin (2-6 godzin). Jej mechanizm jest najprawdopodobniej związany z posttranslacyjnymi modyfikacjami białek sygnałowych, adenozyną i jej receptorem A 1 oraz kanałami K^+ ATP-zależnymi (Nakase i wsp. 2000). Niestety wyniki dotychczas przeprowadzonych badań nie są jednoznaczne, w odróżnieniu od wyników uzyskanych po hartowaniu opóźnionym (Kirino 2002). Tolerancja mózgu na niedokrwienie pojawia się w 12-72 godziny od zadziałania czynnika hartującego i trwa do kilku, kilkunastu dni. Ta forma hartowania związana jest z syntezą białek *de novo.* W procesie wzbudzenia tolerancji na ischemię biorą na pewno udział receptory NMDA i glutaminian. Zablokowanie tych receptorów znosi efekt hartowania. Podanie antyutleniaczy (witamina E, Cu/Zn, SOD) też zapobiega wystąpieniu tolerancji. Po epizodzie hartującym obserwuje się

http://rcin.org.pl

zmianę aktywności kinaz białkowych: CaMKII, ERK czy PKC i wzrost ekspresji Bcl-2, AP-1, NF-κB czy CREB. W sposób znaczący zwiększa się również ekspresja białek szoku cieplnego, głównie Hsp 70, 27, 110/105 i erytropoetyny. Indukcja tolerancji wydaje się uszczelniać błonę mitochondrialną przed wyciekiem proapoptotycznych białek. W ten sposób równowaga odpowiedzi komórkowej na uszkodzenie zostaje przesunięta w kierunku czynników anty-apoptotycznych (Pera 2005).

Z dotychczasowych badań klinicznych wynika, że pacjenci, u których udar poprzedzony był wcześniejszymi epizodami TIA, mieli znacząco lepsze rokowanie i mniejszy deficyt neurologiczny w porównaniu z osobami, które nie przebyły wcześniej takiego krótkotrwałego epizodu niedokrwienia.

I.D.2. Hipotermia

W zależności od temperatury ciała, hipotermię można rozpatrywać jako głęboką (10-20°C), umiarkowaną (28-32°C) i łagodną (33-36°C) (Tisherman i wsp. 1999). W ostatnich latach opublikowano wyniki wielu badań klinicznych, dotyczące praktycznego zastosowania łagodnej hipotermii. Wynika z nich, że stosowanie hipotermii ze spadkiem temperatury ciała do 33°C wyraźnie poprawia wyniki leczenia zawału serca i prawdopodobnie również udarów niedokrwiennych mózgu, chociaż w tym ostatnim przypadku nie przeprowadzono jeszcze prób randomizowanych. W przypadku ostrego niedokrwienia mózgu okazało się, że eksperymentalne obniżenie temperatury zaledwie o 2-3 stopnie, znacznie ogranicza zmiany spowodowane ischemią. Po eksperymentalnym urazie czaszkowo-mózgowym u szczurów dokonanym w temperaturze 30 stopni, śmiertelność okazała się o 75% mniejsza niż po podobnym urazie w warunkach normotermii (Busto i wsp. 1989).

Pomimo licznych i pozytywnych wyników badań *in vitro* i *in vivo* hipotermia nadal nie została włączona do kanonu postępowania po udarze mózgu. Przyczyną takiego stanu mogą być m.in. występujące po zastosowaniu obniżonej temperatury poważne efekty uboczne. Najpoważniejsze z potencjalnych powikłań to arytmia serca, wzrost oporu naczyniowego i lepkości krwi (zespół DIC), wtórne niedokrwienie mięśnia sercowego, obrzęk płuc, zaburzenia funkcji płytek i osoczowego mechanizmu krzepnięcia, immunosupresja oraz trudne do przewidzenia zmiany farmakodynamiki leków. Zauważono też, że podczas wyprowadzania pacjenta z głębokiej hipotermii może dochodzić do nadmiernego wzrostu ciśnienia śródczaszkowego (Ogura i wsp. 1991; Schubert i wsp. 1999).

http://rcin.org.pl

Dotychczas mechanizm protekcyjnego działania hipotermii nie został do końca poznany. Wiadomo, że hipotermia zwalnia metabolizm komórkowy. W mózgu szczura obniżając temperaturę z 37°C do 22°C metabolizm zmniejsza się liniowo o 5% na każdy stopień. Nie jest to jednak jedyny mechanizm neuroprotekcyjnego działania hipotermii. Podczas ischemii dochodzi do wyczerpania zapasów ATP i anoksyjnej depolaryzacji błony komórkowej. Depolaryzacja jest wynikiem otwarcia kanałów jonowych i zahamowania układów transporterowych błon komórkowych. W warunkach normotermii depolaryzacja pojawia się po 1-2 min. od wystąpienia ischemii. Hipotermia wydłuża czas latencji depolaryzacji. Jeśli temperatura zostanie obniżona z 37°C do 33 °C to czas latencji wydłuża się z 65s do 100s, co może być jedną z przyczyn ochrony komórki (Hagerdal i wsp. 1975).

Hipotermia wpływa również istotnie na procesy fosforylacji i defosforylacji białek. Jednym z ważniejszych enzymów fosforylujących wiele białek funkcjonalnych jest kinaza PKC. W czasie przekazywania sygnału w komórce PKC jest odwracalnie translokowana do błony komórkowej i tam aktywowana przez DG. Podczas ischemii PKC zostaje związana z błoną komórkową na stałe, gdzie ulega inhibicji i degradacji (Domańska-Janik, Zalewska 1992; Cardell, Wieloch 1993). Hipotermia zapobiega procesowi nieodwracalnej translokacji wewnątrzkomórkowej PKC do błony komórkowej (Boris-Moller, Wieloch 1998). Inny mechanizm neuroprotekcyjnego oddziaływania łagodnej hipotermii może polegać na zahamowaniu takich reakcji jak oksydatywna deaminacja katecholamin. Hipotermia ogranicza również pourazowe reakcje zapalne i zapobiega nadmiernej syntezie wolnych rodników tlenowych, zmniejsza obrzęk (Mariak i wsp. 2004). Efekt hipotermiczny okazał się być włączony w mechanizmy neuroprotekcyjnego działania wielu potencjalnych leków.

Niestety, pomimo wielu lat badań, mechanizmy związane z działaniem neuroprotekcyjnym hipotermii jak i wzbudzonej tolerancji na niedokrwienie nie zostały w pełni wyjaśnione i najpewniej mają charakter wieloczynnikowy.

I.E. KRYTERIA WYBORU MODELI BADAWCZYCH, ORAZ TESTOWANYCH ZWIĄZKÓW

I.E.1. Ogólna ocena trudności modelowania badań przedklinicznych w ischemii mózgu

Postępowanie ograniczające skutki ischemii mózgu może obejmować następujące cele: zwiększenie reperfuzji, wzmożenie endogennych procesów regeneracyjnych np.

http://rcin.org.pl

przez czynniki wzrostowe promujące neurogenezę, neuroprotekcję neuronów, które przeżyły ischemię oraz długotrwałą rehabilitację wzmagającą plastyczność mózgu.

Weryfikując eksperymentalnie działanie neuroprotekcyjne związków zwiększających przeżycie neuronów po ischemii, należy zwrócić uwagę na następujące cechy zastosowanego modelu badawczego:

- podobieństwo do sytuacji klinicznej
- strukturalne podobieństwo usytuowania neuronów w stosunku do innych elementów komórkowych, które mogą modulować reakcje na neuroprotekcję
- powtarzalność wywoływanych uszkodzeń neuronów, która zależy od stabilizacji czynników środowiska (temperatury, pH, diety i innych cech hodowli *in vitro*)
- możliwość dokładnego dozowania stężeń badanych związków
- stosunkowo jednoznaczny wskaźnik, umożliwiający szybką i wielokrotną ocenę w badaniach przesiewowych

Zastosowane w tej pracy modele *in vitro* i *in vivo* wydają się spełniać powyższe warunki.

I.E.2. Charakterystyka wybranych do doświadczeń modeli badawczych

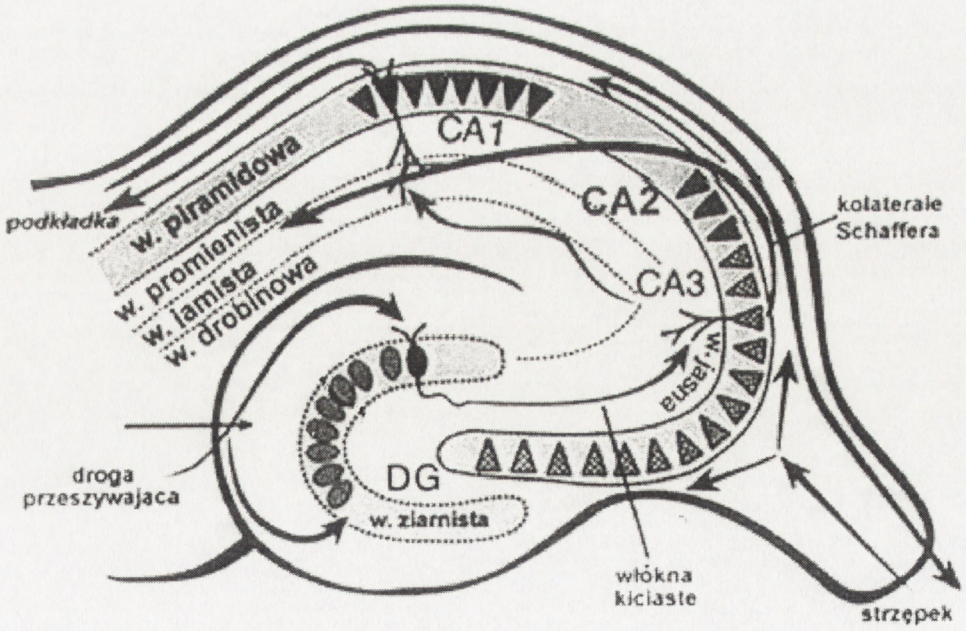
Ischemia uogólniona przodomózgowia u gerbila trwająca 5 min. prowadzi do powtarzalnych i selektywnych uszkodzeń neuronów piramidowych rejonu CA1 hipokampa i odzwierciedla sytuację kliniczną po zatrzymaniu krążenia i innych ostrych zaburzeniach w pracy serca.

Wybór gryzoni, jako podstawowego i szeroko akceptowalnego modelu zwierzęcego nie jest przypadkowy. Genom gryzoni jest bardzo zbliżony do ludzkiego. Dodatkowo badania lokalnego przepływu krwi przez mózg podczas niedokrwienia wykonane u ludzi metodą PET (pozytronową emisyjną tomografią komputerową), a u gryzoni metodą autoradiografii wykazały duże podobieństwo w reakcji komórek z obszaru penumbry na stopień ograniczenia przepływu krwi i w zależności od tego na przejście komórek ze stanu uszkodzenia odwracalnego w martwicę. Stąd też wysnuto wniosek, że czynniki determinujące stopień uszkodzenia tkanki nerwowej, jak również jego zasięg są prawdopodobnie zbliżone u ludzi i gryzoni.

Hodowle organotypowe umożliwiają wykonanie wielu powtórzeń na materiale pochodzącym od jednego zwierzęcia, z równoczesnym monitorowaniem temperatury, pH i składu elektrolitowego środowiska. Hipokampalna hodowla organotypowa zastosowana w

http://rcin.org.pl

miejsce hodowli komórkowych daje możliwość badania przesiewowego wielu substancji, przy czym informacja, jaką otrzymujemy jest bliższa doświadczeniom *in vivo* niż eksperymentom z wykorzystaniem hodowli komórkowych. Sposób podania leku lub innej badanej substancji jest równie łatwy jak w hodowlach komórkowych, a jego penetracja w miarę równomierna. Możliwa jest szybka ocena przeżywalności komórek na poziomie określonej struktury, jak również ocena zmian zachodzących na poziomie subkomórkowym. Ważna jest możliwość wywołania uszkodzeń zbliżonych pod względem czasu trwania i rejonu wystąpienia do zmian zachodzących *in vivo*. Hodowle organotypowe zachowując strukturę przestrzenną, anatomiczną i cechy elektrofizjologiczne tkanki nerwowej, dają możliwość obserwacji naturalnych interakcji pomiędzy różnymi rodzajami komórek podczas uszkodzenia. Pozwalają również na wykluczenie komponenty działania ogólnoustrojowego badanego związku. Podając określony związek do hodowli organotypowej eliminowany jest również efekt leku związany z indukowaną hipotermią, czy sedacją. Przy odpowiednim doborze stężenia i czasu trwania bodźców uszkadzających model stresu wolnorodnikowego lub ekscytotoksycznego w hodowli organotypowej skrawków z hipokampa cechuje się podobną selektywną wrażliwością na uszkodzenie (uszkodzenie neuronów piramidowych rejonu CA1) jak eksperymentalny model zwierzęcy.



Ryc.2 Schemat przedstawiający anatomię skrawka hipokampa ssaków. w-warstwa , CA-rejon zawierający neurony piramidowe, DG – zakręt zębaty, (wg Harry i d'Hellencourt 2003, zmodyfikowany przez Fiedorowicz A. 2005)

http://rcin.org.pl

Warto podkreślić, że postęp nad molekularnymi mechanizmami opóźnionej śmierci neuronów i mechanizmami neuroprotekcyjnymi osiąganymi na drodze farmakologicznej nie byłby możliwy bez badań *in vitro*. Jedynie w tych warunkach możliwa jest pełna weryfikacja funkcji danego białka czy drogi sygnałowej prowadzącej do degeneracji neuronów jak i określenie punktu uchwytu badanego czynnika neuroprotekcyjnego.

I.E.3. Kryteria wyboru związków do przeprowadzanych badań

W związku z różnorodnością mechanizmów biorących udział w procesie niedokrwienia, w celu znalezienia optymalnej neuroprotekcji farmakologicznej, badane są związki działające na różnych etapach indukcji uszkodzenia ischemicznego. Wiele leków o różnym mechanizmie działania (leki hamujące syntezę kwasu glutaminowego, antagoniści receptora NMDA, blokery receptorów i kanałów wapniowych, związki stymulujące układ GABA-ergiczny, przeciwdziałające toksycznemu działaniu tlenku azotu, itp.) wykazuje działanie neuroprotekcyjne na poziomie komórkowym, szczególnie *in vitro*. Wśród tych związków znaleźć też można takie, które dodatkowo wykazują działanie na poziomie ogólnoustrojowym: obniżające ciśnienie krwi (np. nimodypina, perindopril, indapamid), hamujące agregację płytek (np. ASA), hormony (np. estrogeny) itd.

Mimo zachęcających wyników badań doświadczalnych oraz wstępnych badań klinicznych, żaden z nich, jak dotąd, nie został uznany za skuteczny w leczeniu udaru. Do dalszych badań coraz częściej wybierane są związki, które już zaistniały w leczeniu klinicznym, choć w innych jednostkach chorobowych. Ten wybór podyktowany jest względami ekonomicznymi i czasowymi. Jeśli lek był już stosowany w klinice znane są jego działania uboczne i dopuszczalna dawka. Takie informacje dyskwalifikują od razu te leki, które co prawda działają neuroprotekcyjnie, lecz w zbyt dużych dawkach, lub też korzyść z ich zastosowania może być mniejsza od potencjalnych skutków ubocznych. Ważne są również informacje dotyczące kinetyki leku, możliwości szybkiego wysycenia organizmu, jak również koszty leczenia i dostępność preparatu. Do związków, które są wykorzystywane w klinice, a jednocześnie w świetle wcześniej poznanych mechanizmów, dają podstawy do badania ich pod kątem neuroprotekcyjnego działania należą: cyklosporyna A, takrolimus (FK506), Diazepam i Minocyklina.

- *CsA i FK506* są krótkimi peptydami o działaniu immunosupresyjnym. Dzięki zdolności do blokowania aktywacji limfocytów T i komórkowej odpowiedzi immunologicznej znalazły zastosowanie w transplantologii. Stosowane są rutynowo po przeszczepach, pomimo licznych

http://rcin.org.pl

działań ubocznych. Obie substancje łączą się w komórce ze specyficznymi białkami należącymi do grupy immunofilin: CsA z cyklofiliną A, ale również z cyklofiliną D, FK506 z FKBP12. Oba typy kompleksów wiążą się z podjednostką regulatorową kalcyneuryny (PP2B) i hamują jej aktywność. Kalcyneuryna jest kluczowym enzymem zaangażowanym w szlak aktywacji komórek układu odpornościowego (translokacja jądrowa NF-AT, stymulacja produkcji IL, TNFα, limfocytów T), a zahamowanie jej aktywności wydaje się podstawowym mechanizmem jej działania immunosupresyjnego. Poza działaniem immunosupresyjnym CsA i FK506 oddziaływują na inne procesy komórkowe związane z zahamowaniem kalcyneuryny. O ile działanie ochronne FK506 wiąże się głównie z jego efektem hamującym aktywność kalcyneuryny, to CsA poprzez wiązanie z cyklofiliną D, bierze również udział w procesach związanych z regulacją przepuszczalności błony mitochondrialnej. Ta rola wydaje się być kluczowa w jej neuroprotekcyjnym działaniu. Cyklosporyna A wykazuje wysokie powinowactwo do wiązania się z mitochondrialną cyklofiliną D powodując jej dysocjację od ANT (translokaza nukleotydów adeninowych) i zamknięcie megakanału mitochondrialnego. Fizjologicznie cyklofilina D wydaje się niezbędna do otwarcia MPT błony mitochondrialnej, co prowadzi do uwolnienia Ca^{2+}, cytochromu c i uruchomienia szlaku kaspaz (Siesjo i wsp. 1999; Domańska-Janik i wsp. 2004; Kamińska i wsp. 2004).

➢ *Diazepam* jest ligandem wiążącym się z postsynaptycznym receptorem GABA-A. Receptor ten poza miejscowym wiązaniem GABA posiada również oddzielne, ale działające kooperacyjnie miejsce wiążące dla barbituranów oraz tzw. miejsce α dla benzodiazepin, które po aktywacji nasilają hamujący efekt GABA. Miejsce (α) wiążące benzodiazepin na receptorze GABA A nosi też nazwę receptora ośrodkowego (ang. central benzodiazepin receptor - CBR). W klinice Diazepam wykorzystywany jest do hamowania rozprzestrzeniania się patologicznych pobudzeń w mózgu, jako lek przeciwpadaczkowy i anksjolityczny. Oprócz receptora CBR, zidentyfikowano drugi rodzaj receptora wiążącego benzodiazepiny - receptor PBR, występujący w OUN jak również i poza ośrodkowym układem nerwowym. Pierwsze informacje o receptorach dla BZD wchodzących w skład kompleksu MTP pochodzą z 1994 roku (Pasterino i wsp.). Receptor PBR zlokalizowany jest na błonie mitochondrialnej i wchodzi w skład kompleksu białkowego megakanału MTP. Kompleks obejmujący zarówno zewnętrzną jak i wewnętrzną błonę mitochondrialną składa się z trzech głównych podjednostek: IBP, poryny (VDAC) i ANT. Według niektórych autorów receptor PBR jest ograniczony tylko do miejsca wiążącego izochinolinę (IBP). Po połączeniu Diazepamu z PBR dochodzi do usztywnienia tej struktury, uszczelnienia błony mitochondrialnej z wtórnym zahamowaniem wypływu cytochromu c (Szewczyk, Wojtczak 2002). Jego ekspresja zwiększa

http://rcin.org.pl

się w czasie reakcji zapalnej, w uszkodzeniu metabolicznym, urazie i uszkodzeniu ekscytotoksycznym (Rao i wsp. 2001), spowodowanym zarówno podaniem kainianu, AMPA, czy NMDA, jak również po ischemii (Stephenson i wsp. 1995). Receptory PBR są zlokalizowane w OUN głównie w błonie mitochondrialnej komórek glejowych (Stephenson i wsp. 1995), gdzie w patologicznych stanach zwiększa się znacząco ich ekspresja. Ich obecność potwierdzono również w neuronach (Jayakumar i wsp. 2002). Pomimo, że Diazepam wykazuje dużo większe powinowactwo do CBR niż do PBR (Benavides i wsp. 1983), to jednak receptor PBR został opisany jako alternatywny receptor dla Diazepamu (Brauerstrup i wsp. 1977; Gavish i wsp. 1999; Beurdeley-Thomas i wsp. 2000).

➢ *Minocyklina* jest antybiotykiem z rodziny tetracyklin dobrze przenikającym przez barierę krew mózg. Jest ona najprawdopodobniej pierwszą znaną substancją o postulowanym działaniu hamującym na oba mitochondrialne szlaki apoptotyczne: zależną od kaspaz (cytochrom c, Smac/Diablo) i niezależną (AIF/endonukleaza G). Minocyklina hamuje aktywację mikrogleju w niektórych procesach neurodegeneracyjnych (HD, ALS i AD) i jego proliferację, posiada właściwości przeciwzapalne i antyoksydacyjne, włączając w to spadek wolnych rodników uwolnionych z granulocytów obojętnochłonnych (Gabler 1992). Obniża ekspresję i aktywność MMPs, które zmieniają przepuszczalność bariery krew-mózg, uniemożliwiając limfocytom T przemieszczenie do OUN (Golub 1999). Dotychczas jej zastosowanie kliniczne ograniczało się do prób leczenia choroby Huntingtona.

➢ *MK801* jest bezkompetytywnym antagonistą receptora NMDA, posiadającym miejsce wiązania wewnątrz kanału przepuszczalnego dla wapnia. Wiążąc się z receptorem/kanałem NMDA MK-801 w sposób istotny zmniejsza toksyczność glutaminianu, napływ Ca^{2+} do komórki i rozległość uszkodzenia ischemicznego. MK-801 jest związkiem łatwo przechodzącym do mózgu, jednakże posiada silne niepożądane efekty uboczne, między innymi właściwości halucynogenne, a w wyższych dawkach katatoniczne, które limitują możliwość jego użycia jako leku. W przeprowadzonych badaniach *in vitro* związek ten posłużył do potwierdzenia efektu protekcyjnego wyłączenia aktywacji receptora NMDA, a tym samym potwierdzenia jego udziału w mechanizmie uszkodzenia (Łazarewicz i wsp. 1994).

Innym podejściem do neuroprotekcji ischemicznej jest stosowanie czynników troficznych, posiadających bardzo szerokie spektrum działania, przy stosunkowo nielicznych efektach niepożądanych.

➢ *IGF-1* (insulin-like growth factor 1) jest czynnikiem wzrostu. Działa poprzez receptor błonowy IGF-1R należący do rodziny RTK. IGF-1R działając przez PI3K aktywuje ścieżkę

http://rcin.org.pl

Akt/PKB, która ulega fosforylacji/aktywacji przez PDK-1. Aktywacja drogi sygnałowej Akt/PKB pociąga za sobą m.in. wzrost ekspresji takich czynników anty-apoptotycznych jak: Bcl-2, Bcl-xL, czy NF-kB. Do działania anty-apoptotycznego dochodzi również na skutek fosforylacji i unieczynnienia czynników proapoptotycznych: kaspazy 9 (zahamowanie kaskady kaspaz), Bad (zapobieganie tworzenia heterodimerów Bad z Bcl-2), FKHRL-1 (spadek ekspresji FasL), czy GSK3 o bliżej nie sprecyzowanym punkcie uchwytu (Kim, Accili 2002; Vincent, Feldman 2002).

W świetle dotychczasowych badań stosując pojedynczy związek modulujący jeden szlak sygnałowy w komórce, nie uzyska się wymaganej poprawy. Szansę na skuteczną neuroprotekcję daje połączenie kilku substancji działających poprzez różne mechanizmy przeżycia komórki, lub jednego związku o szerokim spektrum działania. Istnieje również konieczność ciągłej weryfikacji schematów działania proponowanych czy wprowadzanych związków protekcyjnych, oraz poszukiwanie nowych.

http://rcin.org.pl

II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Niedokrwienie mózgu jest obecnie jedną z wiodących przyczyn zgonów w Polsce. Nawet krótkotrwałe zatrzymanie krążenia wynikające z zaburzeń rytmu serca, czy mikrozatoru powoduje poważne zaburzenia czynnościowe układu nerwowego, oraz utratę integralności strukturalnej mózgu. W ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) występują rejony szczególnie wrażliwe na choćby kilkuminutowe niedokrwienie, do których należy m.in. rejon CA1 hipokampa. Dotychczas poznano mechanizmy uszkodzenia komórek związane z ostrą fazą uszkodzenia ischemicznego, jednak wydaje się, że są one nie podatne na leczenie farmakologiczne. W ostrym okresie niedokrwienia jedynym postępowaniem protekcyjnym jest przyspieszenie reperfuzji. Jednak ciągle wielkim wyzwaniem terapeutycznym jest zapobieganie tzw. opóźnionej śmierci komórek nerwowych. W ciągu kilku dni po przywróceniu krążenia nadal stwierdza się powolną degradację komórek w rejonach o tak zwanej zwiększonej wrażliwości (penumbra, rejon CA1 hipokampa, II i IV warstwa kory, komórki Purkinjego w móżdżku) a mechanizm tego procesu jak dotąd nie został do końca poznany. Wiadomo, że jest on całkowicie różny od tego, który obserwuje się w ostrej fazie patologii niedokrwiennej. Późne uszkodzenia neuronów powstają prawdopodobnie w wyniku wtórnych zaburzeń biochemicznych i molekularnych, indukowanych stresem metabolicznym. Aby wprowadzić do kliniki efektywne leczenie zatrzymujące opóźnioną śmierć komórek, niezbędne jest przebadanie dużej liczby potencjalnie efektywnych związków w warunkach najbliższych tym, które występują podczas lub po ischemii.

Celem pracy było wprowadzenie efektywnego i powtarzalnego modelu badawczego *in vitro*, który by dobrze odwzorowywał uszkodzenia powstające w wyniku niedokrwienia mózgu i pozwolił na szybką, wstępną selekcję związków o działaniu neuroprotekcyjnym. Weryfikację wyników neuroprotekcji uzyskanych w zastosowanym modelu hodowli organotypowej hipokampa (HOC) przeprowadzono na przykładzie kilku wybranych związków. Wyselekcjonowane wstępnie związki przebadano pod kątem mechanizmu ich działania protekcyjnego oraz porównano z wynikami uzyskanymi w klasycznym modelu ischemii przodomózgowia myszoskoczka mongolskiego *in vivo*. Pozwoliło to na wytypowanie najbardziej obiecujących związków do dalszych badań przedklinicznych.

http://rcin.org.pl

W realizacji badań można wyróżnić następujące etapy:

- Indukcja selektywnego uszkodzenia neuronów rejonu CA1 w modelu HOC wywołanego stresem ekscytotoksycznym lub wolnorodnikowym
- Ocena działania wybranych związków o potencjale neuroprotekcyjnym (CsA, FK506, MK801, IGF-1, Minocyklina, Diazepam) pod kątem ich wpływu na przeżycie neuronów rejonu CA1 hipokampa w obu typach uszkodzeń
- Weryfikacja uzyskanej neuroprotekcji w eksperymentalnym modelu zwierzęcym niedokrwienia przodomózgowia *in vivo*
- Próba oceny mechanizmów działania związków wykazujących efekt neuroprotekcyjny

http://rcin.org.pl

III. MATERIAŁ DOŚWIADCZALNY

Doświadczenia wykonano w trzech grupach zwierząt :

- 7-10 dniowych szczurach szczepu Wistar obu płci
- dorosłych myszoskoczkach mongolskich (gerbilach) obu płci, o ciężarze ciała 50-70 g
- dorosłych szczurach szczepu Wistar obu płci, o ciężarze ciała 250-280 g

Wszystkie zwierzęta pochodziły z hodowli własnej IMDiK PAN i do momentu doświadczenia były karmione i pojone *ad libitum* w naturalnym cyklu dobowym. Przedstawiony projekt badań został pozytywnie zaopiniowany przez Lokalną Komisję Etyczną.

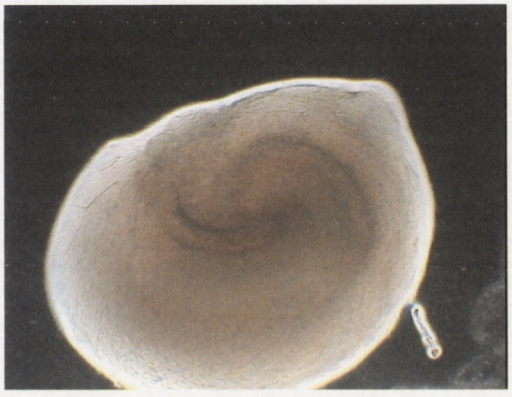
http://rcin.org.pl

IV. METODYKA BADAŃ

IV.A. METODYKA BADAŃ W MODELU ORGANOTYPOWEJ HODOWLI SKRAWKÓW Z HIPOKAMPA SZCZURA

IV.A.1. Hodowla skrawków

Hipokampy izolowano z 7-9 dniowych szczurów szczepu Wistar w/g metody Stoppiniego, zmodyfikowanej w naszym laboratorium.



Ryc.3 5-dniowy skrawek z organotypowej hodowli hipokampalnej. Zdjęcie wykonane pod mikroskopem świetlnym odwróconym, powiększenie 2,5x.

Po anastezji z użyciem Vetbutalu szczury były dekapitowane, hipokampy izolowane, a następnie cięte przy użyciu noża McIlwain'a na skrawki o grubości 400 μm. Skrawki przenoszono na błony (Millicell-CM) do płytek 6-dołkowych, po 4 skrawki na błonę. Cała procedura wykonywana była na lodzie. Przez pierwsze 4 dni hodowlę prowadzono w pożywce składającej się z 50% DMEM, 25% HBSS i 25% inaktywowanej surowicy końskiej z dodatkiem Penicyliny, Amphoterycyny B i B27. Od piątego dnia hodowli redukowano stopniowo zawartość surowicy w pożywce, stosując dotychczasową pożywkę i nową, niezawierającą surowicy (3 objętości do 1 objętości). Co dwa dni zwiększano o 25% zawartość pożywki bez surowicy, aby od 11 dnia hodowlę prowadzić bez obecności surowicy. Pożywka taka składała się z 50% DMEM-F12, 50% HBSS, oraz suplementów: B27 i N2A. Hodowla była prowadzona przez 14-18 dni w temperaturze 35°-36° C, wilgotności 90% i CO_2 5%.

http://rcin.org.pl

IV.A.2. Metoda wywoływania uszkodzenia wolnorodnikowego lub ekscytotoksycznego neuronów rejonu CA1 hipokampa

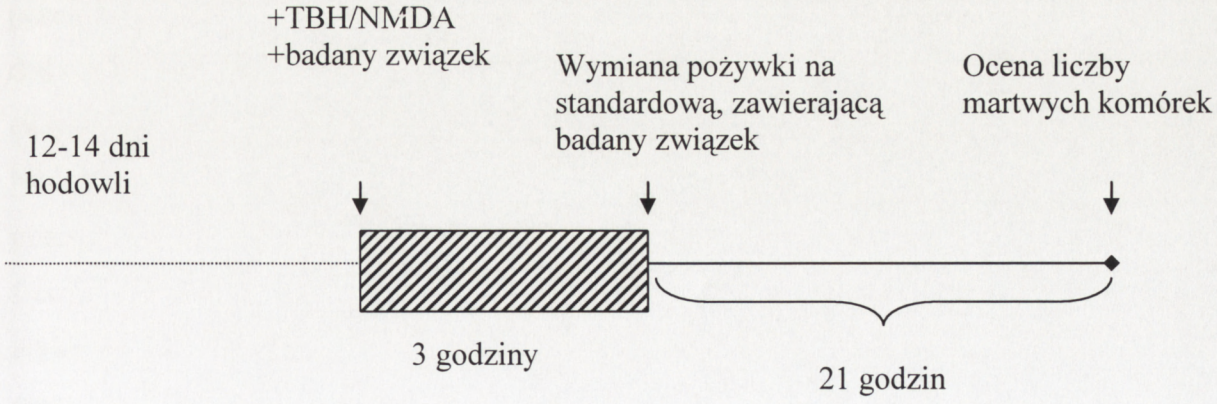
W celu zainicjowania stresu oksydacyjnego do pożywki hodowlanej 14-dniowej hodowli skrawków z hipokampa szczura dodawano substancję generującą ROS - tert-butylhydroperoxide (TBH) (Pias, Aw 2002). Aby zaktywować specyficzne receptory/kanały glutamatergiczne do pożywki dodawano NMDA. Optymalne stężenie obu substancji uszkadzających, oraz czas rejestracji przeżywalności komórek, zostały ustalone we wcześniejszych badaniach eksperymentalnych.

W celu wyboru optymalnego czasu do oceny przeżywalności komórek rejonu CA1 hodowlę skrawków hipokampa szczura poddano działaniu optymalnego stężenia TBH lub NMDA przez 3 godziny. Po 3 godzinach usuwano substancje uszkadzające i dalszą hodowlę prowadzono przez 72 godziny w standardowej pożywce hodowlanej z dodatkiem IP. Podczas doświadczenia czterokrotnie (po 6, 24, 48 i 72 godzinach od indukcji uszkodzenia) rejestrowano zmiany przeżywalności komórek skrawka, w celu wyznaczania czasu, w którym śmiertelność komórek osiąga swoje maksimum.

Dla obu badanych związków cytotoksycznych ustalono optymalną dawkę powodującą śmierć 50% neuronów (LD50) w sektorze CA1 po 24 godzinach hodowli.

IV.A.3. Schemat badania neuroprotekcji farmakologicznej

W tym celu wraz z zainicjowaniem stresu oksydacyjnego lub aktywacją receptorów/kanałów NMDA do podłoża hodowlanego dodawano badane substancje: CsA, FK506, MK80, Diazepam, IGF lub Minocyklinę, które były obecne do końca doświadczenia.



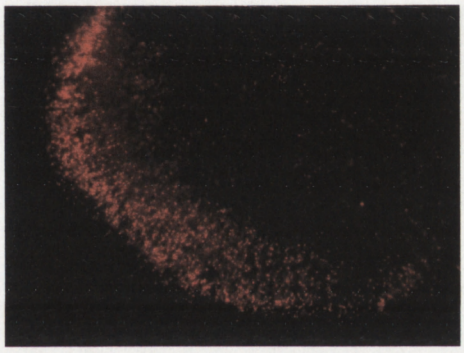
Ryc.4 Przebieg badań nad protekcją farmakologiczną w modelu uszkodzenia wolnorodnikowego lub ekscytotoksycznego.

http://rcin.org.pl

W celu ustalenia optymalnych stężeń dla testowanych neuroprotektantów hodowlę organotypową poddano działaniu różnych stężeń CsA (0.25μM, 0.5μM, 1μM), FK506 (0.1μM, 0.5μM, 5μM), MK801 (1μM, 10μM, 50μM, 100μM), Diazepamu (0.5μM, 5μM, 50μM), IGF (10μg/ml, 100μg/ml, 150μg/ml, 200μg/ml) i Minocykliny (10μM, 30μM, 100μM, 150μM) przez okres 24 godzin.

Zdolności osłaniające badanych związków, tzw. "okno terapeutyczne" obserwowano dodając do pożywki wybrane leki 0,5 godziny, 1 godzinę i 1,5 godziny po zaindukowaniu stresu wolnorodnikowego lub ekscytotoksycznego, prowadząc eksperyment według schematu przedstawionego na Ryc.23.

IV.A.4. Metoda badania przeżycia komórek rejonu CA1 hipokampa z użyciem IP oraz sposób opracowania danych



Ryc.5 Komórki rejonu CA1 wyznakowane IP. Zdjęcie spod mikroskopu odwróconego, fluorescencyjnego, powiększenie 2,5x

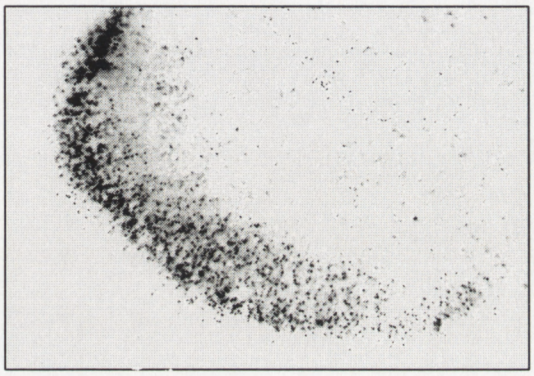
Przeżyciowe barwienie jodkiem propidyny zastosowano w celu oceny morfometrycznej przeżycia komórek w sektorze CA1 hipokampa. Do pożywki hodowlanej przed rozpoczęciem doświadczenia dodawano jodek propidyny (IP). Przed eksperymentem, oraz podczas trwania eksperymentu oceniano zmiany w żywotności komórek w hodowli po podaniu TBH lub NMDA i neuroprotektantów. Zmianę liczby komórek wyznakowanych IP obserwowano przeżyciowo w wybranych punktach czasowych przy użyciu odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego. W celu rejestracji doświadczenia i przeprowadzenia analizy ilościowej wykonywano zdjęcia używając programu KS300 (Zeiss) i kamery Axiocam. Wykonywano następujące zdjęcia:

- hodowli HOC kontrolnej, nie poddanej działaniu czynnika uszkadzającego – F_0 (fluorescent intensity)

http://rcin.org.pl

- hodowli HOC poddanej działaniu wysokich stężeń NMDA lub glutaminianu w celu uszkodzenia wszystkich komórek skrawka – F_{100}
- hodowli HOC poddanej działaniu samych czynników uszkadzających TBH / NMDA lub w skojarzeniu z neuroprotektantami – F_x

Wykonane zdjęcia zostały poddane komputerowej analizie ilościowej. Procentowy udział martwych komórek obliczano według wzoru: $F_x x100\%/ F_{100} = x\%$. Zdjęcia dołączone do pracy zostały przekształcone na obraz biało-czarny w celu lepszego uwidocznienia zmian.



Ryc.6 Obraz przekształcony ze zdjęcia czarno-czerwonego, przedstawiający komórki rejonu CA1 wyznakowane IP (kolor czarny).

IV.A.5. Izolacja frakcji mitochondrialnej i cytozolowej z komórek skrawka hipokampa

W celu zbadania mechanizmów leżących u podstawy neuroprotekcyjnego działania wybranych związków rozdzielano homogenaty uzyskane z hodowli organotypowej hipokampa na frakcję cytozolową i mitochondrialną wg. metody Siesjo i Hu (Ouyang i wsp. 1999). Po zakończeniu eksperymentu hodowlę przemywano PBS, oraz buforem do homogenizacji o składzie: 15mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.25mM sacharoza, 1mM $MgCl_2$, 1mM EDTA, 1mM EGTA. Bezpośrednio przed użyciem do buforu dodawano: 0,5mM PMSF, 1mM DTT, inhibitory proteaz i fosfataz (Sigma). Następnie zdejmowano skrawki z membran i przenoszono je do szklanego homogenizatora. Zawieszoną w buforze tkankę homogenizowano 15 razy teflonowym tłokiem a następnie wirowano 3000 rpm przez 10 min w 4^0C. Otrzymany nadsącz wirowano 13600 rpm przez 20 min w 4^0C. Uzyskany nadsącz określono jako frakcję cytozolową, natomiast osad po zawieszeniu w 100µl buforu jako frakcję błonową, zawierającą mitochondria.

http://rcin.org.pl

IV.A.6. Oznaczanie stężenia białka

Stężenie białka w otrzymanych próbkach oznaczano metodą wg Lowry za pomocą odczynników D_CProtein Assay Reagent A i Reagent B przy długości światła 750nm. Badane próbki zawierały 5µl zawiesiny badanego białka, 5µl buforu do izolacji mitochondriów, 50µl odczynnika A i 400µl odczynnika B. Wszystkie próbki inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej, a następnie mierzono absorbancję. Do kalibracji spektrofotometru użyto próby ślepej, zawierającej bufor do izolacji mitochondriów zamiast badanej zawiesiny białka (w tej samej objętości). Stężenie białka w badanej próbie obliczano odnosząc mierzoną wielkość absorbancji do wartości absorbancji określonej dla znanych stężeń albuminy wołowej.

IV.A.7. Oznaczanie przemieszczeń cytochromu c i aktywności kaspazy 3 metodą Western blot

Metodą Western blot oznaczano ilość białka cytochromu c, oddzielnie we frakcji błonowej i cytoplazmatycznej (metoda opisana powyżej) w odniesieniu do ilości białka badanej próbki. Ilość białka aktywnej formy kaspazy 3 oznaczano w całych homogenatach z HOC również w odniesieniu do ilości białka badanej próbki.

Do próbek o stężeniu 50-60µg białka dodawano 5x stężony bufor (6,25 mM Tris-HCl o pH 6,8, 10% glicerol, 2% SDS, 1,5% β-merkaptoetanol, 0,05% błękit bromofenolowy) i umieszczano na 5 minut w łaźni wodnej o temperaturze 100^0C. Po schłodzeniu i odwirowaniu próbki nakładano do studzienek elektroforetycznych w żelu poliakrylamidowym (4% żel zagęszczający, 12% żel rozdzielający) wg metody Laemmli (1970). Elektroforezę prowadzono przy stałym napięciu 180V przez 45 min w temperaturze pokojowej. Rozdzielone próby białkowe przenoszone były w całości na błony nitrocelulozowe Hybond-Extra C metodą elektroblottingu (Towbin i wsp. 1979). Elektroblotting prowadzono przez 90 minut przy napięciu prądu 100V i natężeniu do 300mA w buforze zawierającym: 25mM Tris-HCl o pH 8,3, 192 mM glicyna, 20% metanol. Efektywność przeniesienia białek sprawdzano poprzez wybarwienie żeli błękitem Coomassie Brilliant Blue R250 i błon nitrocelulozowych czerwienią Ponceau Red S. Analizę immunochemiczną przeprowadzono przy użyciu wymienionych w tabeli przeciwciał i buforu blokującego:

http://rcin.org.pl

I-rzędowe przeciwciało	Bufor blokujący	Stężenie I-rzędowego przeciwciała/Izotyp	II-rzędowe przeciwciało	Czas naświetlania
Cytochrom c monoklonalne PharMingen	5% mleko w PBST	1:1000 w mleku IgG2b	owcze anty-mysie IgG 1:4000 Amersham	30-60 min
Kaspaza 3 poliklonalne IDUN	5% BSA w PBST	1:8000 w mleku IgG (H+L)	kozie anty-królicze IgG 1:8000 Sigma	30-45 min

W czasie całej procedury używano 100mM buforu fosforanowego pH 7.5 PBS (80mM Na_2HPO_4, 20mM NaH_2PO_4,100 mM NaCl) z dodatkiem detergentu w postaci 0,05% Tween 20. Nitrocelulozy inkubowano 1 godzinę w buforze blokującym, a następnie płukano trzykrotnie po 5 minut w PBST. Inkubację z pierwszorzędowym przeciwciałem prowadzono przez noc w temperaturze 4^0C. Po inkubacji nitrocelulozę ponownie płukano i inkubowano z drugorzędowym przeciwciałem przez 1 godzinę w PBST w temperaturze pokojowej. Do immunodetekcji stosowano metodę chemiluminescencji (ECL) wykorzystując firmowy zestaw Amersham. Czas naświetlania kliszy Hyperfilm^{TM}-ECL (Amersham) wynosił 0,5 – 1 godziny. Porównanie stopnia zaczernienia w obrębie jednej kliszy pozwalało na jakościową ocenę białka związanego z pojedynczym prążkiem reagującym z przeciwciałem.

IV.A.8. Oznaczanie przemieszczeń cytochromu c i aktywności kaspazy 3 metodami immunohistochemicznymi w skrawkach *in situ*

W celu oceny zmiany przepuszczalności błony mitochondrialnej dla cytochromu c jak również aktywacji kaspazy 3 po zastosowaniu samych czynników uszkadzających lub w obecności substancji działających potencjalnie protekcyjnie wykonano badania metodą immunocytochemiczną *in situ*. Obecność i subkomórkowa lokalizacja cytochromu c w neuronach została oceniona przy użyciu przeciwciała monoklonalnego anty-cytochrom c i anty-β tubulina III, natomiast obecność w komórkach aktywnej formy kaspazy 3 została sprawdzona przy użyciu przeciwciała wybiórczo znakującego aktywną postać kaspazy 3. Po zakończeniu eksperymentu, podczas którego poddano hodowlę organotypową skrawków hipokampa uszkodzeniu wolnorodnikowemu lub glutamatergicznemu i jednoczesnej neuroprotekcji, skrawki na membranie utrwalano 4% PFA przez 24 godziny. Po tym czasie

http://rcin.org.pl

skrawki przepłukiwano trzykrotnie PBS i wycinano z błony. Skrawki blokowano przez 1 godzinę w PBS z 5% surowicą kozią, 2% surowicą cielęcą, 0,2% mlekiem i 0,1% Triton X-100, a następnie płukano trzykrotnie po 5 minut w PBS. Do lokalizacji doświadczeń użyto następujące przeciwciała:

I-rzędowe przeciwciało	Stężenie I-rzędowego przeciwciała/Izotyp	II-rzędowe przeciwciało	Stężenie II-rzędowego przeciwciała/ Izotyp	Czas inkubacji
β-tubulina III (TUJ) Covance monoklonalne	1:1000 na noc IgG2a	kozie anty – mysie TXRD Southern Biotech.	1:1000 IgG1(γ1)	1 godzina
Cytochrom c PharMingen monoklonalne	1:300 na noc IgG2b	kozie anty – mysie FITC Southern Biotech.	1:500 IgG1(γ1)	1 godzina
Kaspaza 3 CM1 poliklonalne	1:3000 na noc IgG (H+L)	kozie anty – królicze Cy2 Jackson Immunores.	1:100 IgG (H+L)	1 godzina

Inkubację z pierwszorzędowym przeciwciałem prowadzono przez noc w temperaturze 4^0C. Po inkubacji skrawki ponownie płukano i inkubowano z drugorzędowym przeciwciałem w PBS przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Do wyznakowania jąder komórkowych, w badaniach dotyczących aktywacji kaspazy 3, użyto barwienia cytochemicznego IP na utrwalonych skrawkach (Brana i wsp. 2002). Obraz rejestrowany był przy użyciu mikroskopu konfokalnego (Zeiss LSM 510).

http://rcin.org.pl

IV.A.9. Oznaczanie przemieszczeń cytochromu c i aktywności kaspazy 3 metodami immunoenzymatycznymi (ELISA)

- Ocena poziomu cytochromu c we frakcji cytoplazmatycznej

Do oceny ilościowej cytochromu c we frakcji cytozolowej (rozdz. IV.A.5), użyto zestawu Quantikine® (R&D).

W celu pomiaru cytochromu c uwolnionego do cytozolu, skrawki poddawane działaniu TBH/NMDA i neuroprotektantów homogenizowano w warunkach i buforze do izolacji mitochondriów opisanym w rozdziale IV.A.5

Aby ocenić ilość całkowitego cytochromu c, kontrolne skrawki hipokampa, w których nie stosowano TBH/NMDA czy neuroprotektanta homogenizowano w PBS zawierającym 0,5% Triton X-100 i inkubowano 10 minut w 4^0C, a następnie zwirowano w 16 000xg przez 10 minut.

W celu pomiaru całkowitego cytochromu c w mitochondriach, ze skrawków kontrolnych izolowano frakcję mitochondrialną według metody opisanej w rozdziale IV.A.5, a następnie lizowano ją w buforze PBS zawierającym 0,5% Triton X-100 i podobnie jak poprzednio zwirowano w 16 000xg przez 10 minut.

We wszystkich otrzymanych frakcjach cytoplazmatycznych mierzono ilość białka metodą Lowre'go opisaną w rozdziale IV.A.6

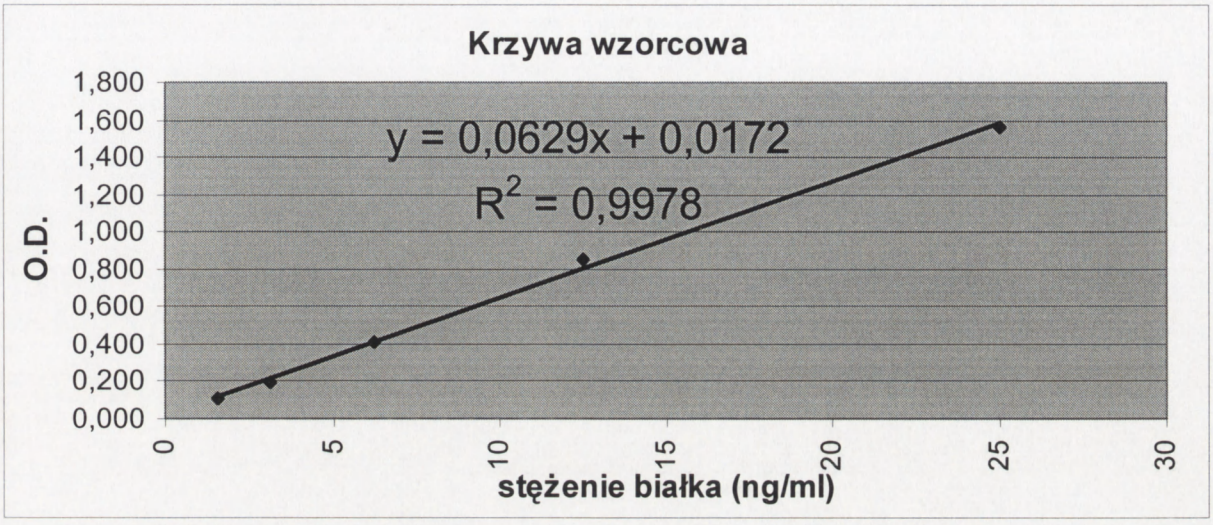
Na 96-dołkową płytkę pokrytą monoklonalnym przeciwciałem anty-cytochrom c nałożono:

- bufor
- standard firmowy zawierający różne stężenia cytochromu c, w celu wyznaczenia krzywej wzorcowej
- frakcję całkowitego białka otrzymanego ze zlizowanych komórek skrawka, w celu oceny całkowitego cytochromu c.
- frakcję zawierającą cytochrom c z wyizolowanych i zlizowanych mitochondriów
- uzyskane frakcje cytozolowe z poszczególnych wariantów doświadczenia

Następnie do dołków dodano przeciwciało monoklonalne anty-cytochrom c sprzężone z peroksydazą chrzanową. Po 2 godzinach inkubacji, po odpłukaniu przeciwciała, dodano firmową substancję barwiącą. Po zastopowaniu reakcji poprzez denaturację próby dwunormalnym kwasem siarkowym odczytano absorbancję (optical density O.D.) przy długości fal: 450 nm i 570 nm. Wartości absorbancji uzyskane przy długości fali 570 nm zostały odjęte od wartości absorbancji otrzymanych przy długości fali 450 nm. i wykreślono

http://rcin.org.pl

krzywą dla wzorcowych stężeń cytochromu c. Przy użyciu programu statystycznego, wyznaczono linię trendu i równanie dla wykreślonej krzywej: y = 0,0629x+0,0172 [O.D = 0,0629x(μg/ml)+0,0172]. Według otrzymanego wzoru przeliczono O.D. badanych próbek, na ilość cytochromu c.



- Ocena aktywności kaspazy 3 w homogenatach HOC

Analiza aktywności kaspazy 3 przeprowadzona była metodą fluorymetryczną z użyciem zestawu Caspase-3 Fluorometric Assay. Po zastosowaniu TBH lub NMDA i czynników neuroprotekcyjnych, skrawki hipokampa zdjęto z błony, po czym zhomogenizowano w buforze lizującym i inkubowano przez 10 minut. Następnie zmierzono zawartość białka w otrzymanym homogenacie metodą Lowrego (rozdz.IV.A.6). Do próbek o tej samej ilości białka dodano bufor reakcyjny zawierający 10mM DTT, oraz specyficzny substrat kaspazy 3 DEVD-AFC (1mM). Mieszaninę inkubowano w 37^0C przez 2 godziny. Spektrofotometryczny pomiar ilości fluorescencyjnego produktu uwolnionego w wyniku reakcji katalizowanej przez kaspazę 3 przeprowadzono przy długości fali pobudzającej Ex: 450 nm i emitowanej Em: 505 nm.

http://rcin.org.pl

IV.B. METODYKA BADAŃ NA ZWIERZĘTACH *IN VIVO*

IV.B.1. Model przejściowej ischemii przodomózgowia u myszoskoczka mongolskiego



Z uwagi na unikalną anatomię unaczynienia mózgu, do badań wybrano myszoskoczka mongolskiego. Jest to jeden z najczęściej stosowanych i dobrze scharakteryzowanych modeli zwierzęcych, ponieważ proste do wykonania zatrzymanie krążenia krwi w tętnicach szyjnych prowadzi do całkowitej ischemii przodomózgowia. W modelu tym w zależności od czasu przerwania krążenia jest możliwe stosunkowo proste wywołanie wybiórczego uszkodzenia w rejonie CA1 hipokampa prowadzącego do tzw. opóźnionej śmierci neuronów.

Niedokrwienie mózgu zostało wywoływane przez obustronne zaciśnięcie chirurgicznymi klipsami naczyniowymi tętnic szyjnych wspólnych. W czasie zabiegu stosowano narkozę halotanową. Zwierzęta oddychały początkowo mieszaniną 2,5% halotanu w O_2/N_2O (30:70, v/v), po czym stężenie halotanu obniżano do 1,5%. Podczas zabiegu utrzymywano stałą temperaturę ciała zwierzęcia poprzez użycie stolika grzewczego. Ciągły pomiar temperatury dokonywano specjalną sondą, metodą *per rectum*. Epizod niedokrwienny trwał 5 minut. Po upływie tego czasu klipsy naczyniowe usuwano. Kolejne 7 dni zwierzęta trzymane były w oddzielnym pomieszczeniu, pojone i karmione *ad litbitum*.

IV.B.2. Schemat zastosowanej neuroprotekcji farmakologicznej *in vivo*

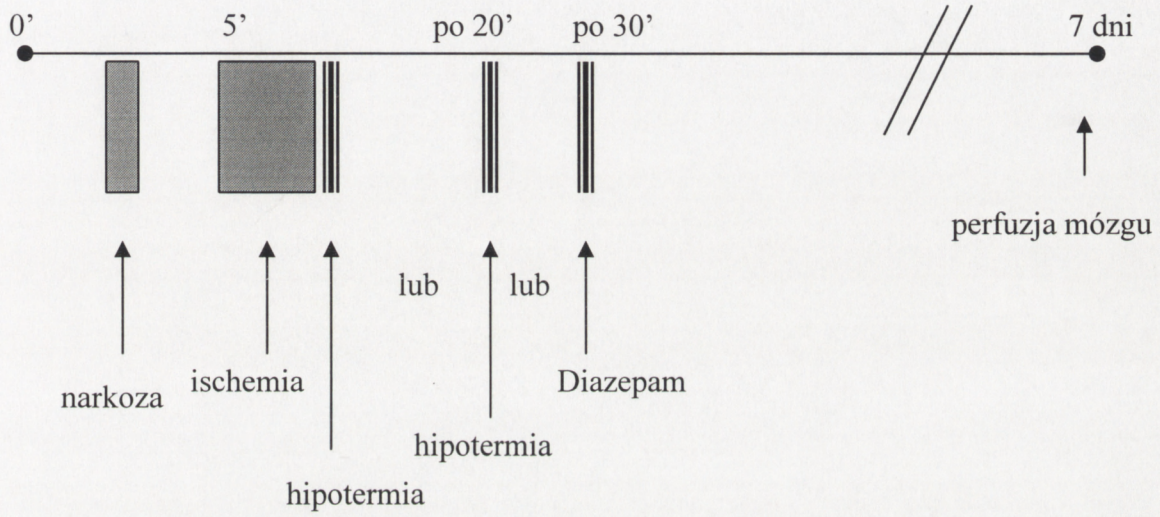
Zwierzętom podawano wybrane związki według następujących schematów:

- CsA podawano do tętnicy szyjnej wspólnej jednoczasowo z wywołaniem ischemii w stężeniu 5mg/kg
- FK506 podawano dootrzewnowo 2 godziny przed ischemią lub 3 godziny po ischemii w pojedynczej dawce 2 mg/kg
- Diazepam podawany był dootrzewnowo w dwóch czasach, 30 minut i 90 minut po ischemii w dawce 10mg/kg
- Minocyklina była podawana dootrzewnowo 30 minut przed ischemią i 90 minut po ischemii, oraz przez trzy kolejne dni w pojedynczej dawce 45 mg/kg/dobę.

http://rcin.org.pl

IV.B.3. Doświadczalne modulowanie temperatury ciała myszoskoczka mongolskiego w czasie i po ischemii

W celu wyjaśnienia mechanizmu neuroprotekcyjnego działania Diazepamu zwierzęta poddano działaniu zewnątrzpochodnej hipotermii bezpośrednio po ischemii lub 30 minut po jej wywołaniu. Pomiar temperatury wykonywany był początkowo w odstępach 5 minutowych, a następnie od 30 minuty reperfuzji w odstępach 30 minutowych.



Ryc.7 Indukcja hipotermii u myszoskoczka mongolskiego po ischemii poprzez chłodzenie zwierząt

lub podanie Diazepamu

IV.B.4. Barwienie histochemiczne i morfometria neuronów rejonu CA1 w skrawkach parafinowych hipokampa

W celu oceny stopnia uszkodzenia neuronów w rejonie CA1 hipokampa po ischemii po 7 dniach od eksperymentu zwierzętom podano Vetbutal i.p., a następnie poddano je perfuzji z użyciem 4% PFA w PBS o temperaturze 4^0C. Mózgi wyizolowano i umieszczono w 4% PFA na 24 godziny. Po tym czasie mózgi odwodniono stosując wzrastające stężenia alkoholu (70%-12 godzin, 90%-12 godzin, 96%-3 godziny i 100%-1,5 godziny) i ksylen 2x15 min, a następnie umieszczono w parafinie w temperaturze 56-58 ^{0}C, zatopiono i pocięto w płaszczyźnie czołowej na skrawki o grubości 10μm. Skrawki mózgu uwodniono przeprowadzając je kolejno przez malejące stężenia alkoholi (odwrotnie do procedury

http://rcin.org.pl

opisanej powyżej), a następnie zabarwiono hematoksyliną (3x5 min) i eozyną (1x2 min). Po ponownym odwodnieniu preparaty zamknięto przy użyciu DePeX mounting medium.

Liczba neuronów w rejonie CA1 hipokampa, które przeżyły ischemię, była oceniana przy użyciu mikroskopu świetlnego (Zeiss Axioskop 2). Wykorzystano do tego celu preparaty, otrzymane wcześniej opisaną metodą, zawierające skrawki mózgu w przekroju czołowym. W celu dokładnego określenia liczby komórek każdy preparat rejestrowano przy pomocy kamery Axioskop 2.0, a następnie przy użyciu programu analizującego (KS 300, Carl Zeiss Jena) liczono prawidłowe morfologicznie neurony. W obrębie każdego hipokampa, zarówno po stronie lewej, jak i prawej, liczono komórki w co najmniej 3 obszarach o długości 200μm. Wynik przedstawiono jako średnią arytmetyczną z kolejnych zliczeń dla poszczególnych wariantów doświadczenia.

IV.B.5. Oznaczenie rodzaju śmierci neuronów (apoptozy) w rejonie CA1 hipokampa na skrawkach parafinowych mózgu metodą TUNEL

W celu scharakteryzowania neuronów o zmienionych cechach morfologicznych w rejonie CA1 hipokampa, przeprowadzono reakcję TUNEL przy użyciu zestawu ApopTag® Apoptosis Detection Kits. Do doświadczenia użyto preparaty parafinowe z mózgu zwierząt. Preparaty odparafinowano przeprowadzając je kolejno przez ksylen (2x5min), oraz malejące stężenia alkoholu (100%, 95% i 70%). W celu odsłonięcia antygenów poddano skrawki 5-minutowemu działaniu Proteinazy K. Aktywność endogennej peroksydazy blokowano przez zastosowanie 3% roztworu H_2O_2. Na skrawki nałożono enzym TdT i inkubowano w temperaturze 37^0C przez 60 minut. Po zahamowaniu reakcji Stop/Wash buforem zastosowano przeciwciało przeciwko digoksynie sprzężone z HRP (30 min). Produkt reakcji uwidoczniano przy pomocy dwuaminobenzydyny (DAB). Preparat podbarwiano hematoksyliną Meyera i eozyną i po odwodnieniu we wzrastających stężeniach alkoholu (70%, 95%, 100%) i ksylenu zamykano używając Fluoromount-G. Zdjęcia preparatu wykonano przy pomocy kamery Axioskop 2.0

IV.C. METODYKA BADAŃ NA IZOLOWANEJ FRAKCJI MITOCHONDRIALNEJ MÓZGU SZCZURA

IV.C.1. Izolacja mitochondriów

Mitochondria izolowano z mózgów dorosłych szczurów szczepu Wistar. Umieszczone na lodzie zwierzęta dekapitowano. Pobrane mózgi chłodzono w roztworze soli fizjologicznej

http://rcin.org.pl

o temp. 4°C (2 minuty), następnie odrzucano móżdżek i odpreparowywano istotę białą, większe naczynia oraz pajęczynówkę. Pozostałą tkankę homogenizowano na lodzie przy użyciu tłoka teflonowego w buforze zawierającym 320mM sacharozę, 1mM EGTA i 25mM HEPES, pH 7,3. W celu usunięcia niezhomogenizowanych części tkanki, homogenat wirowano przez 10 min 600xg w 4°C. Na przygotowany wcześniej gradient Percol'u 26% i 60% (roztwór Percolu w buforze opisanym powyżej) nakładano otrzymany nadsącz. Próbkę wirowano przez 30 min w 40 000xg w 4°C. Po zwirowaniu zbierano frakcję mitochondrialną umiejscowioną pomiędzy dwiema fazami gradientu Percolu. Ilość otrzymanego białka mierzono metodą Lowrego, opisaną wcześniej (rozdz. IV.A.6).

IV.C.2. Schemat uszkodzenia wolnorodnikowego i zastosowanej protekcji mitochondriów *in vitro*

Do wyizolowanych mitochondriów dodawano 30μM TBH i jednocześnie lub z opóźnieniem (10 min. lub 20 min.) dodawano wybrane neuroprotektanty (CsA, Diazepam, Minocyklina) w czterech różnych stężeniach, CsA: 0.125μM, 0.25μM, 1.25μM i 2.25μM, Diazepam: 0.5μM, 1μM, 5μM i 10μM, Minocyklina: 1μM, 10μM, 30μM i 50μM.

IV.C.3. Oznaczenie dynamiki wypływu cytochromu c z wyizolowanych mitochondriów metodą immunoenzymatyczną (ELISA)

Aby ocenić zmiany przepuszczalności błony mitochondrialnej dla cytochromu c w wyizolowanych mitochondriach zastosowano zestaw DuoSet® IC. W tym celu 96-dołkową płytkę pokryto monoklonalnym przeciwciałem anti-cytochrom c i inkubowano 24 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie blokowano przez 2 godziny niespecyficzne miejsca wiązania przeciwciała przy użyciu 1% BSA w PBS. Do poszczególnych dołków płytki nałożono: bufor, standard zawierający różne stężenia cytochromu c, oraz uzyskane mitochondria w końcowej objętości 100μl.

Do dołków płytki zawierających mitochondria dodano:

- Bufor (opisany w rozdz. IV.C.1) w celu oceny wypływu cytochromu c spowodowanego uszkodzeniem mitochondriów podczas preparatyki
- 0,25% TRITON–X100 w celu oceny ilości całkowitego cytochromu c w wyizolowanych mitochondriach
- TBH w celu indukcji wypływu cytochromu c z mitochondriów

http://rcin.org.pl

- Diazepam, CsA, Minocyklinę w różnych stężeniach, w celu oceny wpływu samych neuroprotektantów na wypływ cytochromu c z mitochondriów
- TBH + Diazepam lub CsA lub Minocyklinę w celu oceny zahamowania przez poszczególne neuroprotektanty wypływu cytochromu c z uszkodzonych TBH mitochondriów

Kolejnym etapem doświadczenia było dodanie do dołków płytki monoklonalnego przeciwciała anty-cytochrom c sprzężonego z peroksydazą. Po 30 minutach inkubacji w temperaturze 30^0C dołki płytki odpłukano i dodano firmową substancję barwiącą. Po zatrzymaniu reakcji 2N H_2SO_4 odczytano absorbancję przy użyciu spektrofotometru przy długości fal: 450 nm i 570 nm. Sposób przekształcania otrzymanych danych był identyczny z przedstawionym w rozdziale IV.A.9 dla zestawu Quantikine®.

IV.D. OBLICZENIA STATYSTYCZNE

Wszystkie wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej z poszczególnych danych eksperymentalnych ± odchylenie standardowe. Do oceny istotności statystycznej otrzymanych wyników zastosowano test One-way ANOVA. W zależności od stosowanego sposobu obliczeń, porównania danych eksperymentalnych z kontrolą lub porównania ich pomiędzy sobą, zastosowano odpowiednio testy post-hock Dunneta lub Tukey'a. Do wszystkich obliczeń zastosowano program GraphPad Prism 2.01.

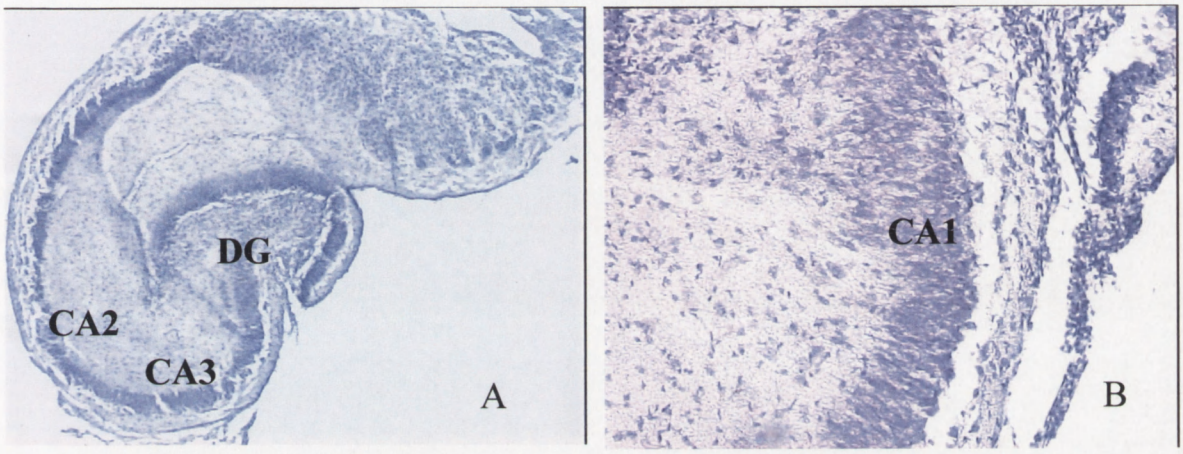
http://rcin.org.pl

V. WYNIKI BADAŃ

V.A. BADANIA PRZEPROWADZONE NA ORGANOTYPOWEJ HODOWLI HIPOKAMPALNEJ

V.A.1. Identyfikacja struktur anatomicznych hipokampa

Hipokampalną hodowlę organotypową prowadzono przez 14-18 dni. Stopień zachowania struktury skrawków oceniano wykonując barwienie hematoksyliną i eozyną preparatów parafinowych o grubości 10μm.



Ryc.8 Budowa morfologiczna skrawków hipokampa szczura w organotypowej hodowli
Skrawki parafinowe 10μm wybarwiono hematoksyliną- eozyną. A - zdjęcie wykonane pod mikroskopem świetlnym przy powiększeniu 2,5x. CA – (cornu Ammonis) warstwa komórek piramidowych, DG – (dentus gyrus) zakręt zębaty. Widoczna prawidłowa, zwarta struktura rejonu CA i DG. B - zdjęcie fragmentu rejonu CA1 wykonane pod mikroskopem świetlnym przy powiększeniu 10x. Widoczne równoległe ułożenie neuronów o prawidłowych cechach morfologicznych.

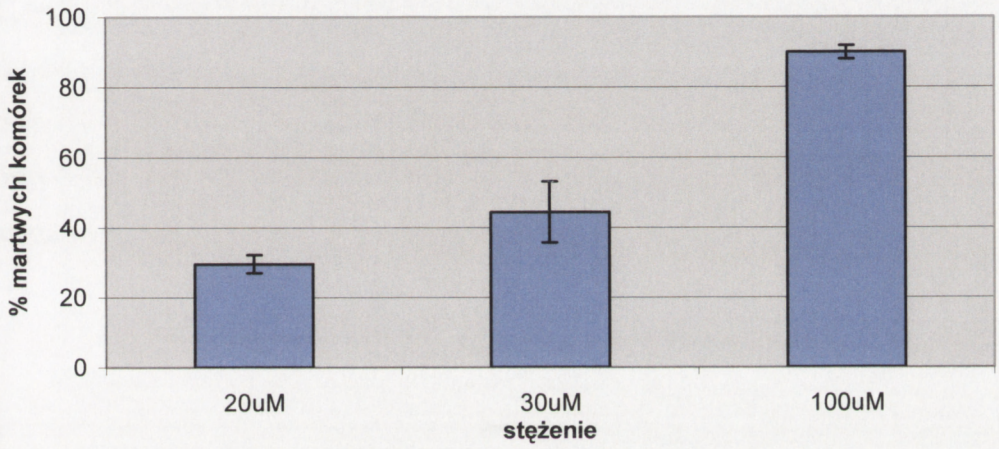
Większość skrawków hipokampa szczura zachowała przez cały okres hodowli swoją cytoarchitekturę z typowym ułożeniem warstwy komórek piramidowych do 14-18 dnia hodowli. Każdy skrawek otaczał się strefą wzrostu zawierającą liczne wywędrowujące komórki astroglejowe oraz pojedyncze neurony. W preparatach parafinowych o grubości 10μm, można było wyodrębnić mocniej wybarwiony rejon CA, składający się z neuronów piramidowych o wyraźnym jądrze i jasnej cytoplazmie, a w nim trzy sektory: CA1 z neuronami mniejszymi od pozostałych, gęsto ułożonymi, CA2 z nieco luźniejszym ułożeniem

http://rcin.org.pl

neuronów i sektor CA3 graniczący z zakrętem zębatym. Podczas hodowli grubość pojedynczego skrawka uległa zmianie, zmniejszając się z 400μm do ok. 200μm.

V.A.2. Określenie stopnia uszkodzenia wolnorodniowego neuronów rejonu CA1 w zależności od dawki TBH i czasu ekspozycji

Po 14 dniach hodowli skrawków do medium hodowlanego dodawano na okres 3 godzin TBH w różnym stężeniu. Po 24 godzinach metodą przeżyciową z użyciem znakowania IP oceniano morfometrycznie stopień przeżycia komórek w rejonie CA1 hipokampa (Ryc.9).



Ryc.9 Wpływ różnych stężeń TBH na żywotność komórek rejonu CA1 hipokampa szczura w hodowli organotypowej. Poszczególne słupki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n= 5.

Przeżywalność komórek malała wraz ze zwiększeniem stężenia TBH. Przy 20μM stężeniu TBH przeżywalność wynosiła 70,4%±3, przy 30μM 55,6%±9, natomiast przy stężeniu 100μM 10,1%±2. W standardowych warunkach hodowli (kontrola) wykazaliśmy śmiertelność komórek na poziomie 1,3%±0,3. Do dalszych doświadczeń wybrano 30μM stężenie TBH, przy którym śmiertelność komórek w rejonie CA1 wynosiła ok. 50% (LD50).

➢ Dynamika umierania komórek rejonu CA1 po uszkodzeniu wolnorodnikowym

Po dodaniu do hipokampalnej hodowli organotypowej 30μM TBH przez kolejne 3 dni obserwowano dynamikę umierania komórek w rejonie CA1 hipokampa. Celem doświadczenia był wybór optymalnego czasu dla rejestracji i oceny przeżywalności komórek rejonu CA1 hodowli skrawków hipokampa w czasie uszkodzenia wolnorodnikowego, a także

http://rcin.org.pl

porównanie dynamiki umierania komórek w hodowli organotypowej, z danymi literaturowymi dotyczącymi przebiegu apoptozy w hodowli komórkowej.

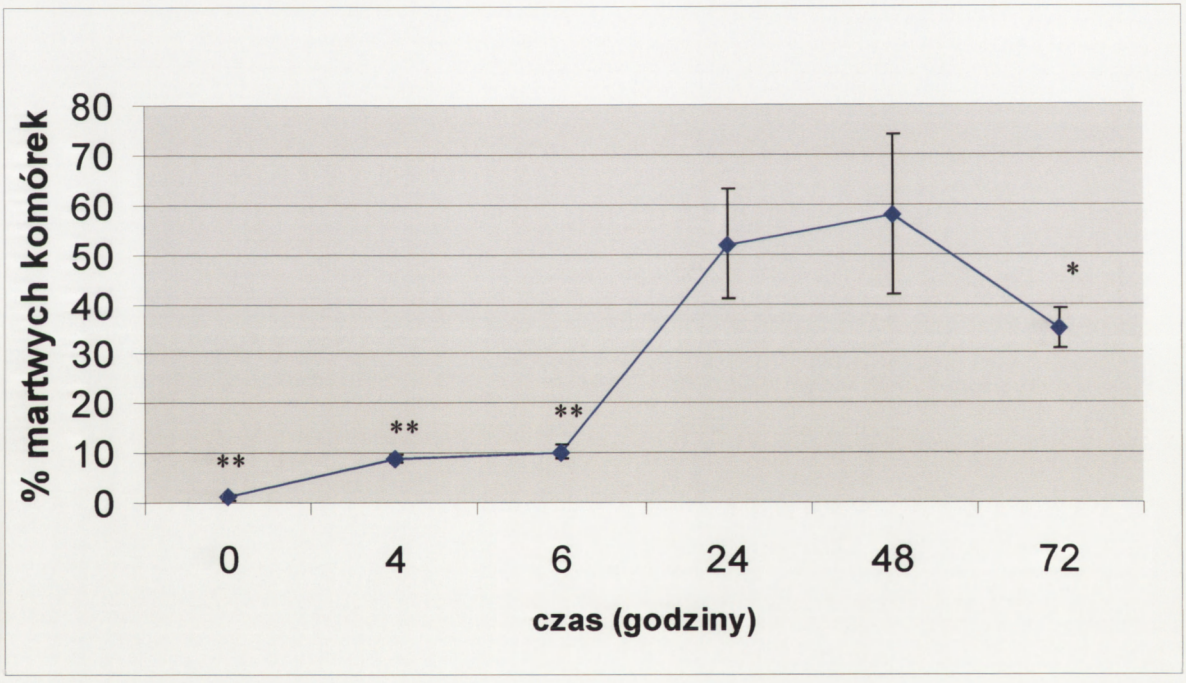
Hodowlę organotypową poddano działaniu 30μM TBH przez 3 godziny. Po tym czasie wymieniono medium na standardowe, pozbawione substancji uszkadzającej i obserwowano zmiany zachodzące w liczbie martwych komórek w ciągu 72 godzin. Dynamika umierania komórek w rejonie CA1 przypominała swoim przebiegiem apoptozę opisywaną w hodowlach komórkowych. Przez okres pierwszych 6 godzin liczba umierających komórek nie przekroczyła 10%±0.7, natomiast po tym czasie następował gwałtowny spadek przeżywalności. Po 24 godzinach liczba komórek martwych w rejonie CA1 ustalała się na najwyższym poziomie, wynoszącym 52±11%. Przez następne 12 godzin liczba komórek martwych wzrastała głównie w DG lub innych rejonach hipokampa, natomiast wzrost w rejonie CA1 był statystycznie nieistotny. Czas 24 godzin ustalono jako optymalny do obserwacji wpływu ochronnego działania badanych związków na przeżycie komórek w rejonie CA1 w dalszych doświadczeniach (Ryc.10).

http://rcin.org.pl

A



B

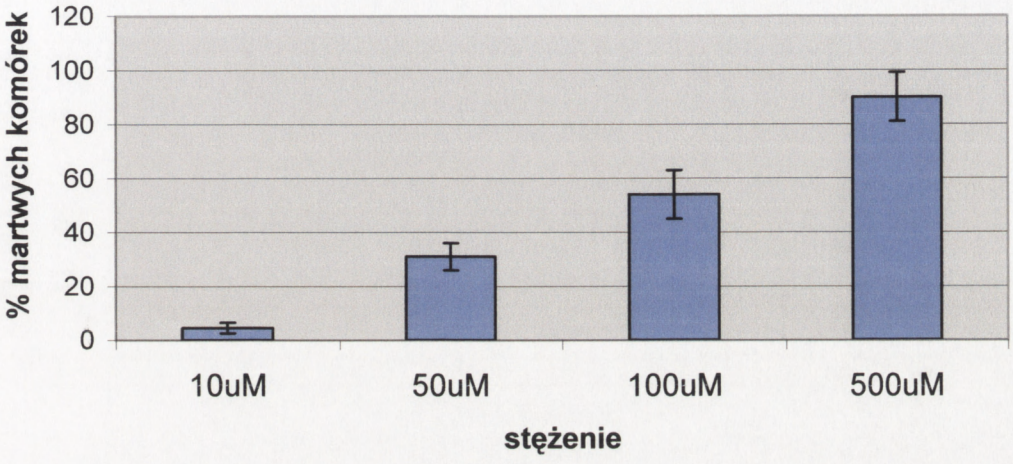


Ryc.10 Dynamika umierania komórek rejonu CA1 po uszkodzeniu TBH. A-Zdjęcia wykonano w mikroskopie fluorescencyjnym odwróconym, powiększenie 2,5. Obraz skonwertowany ze zdjęcia czarno-czerwonego. Kolorem czarnym wyznakowane są komórki martwe, lub umierające. W celu oceny śmiertelności komórek zliczane były komórki wyznakowane IP tylko w rejonie CA1 (pole zaznaczone czerwonym obrysem). B- Poszczególne punkty czasowe przedstawiają średnie arytmetyczne ± SD, n = 3 . Testem Dunneta sprawdzono istotność dla różnych punktów czasowych, za punkt odniesienia uznając 24 godziny.

http://rcin.org.pl

V.A.3. Określenie stopnia uszkodzenia ekscytotoksycznego neuronów rejonu CA1 w zależności od dawki NMDA i czasu ekspozycji

Hodowlę organotypową skrawków hipokampa prowadzono przez 14 dni. Po tym okresie do pożywek dodano NMDA w różnym stężeniu i oceniano stopień przeżycia komórek w rejonie CA1 hipokampa.



Ryc.11 Wpływ różnych stężeń NMDA na żywotność komórek rejonu CA1 hipokampa szczura w hodowli organotypowej. Poszczególne słupki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n= 5.

Hodowlę organotypową poddano działaniu różnych stężeń NMDA przez 24 godziny w celu ustalenia stężenia NMDA, przy którym przeżywalność komórek w rejonie CA1 wynosiła ok. 50%. Podobnie jak w uszkodzeniu wolnorodnikowym, liczba martwych komórek, która w kontroli wynosiła 1,3±0,3% po 24 godzinach zwiększała się wraz ze zwiększeniem stężenia NMDA. Dla stężenia 10μM NMDA wynosiła 4,5±2%, dla 50μM 31±5%, dla 100μM 54±9%, natomiast przy stężeniu NMDA 500μM 90±9%. Do dalszych badań wybrano 100μM stężenie NMDA, przy którym śmiertelność komórek w rejonie CA1 wahała się w okolicy 50% (LD50).

➢ Dynamika umierania komórek rejonu CA1 po uszkodzeniu ekscytotoksycznym

W celu wyboru optymalnego czasu oceny przeżywalności komórek rejonu CA1 hipokampa po uszkodzeniu glutamatergicznym, a także, aby porównać dynamikę umierania komórek w rejonie CA1 w dwóch modelach eksperymentalnych uszkodzenia: ekscytotoksycznym i wolnorodnikowym, dodano do medium hodowlanego na okres 3 godzin

http://rcin.org.pl

100μM NMDA. Po 4, 6, 24, 48 i 72 godzinach obserwowano dynamikę umierania komórek w rejonie CA1.

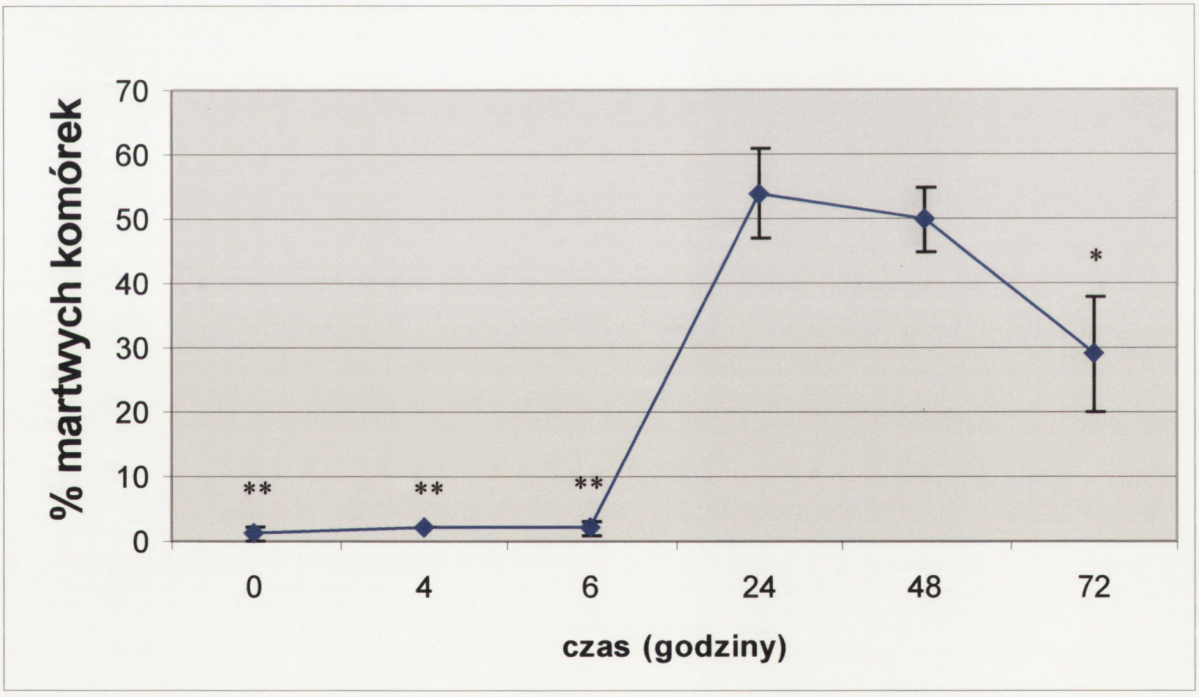
Dynamika umierania komórek w rejonie CA1 wyglądała podobnie jak w uszkodzeniu wolnorodnikowym. Do 6 godzin po zastosowaniu czynnika uszkadzającego, umieralność komórek w rejonie CA1 była bardzo niska (2±1%). Po tym okresie proces umierania przebiegał gwałtowniej niż w uszkodzeniu wolnorodnikowym, osiągając maksimum po 24 godzinach. Różnica w przeżywalności komórek pomiędzy 24 godzinami (54±9%) i 48 godzinami (50±5%) była nieistotna statystycznie. Po 72 godzinach śmiertelność komórek wynosiła 29±9%, co było prawdopodobnie związane z postępującym rozpadem martwych komórek. Podobnie jak w przypadku TBH czas 24 godzin od chwili podania NMDA ustalono jako optymalny do obserwacji w dalszych doświadczeniach (Ryc.12).

http://rcin.org.pl

A



B



Ryc.12 Dynamika umierania komórek rejonu CA1 po uszkodzeniu NMDA. A-Zdjęcia wykonano w mikroskopie fluorescencyjnym odwróconym, powiększenie 2,5. Obraz skonwertowany ze zdjęcia czarno-czerwonego. Kolorem czarnym wyznakowane są komórki martwe, lub umierające. W celu oceny śmiertelności komórek zliczane były komórki wyznakowane IP tylko w rejonie CA1 (pole zaznaczone czerwonym obrysem). B-Poszczególne punkty czasowe przedstawiają średnie arytmetyczne ± SD, n = 3 . Testem Dunneta sprawdzono istotność dla różnych punktów czasowych, za punkt odniesienia uznając 24 godziny.

http://rcin.org.pl

V.A.4. Neuroprotekcyjne działanie wybranych związków w modelu wolnorodnikowego uszkodzenia neuronów rejonu CA1 hipokampa

Schemat przebiegu prowadzonych doświadczeń został przedstawiony na Ryc. 4.

- Wpływ CsA na komórki rejonu CA1 po stresie oksydacyjnym

Hodowlę organotypową skrawków hipokampa prowadzono przez 14 dni. Po tym okresie do medium hodowlanego dodano CsA w różnych stężeniach i morfometrycznie, metodą znakowania przeżyciowo IP oceniano po 24 godzinach stopień przeżycia komórek w rejonie CA1. Ponieważ CsA nie jest substancją obojętną, wyjściowo musieliśmy wyznaczyć stężenie, przy którym sama substancja może działać niekorzystnie na komórki w tkance. W tym celu do hodowli skrawków hipokampa dodano CsA w trzech różnych stężeniach: 0.25μM, 0.5μM i 1μM. Po 24 godzinach otrzymano odpowiednio następujące wartości procentowe, określające martwe komórki: 1.8±0.5%, 3.5±0.3%, 15.8±1.8%. Wykazano, że CsA w niskich stężeniach (0,25-0,5 μM) nie działała w sposób istotny na przeżycie komórek rejonu CA1 hipokampa, natomiast, w stężeniu 1μM to działanie zaczynało być zauważalne.

Po podaniu 30μM TBH i CsA w stężeniach: 0,25μM i 0,5 μM śmiertelność komórek była bardzo niska i wynosiła odpowiednio 4,5±0,5% i 6,9±1%. Po zastosowaniu CsA w wyższym stężeniu (1μM), umieralność komórek wzrastała do 20±1,7%. Ponieważ ochrona uzyskana po zastosowaniu 0,25μM CsA i 0,5μM CsA była porównywalna i nieistotna statystycznie ($p>0,05$ w teście Tukey'a), do dalszych eksperymentów wybrano stężenie 0,25μM CsA (Ryc.13).

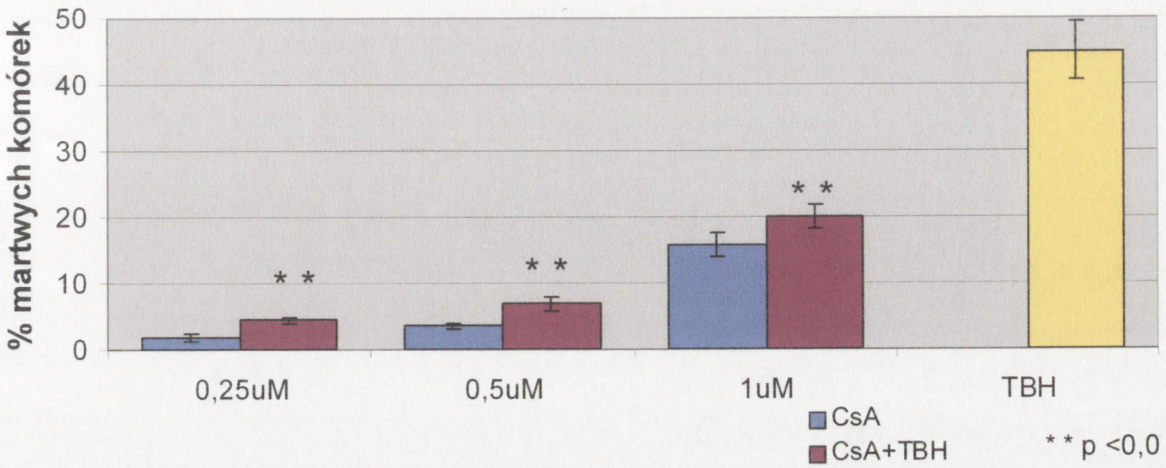
- Wpływ FK506 na komórki rejonu CA1 po stresie oksydacyjnym

Do skrawków hipokampa po 14 dniach hodowli dodano FK506 w czterech różnych stężeniach (0,1μM, 0,5μM, 5μM i 50μM) i po 24 godzinach metodą przeżyciową z użyciem IP oceniono procentowo stopień przeżycia komórek w rejonie CA. Ponieważ żadne z badanych stężeń nie działało uszkadzająco na komórki skrawków hipokampa, wszystkie stężenia FGK506 zastosowano do dalszego badania działania neuroprotekcyjnego związku. Do hodowli organotypowej podano jednoczasowo 30μM TBH i FK506 w w/w stężeniach (Ryc.14).

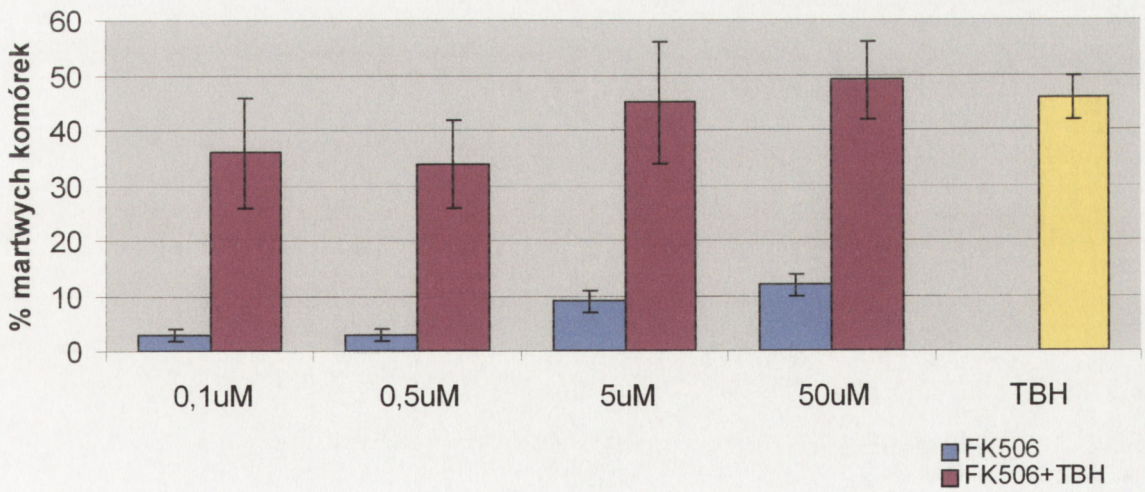
Przy żadnym z zastosowanych stężeń FK506 nie zaobserwowano statystycznie istotnego działania protekcyjnego badanej substancji. Przy stężeniach: 0,1μM, 0,5μM i 5μM FK506 procent martwych komórek wynosił odpowiednio: 36±10%, 34±8% i 45±11%, przy stężeniu 50μM procent komórek martwych wynosił 49±7%. Różnice w umieralności

http://rcin.org.pl

komórek pomiędzy różnymi stężeniami FK506 po uszkodzeniu wolnorodnikowym, szacowane testem Tukey'a, nie były istotne statystycznie (p>0,05).



Ryc. 13 Protekcyjny efekt wybranych stężeń CsA na przeżycie komórek rejonu CA1 mózgu szczura poddanych działaniu 30μM TBH w hodowli organotypowej. Stopień uszkodzenia komórek w rejonie CA1 określono po 24 godzinach od podania 30μM TBH. Poszczególne słupki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n=8. Testem Dunneta sprawdzono istotność dla różnych stężeń CsA po uszkodzeniu TBH, za punkt odniesienia uznając umieralność komórek 24 godziny po uszkodzeniu TBH.



Ryc. 14 Protekcyjny efekt wybranych stężeń FK506 na przeżycie komórek rejonu CA1 mózgu szczura poddanych działaniu 30μM TBH. Stopień uszkodzenia komórek w rejonie CA1 określono po 24 godzinach od podania 30μM TBH. Poszczególne słupki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n=4. Testem Dunneta sprawdzono istotność dla różnych stężeń FK506 po uszkodzeniu TBH, za punkt odniesienia uznając umieralność komórek 24 godziny po uszkodzeniu TBH.

http://rcin.org.pl

➢ Wpływ MK801 na komórki rejonu CA1 po stresie oksydacyjnym

Do hodowli organotypowej po 14 dniach dodano MK801 w czterech różnych stężeniach: 1μM, 10μM, 50μM i 100μM. Po 24 godzinach metodą opisaną wcześniej oceniono stopień przeżycia komórek w rejonie CA1, otrzymując w kolejności dla wymienianych stężeń procent martwych komóreknastepujące wyniki: 3.8±1%, 6.8±1%, 19.8±2% i 23.2±4%.

MK801 w niskich stężeniach: 1μM i 10μM nie wykazywał działania toksycznego. Przy stężeniu 50μM i 100μM ujawniło się działanie uszkadzające badanej substancji, a ponieważ przy stężeniu 100μM procent martwych komórek osiągnął ponad połowę śmiertelności uzyskiwanej przy TBH, został odrzucony w dalszych badaniach. Po doborze stężeń dla MK801, do hodowli podano jednoczasowo z 30μM TBH i MK801 w stężeniach 1μM, 10μM i 50μM. Celem doświadczenia było ustalenie, przy którym stężeniu MK801 działa najsilniej neuroprotekcyjnie (Ryc.15).

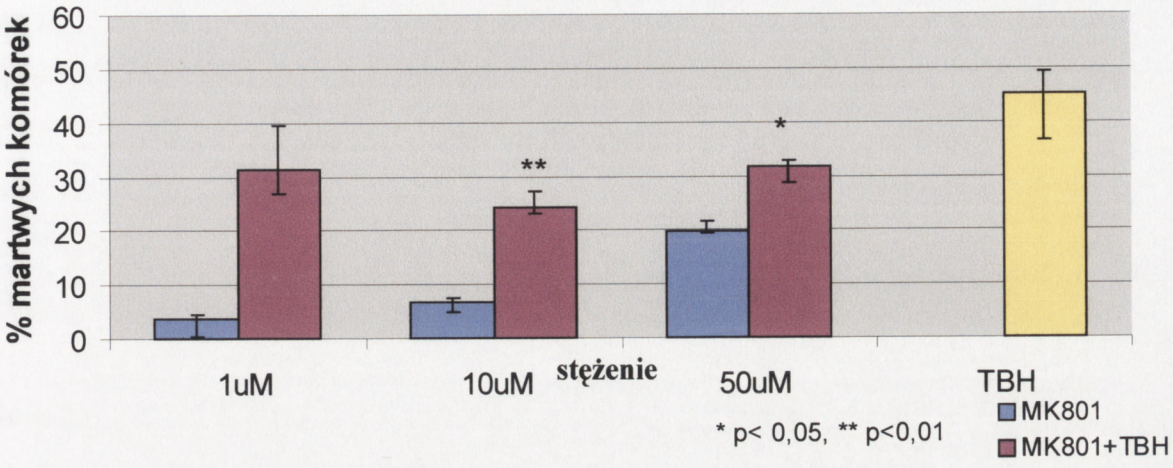
Przy stężeniu 1μM MK801 nie wykazał statystycznie istotnej protekcji pomimo obniżenia śmiertelności komórek do 31.2±8%. Taki rezultat był spowodowany najprawdopodobniej dużym odchyleniem standardowym. Istotną statystycznie protekcję wykazał 10μM i 50μM MK801 obniżając liczbę martwych komórek odpowiednio do 24.3±3% i 31.6±1%. Do dalszych eksperymentów wybrano stężenie 10μM MK801

➢ Wpływ IGF-1 na komórki rejonu CA1 po stresie oksydacyjnym

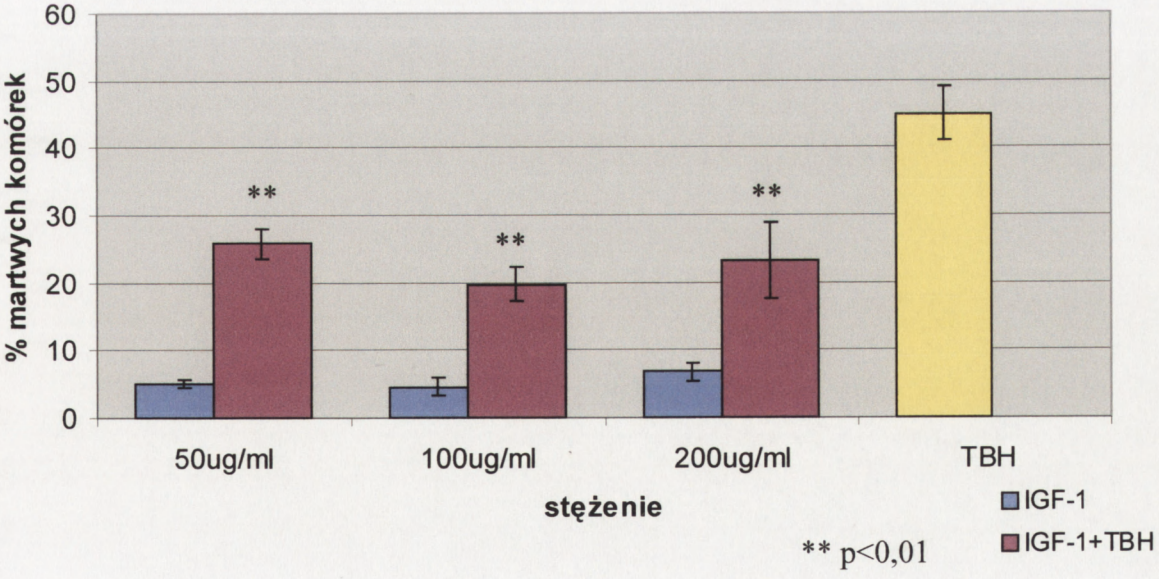
Kolejnym badanym związkiem był czynnik wzrostowy IGF-1. Ponieważ w badanych przez nas stężeniach, a także zgodnie z danymi literaturowymi sam nie powodował uszkodzenia komórek, postanowiliśmy podać go jednocześnie z 30μM TBH w stężeniach 50ng/ml, 100ng/ml i 200ng/ml. Celem doświadczenia było ustalenie, przy którym stężeniu IGF-1 działa najsilniej neuroprotekcyjnie (Ryc.16).

IGF-1 we wszystkich trzech zastosowanych stężeniach wykazał statystycznie istotną protekcję redukując procent martwych komórek odpowiednio: 50ng/ml do 25,8±2,2%, 100ng/ml do 19.7±2.5% i 200ng/ml do 23.3±5.6%. Pomiędzy działaniem ochronnym wywołanym podaniem IGF-1 w najniższym i najwyższym stężeniu nie było istotnej różnicy w teście Tukey'a, natomiast najskuteczniejszą ochronę, statystycznie różną od dwóch poprzednich dawał IGF-1 w stężeniu 100ng/ml i to stężenie było stosowane w dalszych doświadczeniach.

http://rcin.org.pl



Ryc.15 Protekcyjny efekt wybranych stężeń MK801 na przeżycie komórek rejonu CA1 mózgu szczura poddanych działaniu 30μM TBH. Stopień uszkodzenia komórek w rejonie CA1 określono po 24 godzinach od podania 30μM TBH. Poszczególne słupki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n=4. Testem Dunneta sprawdzono istotność dla różnych stężeń MK801 po uszkodzeniu TBH, za punkt odniesienia uznając umieralność komórek 24 godziny po uszkodzeniu TBH.



Ryc.16 Protekcyjny efekt wybranych stężeń IGF-1 na przeżycie komórek rejonu CA1 mózgu szczura poddanych działaniu 30μM TBH. Stopień uszkodzenia komórek w rejonie CA1 określono po 24 godzinach od podania 30μM TBH. Poszczególne słupki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n=4. Testem Dunneta sprawdzono istotność dla różnych stężeń IGF-1 po uszkodzeniu TBH, za punkt odniesienia uznając umieralność komórek 24 godziny po uszkodzeniu TBH.

http://rcin.org.pl

➢ Wpływ Diazepamu na komórki rejonu CA1 po stresie oksydacyjnym

Według schematu doświadczeń prowadzonych wcześniej, w 14 dniu do hodowli dodano Diazepam w trzech różnych stężeniach (0,5μM, 5μM i 50μM) i po 24 godzinach metodą przeżyciową z użyciem IP oceniono procentowo stopień przeżycia komórek w rejonie CA1. Ponieważ Diazepam w żadnym z badanych stężeń nie działał uszkadzająco na komórki hipokampa, wszystkie stężenia zostały zastosowane do dalszego badania działania neuroprotekcyjnego związku. Do hodowli organotypowej podano jednoczasowo 30μM TBH i Diazepam w w/w stężeniach (Ryc.17).

Diazepam we wszystkich zastosowanych stężeniach działał silnie osłaniająco na komórki rejonu CA1 poddane stresowi oksydacyjnemu. Warto jednak zauważyć, że działanie to nie rosło wraz ze stężeniem Diazepamu. 0,5μM Diazepam obniżył śmiertelność komórek do 18.5±1%, 5μM do 15.6±2%, natomiast 50μM do 21.9±1%. Na podstawie otrzymanych wyników do dalszych doświadczeń wybrano Diazepam w stężeniu 5μM.

➢ Wpływ Minocykliny na komórki rejonu CA1 po stresie oksydacyjnym

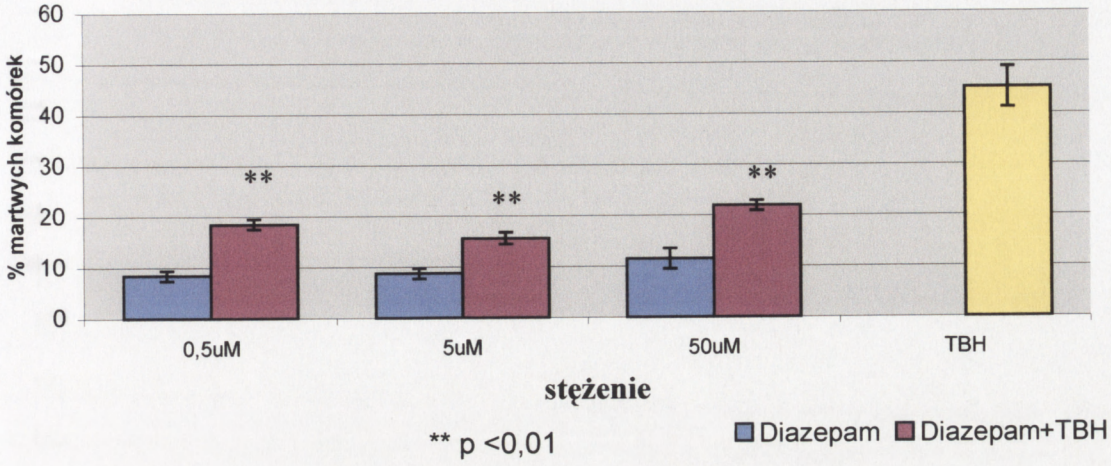
Ostatnim z testowanych związków był antybiotyk z grupy tetracyklin-Minocyklina. Ponieważ z literatury wiadomo, że Minocyklina ma dość wąski przedział dawki terapeutycznej, najpierw postanowiono sprawdzić, przy jakim stężeniu lek zacznie działać uszkadzająco na komórki tkanki. W tym celu do 14 dniowej hodowli dodano Minocyklinę w czterech stężeniach: 10μM, 30μM, 100μM i 150μM. Po 24 godzinach metodą przeżyciową opisaną poprzednio, z użyciem IP oceniono procentowo stopień przeżycia komórek w rejonie CA1.

Uzyskano odpowiednio dla wymienionych stężeń następujące procenty martwych komórek: 5.02±0.7%, 5.3±0.6%, 12.8±1.8% i 25.3± 2.5%. Otrzymane rezultaty potwierdziły, że Minocyklina nie jest substancją obojętną dla tkanki. Minocyklina w dawce 10μM, 30μM i 100μM powodowała śmiertelność komórek odpowiednio w 5.02±0.7%, 5.3±0.6% i 12.8±1.5%. Jej zdecydowane działanie uszkadzające ujawniło się przy stężeniach powyżej 100μM, powodując w stężeniu 150μM śmiertelność komórek na poziomie 25.3±2.5%. W związku z otrzymanymi wynikami, najwyższe badane stężenie Minocykliny zostało odrzucone w dalszych badaniach nad wpływem neuroprotekcyjnym związku (Ryc.18). W następnych badaniach do hodowli organotypowej podano jednoczasowo 30μM TBH i Minocyklinę we wcześniej wybranych stężeniach (10μM, 30μM, 100μM).

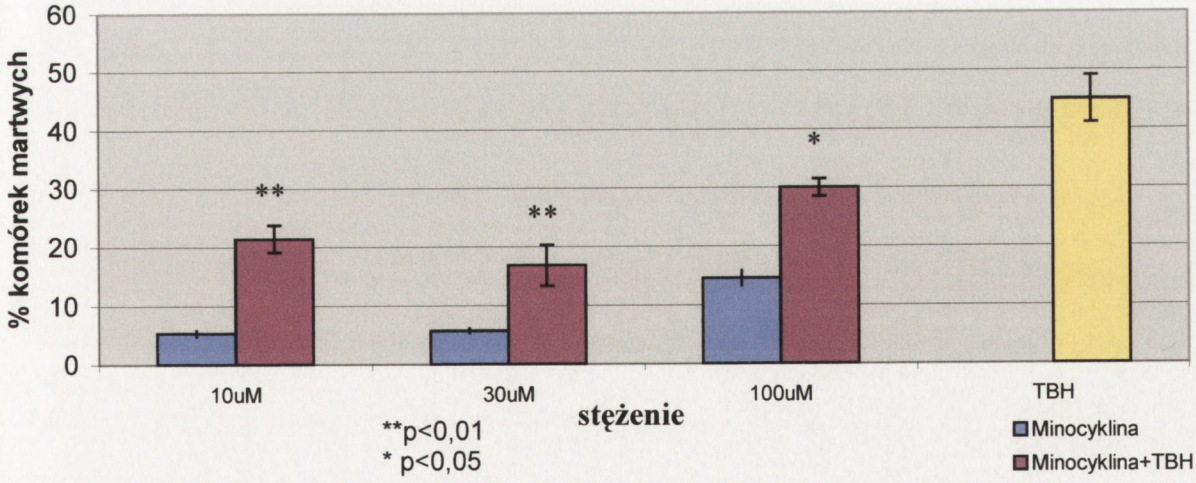
http://rcin.org.pl

Minocyklina we wszystkich trzech testowanych stężeniach wykazała działanie ochronne na komórki rejonu CA1, redukując liczbę martwych komórek po uszkodzeniu wolnorodnikowym odpowiednio do 21±2.3%, 17±3.5% i 30±1.5%. Ze względu na stosunkowo niewielkie działanie uboczne oraz najsilniejsze działanie protekcyjne, do dalszych badań wybrano Minocyklinę w stężeniu 30μM.

http://rcin.org.pl



Ryc.17 Protekcyjny efekt wybranych stężeń Diazepamu na przeżycie komórek rejonu CA1 mózgu szczura poddanych działaniu 30μM TBH. Stopień uszkodzenia komórek w rejonie CA1 określono po 24 godzinach od podania 30μM TBH. Poszczególne słupki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n=5. Testem Dunneta sprawdzono istotność dla różnych stężeń Diazepamu po uszkodzeniu TBH, za punkt odniesienia uznając umieralność komórek 24 godziny po uszkodzeniu TBH.



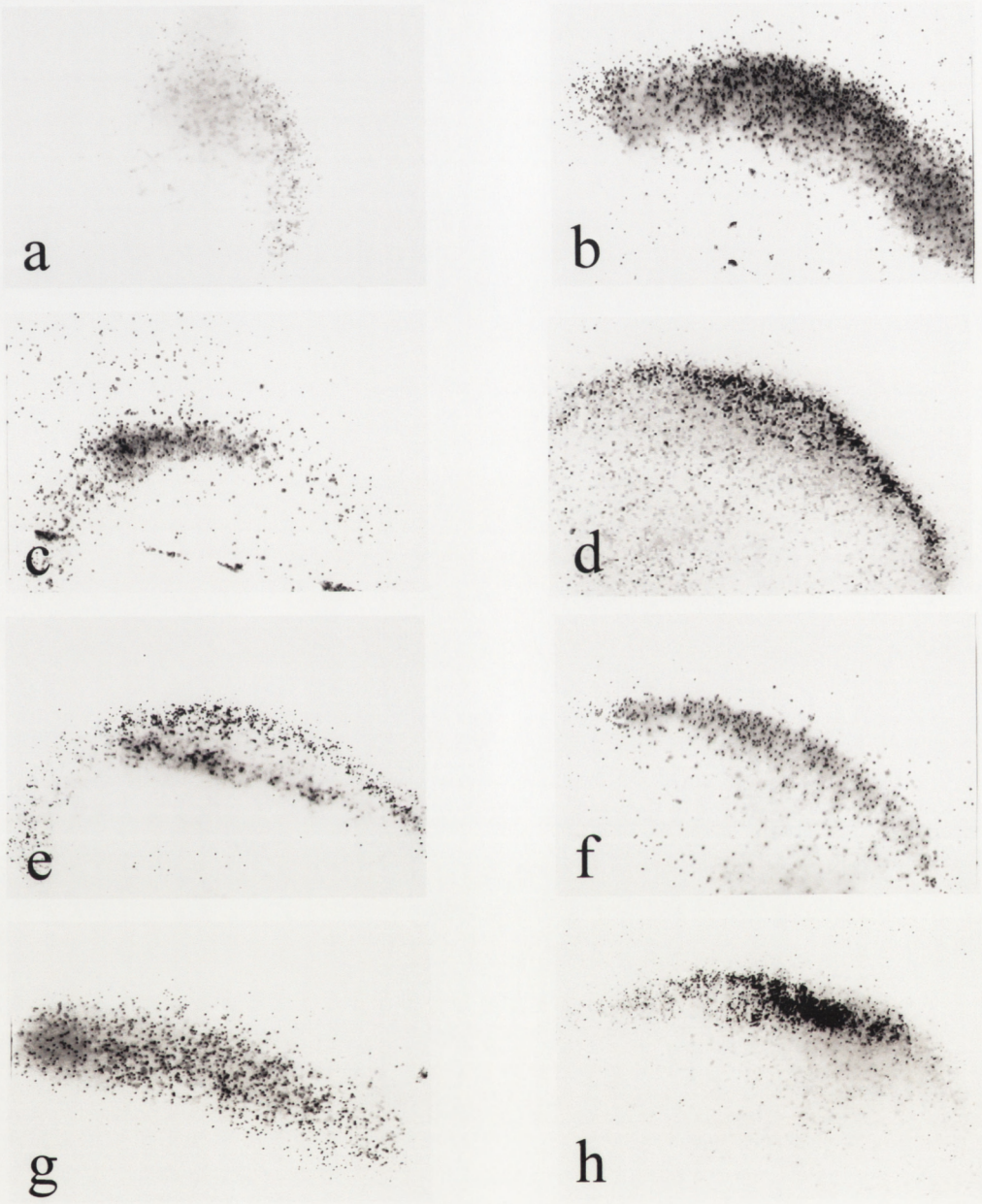
Ryc.18 Protekcyjny efekt wybranych stężeń Minocykliny na przeżycie komórek rejonu CA1 mózgu szczura poddanych działaniu 30μM TBH. Stopień uszkodzenia komórek w rejonie CA1 określono po 24 godzinach od podania 30μM TBH. Poszczególne słupki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n=4. Testem Dunneta sprawdzono istotność dla różnych stężeń Minocykliny po uszkodzeniu TBH, za punkt odniesienia uznając umieralność komórek 24 godziny po uszkodzeniu TBH.

http://rcin.org.pl

V.A.5. Zbiorcze zestawienie działania badanych związków w ich optymalnej dawce na przeżycie komórek rejonu CA1 w modelu uszkodzenia wolnorodnikowego

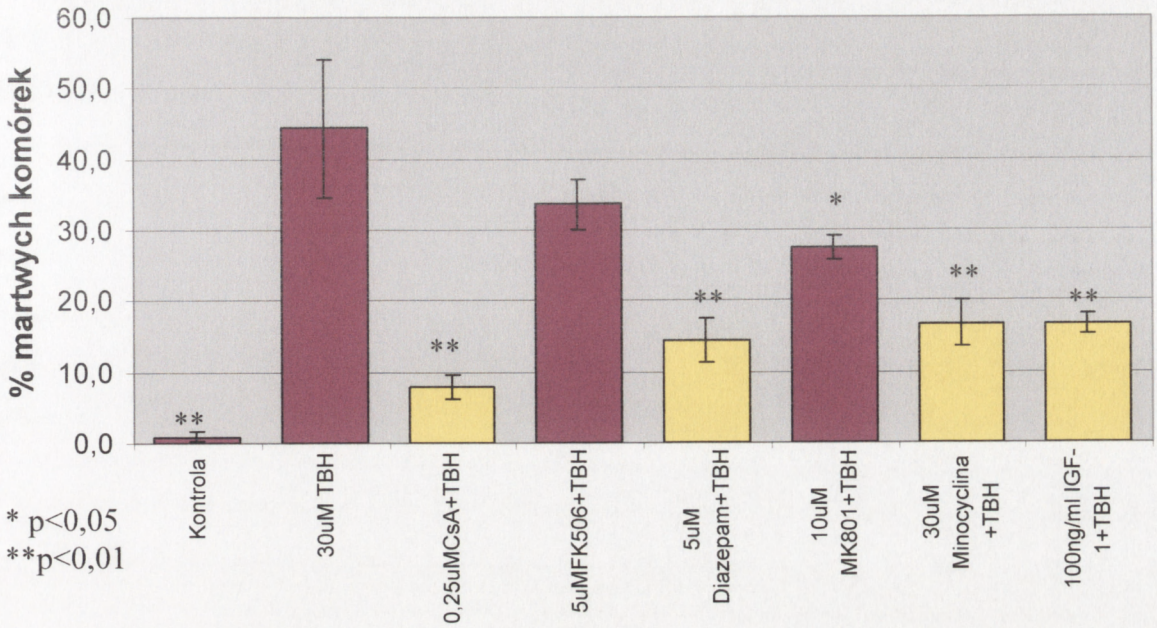
Celem poprzednich doświadczeń było ustalenie stężeń, w których wymienione substancje działałyby optymalnie protekcyjnie, przy jednoczesnym braku z ich strony działania uszkadzającego. W uszkodzeniu wolnorodnikowym z użyciem organotypowej hodowli hipokampa zostało przetestowanych sześć związków. Zdjęcia (Ryc.19) dokumentują przykładowe obrazy neuroprotekcji uzyskane w organotypowej hodowli skrawków hipokampa, które po obróbce komputerowej stanowiły podstawę przedstawionych poniżej wyników badań (Ryc.20). Analizując zbiorczo otrzymane wyniki można wyodrębnić, spośród badanych sześciu substancji, cztery związki, które w sposób istotny ($p<0.01$) chronią komórki rejonu CA1 przed uszkodzeniem wolnorodnikowym: 0,25μM CsA, 5μM Diazepam, IGF-1 w stężeniu 100ng/ml i 30μM Minocyklinę.

http://rcin.org.pl



Ryc.19 Przeżycie komórek w rejonie CA1 hipokampa 24 godziny po uszkodzeniu wolnorodnikowym i zastosowaniu wybranych związków neuroprotekcyjnych. Zdjęcia kolorowe z IP wykonano w powiększeniu 10x. Przekonwertowanie kolorów na czarno-białe wykonano za pomocą programu Adobe Photoshop 6,0 a-kontrola, b-30uM TBH, c-0,25uM CsA+30uM TBH, d-5uM FK506+30uM TBH,e-5uM Diazepam+30uM TBH, f-30uM Minocyklina+30uMTBH, g-10uM MK801+30uM TBH, h-100ng/ml IGF+30uM TBH

http://rcin.org.pl



Ryc.20 Ochronny efekt optymalnych stężeń neuroprotektantów na przeżycie komórek rejonu CA1 mózgu szczura poddanych działaniu 30μM TBH w hodowli organotypowej. Stopień uszkodzenia komórek w rejonie CA1 określono po 24 godzinach od podania 30μM TBH. Poszczególne słupki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n=5. Testem Dunneta sprawdzono statystyczną istotność otrzymanych wartości przedstawiających stopień protekcji różnych substancji po uszkodzeniu TBH, za punkt odniesienia uznając umieralność komórek 24 godziny po uszkodzeniu TBH.

V.A.6. Weryfikacja działania wybranych związków w modelu uszkodzenia ekscytotoksycznego

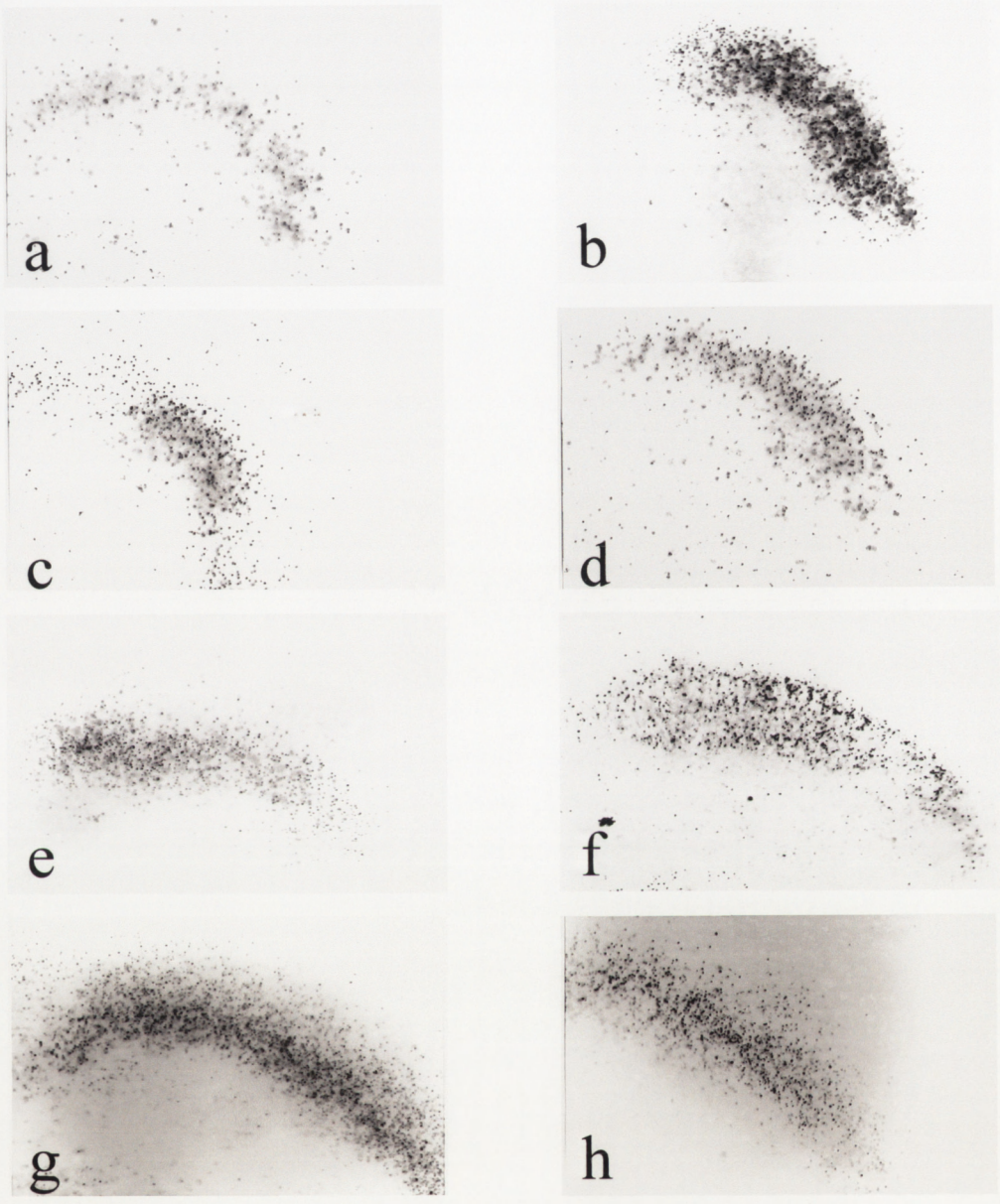
Kolejnym etapem w naszych doświadczeniach, było sprawdzenie, czy badane substancje mogą w tych samych stężeniach działać ochronnie na komórki rejonu CA1 po uszkodzeniu ekscytotoksycznym, który to mechanizm stanowi ważną składową poischemicznej śmierci neuronów. W tym celu do 14 dniowej hodowli dodano jednocześnie 100μM NMDA oraz poszczególne związki w ich poprzednio zoptymalizowanych stężeniach zgodnie ze schematem nr.V.3. Zdjęcia (Ryc.21) obrazują uzyskane zmiany przeżycia komórek CA1 po zastosowaniu badanych neuroprotektantów. Wyniki te, po ich analizie komputerowej, przedstawiono na Ryc.22 w formie wykresu.

http://rcin.org.pl

Badane neuroprotektanty wykazały zróżnicowane działanie ochronne w swoich optymalnych stężeniach. Najsilniejsze działanie ochronne wykazały cztery z sześciu badanych substancji: 0,25μM CsA, 10μM MK801, 30μM Minocyklina i 5μM Diazepam.

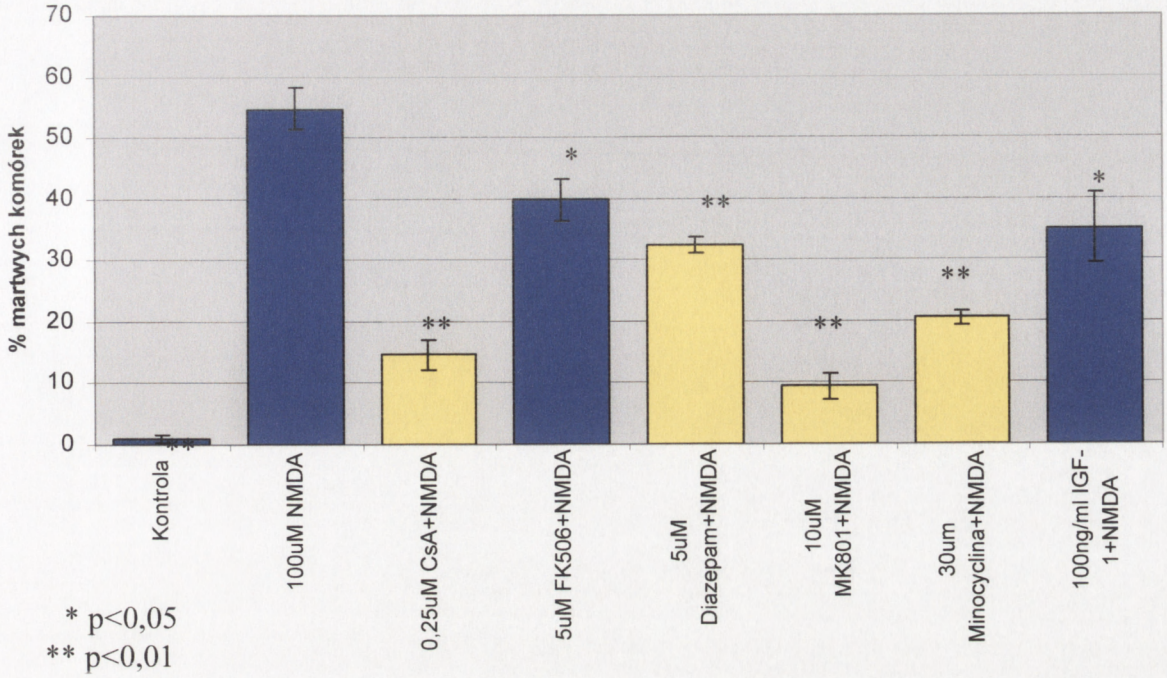
Podsumowując uzyskane dotychczas wyniki, trzy z badanych sześciu substancji o potencjalnym działaniu neuroprotektcyjnym uzyskały w obu modelach uszkodzeń *in vitro* bardzo dobre wyniki: CsA, Diazepam i Minocyklina. Z tego powodu dalsze badania *in vitro* dotyczące wyjaśnienia mechanizmu działania związku działającego protekcyjnie, oraz optymalnego czasu jego zastosowania po uszkodzeniu prowadzone były z zastosowaniem tylko tych trzech wybranych substancji.

http://rcin.org.pl



Ryc. 21 Przeżycie komórek w rejonie CA1 hipokampa 24 godziny po uszkodzeniu wolnorodnikowym i zastosowaniu wybranych związków neuroprotekcyjnych. Zdjęcia kolorowe z IP wykonano pod powiększeniem 10x. Przekonwertowanie kolorów na czarno-białe wykonano za pomocą programu Adobe Photoshop 6,0 a-kontrola, b-100uM NMDA, c-10uM MK801+100uM NMDA, d-5uM Diazepam+100uM NMDA, e-0,25uM CsA+100uM NMDA, f-30uM Minocyklina+100uM NMDA, g-5uM FK506+NMDA, h-100ng/ml IGF+100uM NMDA

http://rcin.org.pl

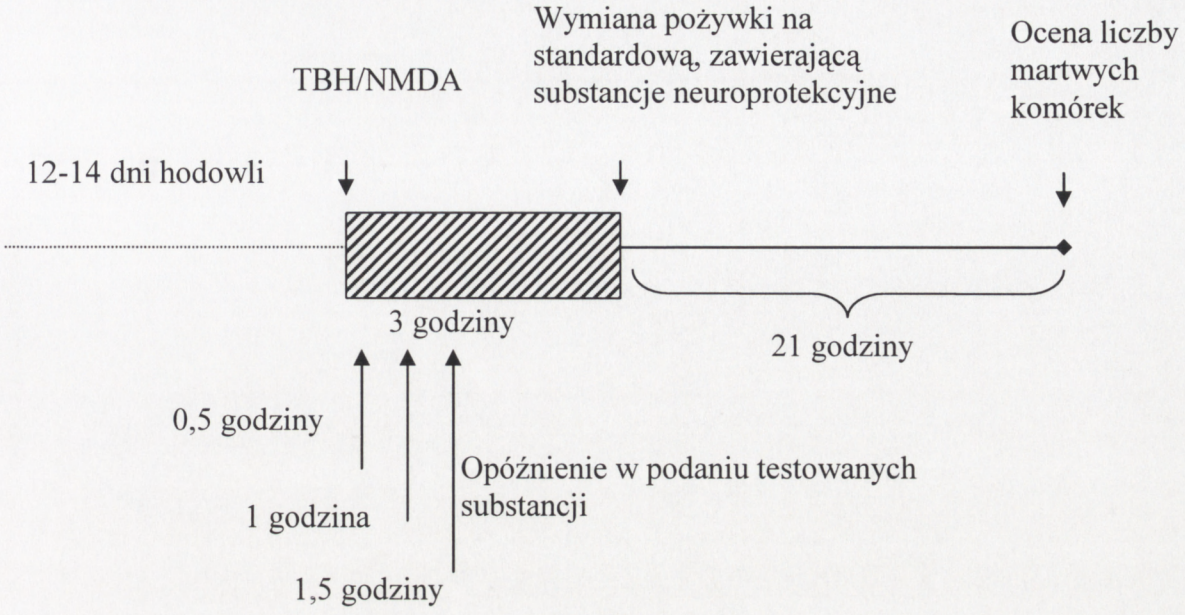


Ryc.22 Ochronny efekt optymalnych stężeń neuroprotektantów na przeżycie komórek rejonu CA1 mózgu szczura poddanych działaniu 100μM NMDA w hodowli organotypowej. Stopień uszkodzenia komórek w rejonie CA1 określono po 24 godzinach od podania 100μM NMDA. Poszczególne słupki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n=5. Testem Dunneta sprawdzono statystyczną istotność otrzymanych wartości przedstawiających stopień protekcji różnych substancji po uszkodzeniu NMDA, za punkt odniesienia uznając umieralność komórek 24 godziny po uszkodzeniu NMDA.

V.A.7. Zależność efektu ochronnego badanych związków od czasu zastosowania neuroprotekcji

W praktyce klinicznej, od epizodu niedokrwienia do czasu, kiedy można byłoby podać pacjentowi lek protekcyjny (kiedy chory zgłasza się do szpitala) mija kilka godzin. Dlatego staraliśmy się sprawdzić, czy badane przez nas substancje zachowają swoje zdolności ochronne, gdy zostaną podane z opóźnieniem w stosunku do czynnika uszkadzającego (określaliśmy tzw. okno terapeutyczne). W tym celu po zainicjowaniu stresu wolnorodnikowego lub ekscytotoksycznego, w odstępach czasu: 0,5 godziny, 1 godziny i 1.5 godziny podawaliśmy wybrane substancje neuroprotekcyjne. Poniżej przedstawiono schemat przeprowadzanego doświadczenia (Ryc.23).

http://rcin.org.pl

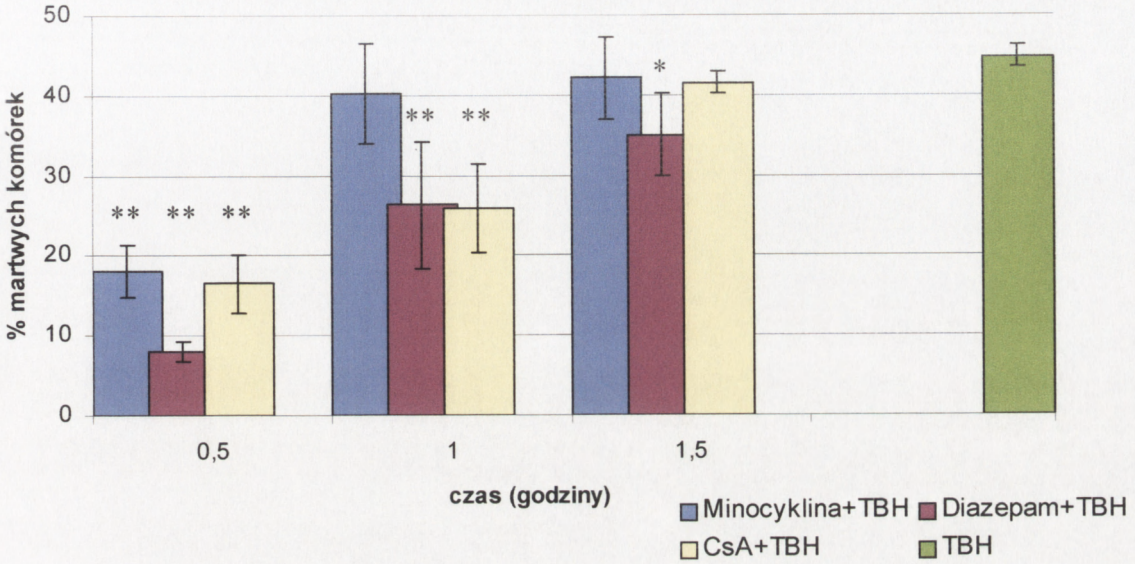


Ryc.23 Schemat przebiegu doświadczeń oceniających okno terapeutyczne badanych substancji

W 14 dniowej hodowli zainicjowano uszkodzenie wolnorodnikowe (30μM TBH), lub ekscytotoksyczne (100μM NMDA), a następnie po upływie określonego czasu (0,5 godziny, 1 godziny lub 1,5 godziny) dodano do pożywki zoptymalizowane stężenia CsA (0,25μM), Minocykliny (30μM) lub Diazepamu (5μM).

W modelu uszkodzenia wywołanego TBH, po podaniu badanych związków, najsilniejsze właściwości protekcyjne wykazał Diazepam (8.1±1.2% martwych komórek), chociaż również pozostałe badane związki: Minocyklina i CsA w sposób statystycznie istotny wykazały działanie ochronne, odpowiednio 18.1±3.2% i 16,5%±3,6 martwych komórek. Ochronne działanie Diazepamu i CsA utrzymywało się nawet przy ich podaniu do pożywki godzinę po indukcji uszkodzenia, obniżając procentowy udział martwych komórek odpowiednio do 26.3±7.9% i 25.9±5.5%. Liczba komórek martwych po opóźnionym podaniu Minocykliny wynosiła 40.2±6.2% i nie była statystycznie istotna w stosunku do liczby martwych komórek po samym uszkodzeniu. Po 1,5 godziny istotnie statystycznie chronił komórki rejonu CA1 tylko Diazepam (35.1±5.1% martwych komórek)(Ryc.24).

http://rcin.org.pl

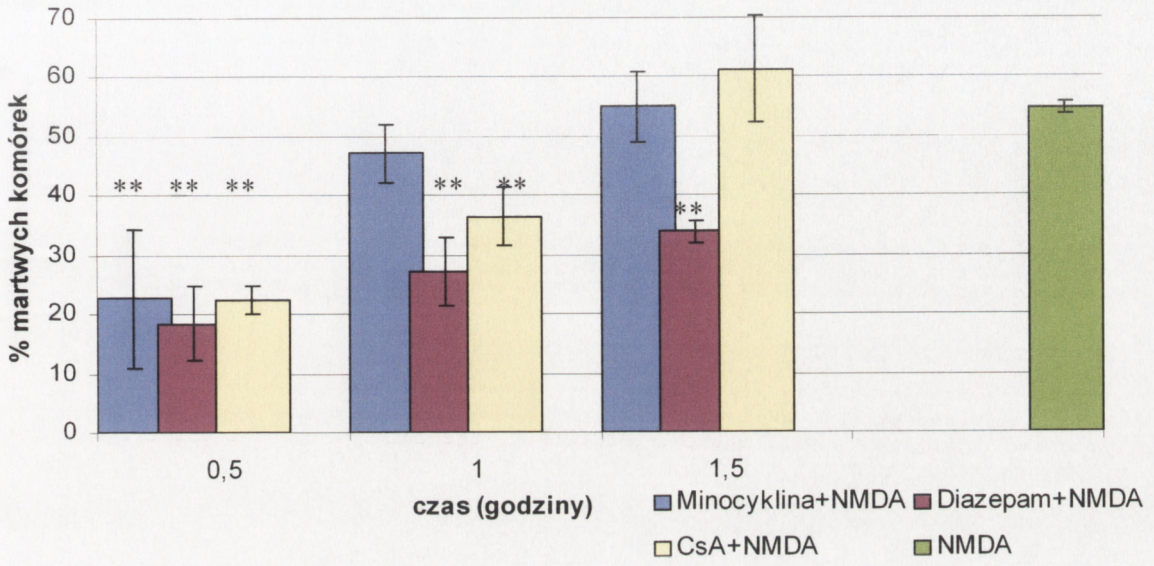


Ryc. 24 Ochronny efekt 0,25μM CsA, 30μM Minocykliny i 5μM Diazepamu na przeżycie komórek rejonu CA1 mózgu szczura poddanych działaniu 30μM TBH w zależności od czasu podania substancji ochronnej. Stopień uszkodzenia komórek po uszkodzeniu wywołanym TBH był oceniany po 24 godzinach. Protektanty dodawano do medium hodowlanego z opóźnieniem 30 min, 1 godziny i 1,5 godziny w stosunku do bodźca uszkadzającego. Poszczególne słupki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n=4. Testem Dunneta sprawdzono statystyczną istotność otrzymanych wartości przedstawiających stopień protekcji różnych substancji po uszkodzeniu TBH, za punkt odniesienia uznając umieralność komórek 24 godziny po uszkodzeniu TBH.

W uszkodzeniu wywołanym NMDA wszystkie badane związki wykazały działanie protekcyjne gdy podano je do 30 minut od inicjacji uszkodzenia. W najsilniejszym stopniu działanie ochronne wykazywał Diazepam obniżając procent martwych komórek do 18.5±6.2%. Po upływie 1 godziny od uszkodzenia osiągana protekcja była nieco mniejsza. Diazepam i CsA nadal wykazywały istotne statystycznie zwiększenie przeżywalności komórek w rejonie CA1 obniżając odpowiednio ilość martwych komórek do 27.2±5.8% i 36.5±4.9%, natomiast przy podaniu Minocykliny tej istotności nie stwierdzono (47.2±4.9%).

http://rcin.org.pl

Przy podaniu substancji 1,5 godziny po uszkodzeniu tylko Diazepam nadal wykazywał duży stopień neuroprotekcji (33.9±1.8%), natomiast pozostałe dwie substancje: CsA i Minocyklina, nie wykazywały ochronnego działania (54.9±9% i 61.3±5.9% martwych komórek) (Ryc.25).



Ryc. 25 Ochronny efekt 0,25μM CsA, 30μM Minocykliny i 5μM Diazepamu na przeżycie komórek rejonu CA1 mózgu szczura poddanych działaniu 100μM NMDA w zależności od czasu podania substancji ochronnej. Stopień uszkodzenia komórek po uszkodzeniu wywołanym NMDA był oceniany po 24 godzinach. Substancje ochronne zostały dodane do medium hodowlanego z opóźnieniem 30 min, 1 godzinę i 1,5 godziny w stosunku do bodźca uszkadzającego. Poszczególne słupki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n=4. Testem Dunneta sprawdzono statystyczną istotność otrzymanych wartości przedstawiających stopień protekcji różnych substancji po uszkodzeniu NMDA, za punkt odniesienia uznając umieralność komórek 24 godziny po uszkodzeniu NMDA.

Kolejnym etapem w naszych doświadczeniach było prześledzenie mechanizmów, które mogą odpowiadać za protekcyjne działanie wybranych związków.

http://rcin.org.pl

V.A.8. Zmiana przepuszczalności błony mitochondrialnej dla cytochromu c i aktywacji kaspazy 3 w modelu uszkodzenia neuronów rejonu CA1

Kolejnym etapem naszych doświadczeń było określenie wiodącego mechanizmu, w którym testowane substancje działają neuroprotekcyjnie. Nasze badania miały za zadanie określenie udziału mechanizmu uszczelnienia mitochondriów w szlaku anty-apoptotycznym.

- Stopień wypływu cytochromu c i jego modulacja przez wybrane neuroprotektanty w modelu uszkodzenia neuronów rejonu CA1

W celu ustalenia udziału wybranych związków w zahamowaniu apoptozy poprzez zmniejszenie wypływu cytochromu c, sprawdziliśmy, w jakim stopniu w indukowanych przez nas uszkodzeniach aktywowany jest proapoptotyczny szlak mitochondrialny.

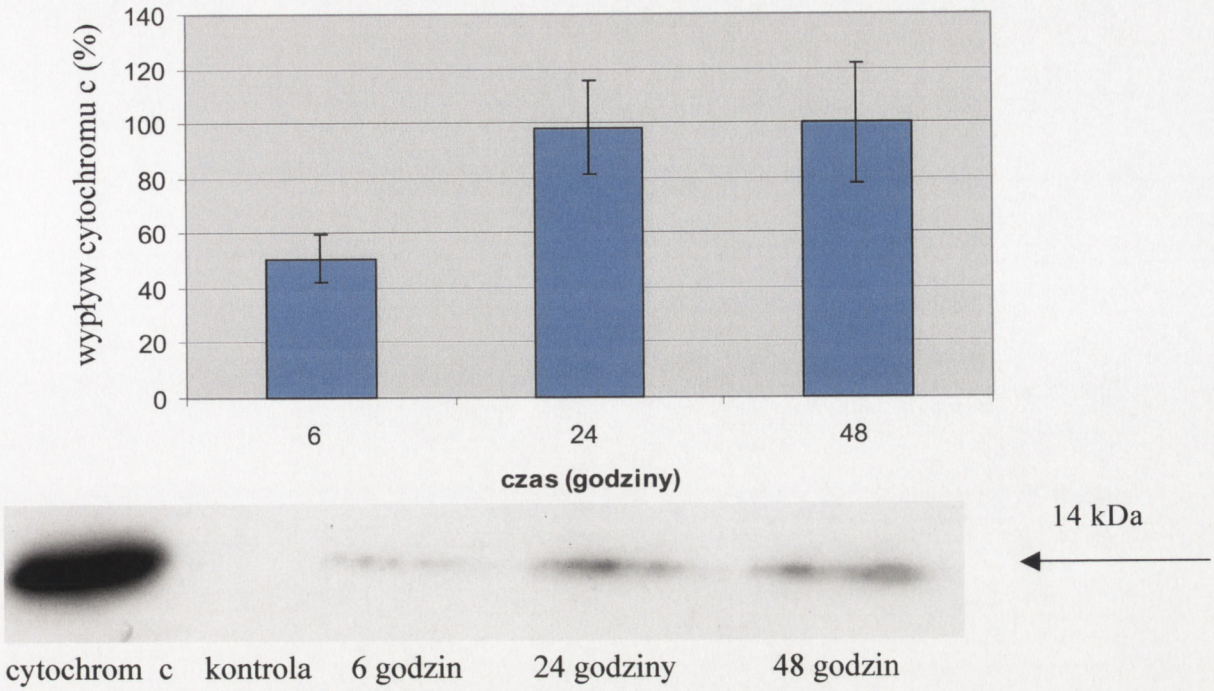
➢ Dynamika wypływu cytochromu c w modelu uszkodzenia TBH

Aby ocenić stopień uszkodzenia mitochondriów po podaniu do medium hodowlanego 30μM TBH, oznaczono poziom cytochromu c w lizatach cytozolowych, otrzymanych według wcześniej opisanej metody (rozdz. IV.A.5), po 6, 24 i 48 godzinach od uszkodzenia (Ryc.26). Poziom cytochromu c we frakcji cytoplazmatycznej zwiekszał się wraz z upływem czasu, od momentu uszkodzenia do 48 godzin. Największą różnicę w wypływie cytochromu c obserwowano pomiędzy 6 a 24 godziną (o 47%). Pomiędzy 24 a 48 godziną różnice były niewielkie (2%).

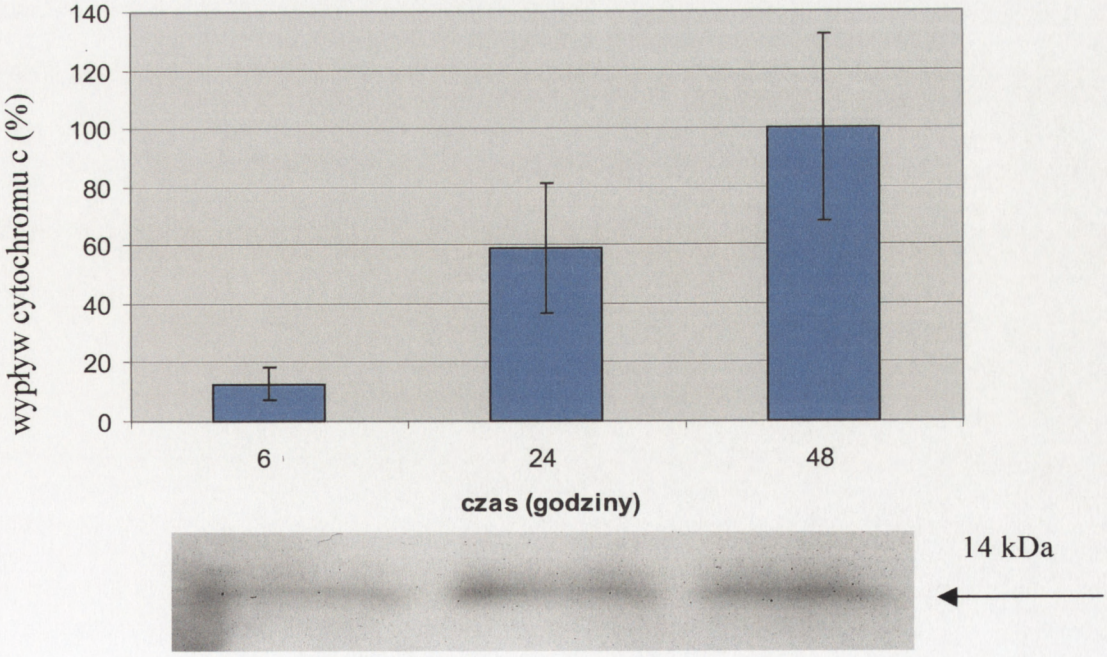
➢ Dynamika wypływu cytochromu c w modelu uszkodzenia NMDA

W celu porównania dynamiki wypływu cytochromu c pod wpływem uszkodzenia tkanki 30μM TBH lub 100μM NMDA, powtórzono badanie ilości cytochromu c we frakcji cytozolowej po podaniu do medium hodowlanego 100μM NMDA, w tych samo, co poprzednio punktach czasowych (Ryc.27). Poziom cytochromu c we frakcji cytoplazmatycznej zwiekszał się wraz z upływem czasu podobnie jak po uszkodzeniu wolnorodnikowym, choć z mniejszą dynamiką. Ilość cytochromu c pomiędzy 6 a 24 godziną wzrosła o 47%. Różnica pomiędzy poziomem cytochromu c po 24 i 48 godzinach była zauważalna (40%) ale nie istotna statystycznie ze względu na duże odchylenie standardowe w obu czasach. Porównując wypływ cytochromu c po uszkodzeniu wywołanym TBH lub NMDA przy tej samej ilości nałożonego białka, można zauważyć dużo słabsze uszkodzenie mitochondriów po uszkodzeniu ekscytotoksycznym, niż w tym samym czasie, po uszkodzeniu wolnorodnikowym.

http://rcin.org.pl



Ryc.26 Ocena metodą Western-blot poziomu cytochromu c we frakcji cytoplazmatycznej po uszkodzeniu HOC 30μM TBH, w zależności od czasu jaki upłynął od uszkodzenia. K- frakcja wyizolowanych mitochondriów, 1- 6 godzin po uszkodzeniu TBH, 2- 24 godziny po uszkodzeniu TBH, 3- 48 godzin po uszkodzeniu TBH. Za 100% przyjęto ilość cytochromu c w cytoplazmie po 48 godzinach.



Ryc. 27 Ocena metodą Western-blot poziomu cytochromu c we frakcji cytoplazmatycznej po uszkodzeniu HOC 100μM NMDA, w zależności od czasu jaki upłynął od uszkodzenia. 1- 6 godzin po uszkodzeniu NMDA, 2- 24 godziny po uszkodzeniu NMDA, 3- 48 godzin po uszkodzeniu NMDA. Za 100% przyjęto ilość cytochromu c w cytoplazmie po 48 godzinach.

http://rcin.org.pl

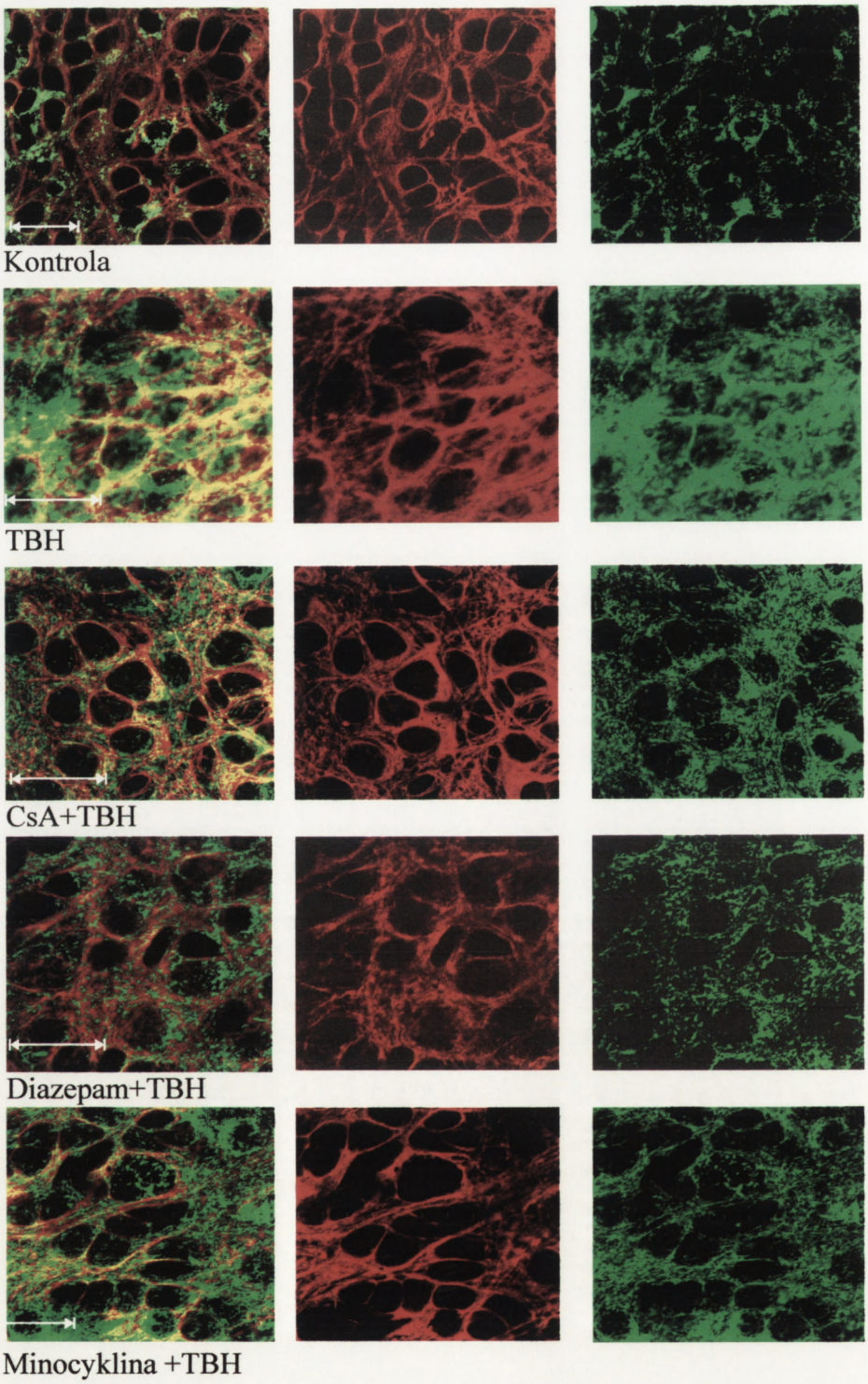
Kolejnym etapem naszych doświadczeń było zbadanie wpływu wybranych substancji protekcyjnych na stopień wypływu cytochromu c indukowanego uszkodzeniem wolnorodnikowym i ekscytotoksycznym.

- Wypływ cytochromu c z mitochondriów po uszkodzeniu wolnorodnikowym i ekscytotoksycznym, oraz po zastosowaniu protekcji ocenianej w HOC *in situ*

Po poddaniu hodowli skrawków hipokampa uszkodzeniu wolnorodnikowemu lub ekscytotoksycznemu i neuroprotekcji z zastosowaniem trzech wcześniej wymienionych substancji, skrawki utrwalono i wykonano barwienie metodą immunocytochemiczną w celu ustalenia lokalizacji cytochromu c (Ryc.28 i 29). W preparatach kontrolnych cytochrom c widoczny był głównie w ziarnistych strukturach na terenie cytoplazmy, odpowiadających wielkością mitochondriom. Zarówno po podaniu do medium hodowlanego TBH jak NMDA obserwowano dyfuzję (rozmycie ziarnistości) cytochromu c do cytoplazmy. Przemieszczenie cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy obserwowano w komórkach o ekspresji β-tubuliny III (Tuj1) co wskazuje na lokalizację neuronalną w rejonie CA1. Po uszkodzeniu wolnorodnikowym i podaniu badanych substancji protekcyjnych można było zaobserwować znaczące zahamowanie wypływu cytochromu c do cytoplazmy komórki. W oparciu o kilkakrotne obserwacje, można stwierdzić, że zahamowanie wypływu cytochromu c jest najsilniejsze po podaniu CsA i Diazepamu, natomiast Minocyklina hamuje ten wypływ w znacznie mniejszym stopniu.

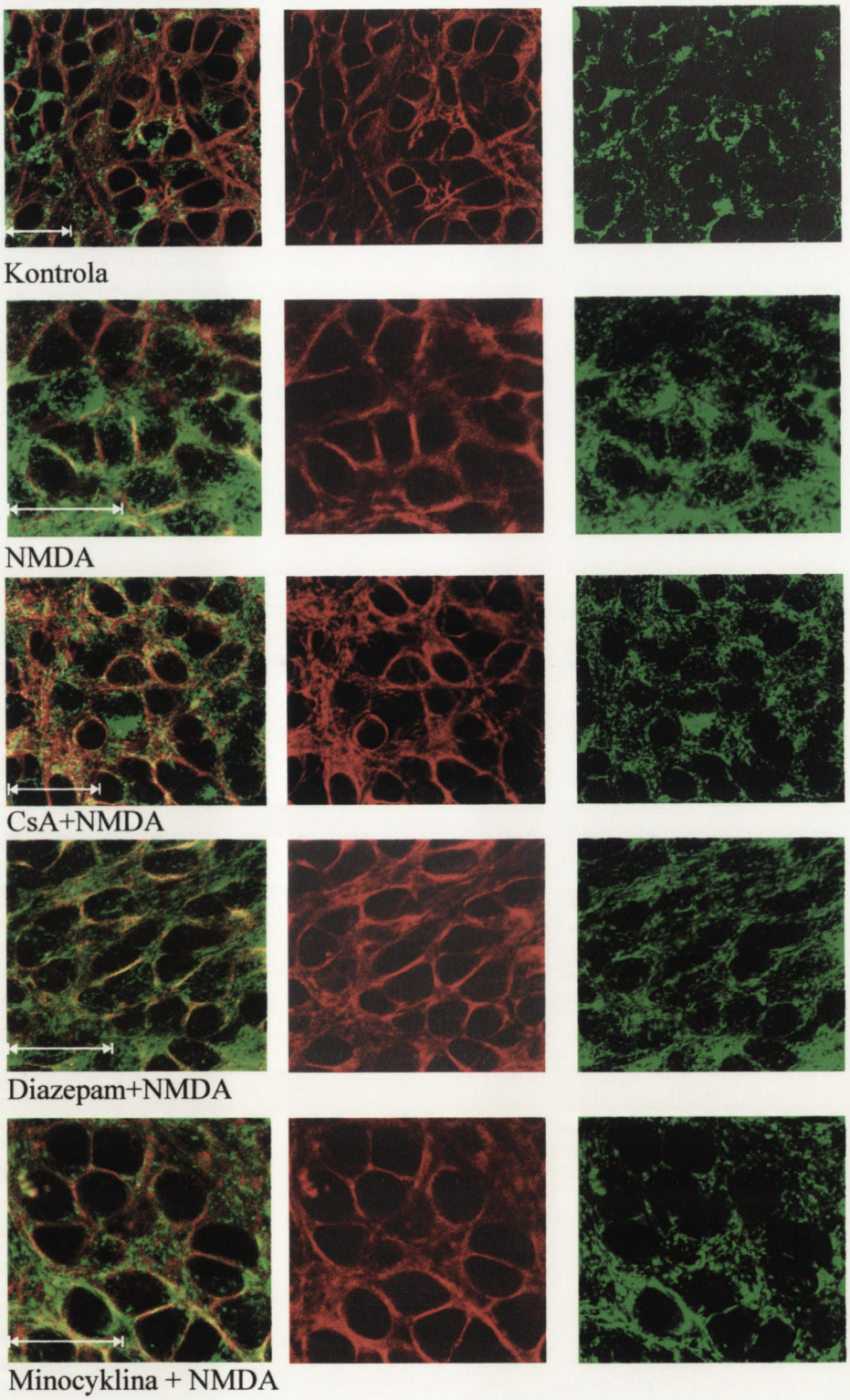
Po uszkodzeniu ekscytotoksycznym wszystkie badane związki wykazały zdolność zahamowania wypływu cytochromu c do cytoplazmy, jednak różnica pomiędzy badanymi związkami w zahamowaniu wypływu cytochromu c oceniana powyższą metodą, nie pozwoliła na gradację efektywności działania poszczególnych związków.

http://rcin.org.pl



Ryc. 28 Wypływ cytochromu c z komórek rejonu CA1 hipokampa poddanych działaniu TBH. CsA, Diazepam a także w dużo mniejszym stopniu Minocyklina hamują wczesny wypływ cytochromu c z neuronów rejonu CA1 hipokampa. W neuronach niczym nie traktowanych, oraz w neuronach traktowanych TBH+CsA/Diazepam/Minocyklina cytochrom c zlokalizowany jest w mitochondriach. W neuronach poddanych tylko uszkodzeniu wolnorodnikowemu widoczna jest dyfuzja cytochromu c do cytoplazmy komórek. Zdjęcia zostały wykonane w mikroskopie konfokalnym, powiekszenie 63x. Neurony zostały wyznakowane przeciwciałem anty-TUJ +TXRD, cytochromu c przeciwciałem anty cytochrom c+FITC. Scala wynosi 20μm.

http://rcin.org.pl



Ryc. 29 Wypływ cytochromu c z komórek rejonu CA1 hipokampa poddanych działaniu NMDA. CsA, Diazepam a także Minocyklina hamują wczesny wypływ cytochromu c z neuronów rejonu CA1 hipokampa. W neuronach niczym nie traktowanych, oraz w neuronach traktowanych NMDA+CsA/Diazepam/Minocyklina cytochrom c zlokalizowany jest w mitochondriach. W neuronach poddanych tylko uszkodzeniu glutamatergicznemu widoczna jest dyfuzja cytochromu c do cytoplazmy komórek. Zdjęcia wykonane zostaływ mikroskopie konfokalnym, powiekszenie 63x. Neurony zostały wyznakowane przeciwciałem anty-TUJ +TXRD, cytochromu c przeciwciałem anty cytochrom c+FITC. Scala wynosi 20μm.

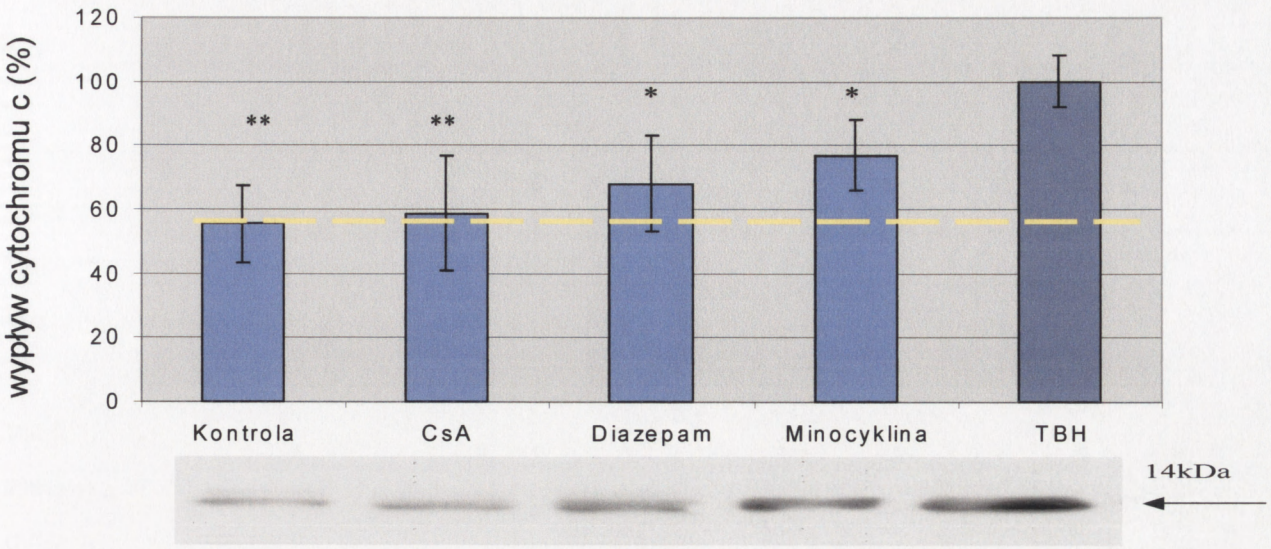
http://rcin.org.pl

- Wypływ cytochromu c z mitochondriów po uszkodzeniu wolnorodnikowym lub ekscytotoksycznym i zastosowaniu protekcji oceniany metodą immunoblotingu

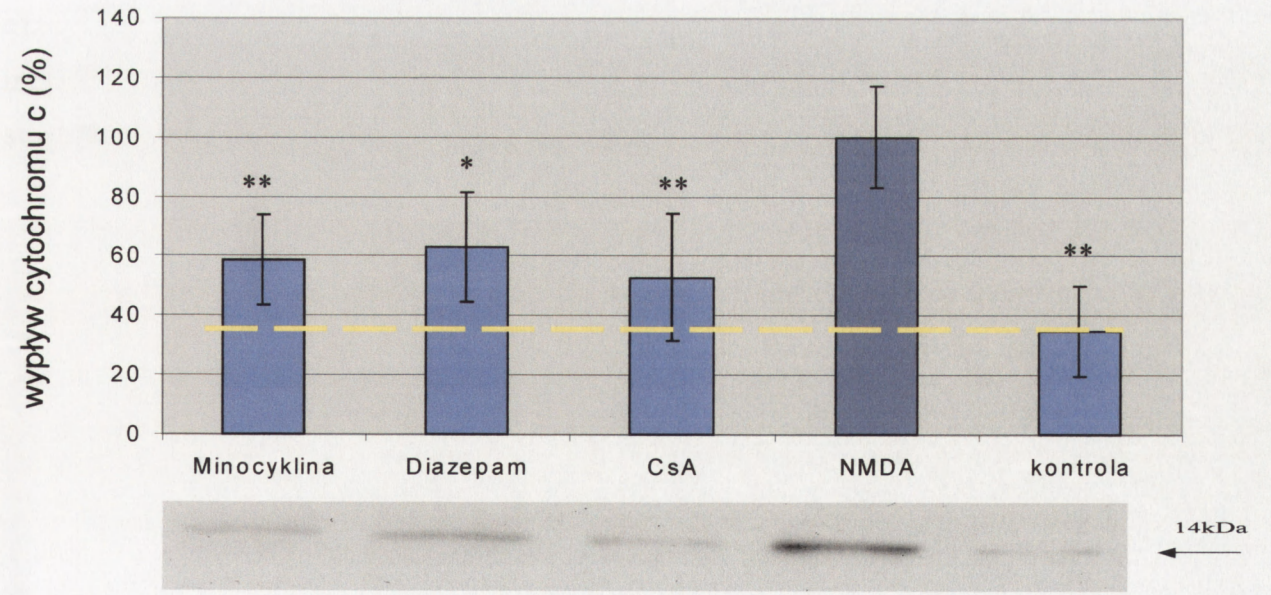
W celu potwierdzenia uzyskanych wyników, wypływ cytochromu c po uszkodzeniu i stosowanej protekcji oceniano również metodą Western blot. Poziom cytochromu c we frakcji cytoplazmatycznej badany w hodowli organotypowej poddanej uszkodzeniu wolnorodnikowemu wzrastał mniej wyraźnie w stosunku do kontroli niż w przypadku uszkodzenia ekscytotoksycznego. Przyjmując ilość cytochromu c w cytoplazmie po uszkodzeniu wolnorodnikowym za 100%, kontrola wykazała 55.4% tej wartości. CsA, Diazepam i Minocyklina zahamowały wypływ cytochromu c do cytoplazmy odpowiednio do 58.6±18%, 67.9±15% i 76.86±11%. Przy każdym ze stosowanych związków było to zahamowanie statystycznie znamienne (Ryc.30).

Uszkodzenie ekscytotoksyczne spowodowało trzykrotny wzrost poziomu cytochromu c w stosunku do kontroli. Przyjmując jak poprzednio ilość cytochromu c w cytoplazmie po uszkodzeniu ekscytotoksycznym za 100%, CsA, Diazepam i Minocyklina zahamowały ten wypływ odpowiednio do 52.3±21%, 63.2±18% i 58.7±15%. Przy każdym ze stosowanych związków było to zahamowanie statystycznie znamienne (Ryc.31).

http://rcin.org.pl



Ryc. 30 Ocena metodą Western-blot poziomu cytochromu c we frakcji cytoplazmatycznej 24 godziny po uszkodzeniu HOC 30μM TBH - wpływ neuroprotektantów w stężeniach CsA 0,25μM, Minocyklina 30μM i Diazepam 5μM . 1-kontrola, 2-CsA+ TBH 3-Diazepam+TBH, 4-Minocyklina+TBH, 5-TBH. 14kDa cytochrom c. Poszczególne słupki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n=3. Testem Dunneta sprawdzono statystyczną istotność różnic pomiędzy ilością cytoplazmatycznego cytochromu c w badanych układach doświadczalnych po uszkodzeniu TBH.



Ryc. 31 Ocena metodą Western-blot poziomu cytochromu c we frakcji cytoplazmatycznej 24 godziny po uszkodzeniu HOC 100μM NMDA - wpływ neuroprotektantów w stężeniach CsA 0,25μM, Minocyklina 30μM i Diazepam 5μM. 1- Minocyklina+NMDA, 2- Diazepam+NMDA, 3 CsA+ NMDA, 4- NMDA, 5- kontrola . 14kDa cytochrom c. Poszczególne słupki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n=3. Testem Dunneta sprawdzono statystyczną istotność różnic pomiędzy ilością cytoplazmatycznego cytochromu c w badanych układach doświadczalnych po uszkodzeniu

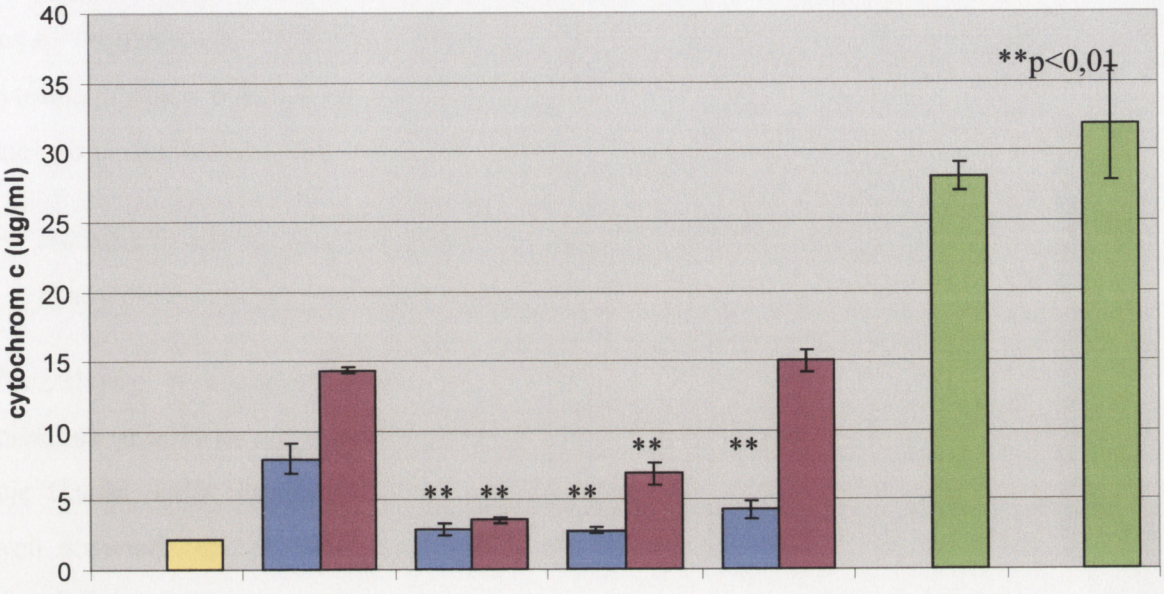
http://rcin.org.pl

- Badanie metodą ELISA wypływu cytochromu c z mitochondriów po uszkodzeniu wolnorodnikowym lub ekscytotoksycznym oraz zastosowaniu protekcji

Ponieważ stosowane powyżej metody miały charakter jakościowy, lub półilościowy, w celu dokładnego pomiaru wypływu cytochromu c zastosowano metodę ELISA. Oznaczono ilościowo cytochrom c we frakcji cytoplazmatycznej ze skrawków po uszkodzeniu wolnorodnikowym lub ekscytotoksycznym i neuroprotekcji (Ryc.32).

W grupie kontrolnej - hodowli skrawków hipokampa nie poddanej działaniu czynnika uszkadzającego, wypływ cytochromu c był spowodowany uszkodzeniem mechanicznym związanym z procedurą przygotowania homogenatu. Wykazano, że TBH indukuje wypływ cytochromu c w sposób istotny i odpowiadający 51.2% ilości mitochondrialnego cytochromu c. NMDA indukuje wypływ cytochromu c w znacznie słabszym stopniu (28.45% mitochondrialnego cytochromu c). Po uszkodzeniu wolnorodnikowym najsilniejsze zahamowanie wypływu cytochromu c wykazano po zastosowaniu CsA i Diazepamu odpowiednio do poziomu 12.24% i 24.48% mitochondrialnego cytochromu c. Minocyklina nie wykazała w badaniu ilościowym hamującego działania na wypływ cytochromu c, który we frakcji rozpuszczalnej stanowił aż 53% cytochromu c mitochondrialnego. Po uszkodzeniu ekscytotoksycznym wszystkie trzy związki zmniejszyły wypływ cytochromu c z mitochondriów: CsA – do poziomu 10.29%, Diazepam – 9.88% i Minocyklina 15.32%, w stosunku do cytochromu c uzyskanego po lizie mitochondriów.

http://rcin.org.pl



TBH	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
NMDA	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
CsA	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Diazepam	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Minocyklina	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Cyt. całkowity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Cyt. Mit.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Ryc.32 Ocena ilości cytochromu c we frakcji cytoplazmatycznej metodą ELISA, po zadziałaniu na hodowlę 30μM TBH lub 100μM NMDA i substancji ochronnych: 0,25μM CsA, 30μM Minocykliny lub 5μM Diazepamu. Poziom cytochromu c we frakcji rozpuszczalnej oznaczany był 24 godziny po zadziałaniu czynnika uszkadzającego i substancji testowanych. Poszczególne słupki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n=3. Testem Dunneta sprawdzono statystyczną istotność różnic pomiędzy badanymi układami doświadczalnymi, a ilością rozpuszczonego cytochromu c po uszkodzeniu odpowiednio TBH lub NMDA.

http://rcin.org.pl

- Stopień aktywacji kaspazy 3 i jego modulacja przez wybrane neuroprotektanty w modelu uszkodzenia neuronów rejonu CA1

Kolejnym etapem potwierdzającym bardzo ważną rolę szlaku mitochondrialnego w procesie opóźnionej śmierci komórek w uszkodzeniu wolnorodnikowym lub ekscytotoksycznym była ocena aktywacji kaspazy 3, zarówno po indukcji uszkodzenia, jak również po podaniu badanych związków wraz z zainicjowanym uszkodzeniem.

- Badanie *in situ* aktywacji kaspazy 3 po uszkodzeniu wolnorodnikowym i ekscytotoksycznym i zastosowaniu protekcji

Poczatkowo wykonaliśmy barwienie metodą immunohistochemiczną z zastosowaniem przeciwciała przeciwko aktywnej formie kaspazy 3. Przedstawiony panel reprezentuje typową reakcję tkanki, która pozwoliła nam na ocenę aktywności kaspazy 3 po zastosowaniu w naszych doświadczeniach wszystkich substancji neuroprotekcyjnych (Ryc.33 i 34) i wybór trzech naisilniej działających związków.

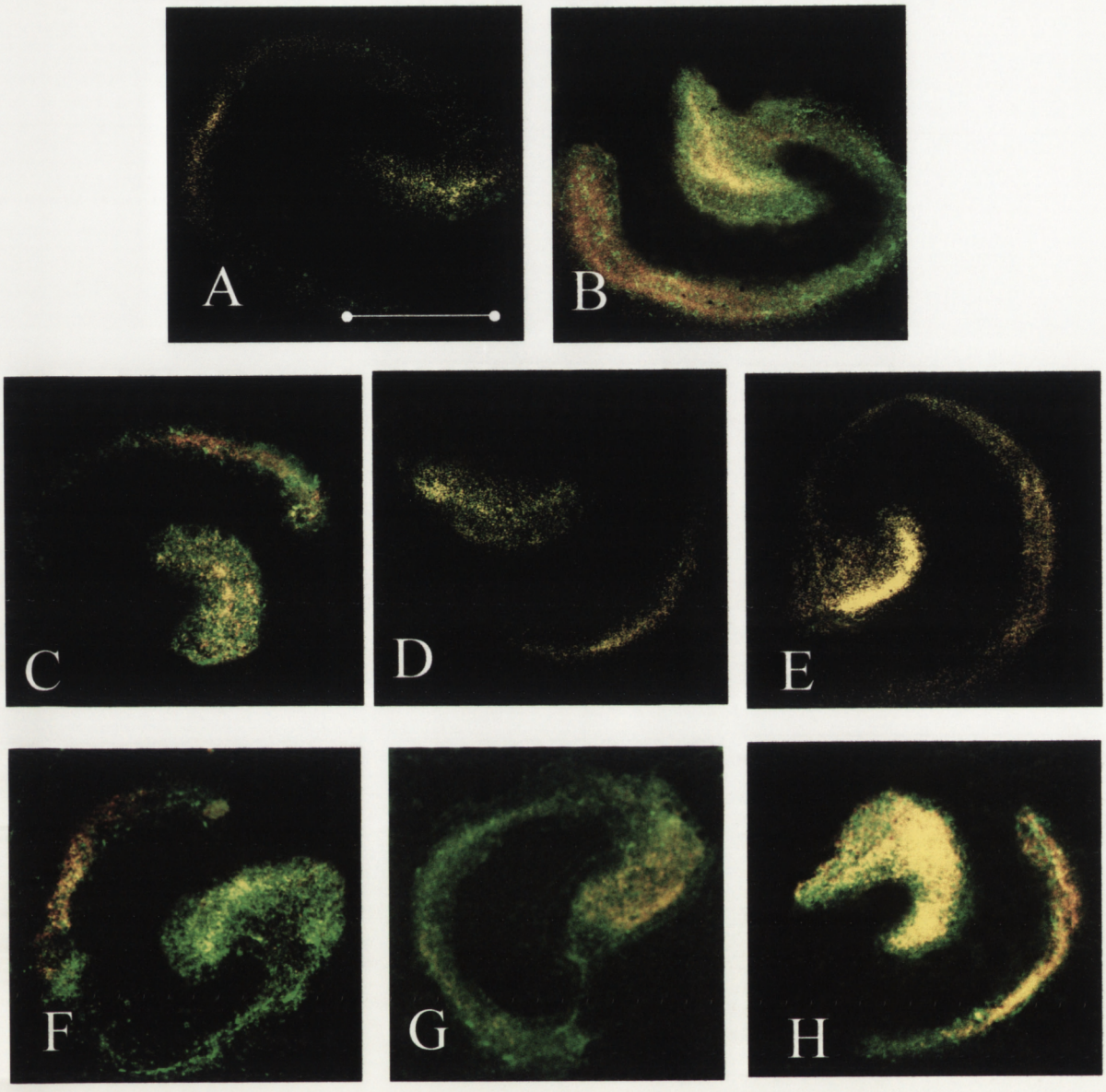
	----	CsA	Diazepam	Minocyklina
+TBH	+++	+	+	++
+NMDA	+++	+	++	+

(+) - słaba aktywacja kaspazy 3, (+++) - bardzo silna aktywacja kaspazy 3

W obu typach uszkodzenia indukowana była aktywna forma kaspazy 3 w rejonie CA1. Zastosowanie w hodowli skrawków hipokampa trzech badanych związków protekcyjnych hamowało w sposób istotny tę związaną z rejonem CA1 aktywację kaspazy 3. Po uszkodzeniu wolnorodnikowym najsilniejsze właściwości hamujące wykazywał Diazepam, natomiast po uszkodzeniu ekscytotoksycznym Minocyklina.

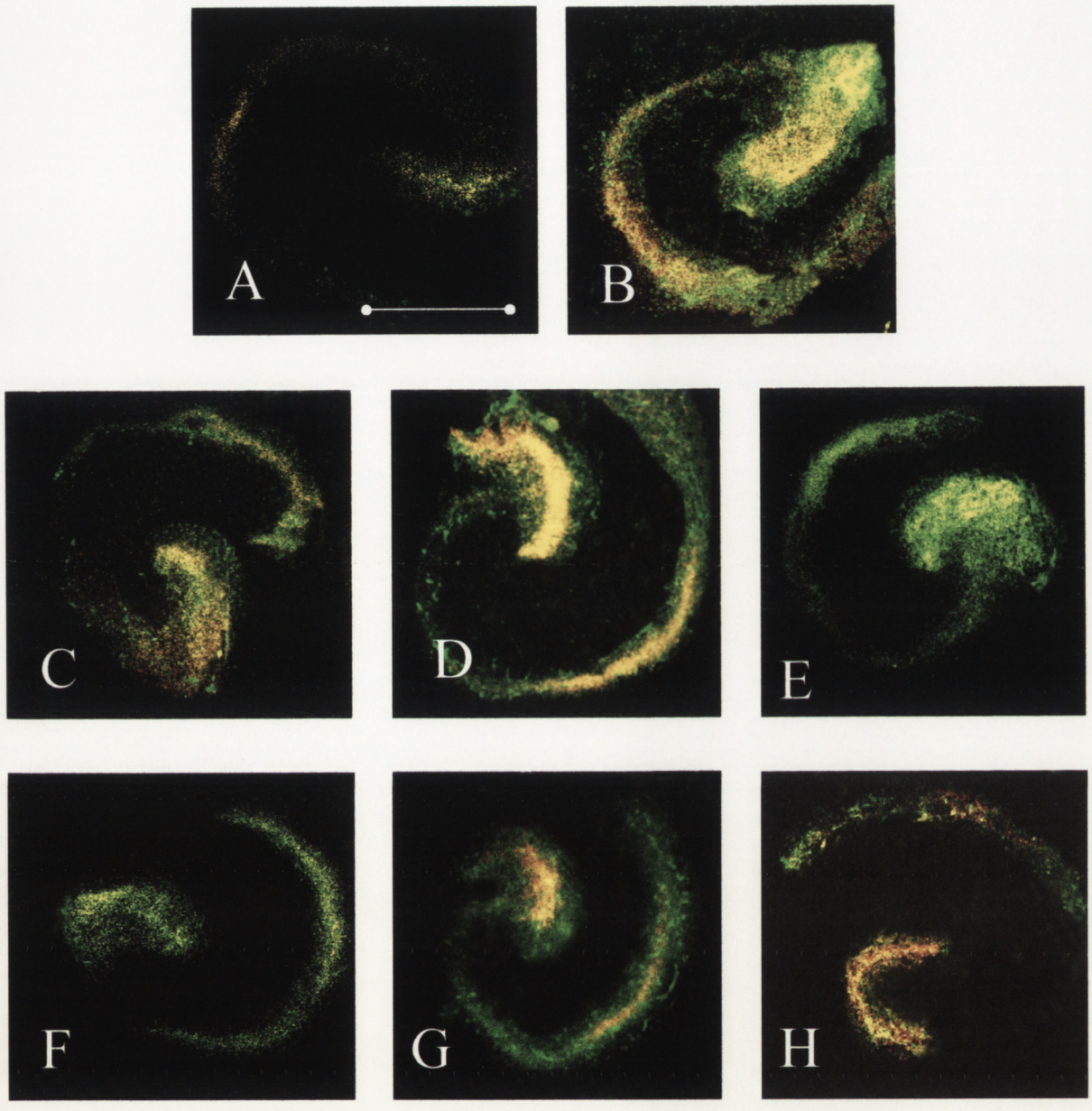
Nasza ocena dotyczyła rejonu CA1 w HOC. Natomiast w obu modelach uszkodzenia (TBH/NMDA) największy stopień aktywacji wystapił w rejonie DG, który wykazywał również mniejszą wrażliwość na stosowane substancje neuroprotekcyjne.

http://rcin.org.pl



Rys.33 Aktywacja kaspazy 3 w komórkach rejonu CA1 hipokampa poddanych działaniu TBH. Zdjęcia wykonane zostały pod mikroskopem konfokalnym. Jądra martwych komórek zostały wyznakowane IP, a aktywna forma kaspazy 3 przeciwciałem anty-caspase 3 związanym z FITC. Scala 1mm. A-kontrola, B-TBH, C-CsA+TBH, D-FK506+TBH, E-Diazepam+TBH, F-Minocyklina+TBH, G-IGF+TBH, H-MK801+TBH

http://rcin.org.pl



Ryc.34 Aktywacja kaspazy 3 w komórkach rejonu CA1 hipokampa poddanych działaniu NMDA. Zdjęcia wykonane pod mikroskopem konfokalnym. Jądra martwych komórek zostały wyznakowane IP, a aktywna forma kaspazy 3 przeciwciałem anty-caspase 3 związanym z FITC. Scala 1mm. A-kontrola, B-NMDA, C-CsA+NMDA, D-FK506+NMDA, E-Diazepam+NMDA, F-Minocyklina+NMDA, G-IGF+NMDA, H-MK801+NMDA

http://rcin.org.pl

➢ Oznaczenie aktywności kaspazy 3 metodą ELISA

W celu obiektywizacji naszych obserwacji dotyczących aktywności kaspazy 3 po uszkodzeniu wolnorodnikowym lub glutamatergicznym z zastosowaniem protekcji farmakologicznej, wykonano oznaczenia półilościowe metodą fluorymetryczną ELISA.

Z otrzymanych danych wynika, że najsilniej aktywację kaspazy 3 po uszkodzeniu wolnorodnikowym zahamowały: Minocyklina – w 53±3.4% i CsA – w 45±22.8%, natomiast Diazepam, zahamował aktywację kaspazy 3 w sposób niewielki, jednakże nadal istotny statystycznie – w 28±9.3% (Ryc.35A).

Po uszkodzeniu ekscytotoksycznym stopień zahamowania aktywacji kaspazy 3 przez poszczególne testowane substancje różnił się od wyników uzyskanych po uszkodzeniu wolnorodnikowym. Najmocniej aktywację kaspazy 3 hamowały: CsA – w 51±7% i Diazepam – w 45±38.8%. W przypadku Minocykliny zahamowanie to nie było istotne statystycznie i wynosiło 17±6% (Ryc.36A).

Powyższe obserwacje poczyniono na podstawie doświadczeń przeprowadzonych na homogenatach z całych skrawków HOC. Otrzymane tą metodą wyniki nie obrazują zmian zachodzących w poszczególnych rejonach hipokampa.

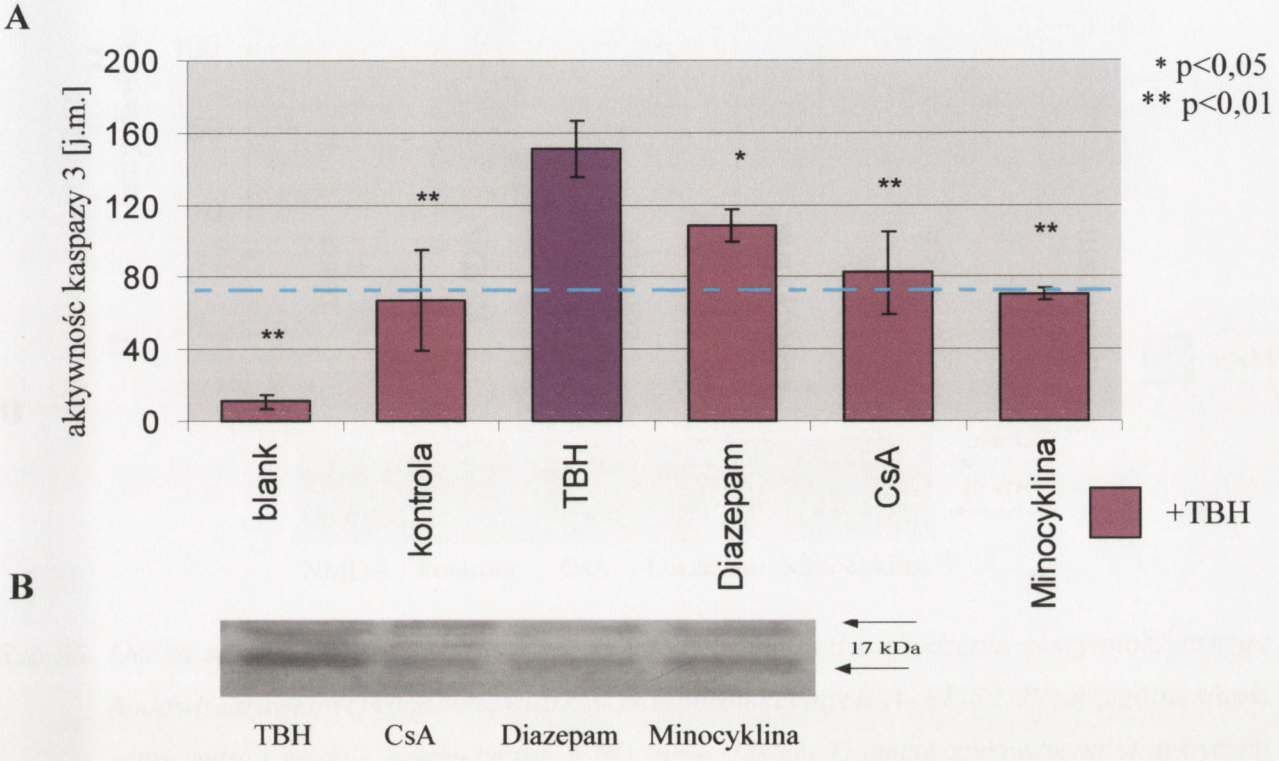
➢ Ocena stopnia aktywacji kaspazy 3 metodą immunoblotingu

W celu dodatkowego potwierdzenia otrzymanych wyników wykonano również badanie całych skrawków metodą Western blot. Otrzymano potwierdzenie wcześniej uzyskanych wyników (Ryc.35A/36A). Poziom aktywnej formy kaspazy 3 w homogenacie otrzymanym z hodowli poddanej uszkodzeniu wolnorodnikowemu oraz neuroprotekcji z zastosowaniem CsA, Minocykliny lub Diazepamu był niższy w porównaniu z poziomem kaspazy po zastosowaniu w hodowli skrawków hipokampa tylko TBH. Przyjmując ilość aktywnej formy kaspazy 3 w homogenacie po uszkodzeniu TBH za 100%, CsA, Diazepam i Minocyklina zahamowały wypływ cytochromu c do cytoplazmy odpowiednio do 53.4±16%, 77.4±10% i 72.2±11%. W przypadku każdego ze stosowanych związków było to zahamowanie istotne statystycznie (Ryc.35B).

Poziom prokaspazy 3 w homogenacie otrzymanym z hodowli poddanej uszkodzeniu ekscytotoksycznemu po podaniu NMDA i neuroprotekcji z zastosowaniem CsA, Minocykliny lub Diazepamu był jednakowy we wszystkich próbkach. Różnice widoczne były w poziomie aktywnej formy kaspazy 3. Przyjmując ilość aktywnej formy kaspazy 3 w homogenacie po

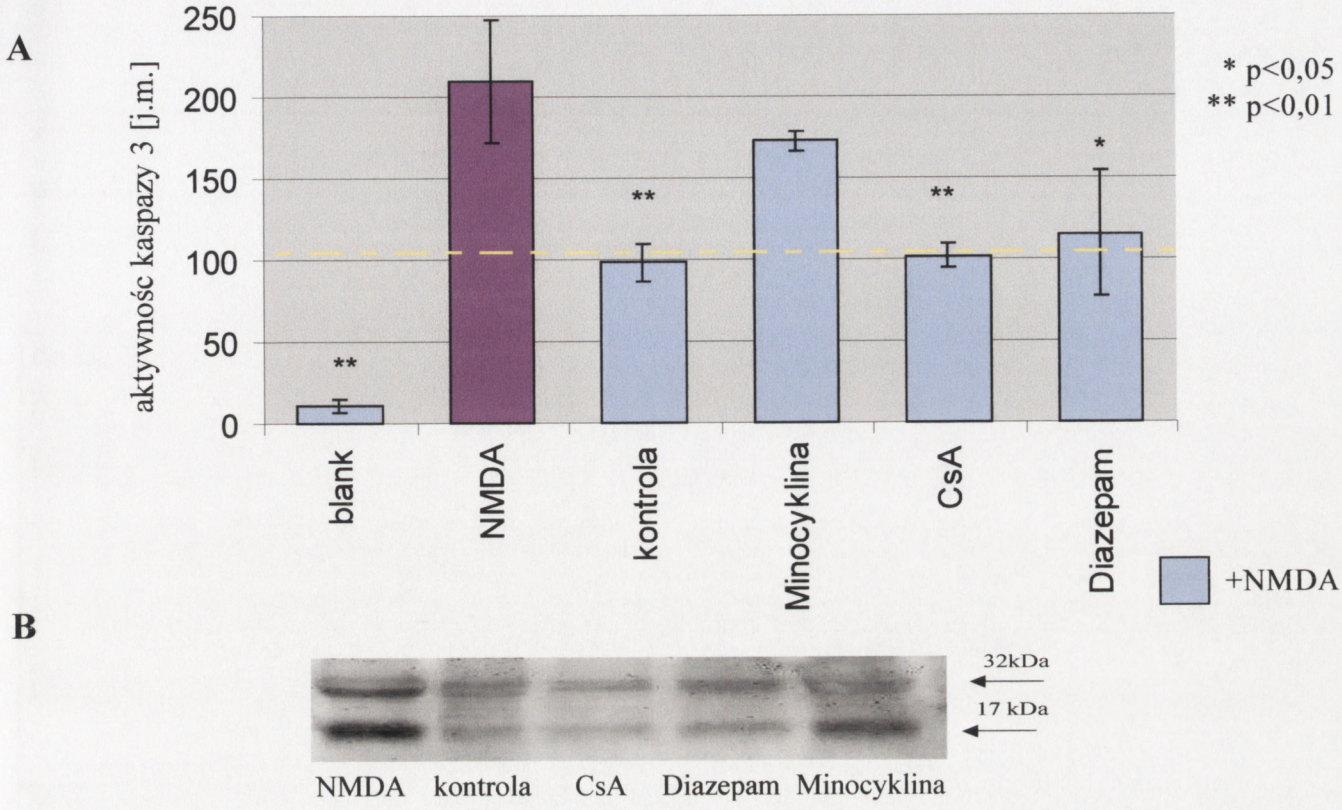
http://rcin.org.pl

uszkodzeniu wolnorodnikowym za 100%, CsA, Diazepam i Minocyklina zahamowały wypływ cytochromu c do cytoplazmy odpowiednio do 67.9±14%, 70.7±15% i 73.9±18%. Tylko w przypadku CsA i Diazepamu było to zahamowanie istotne statystycznie (Ryc.36B).



Ryc.35 Ocena stopnia aktywacji kaspazy 3 po 24 godzinach od uszkodzenia wolnorodnikowego (30μM TBH) i po podaniu związków neuroprotekcyjnych. ***A*** *- ELISA- Poszczególne słupki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n=4. Testem Dunneta sprawdzono statystyczną istotność pomiędzy badanymi układami doświadczalnymi, za punkt odniesienia uznając aktywność kaspazy 3 po uszkodzeniu hodowli skrawkowej 30μM TBH.* ***B*** *- Western blot 1- 30μM TBH 2- kontrola, 3 0,25μM CsA+ TBH, 4- 5μM Diazepam+TBH, 5- 30μM Minocyklina+TBH. 32kDa-prokaspaza 3, 17kDa-aktywna forma kaspazy 3. Poszczególne słupki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n=3. Testem Dunneta sprawdzono statystyczną istotność różnic pomiędzy ilością aktywnej formy kaspazy 3 w badanych układach doświadczalnych po uszkodzeniu TBH.*

http://rcin.org.pl



Ryc. 36 Ocena stopnia aktywacji kaspazy 3 po 24 godzinach od uszkodzenia ekscytotoksycznego hodowli skrawkowej i podaniuzwiązków neuroprotekcyjnych. ***A-*** *ELISA. Poszczególne słupki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n=4. Testem Dunneta sprawdzono statystyczną istotność pomiędzy badanymi układami doświadczalnymi, za punkt odniesienia uznając aktywność kaspazy 3 po uszkodzeniu hodowli skrawkowej 100μM NMDA.* ***B-****Western blot. 1- 100μM NMDA, 2- 30μM Minocyklina+NMDA, 3 0,25μM CsA+ NMDA, 4- 5μM Diazepam+NMDA . 32kDa-prokaspaza 3, 17kDa-aktywna forma kaspazy 3. Poszczególne słupki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n=3. Testem Dunneta sprawdzono statystyczną istotność różnic pomiędzy ilością aktywnej formy kaspazy 3 w badanych układach doświadczalnych po uszkodzeniu NMDA.*

V.B. BADANIA PRZEPROWADZONE NA ZWIERZĘTACH *IN VIVO*

W związku z osiągniętymi rezultatami w badaniach *in vitro* postanowiliśmy przetestować wybrane substancje o najsilniejszym potencjale neuroprotekcyjnym *in vivo* w modelu ischemii przodomózgowia u gerbila.

http://rcin.org.pl

V.B.1. Neuroprotekcyjne działanie CsA, FK506, Diazepamu i Minocykliny oraz morfometryczna ocena neuronów rejonu CA1 hipokampa

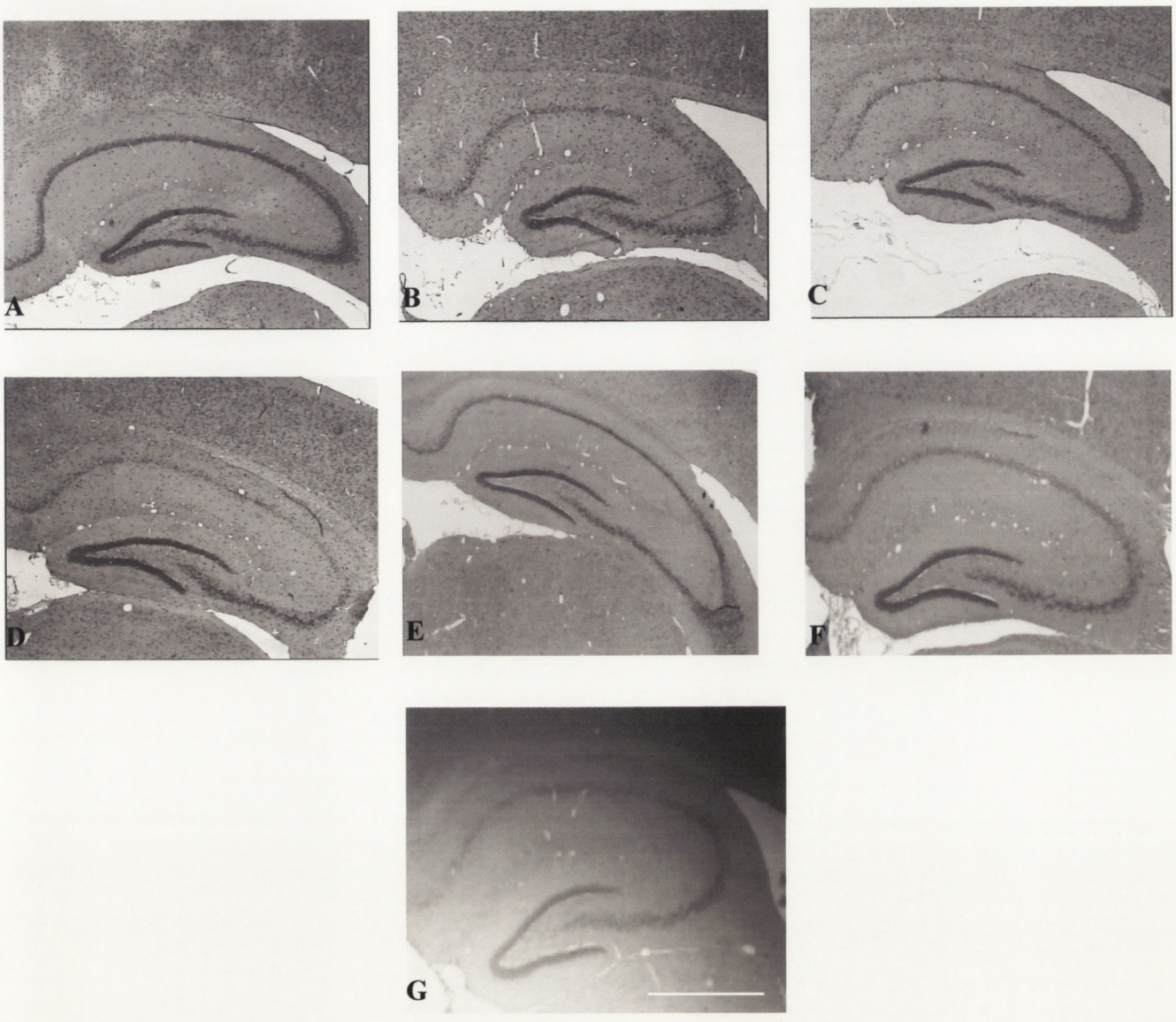
Zwierzęta poddano 5 min. ischemii poprzez obustronne zamknięcie tętnic szyjnych wspólnych. Kierując się wynikami dotyczącymi "okna terapeutycznego", które dla poszczególnych substancji wyznaczono w uprzednich badaniach *in vitro*, testowane związki były podawane przed ischemią, podczas lub po ischemii.

badany związek	czas podania leku	ilość dawek	dawka dobowa	sposób podania
CsA	zaraz po ischemii	jednorazowo	5mg/kg	i.a.
FK506	2 godziny przed ischemią lub 3 godziny po ischemii	jednorazowo	2mg/kg	i.p.
Diazepam	30 min. i 90 min. po ischemii	jednorazowo	10mg/kg	i.p.
Minocyklina	30 min. przed ischemią i 90 min. po ischemii	przez kolejne 3 dni	45mg/kg	i.p.

Po 7 dniach od ischemii zwierzęta perfundowano, wyizolowano mózgi i wykonano preparaty parafinowe w przekroju czołowym (Ryc.37).

Oceniając strukturę rejonu CA1 hipokampa 7 dni po ischemii można stwierdzić, że zarówno w przypadku CsA jak i Diazepamu rejon CA1 jest zwarty, nieco zcieńczony, lecz zachowany. W przypadku podania zwierzętom przed ischemią i po ischemii Minocykliny, struktura rejonu CA1 hipokampa jest wyraźniejsza niż po ischemii, jednakże obraz morfologiczny neuronów otrzmany w powiększeniu (20x) przemawia za uszkodzeniem wiekszości komórek. Po podaniu FK506 2 godziny przed ischemią rejon CA1 sprawiał wrażenie dość dobrze chronionego, choć bardzo zcieńczonego. Po podaniu tego związku 3 godziny po ischemii, nie można było zauważyć żadnej ochrony, a rejon CA1 wyglądał identycznie jak po samej ischemii.

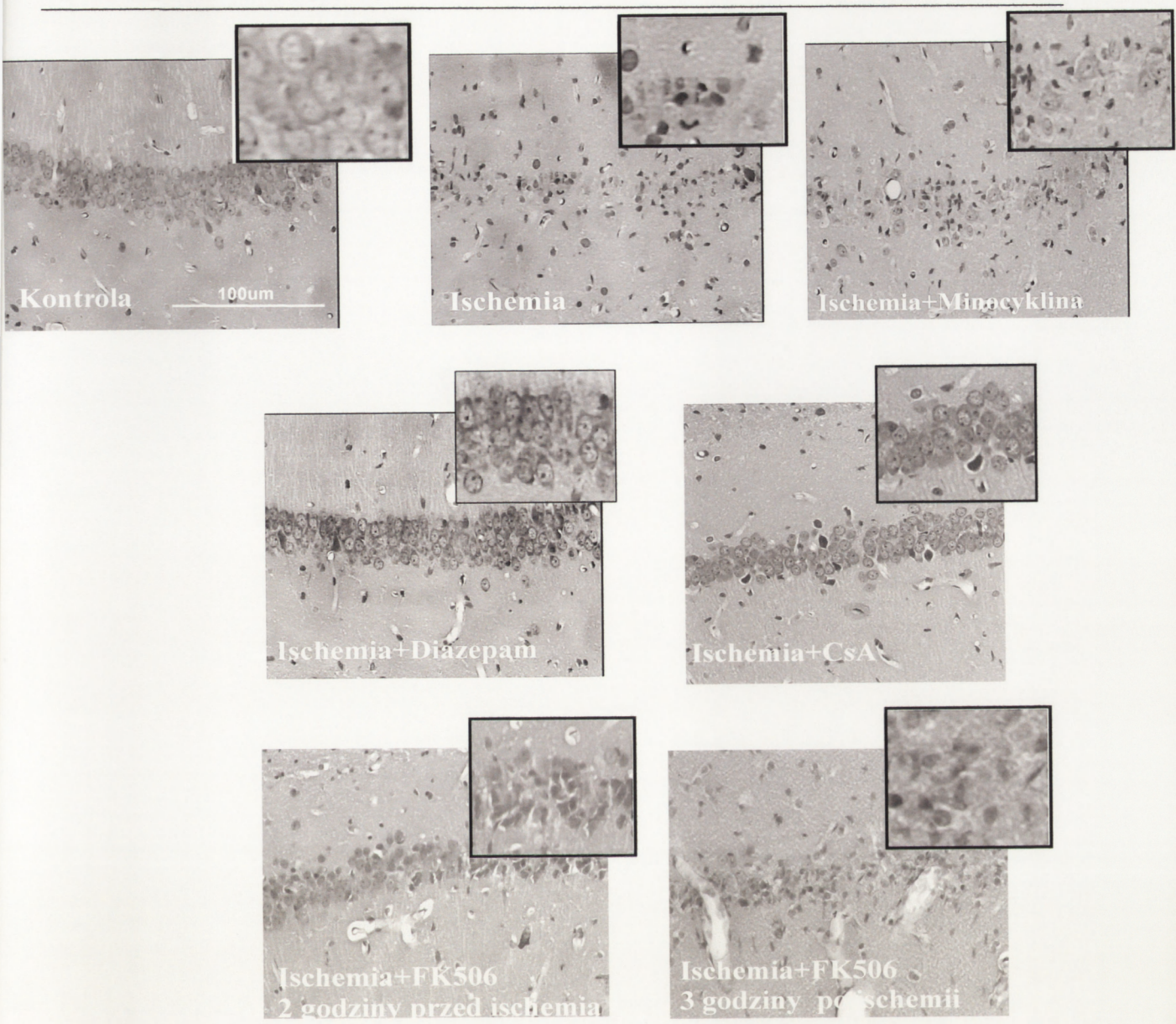
http://rcin.org.pl



Ryc.37 Struktura anatomiczna hipokampa u gerbila po przejściowej 5' ischemii i podaniu substancji ochronnych. Po 7 dniach od ischemii wykonano perfuzję zwierząt. Po izolacji mózgów i wykonaniu 10um preparatów parafinowych w przekroju czołowym, zabarwiono je hematoksyliną-eozyną w celu uwidocznienia struktury hipokampa. Zdjęcia wykonane zostały pod mikroskopem świetlnym. Scala 0,6um. A-kontrola, B-ischemia, C-Diazepam+ischemia, D-Minocyklina+ischemia, E-CsA+ischemia, F-FK506 podany 2 godziny przed ischemią, G-FK506 podany 3 godziny po ischemii.

W celu dokonania morfometrycznej oceny liczby przetrwałych w rejonie CA1 hipokampa neuronów, wykonano zdjęcia preparatów pod powiększeniem 20x i 40x (zdjęcie w rogu) (Ryc.38).

http://rcin.org.pl

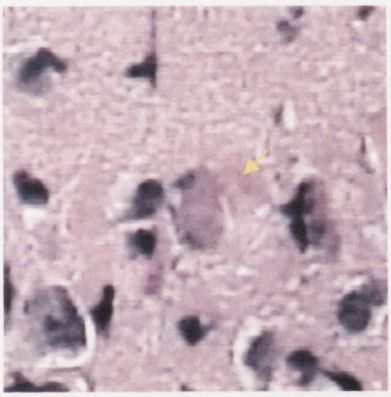


Ryc.38 Struktura anatomiczna rejonu CA1 hipokampa u gerbila 7 dni po ischemii po podaniu substancji ochronnych. Preparaty parafinowe o grubości 10μm wybarwione hematoksyliną i eozyną. Zdjęcia wykonano pod mikroskopem świetlnym, powiększenie 20x i 40x (w ramce).

Przy większym powiększeniu (20x i 40x), u zwierząt kontrolnych, które nie przebyły uszkodzenia ischemicznego, można było zaobserwować zwartą strukturę rejonu CA1, zachowany kontakt pomiędzy komórkami, ułożenie równolegle neuronów, ich regularne kształty, i centralnie położone jądra. Obraz uzyskany po ischemii przedstawiał chaotycznie rozmieszczone komórki, pozbawione kontaktu miedzy sobą, o bardzo ciemnych jądrach i obkurczonej cytoplazmie. W preparatach uzyskanych z mózgów zwierząt po podaniu CsA lub Diazepamu, większość neuronów w rejonie CA1 hipokampa tworzyła ścisłą strukturę, a ich budowa morfologiczna była prawidłowa, zbliżona do kontrolnej. W obrazie uzyskanym z mózgów zwierząt, którym podano FK506 dwie godziny przed ischemią, pomimo dość

http://rcin.org.pl

wyraźnie zachowanej struktury rejonu CA1, można było zobaczyć głównie neurony, które utraciły kontakt między sobą, o ciemno wybarwionych, uszkodzonych jądrach. Obraz rejonu CA1 uzyskany z mózgów zwierząt po ischemii i podaniu FK506 3 godziny po ischemii przypominał obraz struktury hipokampa po ischemii, z chaotycznie rozmieszczonymi, uszkodzonymi neuronami. Ciekawy obraz przedstawiały preparaty z hipokampów zwierząt traktowanych Minocykliną. Struktura rejonu CA1 nie była zwarta, ale jej zarys był wyraźniejszy niż w obrazie rejonu CA1 po ischemii. Obok nielicznych neuronów o prawidłowej budowie morfologicznej, pojawiły się neurony o jaśniejszej cytoplazmie, jądrze zachowanym, lecz o rozmytym zarysie, przesuniętym na skraj komórki, jednakże nieprzypominające komórek obumierających, a raczej zbliżone cechami morfologicznymi do komórek przechodzących chromatolizę.

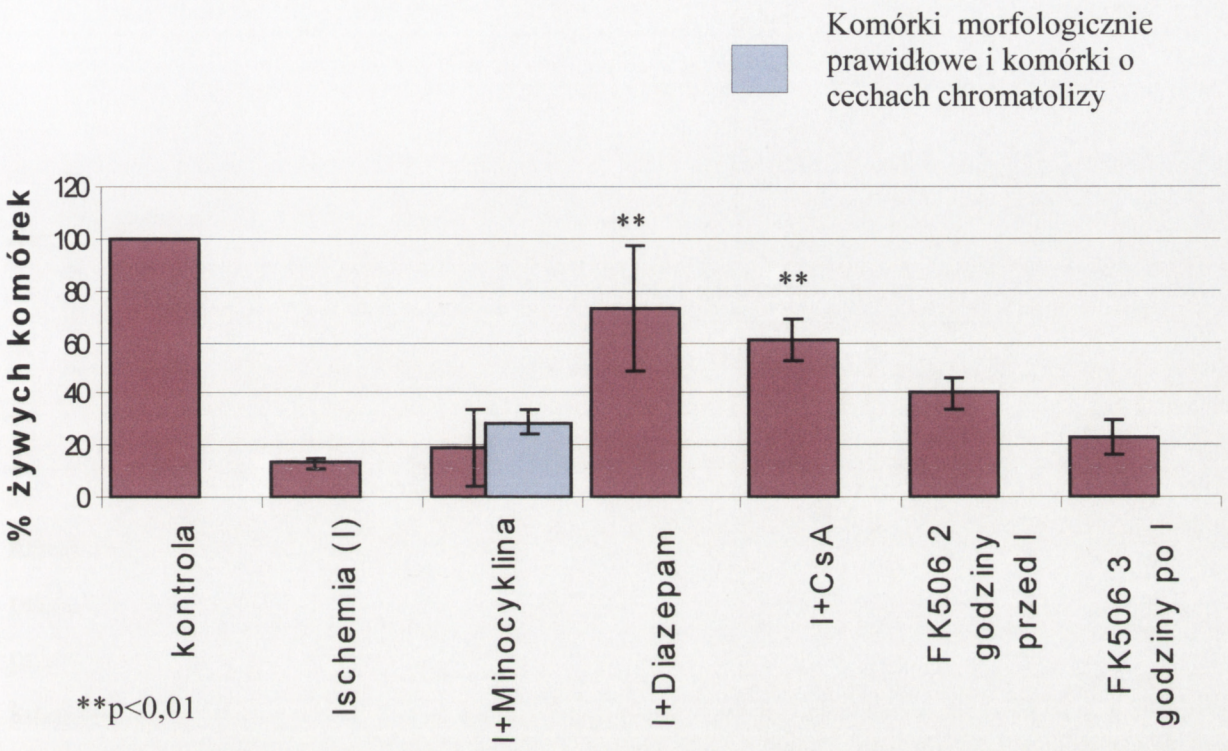


Ryc.39 Struktura komórek rejonu CA1 hipokampa u gerbila po ischemii i podaniu Minocykliny. Preparat barwiony hematoksyliną-eozyną. Na zdjęciu widoczny jest fragment rejonu CA1. W polu widzenia komórki o jaśniejszej cytoplazmie i rozmytym, zsuniętym na obwód jądrze (strzałka).

Po zliczeniu przetrwałych po 7 dniach od ischemii, neuronów o prawidłowej budowie morfologicznej, uzyskano następujące wyniki. Po ischemii w rejonie CA1 przeżyło 12.87±0.3% neuronów (w stosunku do liczby neuronów w preparatach uzyskanych ze zwierząt kontrolnych). Po zastosowaniu CsA lub Diazepamu odnotowano statystycznie ważny wzrost przeżycia neuronów odpowiednio do 61±24.3% i 72.4±14.5%. Po zastosowaniu FK506 2 godziny przed ischemią przetrwało 40.13%±6.3, ale gdy FK506 podano 3 godziny po ischemii przeżyło już tylko 32.08±6.3% neuronów. Po podaniu Minocykliny i policzeniu neuronów tylko o prawidłowych cechach morfologicznych, przeżycie komórek wynosiło 19±2.34%. Po ponownym policzeniu wszystkich komórek w rejonie CA1 (o prawidłowych cechach morfologicznych i komórek wykazujących cechy

http://rcin.org.pl

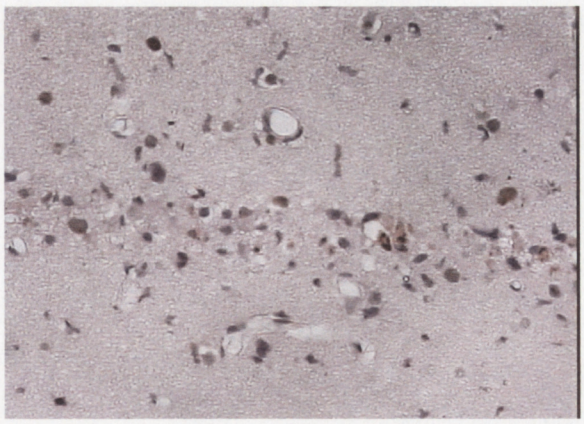
chromatolizy) uzyskano przeżycie 28.8±4.85% neuronów, co w dalszym ciągu nie powodowało istotnej statystycznie protekcji (Ryc.40).



Ryc. 40 Protekcyjny efekt CsA, Minocykliny i Diazepamu na przeżycie komórek rejonu CA1 hipokampa gerbila 7 dni po ischemii. Poszczególne słupki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n=18. Liczbę żywych neuronów liczono w 3 sektorach o długości 200μm w każdym hipokampie. Testem Dunneta sprawdzono istotność pomiędzy wynikami po różnych wariantach doświadczenia, za punkt odniesienia uznając ilość komórek w kontroli.

Ponieważ Minocyklina dawała widoczną protekcję *in vitro*, a w preparatach z mózgów zwierząt po ischemii i podaniu Minocykliny cytoarchitektura rejonu CA1 była częściowo zachowana, staraliśmy się sprawdzić, czy komórki w tym rejonie nie są komórkami apoptotycznymi. W tym celu wykonano barwienie metodą TUNEL.

http://rcin.org.pl



Ryc.41 Ocena stopnia przeżycia komórek w rejonie CA1 hipokampa. Barwienie metodą TUNEL skrawków parafinowych z hipokampa gerbila 7 dni po ischemii i podaniu Minocykliny. Preparat barwiony hematoksyliną-eozyną. Na kolor brunatny wybarwiono przy użyciu DAB komórki pozytywne w reakcji TUNEL.

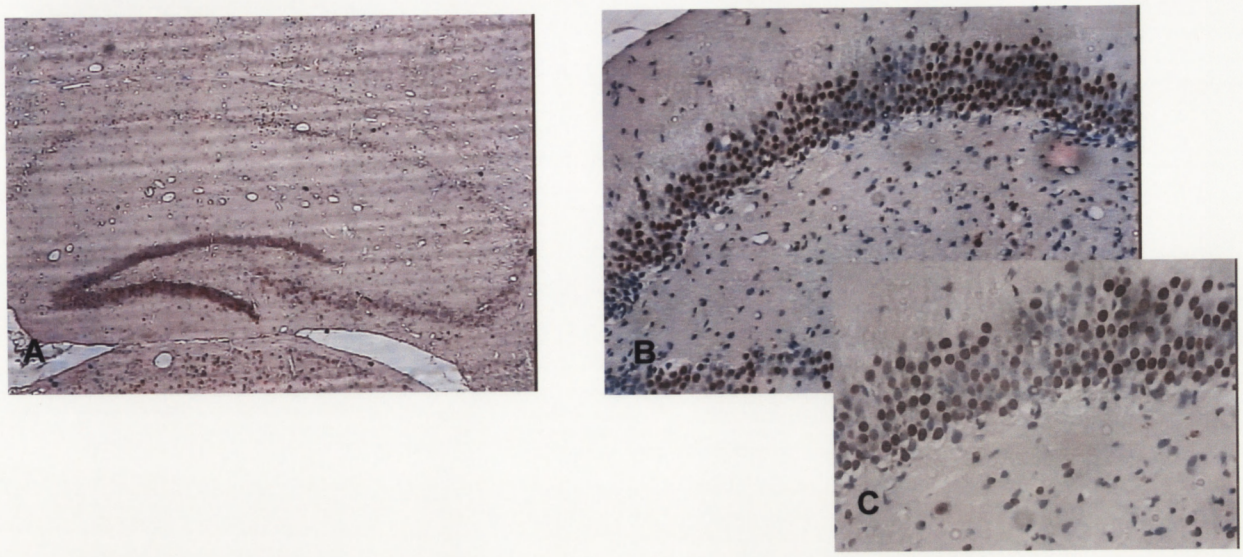
Barwienie metodą TUNEL nie potwierdziło zmian apoptotycznych w neuronach o nieco zmienionych cechach morfologicznych, jasnej cytoplazmie, jądrze rozmytym, przesuniętym na obwód komórki, które obecne były w rejonie CA1 po podaniu zwierzętom przed ischemią Minocykliny. W rejonie CA1 hipokampa widoczne były tylko pojedyncze komórki wybarwione pozytywnie metodą TUNEL.

Podczas oglądania preparatów z mózgów zwierząt po ischemii i podaniu Minocykliny, oraz po zastosowaniu metody TUNEL, zwróciło naszą uwagę silne wyznakowanie rejonu DG hipokampa. Taki obraz powtarzał się we wszystkich skrawkach ze zwierząt poddanych działaniu Minocykliny, natomiast zjawisko to nie występowało w preparatach z mózgów zwierząt tylko po ischemii lub po ischemii i podaniu Diazepamu (Ryc.42).

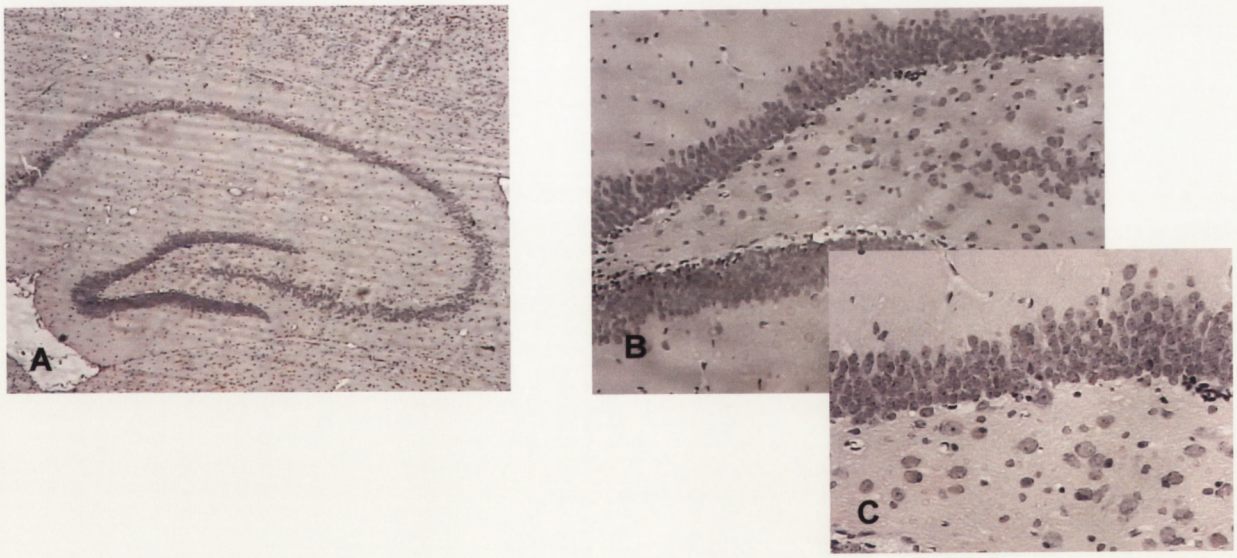
Po porównaniu skrawków parafinowych otrzymanych z mózgów myszoskoczka mongolskiego po ischemii i podaniu zwierzętom Minocykliny lub Diazepamu, zauważono różnicę w wyznakowaniu komórek w rejonie zakrętu zębatego (DG)w reakcji TUNEL. W preparatach przedstawiających cechy morfologiczne hipokampów zwierząt po ischemii i Minocyklinie znacząco zwiększyła się liczba komórek wchodzących w apoptozę.

http://rcin.org.pl

Panel 1



Panel 2



Ryc. 42 Barwienie metodą TUNEL skrawków parafinowych z hipokampa gerbila 7 dni po ischemii i podaniu Minocykliny (Panel 1) lub Diazepamu (Panel 2). Skrawki parafinowe otrzymane z mózgów gerbili po 5' ischemii, i perfuzji po 7 dniach od ischemii, zabarwiono hematoksyliną-eozyną. Na kolor brunatny (barwienie DAB) wyznakowane są komórki pozytywne w reakcji TUNEL. A-struktura całego hipokampa (powiększenie 2,5x), B- rejon DG (powiększenie 20x), C- fragment rejonu DG (powiększenie 40x).

http://rcin.org.pl

V.B.2. Określenie udziału hipotermii w neuroprotekcyjnym działaniu Diazepamu

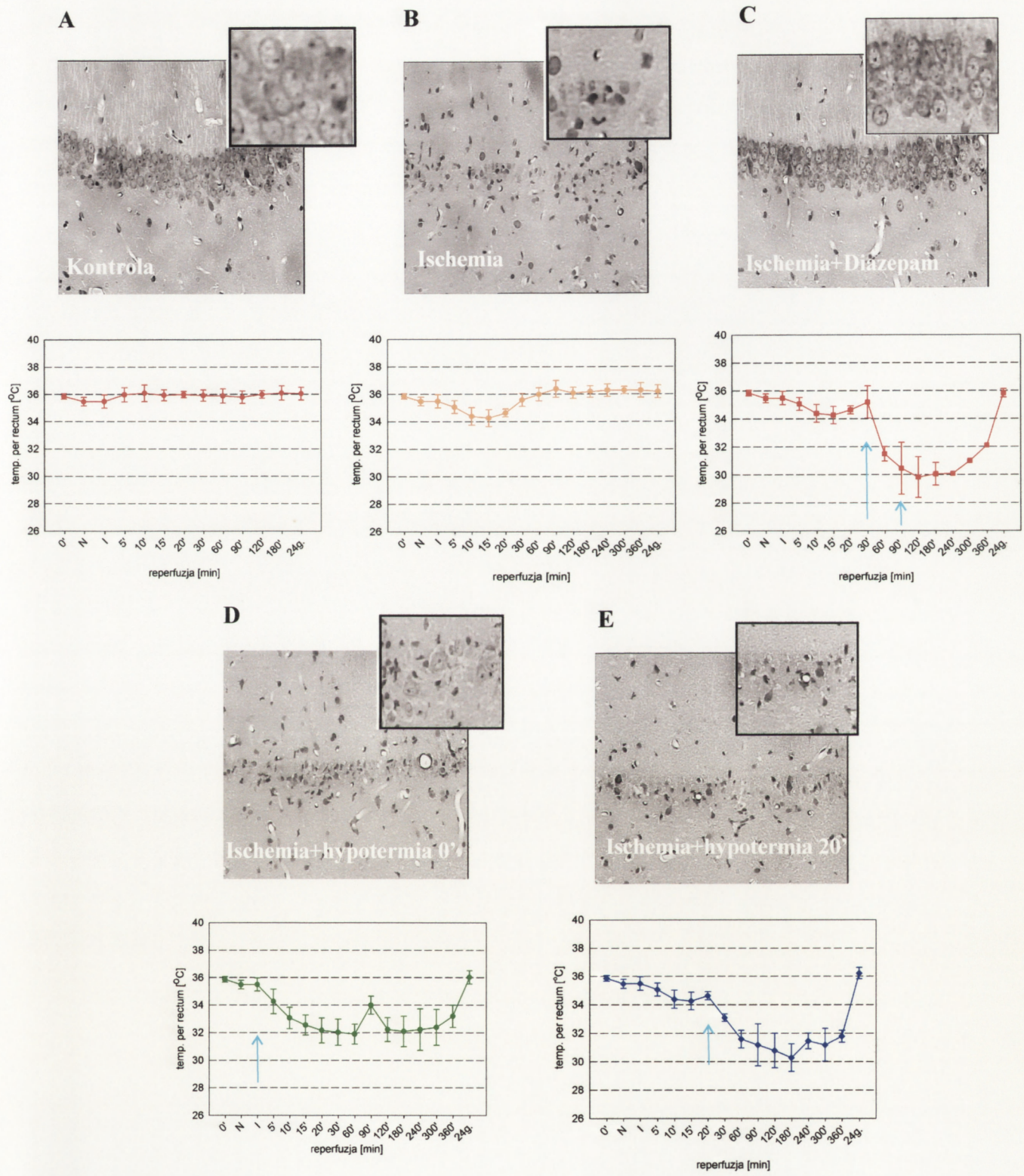
Działanie protekcyjne Diazepamu przypisuje się konwencjonalnie jego działaniu hipotermicznemu lub wiązaniu z receptorem GABA-A. Wobec wcześniejszych obiecujących wyników protekcyjnego działania Diazepamu w obu modelach uszkodzeń *in vitro*, gdzie czynnik temperatury nie odegrał roli, postanowiliśmy sprawdzić *in vivo* na ile w działaniu neuroprotekcyjnym leku czynnik hipotermiczny może mieć znaczenie. Diazepam został podany zwierzętom i.p. w 30 minucie po ischemii. Podczas ischemii, oraz w ciągu następnych 6 godzin mierzono zwierzętom temperaturę ciała *per rectum*. Równolegle poddaliśmy gerbile po ischemii sztucznie wywołanej hipotermii. Jedna grupa zwierząt była chłodzona natychmiast po przywróceniu krążenia, druga - poczynając od 20 minut po ischemii, w celu osiągnięcia po 30 minutach od ischemii, temperatury ciała wywołanej podaniem Diazepamu. W czasie ischemii bez dodatkowych modyfikacji temperatura ciała badana *per rectum* wynosiła ok. 36±0.7 ^{0}C przed zabiegiem (Ryc.43A). Bezpośrednio po zastosowaniu narkozy jak również po operacji podwiązania tętnic temperatura nieznacznie się obniżała, pomimo wyrównawczego grzania zwierząt (rozdz.IV.B.3) nie obniżając się jednakże poniżej 35±0.7^{0}C. Po 20 minutach od ischemii, temperatura zaczynała wzrastać i po około 90 minutach powracała do normy (36.6^{0}C) (Ryc.43B).

Podanie Diazepamu 30 minut po ischemii powodowało obniżenie temperatury w ciągu 1.5 godziny do 30±1^{0}C. Po 5 godzinach temperatura zaczęła ponownie wzrastać (Ryc.43C).

W celu obniżenia temperatury ciała u myszoskoczka mongolskiego do wartości indukowanych podaniem Diazepamu, zwierzęta natychmiast po epizodzie ischemicznym umieszczono na lodzie (na wykresie czas oznaczony strzałką). Podczas hipotermii staraliśmy się, aby zwierzęta osiągnęły temperaturę ciała 31^{0}C-29^{0}C, która odpowiadała temperaturze obserwowanej po podaniu Diazepamu (30±1^{0}C). Podczas kolejnych pomiarów *per rectum* zaobserwowano powolny spadek temperatury. Po 20 minutach temperatura została obniżona do 32±1^{0}C, co odwzorowywało wartości obserwowane po podaniu Diazepamu bezpośrednio po ischemii. Taka temperatura była utrzymywana przez 5 godzin (Ryc.43D).

W kolejnej grupie zwierząt zaplanowano obniżenie temperatury ciała do wartości indukowanych podaniem Diazepamu poprzez chłodzenie zapoczątkowane dopiero po 20 min. poischemicznej reperfuzji. Już w 30 minucie mierzona temperatura osiągnęła 30±1^{0}C (zbliżona do wywołanej przez podanie Diazepamu). Po 1.5 godziny od ischemii temperatura utrzymywała się na poziomie 30±1^{0}C i na tym samym poziomie była utrzymywana przez 5 godzin (Ryc.43D).

http://rcin.org.pl



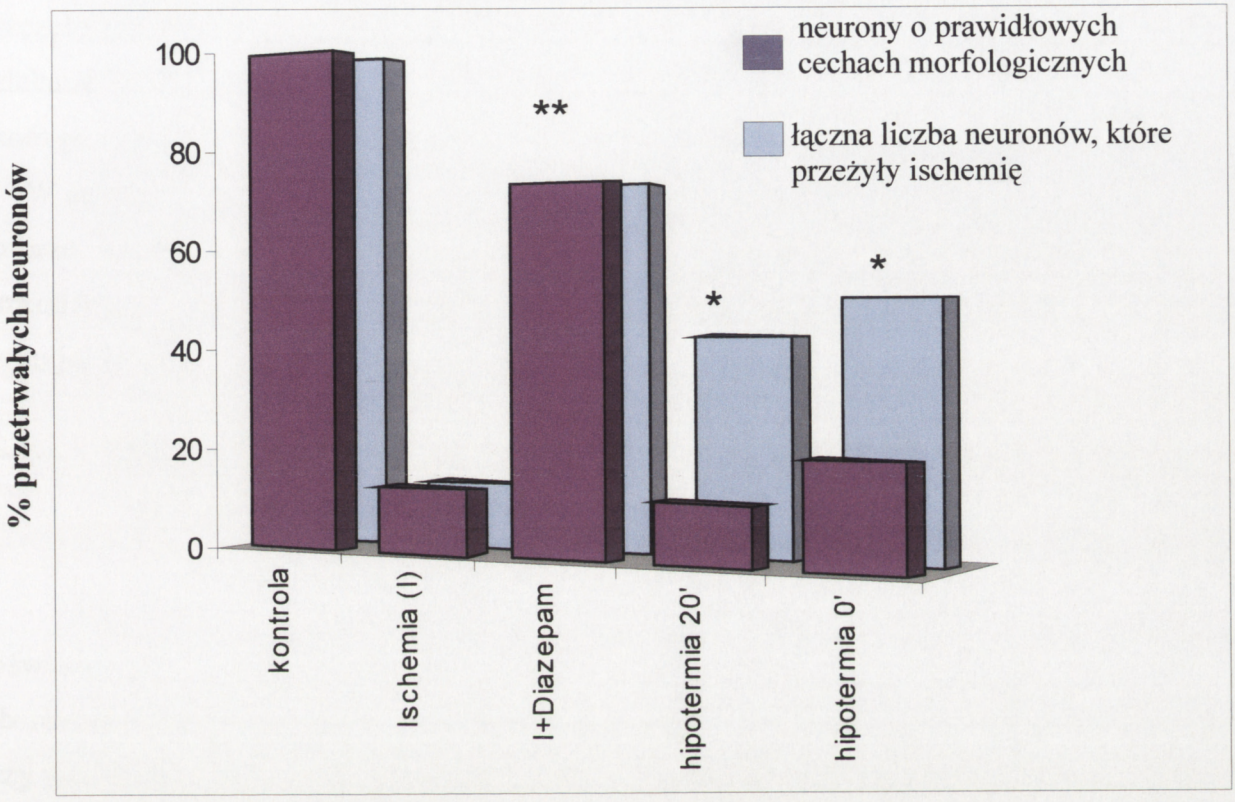
Ryc. 43 Stopień zachowania struktury anatomicznej rejonu CA1 hipokampa 7 dni po 5' ischemii nieleczonej (B), z zastosowaniem hipotermii zewnątrzpochodnej (D,E) lub po podaniu Diazepamu (C). Pomiar temperatury prowadzono metodą per rectum. Strzałka wskazuje moment zastosowania leczenia. Zdjęcia preparatów parafinowych (10μm) wybarwionych hematoksyliną i eozyną wykonano w mikroskopie świetlnym (pierwotne powiększenie 20x). Wykresy przedstawiają średnie arytmetyczne temperatur ± SD, n=3.

http://rcin.org.pl

W celu morfometrycznej oceny działania ochronnego Diazepamu na neurony rejonu CA1 hipokampa w porównaniu z efektem otrzymanym po zastosowaniu zewnątrzpochodnej hipotermii, w otrzymanych preparatach parafinowych liczono neurony w rejonie CA1 zarówno o zachowanych prawidłowych cechach morfologicznych, jak również neurony o rozmytym jądrze, które uległy chromatolizie.

Analizując otrzymane obrazy, stwierdzono, że po podaniu Diazepamu struktura rejonu CA1 pozostaje w dużym stopniu ochroniona przed działaniem ischemii. Natomiast w obu badanych grupach, w których ischemię połączono z hipotermią zewnątrzpochodną znaczna część neuronów została uszkodzona, jednakże struktura rejonu była nadal widoczna, choć utworzona przez komórki stosunkowo jasne (w chromatolizie). Nie nastąpiło tu istotne statystycznie zwiększenie przeżywalności komórek w rejonie CA1 uwzględniając jedynie komórki prawidłowo wybarwione (20.57% żywych komórek). Natomiast włączając do tej grupy komórki wykazujące cechy chromatolizy, można przypuszczać, że taka protekcja mogła mieć miejsce (49.8% żywych komórek), choć była prawie o połowę niższa od otrzymanej po podaniu zwierzętom Diazepamu. Podobne wyniki uzyskano w przypadku hipotermii zewnątrzpochodnej zaindukowanej 20 minut po ischemii. Licząc prawidłowo wybarwione neurony, różnica w przeżywalności komórek, nie była statystycznie istotna, natomiast włączając do tej grupy komórki wykazujące cechy chromatolizy obserwowano efekt protekcyjny odpowiednio 11.8% i 42.7% żywych komórek, w stosunku do zwierząt nie poddanych uszkodzeniu ischemicznemu (Ryc.44). Z powyższych wyników widać, że korzystne działanie badanego leku przewyższa współistniejący efekt hipotermiczny i najprawdopodobniej jest wypadkową synergistycznego działania dwóch lub więcej mechanizmów.

http://rcin.org.pl



Ryc. 44 Działanie ochronne Diazepamu i hipotermii na przeżycie komórek rejonu CA1 hipokampa gerbila 7 dni po ischemii. Poszczególne słupki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n=3. Statystyczna istotność różnicy w ilości przetrwałych neuronów w poszczególnych wariantach doświadczenia oceniona została testem Dunneta, za punkt odniesienia uznano ilość komórek w grupie zwierząt kontrolnych (sham)

http://rcin.org.pl

V.C. BADANIA *IN VITRO* W IZOLOWANYCH MITOCHONDRIACH SZCZURA

Zakładając integracyjną rolę mitochondriów w propagacji sygnału śmierci, kolejnym krokiem mogącym wyjaśnić ochronne działanie Diazepamu, potwierdzić mechanizm uszczelniającego mitochondria działania CsA, a także wyjaśnić mechanizm ochronnego działania Minocykliny w doświadczeniach *in vitro*, było wykonanie badań na wyizolowanych z mózgu i poddanych stresowi oksydacyjnemu mitochondriów.

W dalszych badaniach oceniano wypływ cytochromu c z mitochondriów, zawieszonych w buforze zawierającym związek protekcyjny lub protektant i TBH (w celu indukcji uszkodzenia wolnorodnkikowego), w zależności od stosowanego stężenia substancji badanej i czasu jej podania.

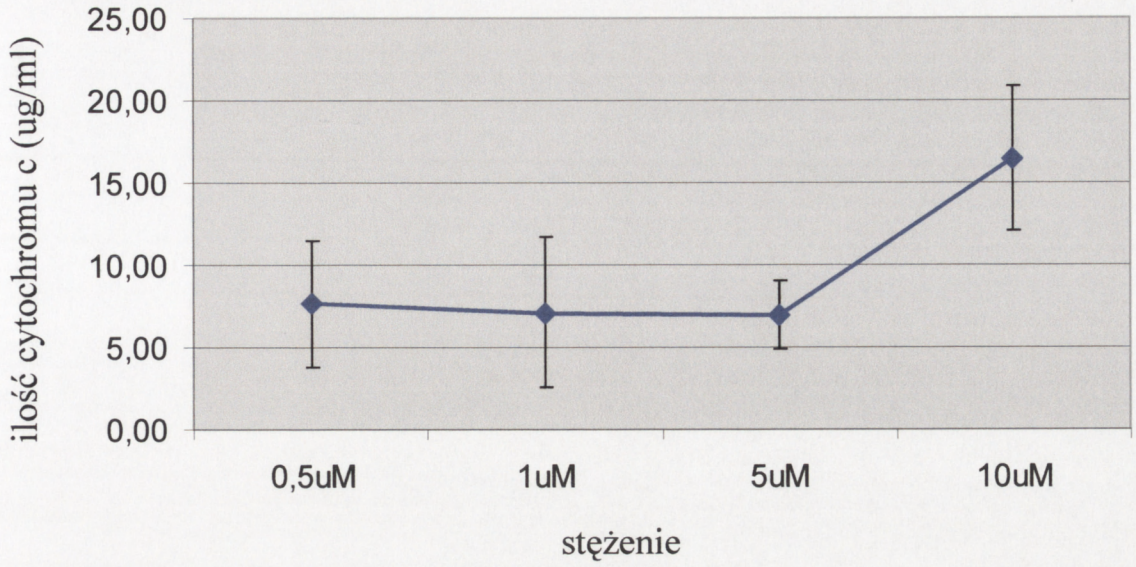
V.C.1. Zmiana przepuszczalności błony mitochondrialnej dla cytochromu c w modelu uszkodzenia wolnorodnikowego oraz po podaniu Diazepamu

Do doświadczenia użyto czterech stężeń Diazepamu, w tym stężenia używanego w doświadczeniach w hodowli organotypowej (5μM) (Ryc.45). Podając lek w stężeniu niższym lub równym 5μM, wypływ cytochromu c utrzymywał się na jednakowo niskim poziomie. Przy zwiększeniu stężenia lek sam indukował wypływ cytochromu c.

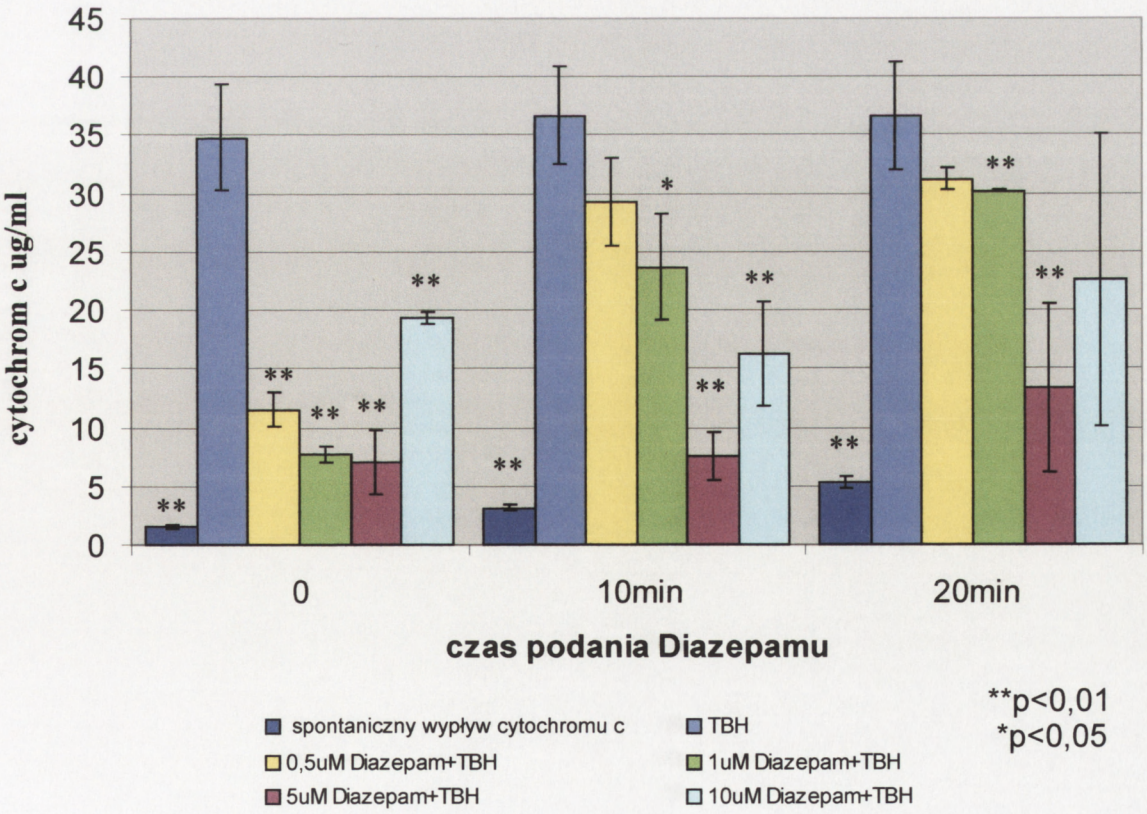
Kolejnym krokiem była ocena stopnia zahamowania wypływu cytochromu c w zależności od czasu podania leku po uszkodzeniu wolnorodnikowym. W tym celu po dodaniu do wyizolowanych mitochondriów TBH, podano Diazepam we wcześniej stosowanych stężeniach, w trzech różnych punktach czasowych: 0 min, 10 min i 20 min. Wyniki przedstawiono na Ryc.46.

Otrzymane wyniki wskazują, że podanie Diazepamu w stężeniu do 5μM równocześnie z zainicjowaniem uszkodzenia wolnorodnikowego hamuje w znacznym stopniu wypływ cytochromu c. Znaczący efekt hamujący po późniejszym podaniu wykazuje tylko Diazepam w stężeniu 5μM. Diazepam 10μM również wykazuje działanie hamujące wypływ cytochromu c, jednak prawdopodobnie ze względu na samoistną indukcję wypływu cytochromu c, to zahamowanie nie jest tak widoczne jak w przypadku niższego stężenia.

http://rcin.org.pl



Ryc. 45 Stopień wypływu cytochromu c w zależności od stężenia Diazepamu. Poszczególne znaczniki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n= 3.



Ryc. 46 Stopień wypływu cytochromu c po uszkodzeniu wolnorodnikowym, w zależności od stosowanego stężenia Diazepamu i czasu podania leku. Poszczególne słupki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n= 3.

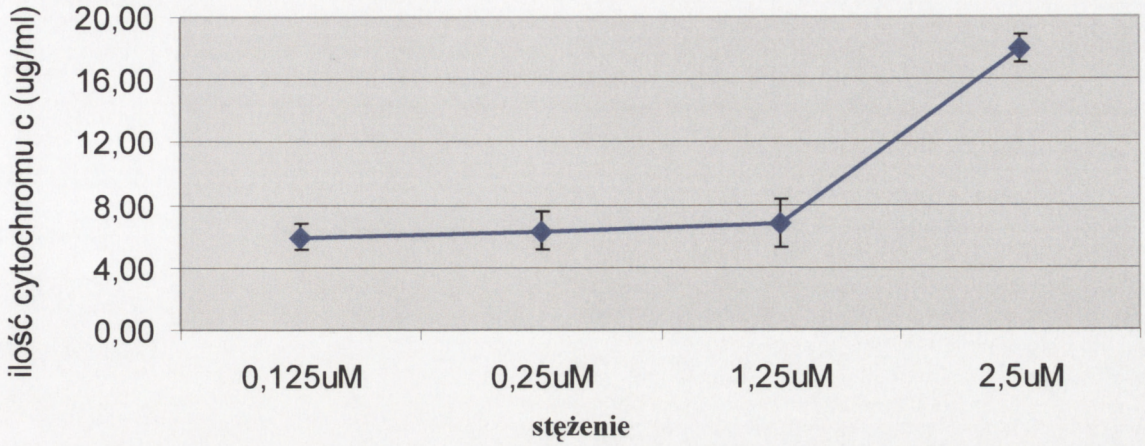
http://rcin.org.pl

V.C.2. Zmiana przepuszczalności błony mitochondrialnej dla cytochromu c w modelu uszkodzenia wolnorodnikowego oraz po podaniu CsA

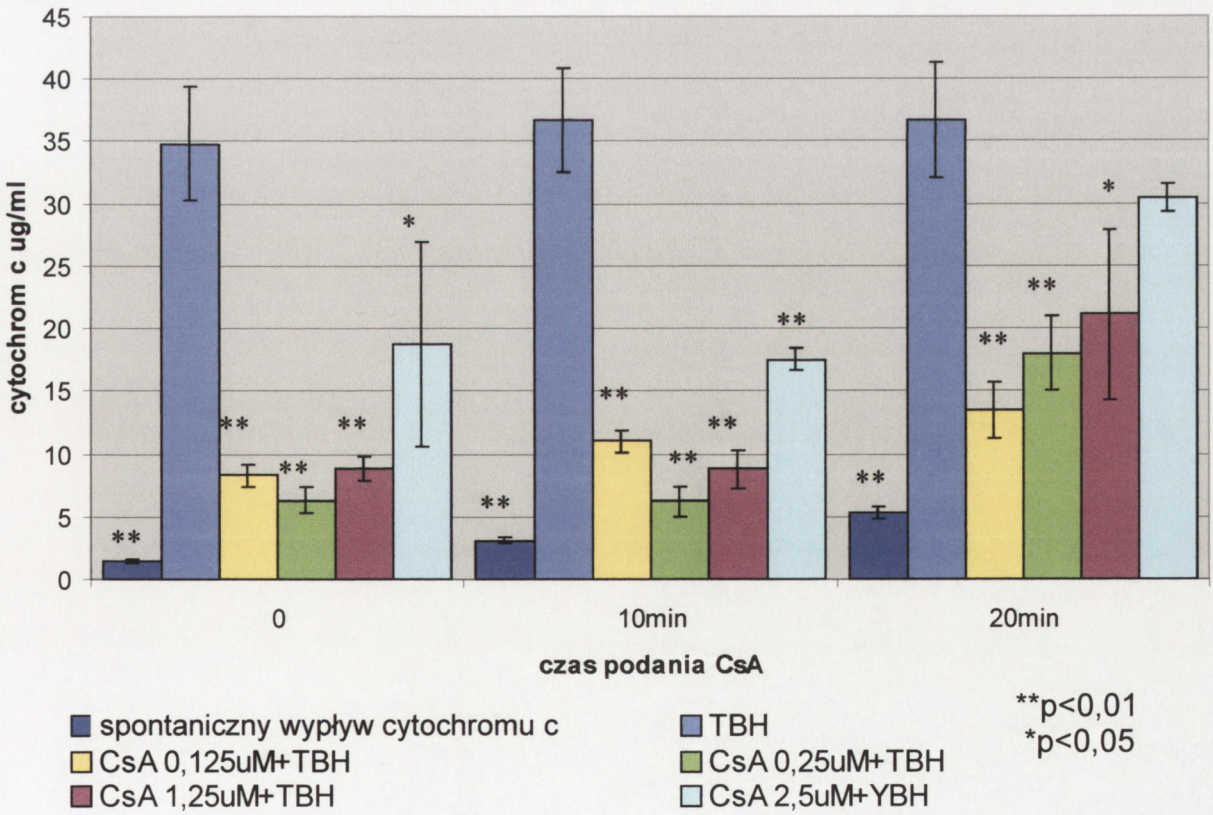
Mechanizm uszczelniania MTP, a co za tym idzie, hamowanie wypływu cytochromu c przez CsA jest znany i szeroko opisany w literaturze. Z tego powodu w naszym doświadczeniu CsA służyła jako swoista kontrola pozytywna stosowanej metody. Początkowo oceniono wypływ cytochromu c z mitochondriów po podaniu samej CsA, w zależności od stężenia. W tym celu do doświadczenia użyto czterech stężeń CsA, w tym stężenia używanego w doświadczeniach w hodowli organotypowej (0,25μM) (Ryc.47). Do stężenia CsA 1,25μM wypływ cytochromu c utrzymywał się na jednakowo niskim poziomie. Przy zwiększeniu stężenia do 2,5μM lek indukował samoistnie wypływ cytochromu c.

Kolejnym krokiem była ocena stopnia wypływu cytochromu c w zależności od czasu podania leku po uszkodzeniu wolnorodnikowym. Postępowano analogicznie jak w poprzednim doświadczeniu (Ryc.48). CsA w stężeniu niższym, lub równym 1,25μM działała hamująco na wypływ cytochromu c, podana nawet do 20 min od uszkodzenia. Przy wyższych stężeniach efekt uszczelniający błonę mitochondrialną nie był widoczny.

http://rcin.org.pl



Ryc. 47 Stopień wypływu cytochromu c w zależności od stężenia CsA. Poszczególne znaczniki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n= 3.



Ryc. 48 Stopień wypływu cytochromu c po uszkodzeniu wolnorodnikowym, w zależności od stosowanego stężenia CsA i czasu podania leku. Poszczególne słupki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n= 3.

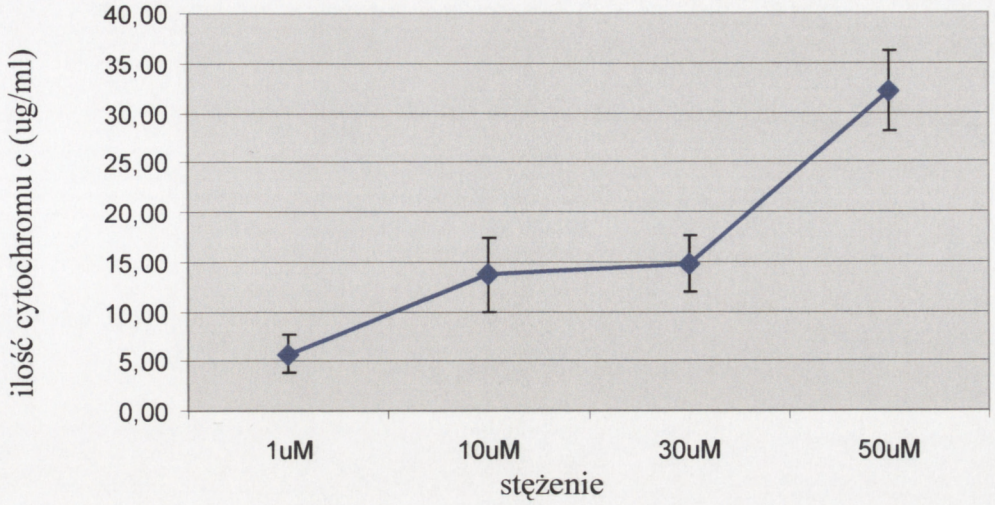
http://rcin.org.pl

V.C.3. Zmiana przepuszczalności błony mitochondrialnej dla cytochromu c w modelu uszkodzenia wolnorodnikowego oraz po podaniu Minocykliny

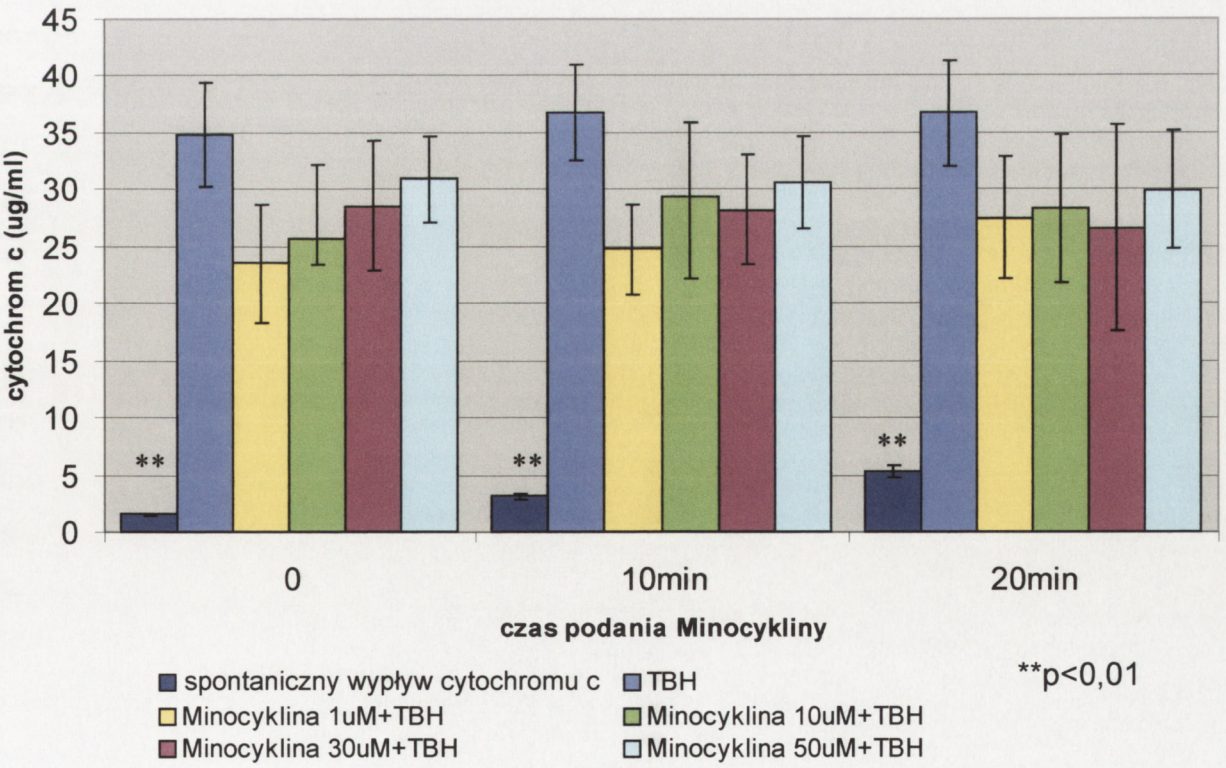
Pomimo mało obiecujących wyników dotyczących działania protekcyjnego Minocykliny w doświadczeniach po ischemii *in vivo*, podjęliśmy próbę zbadania, czy Minocyklina ma zdolność hamowania wypływu cytochromu c z mitochondriów po zastosowaniu TBH. Tak jak w poprzednich doświadczeniach, w pierwszej kolejności sprawdziliśmy, jak sama Minocyklina, w zależności od stężenia, działa na mitochondria. Do doświadczenia użyto czterech stężeń Minocykliny, w tym stężenia używanego w doświadczeniach w hodowli organotypowej (30μM) (Ryc.49). Z otrzymanych danych wynika, że tylko w najmniejszym stężeniu Minocyklina nie powoduje sama wypływu cytochromu c. Już powyżej stężenia 1μM lek działał uszkadzająco na mitochondria.

Kolejnym etapem była ocena stopnia wypływu cytochromu c w zależności od czasu podania leku po uszkodzeniu wolnorodnikowym. Postępowano analogicznie jak w poprzednich doświadczeniach. Wykazano, że Minocyklina w żadnym ze stosowanych stężeń nie hamowała wypływu cytochromu c (Ryc.50).

http://rcin.org.pl



Ryc. 49 Stopień wypływu cytochromu c w zależności od stężenia Minocykliny. Poszczególne znaczniki reprezentują średnie z wyników otrzymanych ± SD, n=3.



Ryc. 50 Stopień wypływu cytochromu c po uszkodzeniu wolnorodnikowym, w zależności od stosowanego stężenia Minocykliny i czasu podania leku. Poszczególne słupki reprezentują średnie arytmetyczne ± SD, n= 3.

http://rcin.org.pl

VI. DYSKUSJA

VI.A. ANALIZA ZASTOSOWANEJ METODYKI DOŚWIADCZEŃ

VI.A.1. Analiza metody hodowli organotypowej skrawków hipokampa

Do doświadczeń *in vitro* wybrano organotypową hodowlę skrawków hipokampa szczura. Zalety stosowania tego modelu, a także różnice w technikach prowadzenia hodowli organotypowych zostały opisane przez Stoppiniego i wsp. (1991).

Hodowle skrawków otrzymywanych z różnych tkanek i narządów są stosowane od wielu lat. Początkowo doświadczenia przeprowadzano na świeżo wyizolowanych skrawkach, a obecnie eksperymenty prowadzone są na kilkutygodniowych hodowlach skrawków. Do ważnych zalet hodowli organotypowej skrawków hipokampa należy m.in. zachowanie regionalnej cytoarchitektury i połączeń neuronalnych, które nie występują w pierwotnych hodowlach mieszanych glejowo-neuronalnych. Hodowla prowadzona w kontrolowanych warunkach zewnętrznych (pH, temperatura, skład elektrolitów w pożywce) umożliwia wyeliminowanie efektu hipotermii i sedacji polekowej oraz zmian związanych z zaburzeniami w przepływie mózgowym, które mogą utrudniać interpretację wyników badań otrzymanych w eksperymentalnym modelu zwierzęcym (Galeffi i wsp. 2000).

W celu uzyskania hodowli organotypowej hipokampa izolowano mózgi z 7-9 dniowych zwierząt, gdyż cytoarchitektura i połączenia nerwowe w tym okresie w tkance są już w większości ukształtowane, a jeszcze w pełni plastyczne.

Tkanka nerwowa pobrana z płodów przeżywa w hodowli *in vitro* nieco dłużej, lecz nie można w niej obserwować prawidłowej i funkcjonalnej organizacji połączeń nerwowych, odpowiedź komórek rejonu CA1 jest nieadekwatna do bodźca, wiele komórek neuralnych podlega jeszcze migracji (Stoppini i wsp. 1999). Ponadto w hodowlach skrawków hipokampa uzyskanych z mózgów 5-8 dniowych szczurów występujące w rejonie CA komórki piramidowe wykazują prawidłowe przekaźnictwo synaptyczne (Debanne i wsp. 1995) oraz krótko- i długotrwałą plastyczność synaptyczną (Muller i wsp. 1996). Wyniki badań elektrofizjologii skrawków hodowanych kilka tygodni były identyczne z uzyskanymi na hodowlach prowadzonych przez 24 godziny (Galeffi i wsp. 2000).

Z naszych doświadczeń wynika również, że skrawki izolowane z hipokampów starszych zwierząt (>11 dni) tracą dość szybko cytoarchitekturę, przeżywalność komórek w skrawku jest znacząco niższa niż w skrawkach izolowanych z 7-9 dniowych zwierząt,

http://rcin.org.pl

znaczący procent hodowli musi być wykluczony z eksperymentu ze względu na spontaniczną śmierć komórek skrawka (Sarnowska 2002).

Hodowle organotypowe mogą być prowadzone dwiema technikami: metodą tzw. roller-tube (Gahlwiler i wsp. 1997) i metodą dwóch faz, na błonach półprzepuszczalnych (Stoppini i wsp. 1991). Uzyskane tymi dwiema technikami hodowle różnią się nieco cechami morfologicznymi, oraz końcową grubością skrawków. Do naszych doświadczeń wybraliśmy metodę opisaną przez Stoppiniego i nieznacznie zmodyfikowaną w naszym Zakładzie, na półprzepuszczalnych błonach. Skrawki hodowane tą metodą, w odróżnieniu od skrawków hodowanych metodą „roller tube", ulegają wprawdzie zcieńczeniu po siedmiu dniach hodowli, ale zachowują trójwymiarową strukturę. W ich składzie wyróżniamy wszystkie typy komórek obecne w hipokampie.

Wybór hipokampa jako struktury mózgu do otrzymania hodowli organotypowej w naszych badaniach był podyktowany tym, iż stanowi on jedną ze struktur szczególnie wrażliwych na krótkotrwałe niedokrwienie i nawet podczas krótkich epizodów o typie TIA często dochodzi w nim do trwałych zmian (Alblas i wsp. 2006, Yukie i wsp. 2006).

Używając organotypowych hodowli skrawków hipokampa można w dość precyzyjny sposób odtworzyć proces obumierania komórek, jaki zachodzi po uszkodzeniu tkanki w wyniku niedokrwienia, zarówno pod względem specyficznosci regionalnej zmian dotyczącej rejonu CA1, jak również dynamiki zachodzenia zmian tzw.opóźnionej śmierci komórek. (Sarnowska 2002).

VI.A.2. Analiza zastosowanych modeli uszkodzenia neuronów wywołanych podaniem TBH i NMDA

Proces obumierania neuronów po przejściowym niedokrwieniu mózgu jest zjawiskiem złożonym, w który zaangażowanych jest wiele mechanizmów wewnątrzkomórkowych. Podczas krótkotrwałego niedokrwienia dochodzi m.in. do aktywacji receptorów glutamatergicznych i wzrostu produkcji wolnych rodników. Ponieważ *in vivo* powyższe dwa procesy przebiegają równolegle, trudno jest jednoznacznie ocenić, zahamowanie którego procesu odpowiada za ochronne działanie badanego związku. Aby wyjaśnić powyższe działanie, w hodowli organotypowej skrawków hipokampa szczura rozdzielono dwa mechanizmy uszkadzające, indukując oddzielnie uszkodzenie wolnorodnikowe poprzez podanie do hodowli tert-butylhydroperoxide (TBH) – induktora wolnych rodników (Zhu i wsp. 2004) lub uszkodzenie ekscytotoksyczne poprzez podanie NMDA, aktywatora receptorów/kanałów NMDA (Casaccia-Bonnefil i wsp.1993).

http://rcin.org.pl

W zwierzęcych modelach eksperymentalnych ischemii pierwsze cechy opóźnionej śmierci neuronów w hipokampie widoczne są po 48-72 godzinach od reperfuzji (Gadamski i wsp. 1992, Kirino 1982) i ograniczone są głównie do rejonu CA1. W opracowanym przeze mnie modelu uszkodzenia wolnorodnikowego jak i ekscytotoksycznego w HOC czasowa i przestrzenna organizacja zmian zachodzących po uszkodzeniu różni się nieznacznie od modelu ischemii *in vivo*. Do opóźnionej śmierci neuronów dochodzi głównie w rejonie CA1. Ponadto śmierć komórek zaobserwowano również w rejonie DG, który jest w modelu ischemii zwierzęcej dość odporny na epizody niedokrwienia. Badane związki wykazujące działanie ochronne na komórki rejonu CA1 nie zmniejszały śmiertelności komórek w rejonie DG.

W modelach uszkodzenia naśladujących zmiany zachodzące podczas niedokrwienia zarówno w hodowlach komórkowych jak i w organotypowych do śmierci neuronów dochodzi znacznie szybciej niż w modelu ischemii *in vivo*. W hodowli neuronów korowych poddanych OGD nagły wzrost LDH obserwowano w pożywce hodowlanej po 2 godzinach od uszkodzenia (Goldberg i Choi 1993). W naszych doświadczeniach pierwsze cechy opóźnionej śmierci neuronów po zastosowaniu odpowiednio niskich, ale efektywnych dawek TBH/NMDA obserwowaliśmy 6 godzin po uszkodzeniu. Podobne obserwacje opisane zostały przez Rytter i wsp. (2003) w modelu OGD hodowli skrawków hipokampa myszy.

- Uszkodzenie wolnorodnikowe

W doświadczeniach przedstawionych w tej rozprawie zastosowanie w hodowli organotypowej hipokampa, czy dodanie do wyizolowanych mitochondriów szczura 30μM TBH powodowało znaczny wypływ cytochromu c z mitochondriów oraz aktywację kaspazy 3. Powyższe efekty są skutkiem otwarcia megakanałów mitochondrialnych (MPT) po uszkodzeniu inicjowanym przez TBH (Gunter i wsp. 1990, Crompton i wsp. 1987, Fabian i wsp. 1990, Nieminen i wsp. 1995), co potwierdzono m.in. w mikroskopie konfokalnym obserwując po dodaniu oksydanta utratę mitochondrialnego potencjału błonowego (Nieminen i wsp. 1995). W naszych doświadczeniach udział TBH w aktywacji apoptotycznego szlaku mitochondrialnego potwierdzono podając do hodowli równocześnie z TBH Cyklosporynę A (blokującą otwarcie kanału MTP) (Lemaster i wsp. 1999) i obserwując zahamowanie opóźnionej śmierci neuronów.

http://rcin.org.pl

➢ Uszkodzenie ekscytotoksyczne

W ischemii mózgu istotną rolę przypisuje się nadmiernemu uwalnianiu glutaminianu z zakończeń nerwowych, pobudzeniu jego receptorów co zapoczątkowuje wzrost stężenia jonów wapnia w neuronach (Siesjo i wsp. 1989). W celu wywołania uszkodzenia ekscytotoksycznego, do hodowli organotypowej dodawano 100μM NMDA. W celu weryfikacji mechanizmu aktywacji receptorów/kanałów NMDA prowadzących do powolnej śmierci neuronów, do hodowli dodano MK801, bezkompetytywnego antagonistę NMDA. Poprzez zastosowanie MK801 osiągnęliśmy w naszych doświadczeniach znaczącą protekcję neuronów rejonu CA1 w HOC, potwierdzając tym samym ekscytotoksyczny mechanizm zastosowanego uszkodzenia. Protekcja ta nie była całkowita, co może wiązać się między innymi z opisywaną przez NMDA aktywacją również innych receptorów, których pobudzenie nie może być blokowane przez MK801 (Pringle i wsp. 1996). Ponieważ doświadczenia *in vitro* były prowadzone w stałej temperaturze (36^0C), efekt ochronny związku nie mógł być spowodowany wywołaniem hipotermii polekowej, jak sugerują niektórzy autorzy (Buchan, Pulsinelli 1999, Łazarewicz i wsp. 1994).

Wykluczenie MK801 z dalszych naszych badań *in vivo*, pomimo pozytywnych wyników otrzymanych *in vitro* wynika z licznych działań ubocznych leku (nasilenie objawów psychotycznych, wywoływanie halucynacji i uczucia niepokoju) (Loscher i wsp. 1998) uniemożliwiających jego zastosowanie w niezmienionej formie chemicznej w leczeniu powszechnym.

VI.A.3. Analiza zastosowanego modelu ischemii *in vivo*

Doświadczenia *in vivo* dotyczące badania neuroprotekcyjnego wpływu CsA, FK506, Diazepamu i Minocykliny na komórki piramidowe rejonu CA1 po ischemii prowadzone były w modelu przejściowej ischemii przodomózgowia u myszoskoczka mongolskiego. Ten gatunek zwierząt został przez nas wybrany celowo, ze względu na specyficzną budowę układu krążenia mózgowego. U większości tych zwierząt brak jest tętnicy łączącej tylnej, co powoduje brak funkcjonalnego koła Willisa. Dzięki takiej budowie anatomicznej unaczynienia, po obustronnym zamknięciu tętnic szyjnych wspólnych brak jest kompensacyjnego ukrwienia przodomózgowia przez tętnice kręgowe. Podczas 5-minutowej ischemii dochodzi do wybiórczego, opóźnionego uszkodzenia neuronów w hipokampie, głównie w rejonie CA1, którego pierwsze morfologiczne cechy pojawiają się nie wcześniej niż po 3-4 dniach po zabiegu (Kirino i wsp. 1992; Domańska-Janik i wsp. 1985; Łazarewicz i

http://rcin.org.pl

wsp. 1994). W tym modelu ischemii, w odróżnieniu od ischemii ogniskowej, proces zapalny indukowany uszkodzeniem jest bardzo słabo wyrażony i odgrywa drugorzędną rolę w mechanizmie opóźnionej śmierci neuronów. W przypadku ischemii 5 minutowej, w odróżnieniu do ischemii długotrwałej (10-20 min) lub ischemii ogniskowej, zaobserwowana w doświadczeniach różnych zespołów, śmiertelność zwierząt podczas jak i po niedokrwieniu była niewielka (1-2%).

VI.B. OCENA DZIAŁANIA NEUROPROTEKCYJNEGO WYBRANYCH ZWIĄZKÓW W ASPEKCIE USZKODZENIA ISCHEMICZNEGO MÓZGU

VI.B.1. Ocena działania protekcyjnego IGF-1 po uszkodzeniu wolnorodnikowym i ekscytotoksycznym w badaniach *in vitro i in vivo*

IGF-1 jest wielkocząsteczkowym peptydem, należącym do czynników wzrostowych. Dotychczas opisywano jego działanie ochronne w stosunku do mięśnia sercowego (naczyń wieńcowych) i naczyń obwodowych związane z aktywacją NOS i wpływem na prawidłowe działanie śródbłonka (Obrępalska-Stępłowska i wsp. 2005; McCarty 2003). Pojawiły się również informacje o neuroprotekcyjnym działaniu IGF-1, wiązane zarówno z jego wpływem na naczynia mózgowe, jak również z blokowaniem uszkadzającego działania glutaminianu w komórkach nerwowych.

W naszych badaniach, ograniczonych w tej rozprawie jedynie do organotypowej hodowli skrawków z hipokampa szczura, zarówno w uszkodzeniu wolnorodnikowym, jak i w znacznie mniejszym stopniu w uszkodzeniu ekscytotoksycznym, IGF-1 wykazał pewne działanie ochronne. Podobne działanie IGF-1 na neurony rejonu CA1 w modelu 35-minutowego OGD z użyciem skrawków organotypowych mysich opisał również Mackay i wsp. (2003). W modelu ALS, na motoneuronach uzyskanych z rdzenia kręgowego płodów szczurzych, podanie IGF-1 blokowało uszkadzające działanie glutaminianu, aczkolwiek opóźnione choćby o 30 minut podanie peptydu nie wykazywało dalszego działania ochronnego.

W naszych doświadczeniach *in vivo*, przeprowadzonych wcześniej i nie zamieszczonych w tej rozprawie, IGF-1 podawany dotętniczo podczas ischemii przodmózgowia u myszoskoczka mongolskiego nie powodował istotnej statystycznie neuroprotekcji, w odróżnieniu od MGF (fragmentu C-końcowego peptydu IGF-1 Ec) (Dłużniewska i wsp. 2005). W pracy Bergstedta z 1993 badano wiązanie liganda ^{125}I-IGF-1 z receptorem IGF-1 w modelu 15 minutowego podwiązania obu tętnic szyjnych u szczura.

http://rcin.org.pl

Wiązanie liganda do receptora wzrastało po 6 godzinach od reperfuzji w rejonach CA1, CA3 i DG hipokampa, sugerując zwiększoną ekspresję receptora IGF-1 w tej strukturze (Bergstedt i wsp. 1993). Podobnego zwiększenia wiązania liganda nie obserwowano w prążkowiu ani w korze mózgu. Podanie dokomorowe IGF-1 przed i po przejściowej ischemii nie miało wpływu na śmierć neuronów. Nadekspresja receptora IGF-1 pojawiająca się tuż po ischemii i brak działania neuroprotekcyjnego po podaniu IGF-1 w naszych badaniach mogą sugerować, że pomimo dużej aktywacji receptora, związany z nim szlak komórkowy może być podczas niedokrwienia zaburzony (Bergstedt i wsp. 1993; Dłużniewska i wsp. 2005).

W doświadczeniach *in vivo* istotnym problemem wydaje się być sposób podania związku. IGF-1 jest 70-aminokwasowym peptydem i trudno przenika do mózgu. W celu ominięcia bariery krew-mózg IGF-1 podawano w formie wektora bezpośrednio na korę mózgu. W modelu ischemii ogniskowej mózgu szczura MCAo IGF-1 podany dokomorowo podczas niedokrwienia, redukował uszkodzenie poischemiczne w sposób zależny od dawki (Mackay i wsp. 2003). Taki sposób podania leku jest zabiegiem zbyt traumatycznym do zastosowania w klinice. W piśmiennictwie znaleźć można pojedyncze prace opisujące działanie ochronne IGF-1 wywołane podaniem związku donosowo po reperfuzji w modelu MCAo u szczurów (Liu i wsp. 2001) IGF-1 był transportowany wzdłuż nerwów, z opuszki węchowej do kory mózgu.

Pomimo trudności związanych z podaniem leku, jak również z kontrowersyjnymi wynikami dotychczasowych badań dotyczących zastosowania IGF-1 w leczeniu incydentów niedokrwiennych mózgu, związek ten jest obecnie w stadium badań klinicznych nad jego zastosowaniem w leczeniu ALS (Nagano i wsp. 2005, Traynor i wsp. 2006).

VI.B.2. Ocena działania protekcyjnego CsA i możliwości jej zastosowania w niedokrwieniu mózgu

Z badanych przeze mnie związków o prawdopodobnym potencjale neuroprotekcyjnym najwięcej informacji zebrano na temat cyklosporyny A (CsA). Cyklosporyna A jest peptydem złożonym z 11 aminokwasów i powszechnie stosowanym lekiem immunosupresyjnym o dobrze zbadanej farmakokinetyce.

Mechanizm supresji reakcji immunologicznej przez CsA jest związany z zahamowanie aktywacji limfocytów T (Uchino i wsp. 1998). CsA w kompleksie z cyklofiliną A wiąże się z podjednostką regulatorową fosfatazy serynowo/treoninowej kalcyneuryny w cytoplazmie komórki i hamuje jej aktywność. Kalcyneuryna jest kluczowym enzymem zaangażowanym w szlak aktywacji komórek układu odpornościowego, a zahamowanie jej aktywności jest

http://rcin.org.pl

podstawowym mechanizmem immunosupresyjnego działania niektórych, obecnie używanych w transplantologii leków. Ten mechanizm działania immunosupresyjnego jest wspólny dla CsA i FK506, który wiąże się z kalcyneuryną w kompleksie z sobie specyficznym białkiem należącym do rodziny cyklofilin – FKBP12.

Oprócz działania immunosupresyjnego CsA wiążąc się cyklofiliną D zapobiega jej przyłączeniu się do translokazy nukleotydów adeninowych (ANT). W ten sposób CsA wpływa na zamknięcie megakanału mitochondrialnego (MTP) i stabilizację błony mitochondrialnej (Crompton i wsp. 1999). Zostało to potwierdzone w naszych doświadczeniach, gdzie cyklosporyna A zastosowana w uszkodzeniu wolnorodnikowym zapobiegała wypływowi cytochromu c i aktywacji szlaku kaspaz, prowadzącego do apoptozy komórek (Lemaster i wsp.1999).

Pomimo licznych prowadzonych badań, nadal nie wiadomo jaki jest główny mechanizm odpowiedzialny za działanie ochronne CsA na neurony po ischemii. W celu wyjaśnienia sposobu działania cyklosporyny A w doświadczeniach *in vitro* i *in vivo* zastosowaliśmy dwa, różnie działające inhibitory kalcyneuryny: CsA i FK506.

- Ocena działania protekcyjnego CsA i FK506 na neurony rejonu CA1 w po uszkodzeniu wolnorodnikowym i ekscytotoksycznym *in vitro*

W doświadczeniach *in vitro* na hodowlach organotypowych skrawków z hipokampa szczura cyklosporyna A wykazała znaczącą ochronę neuronów CA1 po zainicjowaniu zarówno uszkodzenia wolnorodnikowego, jak i ekscytotoksycznego. Ochronne działanie leku na neurony rejonu CA1 wykazano nawet po podaniu opóźnionym o 60 min w stosunku do uszkodzenia. Nieco skuteczniejsza ochrona była obserwowana po uszkodzeniu wolnorodnikowym niż po aktywacji kanałów/receptorów NMDA. Jest to zgodne z obserwacjami innych grup badawczych. W organotypowej hodowli skrawków hipokampa szczura podając H_2O_2, inicjowano opóźnioną śmierć komórek, która była hamowana po podaniu 5μM CsA (Frantseva i wsp. 2002). W pracy Chinopoulus'a i wsp. (1999) zauważono, że CsA hamowała produkcję wolnych rodników inicjowaną stresem wolnorodnikowym, zmniejszając depolaryzację i przeładowanie wapniem mitochondriów. Powyższe wyniki wskazujące na bezpośrednie działanie CsA na błonę mitochondrialną są zgodne z naszymi obserwacjami prowadzonymi na wyizolowanych mitochondriach z mózgu szczura. Po dodaniu do wyizolowanych mitochondriów 30μM TBH zaobserwowaliśmy znaczny wypływ cytochromu c, który był hamowany przez CsA, podaną nawet po niewielkim odstępie czasu

http://rcin.org.pl

od zainicjowanego uszkodzenia. Nieminen i wsp. opisali działanie CsA zależne od jej użytego stężenia, opóźniające depolaryzację mitochondriów po uszkodzeniu ekscytotoksycznym w modelu hodowli neuronalnej (Nieminen i wsp. 1996). Autorzy przedstawionych powyżej wyników wnioskowali, że depolaryzacja mitochondriów po aktywacji receptorów/kanałów NMDA może również powodować aktywację MPT.

Istotne znaczenie dla wyjaśnienia mechanizmu opóźnionej śmierci komórek ma czas podania CsA. W naszych doświadczeniach przeprowadzonych zarówno w HOC jak i na wyizolowanych mitochondriach z mózgu szczura, CsA wykazywała działanie ochronne podana tylko w pierwszych 60 min. od zainicjowania uszkodzenia. W otrzymanych przez nas wcześniej i niezamieszczonych w tej rozprawie wynikach doświadczeń, obserwowaliśmy zależność ochronnego działania 0,5μM CsA od czasu podania związku po uszkodzeniu inicjowanym staurosporyną, H_2O_2 lub glutaminianem. Doświadczenia prowadzono w eksperymentalnym modelu pierwotnej hodowli mieszanej komórek izolowanych z kory mózgu szczura. Neuroprotekcyjne działanie CsA, obserwowane po uszkodzeniu, zmniejszało się wraz z wydłużeniem odtępu czasu od uszkodzenia do podania leku. Po 3 godzinach od uszkodzenia efekt ochronny CsA nie był już znamienny statystycznie (Domańska-Janik i wsp. 2004). Badając w tym samym czasie wypływ cytochromu c z mitochondriów zaobserwowaliśmy jego dwufazowość. Do pierwszej fazy wypływu cytochromu c dochodziło zaraz po zainicjowaniu ischemii, ze szczytem w 30 min. Po 3 godzinach poziom cytochromu c obniżał się, aby kolejny raz zwiększyć się po 24-48 godzinach. Jednocześnie, w trakcie pierwszej fazy wypływu cytochromu c dochodziło do łączenia się cytochromu c z receptorem IP3 na siateczce śródplazmatycznej i uwolnienia Ca^{2+} do cytoplazmy komórki, co potęgowało zainicjowaną wcześniej kaskadę reakcji proapoptotycznych (Beręsewicz i wsp. 2006). CsA podana zaraz po uszkodzeniu blokując otwarcie MTP, hamowała pierwszą fazę wypływu cytochromu. CsA podana po dłuższym czasie od uszkodzenia (powyżej 3 godzin) nie wykazała działania neuroprotekcyjnego (Domańska-Janik i wsp. 2004).

W odróżnieniu od wyników uzyskanych przez nas po podaniu do organotypowej hodowli hipokampa CsA wraz z zainicjowaniem uszkodzenia wolnorodnikowego lub ekscytotoksycznego, zastosowanie FK506 powodowało tylko nieznaczną ochronę neuronów CA1 w obu typach uszkodzenia (inicjowanych TBH lub NMDA). W uszkodzeniu ekscytotoksycznym ochronny wpływ FK506 był bardziej widoczny, niż w uszkodzeniu wolnorodnikowym. Obserwacje te są zgodne z naszymi wcześniejszymi doświadczeniami prowadzonymi w modelu pierwotnej mieszanej hodowli komórek izolowanych z kory mózgu szczura, gdzie FK506 również nie wykazywał działania ochronnego (Domańska-Janik i wsp.

http://rcin.org.pl

2004). Nieco inne wyniki przedstawił Dawson i wsp. (1993), opisując działanie ochronne FK506 *in vitro* w hodowli neuronów kory mózgu szczura po uszkodzeniu wywołanym podaniem NMDA. Autor wiązał protekcyjne działanie związku z zahamowaniem aktywności NOS i syntezy NO. Ten mechanizm nie został potwierdzony w doświadczeniach *in vivo* (Kamińska i wsp. 2004). Wydaje się, że główne działanie FK506 dotyczy hamowania aktywności kalcyneuryny. Kalcyneuryna nasila aktywność receptora NMDA przez promowanie wrażliwości i zmianę poziomu bramkowania kanału jonowego, oraz zwiększa uwalnianie glutaminianu w hodowli komórek hipokampa. Zahamowanie aktywności kalcyneuryny zapobiega również defosforylacji Bad (Uchino i wsp. 2002) i aktywacji apoptotycznego szlaku mitochondrialnego (Domańska-Janik i wsp. 2004, Nichols i wsp. 1994, Sihran i wsp. 1995).

W prezentowanych doświadczeniach cyklosporyna A hamuje w znacznie większym stopniu wypływ cytochromu c i aktywację kaspazy 3 niż FK506. Doniesienia literaturowe dotyczące porównania obu związków są dość rozbieżne. W większości cytowanych prac oba związki w różnym stopniu wykazują działanie protekcyjne, zarówno po uszkodzeniu wolnorodnikowym (Hong i wsp. 2002), w uszkodzeniu ekscytotoksycznym (Dawson i wsp. 1993, Łazarewicz i wsp. 2003), jak i w śmierci neuronów indukowanej staurosporyną (Domańska-Janik i wsp. 2004).

Wyniki naszych badań wskazują na większy potencjał ochronny CsA w hodowli organotypowej skrawków hipokampa oraz w badaniach *in vivo*. Ponieważ oba badane związki wykazują podobne działanie immunosupresyjne, to większy potencjał neuroprotekcyjny CsA związany jest prawdopodobnie z tylko jej właściwym, bezpośrednim działaniem uszczelniającym megakanał w błonie mitochondrialnej.

Podobne wnioski przedstawiono w innej pracy (Rytter i wsp. 2005). W doświadczeniach z użyciem skrawków hipokampa myszy w modelu OGD, CsA i jej analogi (MeVal-CsA, Melle-CsA=NIM 811) pozbawione, w odróżnieniu od FK506, działania hamującego kalcyneurynę zmniejszały znacznie uszkodzenie neuronów w rejonie CA1. Zarówno CsA jak i jej analogi miały zdolność do blokowania MTP, natomiast FK506 nie wpływał na zamknięcie MPT i nie zabezpieczał neuronów przed śmiercią.

- Porównanie działania protekcyjnego CsA i FK506 na neurony rejonu CA1 w modelu przejściowej ischemii przodomózgowia u myszoskoczka mongolskiego

Ponieważ badania w hodowli organotypowej eliminują ewentualnie korzystne systemowe działanie leków np. poprzez immunosupresję układową, postanowiliśmy sprawdzić działanie cyklosporyny A i FK506 również w ischemii *in vivo*. W naszych

http://rcin.org.pl

doświadczeniach CsA podawano zwierzętom do tętnicy szyjnej wraz z przywróceniem krążenia krwi w naczyniach mózgowych po przejściowej ischemii przodomózgowia. FK506 został podany dootrzewnowo 2 godziny przed epizodem niedokrwienia lub 3 godziny po ischemii (Steiner i wsp. 1992).

Droga podania cyklosporyny A do tętnicy szyjnej (i.a.) została przez nas wybrana celowo (Domańska i wsp. 2004). W piśmiennictwie istnieją sprzeczne dane na temat działania ochronnego CsA w ischemii uogólnionej i ogniskowej. Te rozbieżności są najczęściej tłumaczone sposobem podania i różnicami w penetracji związku. CsA jest związkiem trudno przechodzącym, w odróżnieniu od FK506, przez barierę krew-mózg (BBB) przy prawidłowym stanie tkanki mózgu. W licznych pracach w celu uzyskania zwiększonej penetracji CsA przez BBB w eksperymentalnych modelach ischemii uogólnionej doprowadzano do otwarcia bariery poprzez jej fizyczne uszkodzenie np. igłą lub podanie do tętnicy szyjnej mannitolu (Uchino i wsp. 1995). Inną stosowaną metodą zwiększenia stężenia leku w mózgu jest podanie CsA do tętnicy szyjnej, powodując jej bardzo wysokie stężenie lokalne (Yoshimoto i wsp. 1999). W doświadczeniach, w których [a)] jednocześnie z podaniem CsA otwarto barierę krew-mózg (Vachon i wsp. 2002, Uchino i wsp. 1999), [b)] podano CsA domózgowo (i.c.) zwiększając w ten sposób jej stężenie w tkance 2-3-krotnie w stosunku do podania dożylnego (Yoshimoto i wsp. 2001) lub [c)] podano CsA do tętnicy szyjnej wykorzystując otwarcie BBB występujące podczas ischemii (Domańska-Janik i wsp. 2004), zaobserwowano ochronne działanie leku. Również w badaniach prezentowanych w tej rozprawie CsA podana do tętnicy szyjnej podczas ischemii dawała znaczącą ochronę neuronów rejonu CA1 hipokampa. Przy systemowym podawaniu leków w ischemii ogniskowej należy też brać pod uwagę czas otwarcia BBB, który zależy od czasu trwania niedokrwienia (Preston i wsp. 1990, Preston i wsp. 1993). Jednak w modelu ischemii uogólnionej określenie stopnia jak i czasu otwarcia BBB, jest bardziej problematyczne z uwagi na mniej burzliwy przebieg i skutki uszkodzenia mózgu. Wyniki pracy Prestona i wsp. wykazały, iż w modelu eksperymentalnym 10-minutowej ischemii przodomózgowia u szczura otwarcie BBB w prążkowiu i hipokampie następuje po 10 min od rozpoczęcia ischemii, a najwyraźniej zaznaczone jest po 6 godzinach (Preston i wsp. 1997). Według Kirino i wsp. otwarcie bariery krew-mózg przebiega podobnie jak w ischemii ogniskowej, dwufazowo. Bariera otwiera się na krótki czas wraz z zainicjowaniem uszkodzenia. Ponowne jej otwarcie następuje dopiero po kilku dniach, już w fazie śmierci neuronów (Kirino i wsp.1983). Korzystając z doniesień literaturowych, do podania CsA w naszym modelu wykorzystaliśmy otwarcie BBB związane z uszkodzeniem mózgu indukowanym ischemią.

http://rcin.org.pl

Nasze wyniki otrzymane po zastosowaniu CsA jak i FK506 w tym samym modelu ischemii wskazują na znaczącą protekcję neuronów CA1 po podaniu CsA, w odróżnieniu od FK506, który wykazywał działanie ochronne tylko podany przed ischemią (Domańska-Janik i wsp. 2004). Powyższe obserwacje znajdują potwierdzenie w badaniach innych grup. W modelu ischemii przodomózgowia u szczura CsA wykazywała znacznie mocniejszą ochronę przed ischemią, niż FK506, hamując obrzęk mitochondriów i wypływ cytochromu c (Uchino i wsp. 2002).

Zakładając, że działanie ochronne CsA jest w głównej mierze związane z ochroną mitochondriów, należałoby wyjaśnić niewielkie, ale zauważalne działanie protekcyjne FK506. W niektórych pracach opisano hipotermię ($31,8\pm1^0$C) wywołaną podaniem tego związku. Stopień protekcji w CA1 był nieco niższy w grupie, w której utrzymywano stałą temperaturę ciała zwierząt, niż w grupie z wyindukowaną FK506 hipotermią (Ide i wsp. 1996). Efekt hipotermiczny wywołany podaniem FK506 nie wyjaśnia jednak do końca działania protekcyjnego leku, za który odpowiada prawdopodobnie również immunosupresja układowa wywoływana podaniem FK506.

Większość badań dotyczy efektu neuroprotekcyjnego FK506 w modelu MCAo (Kamińska i wsp. 2004, Butcher i wsp. 1997). W tym modelu zarówno przebieg ischemii, stopień i czas otwarcia BBB, jak również mocno wyrażona komponenta zapalna przyczyniająca się do śmierci komórek, są krańcowo różne w porównaniu z modelem przejściowej ischemii przodomózgowia. Działanie przeciwzapalne ma znacznie większe znaczenie niż w ischemii uogólnionej przodomózgowia. Stąd może wynikać różnica w protekcji wywołanej podaniem FK506.

Niestety, chociaż CsA wydaje się w znacznym stopniu chronić neurony przed uszkodzeniem, to w naszych doświadczeniach jej działanie ochronne można było zaobserwować tylko w przypadku podania leku natychmiast po wystąpieniu epizodu niedokrwienia mózgu. Jest to najprawdopodobniej związane z dwufazowym wypływem cytochromu c z mitochondriów po uszkodzeniu, opisanym przeze mnie wcześniej. Przedstawione wyniki podkreślają znaczenie pierwszej fazy wypływu cytochromu c w inicjacji opóźnionej śmierci neuronów. Wykazują również niewielką możliwość zastosowania CsA w praktyce klinicznej ze względu na krótki okres jaki może upłynąć od epizodu niedokrwienia do podania leku, aby ten nadal wykazywał właściwości neuroprotekcyjne.

CsA posiada również stosunkowo wąski zakres działania terapeutycznego a zwiększenie jej stężenia w tkance powyżej 1mM może prowadzić do efektu neurotoksycznego. Obecnie największy problem, związany z utrudnioną penetracją leku przez

http://rcin.org.pl

BBB, stanowi monitorowanie stężenia CsA osiąganego w mózgu. Podając lek dotętniczo jego stężenie w mózgu zależy od aktualnego stopnia otwarcia bariery krew mózg, oraz stanu ogólnego pacjenta. W udarze mózgu, kiedy metabolizm chorego jest poważnie zaburzony, wąskie okno terapeutyczne leku niemalże wyklucza go z zastosowania u chorych. Obecnie prowadzone są liczne badania mające na celu syntezę analogów CsA posiadających większą zdolność do penetracji przez BBB, a w związku z tym, osiagających stałe stężenie w mózgu w zależności od drogi podania.

VI.B.3. Ocena działania protekcyjnego Minocykliny i możliwości jej zastosowania w niedokrwieniu mózgu

Minocyklina jest półsyntetyczną tetracykliną o znaczącym działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwzapalnym. Obecnie jest lekiem stosowanym w klinice, głównie w dermatologii, w leczeniu chorób o podłożu zapalnym i autoimmunologicznym. Ze względu na niewielkie działania uboczne przy stosowanych dawkach jest dobrze tolerowana przez pacjentów. Jej działanie ochronne w przewlekłych chorobach neurodegeneracyjnych jak i po ostrym epizodzie niedokrwienia jest szeroko dyskutowane i nadal niejednoznaczne.

- Ocena działania protekcyjnego Minocykliny po uszkodzeniu wolnorodnikowym i ekscytotoksycznym *in vitro*

Wyniki naszej pracy wykazały, że Minocyklina zastosowana w organotypowej hodowli skrawków hipokampa szczura w modelu uszkodzenia wolnorodnikowego, jak i stresu ekscytotoksycznego wykazuje znaczącą neuroprotekcję. Efekt ten jest wyraźniej zaznaczony w uszkodzeniu z udziałem kanałów/receptorów NMDA. Podobny do prezentowanego w tej pracy, silny efekt ochronny Minocykliny po uszkodzeniu ekscytotoksycznym zauważono również w hodowlach pierwotnych neuronów oraz w neuronach mieszanej hodowli z rdzenia kręgowego szczurów (Tikka i wsp. 2001). W badaniach *in vitro* w hodowlach pierwotnych neuronów ziarnistych móżdżku stwierdzono, że tetracykliny w tym Minocyklina, podane 15-20 minut przed bodźcem uszkadzającym wykazują działanie neuroprotekcyjne w uszkodzeniu ekscytotoksycznym, w sposób zależny od dawki i czasu (Pi i wsp. 2004.).

Nie do końca zbadany jest mechanizm, w którym Minocyklina działa ochronnie w modelu uszkodzenia wolnorodnikowego *in vitro* w hodowli pierwotnych komórek neuronalnych. Pojawiły się doniesienia wskazujące na działanie antyoksydacyjne związku.

http://rcin.org.pl

Wykazano, że Minocyklina hamuje śmierć wywołaną podaniem glutaminianu w hodowli pierwotnej neuronów korowych izolowanych z płodów myszy (Kraus i wsp. 2005). W modelu tym toksyczność spowodowana przez glutaminian nie jest związana z aktywacją receptorów NMDA, a raczej z uszkodzeniem wolnorodnikowym, ponieważ w tak niedojrzałych neuronach nie wykazano obecności receptorów/kanałów NMDA. Potwierdzeniem tej hipotezy jest brak jakiejkolwiek ochrony neuronów w tym modelu po podaniu MK801 i silne działanie ochronne alfa-tokoferolu. Właściwości antyoksydacyjne Minocykliny potwierdza również zahamowanie śmierci komórek neuroblastomy po podaniu H_2O_2 lub tapsigarginy w bezpośredniej obecności leku (Zhu i wsp. 2002). Jednak w porównaniu z silnym antyoksydantem jakim jest witamina E Minocyklina wykazuje znacznie mniejsze zdolność przeciwutleniające (Miyachi i wsp. 1986).

Podając do hodowli komórek mieszanych (neurony, astrocyty i mikroglej) glutaminian i Minocyklinę uzyskano większe o 85% przeżycie neuronów w stosunku do kontroli z użyciem tylko glutaminianu. W doświadczeniu tym eliminując udział komórek śródbłonka i leukocytów wykluczono przeciwzapalne działanie związku, obserwowane w doświadczeniach na modelach eksperymentalnych zwierzęcych (Yrjanheikki i wsp. 1999).

Wydaje się, że działanie Minocykliny nie wiąże się z bezpośrednim efektem uszczelnienia błony mitochondrialnej. W naszych badaniach wykazano, że Minocyklina podana do wyizolowanych mitochondriów szczura, po uszkodzeniu wywołanym podaniem TBH, nie wpływa na zmniejszenie wypływu cytochromu c. Podobnie Minocyklina nie wykazywała działania ochronnego po podaniu do wyizolowanych mitochondriów malonianu (odwracalnego inhibitora kompleksu II) (Leventhal i wsp. 2000, Cornet i wsp. 2004). Minocyklina nie hamuje również pęcznienia mitochondriów w modelu toksycznego uszkodzenia z użyciem MPTP (Cornet i wsp. 2004). Co wiecej, opisano, że lek w wyższych stężeniach (>1μM) sam powodował pęcznienie tych organelli (Cornet i wsp. 2004).

W piśmiennictwie pojawiają się również krańcowo odmienne doniesienia dotyczące protekcyjnego działania Minocykliny na mitochondria. Opisywano zmniejszenie pod wpływem leku pęcznienia wyizolowanych mitochondriów indukowanego zwiększeniem w środowisku stężenia wapnia lub podaniem rekombinowanego białka Bid (Zhu i wsp. 2002). Obserwowano także zmniejszenie pod wpływem Minocykliny wypływu z mitochondriów czynnika AIF (zahamowanie niezależnego od kaspazy 3 szlaku proapoptotycznego) w różnych modelach eksperymentalnych uszkodzeń komórek *in vitro* (Wang i wsp. 2003; Benavides i wsp. 1990; Kirino i wsp. 1982).

http://rcin.org.pl

- Ocena działania protekcyjnego Minocykliny na neurony rejonu CA1 w modelu przejściowej ischemii przodomózgowia u myszoskoczka mongolskiego

Dane literaturowe dotyczące działania ochronnego Minocykliny w badaniach *in vitro* wskazują na aktywację przez lek licznych mechanizmów obronnych komórki (Wang i wsp. 2003). Minocyklina łatwo przechodzi przez barierę krew-mózg, co dodatkowo zwiększa jej szansę na skuteczne działanie ochronne *in vivo* (Brogden i wsp. 1975, Aronson i wsp. 1980). Tetracykliny nie przechodzące przez BBB, nie wykazują neuroprotekcji (Domercq i wsp. 2004), co przemawia raczej za bezpośrednim działaniem ochronnym Minocykliny na tkankę nerwową, niż za jej działaniem w mechanizmie immunosupresji układowej.

Pomimo licznych doniesień literaturowych wskazujących na silne działanie ochronne związku w uszkodzeniu zarówno wolnorodnikowym jak i ekscytotoksycznym w badaniach *in vitro*, opisywane wyniki badań *in vivo* po zastosowaniu Minocykliny w ischemii są bardzo rozbieżne. W naszych doświadczeniach prowadzonych w modelu przejściowej ischemii przodomózgowia u gerbila Minocyklina nie wykazała statystycznie znamiennego działania ochronnego, choć liczba przetrwałych neuronów wydawała się zauważalnie większa niż u zwierząt poddanych ischemii nieleczonej. Również rejon CA1 pomimo śmierci większości neuronów był wyraźniej zachowany, w odróżnieniu od obrazu uzyskanego po ischemii nieleczonej. Podobny brak działania ochronnego po zastosowaniu Minocykliny obserwowano również w innych modelach eksperymentalnych neurotoksyczności (NMDA lub malonian podane domózgowo) (Goni-Allo i wsp. 2005). Z badań Guerin i wsp. wynika, że Minocyklina ma antyproliferacyjny wpływ na komórki śródbłonka i obniża proces angiogenezy w rozplemie nowotworowym (Guerin i wsp. 1992). W powyższym mechanizmie można przewidywać również niekorzystnie działanie związku na proces tworzenia się nowych naczyń po uszkodzeniu mózgu. Wykazano także, że tetracykliny hamują ekspresję niektórych genów i syntezę białek mitochondrialnych (Kroon i wsp. 1984), co sugeruje potencjalne uszkodzenie funkcji mitochondriów przez zastosowanie leku. Minocyklina nasila u myszy uszkodzenie neuronów dopaminergicznych wywołane MPTP (Yang i wsp. 2003). Możliwe, że te różnorodne, niekorzystne działania odpowiadają również za obserwowane przez nas uszkodzenie komórek w rejonie DG hipokampa, po podaniu zwierzętom po ischemii Minocykliny. Innym wytłumaczeniem toksycznego działania Minocykliny na komórki rejonu DG może być większa wrażliwość niezróżnicowanych komórek i progenitorów obecnych w opisywanym rejonie hipokampa na uszkadzające działanie tetracyklin.

http://rcin.org.pl

W piśmiennictwie znaleźć można również obserwacje przemawiające za działaniem neuroprotekcyjnym Minocykliny w ischemii. Jednym z postulowanych mechanizmów jest zahamowanie przez lek aktywacji mikrogleju (Yrjanheikki i wsp. 1998). Po uszkodzeniu tkanki dochodzi do indukcji proliferacji komórek mikrogleju, które uwalniają neurotoksyny (np.wolne rodniki), wzmacniają reakcję zapalną i nasilają zmiany neurodegeneracyjne. Z cytowanej pracy wynika, że w modelu ischemii uogólnionej u gerbila Minocyklina hamowała indukcję czynników prozapalnych t.j. konwertazy IL-1, cyclooxygenazy 2, a tym samym syntezę prostaglandyny E-2. Jednocześnie lek podany nawet 30 min po reperfuzji powodował przeżycie dużej części neuronów (71%) rejonu CA1. Dawki podawanej Monocykliny były jednak bardzo wysokie (trzydziestokrotnie wyższe od stosowanych w klinice). Dotychczas nie udowodniono, czy zahamowanie *in vivo* reakcji mikrogleju jest spowodowane bezpośrednim oddziaływaniem związku na mikroglej, czy też jest skutkiem zahamowania śmierci neuronów, a tym samym mniejszej reakcji mikrogleju.

Większość doświadczeń przeprowadzanych w celu oceny ochronnego działania Minocykliny w niedokrwieniu *in vivo* było wykonywanych w modelu ischemii ogniskowej u szczurów. W pracach tych prezentowane wyniki w większości potwierdzały ochronne działanie leku. Minocyklina wykazywała działanie ochronne podana nawet 4 godziny po ischemii (Yrjanheikki i wsp. 1999), a stosowana dootrzewnowo 12 godzin przed urazem mózgu lub 30 min. po urazie poprawiała koordynację ruchową zwierząt (Sanchez i wsp. 2001). Jednakże model ischemii ogniskowej różni się diametralnie od modelu krótkotrwałej 5' ischemii uogólnionej. Ischemia ogniskowa przebiega gwałtowniej i prowadzi do silnej reakcji zapalnej w ognisku zawału, stąd też efekt przeciwzapalny, a co z tym się wiąże, działanie ochronne Minocykliny, może być lepiej widoczne w tym modelu ischemii niż w modelu ischemii uogólnionej.

Tak rozbieżne wyniki dotyczące ochronnego działania Minocykliny wynikają nie tylko z różnic pomiędzy stosowanymi eksperymentalnymi modelami uszkodzenia ischemicznego. Na efekt ochronny leku wpływa również wiek i gatunek wybranych do doświadczenia zwierząt. Pomimo licznych prac opisujących działanie Minocykliny, trudno jest jednoznacznie ocenić efekt jej podania ze względu na wyraźne różnice pomiędzy zastosowanymi procedurami dotyczącymi eksperymentalnego modelu uszkodzenia, sposobu podania leku, dawki i czasu kuracji.

Pomimo kontrowersji wokół zastosowania Minocykliny w ostrym epizodzie niedokrwienia mózgu lek dzięki swoim opisywanym właściwościom przeciwzapalnym jest

http://rcin.org.pl

obecnie badany w grupie pacjentów z HD (http://www.huntington-study-grup.org). Pierwsze wyniki są obiecujące.

Minocyklina wykazuje silne działanie ochronne w krwotoku śródmózgowym i uszkodzeniu rdzenia kręgowego u gryzoni (Power i wsp. 2003, Wells i wsp. 2003). Dotychczas w leczeniu klinicznym stosuje się dawkę 3mg/kg/dobę. Dawki stosowane w eksperymentalnym modelu uszkodzenia rdzenia kręgowego u zwierzat są bardzo wysokie (44-90mg/kg/dobę). Taka terapia jest obarczona poważnymi powikłaniami związanymi z działaniem ototoksycznym tetracyklin. Efektem lekopochodnego uszkodzenia ucha środkowego są zaburzenia równowagi, zawroty głowy i nudności, które mogą maskować wycofywanie się zmian powstałych po epizodzie niedokrwienia mózgu. Po podawaniu Minocykliny opisano również wystąpienie idiopatycznego, indukowanego podaniem tetracyklin, wzrostu ciśnienia śródczaszkowego. W świetle przedstawionych informacji zastosowanie Minocykliny w udarach mózgu wydaje się być dość kontrowersyjne.

VI.B.4. Ocena działania protekcyjnego Diazepamu i możliwości jego zastosowania w niedokrwieniu mózgu

Diazepam jest używanym w klinice lekiem o działaniu przeciwdrgawkowym, przeciwlękowym, powodującym relaksację mięśni szkieletowych.

- Ocena działania protekcyjnego Diazepamu po uszkodzeniu wolnorodnikowym i ekscytotoksycznym *in vitro*

Wyniki naszych badań przeprowadzonych w organotypowej hodowli hipokampa szczura z udziałem Diazepamu wykazały jego działanie ochronne zarówno w uszkodzeniu ekscytotokscycznym, jak i po zainicjowaniu stresu wolnorodnikowego z przewagą działania ochronnego po uszkodzeniu wolnorodnikowym. Protekcyjne działanie Diazepamu w stosunku do neuronów rejonu CA1 hipokampa obserwowano nawet po podaniu leku po 90 minutach od uszkodzenia. Zarówno w modelu hodowli organotypowej, jak i w wyizolowanych mitochondriach poddanych uszkodzeniu wolnorodnikowemu (TBH), Diazepam w znaczącym stopniu hamował wypływ cytochromu c, a w hodowli organotypowej również aktywację kaspazy 3.

Obecnie znane są dwa mechanizmy działania leku. Diazepam jest agonistą receptora GABA A. Nasila transmisję hamującą w OUN, podtrzymując efekt hiperpolaryzacji wywołany przez kwas γ-aminomasłowy oraz indukuje polekową hipotermię.

http://rcin.org.pl

Jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za neuroprotekcyjne działanie związku jest oddziaływanie Diazepamu z receptorem GABA A. Receptor ten jest jednym z głównych receptorów dla hamujących neuroprzekaźników w OUN. Jego pobudzenie aktywuje kanał chlorkowy prowadząc do powstania hamującego potencjału postsynaptycznego (PSP) i do hiperpolaryzacji neuronu. Receptor ten poza miejscowym wiązaniem GABA posiada również oddzielne, ale działające kooperacyjnie miejsce wiążące dla barbituranów oraz tzw. miejsce α dla benzodiazepin, które po aktywacji nasilają hamujący efekt GABA. Miejsce (α) wiążące benzodiazepiny na receptorze GABA A nosi też nazwę receptora ośrodkowego (ang. central benzodiazepin receptor). W piśmiennictwie opisywano neuroprotekcyjne działanie Diazepamu w modelu eksperymentalnym 7-minutowego OGD z użyciem skrawków hipokampa. Po OGD i podaniu leku zaobserwowano powrót w ciągu 3 godzin znacznie obniżonego poziomu ATP do wyjściowego stanu. Efekt ten był całkowicie blokowany przez pikrotoksynę (antagonistę receptora GABA A), jednakże inny antagonista tego receptora – Flumazenil, nie znosił ochronnego działania Diazepamu (Galeffi i wsp. 2000).

Prowadząc hodowlę organotypową hipokampa w stałej temperaturze (36^0C) wykluczyliśmy w naszych doświadczeniach drugi z postulowanych mechanizmów działania leku, związany z indukowaniem hipotermii.

Wyniki naszych badań dotyczące blokowania przez Diazepam wypływu cytochromu c z poddanych uszkodzeniu wolnorodnikowemu mitochondriów wskazują na dodatkowy mechanizm działania leku. Ponieważ Diazepam wykazywał efekt ochronny w stosunku do wyizolowanych mitochondriów, przypuszczalnie dodatkowe działanie leku związane jest z bezpośrednim oddziaływaniem związku z innym typem receptora dla BZD, umiejscowionym w błonie mitochondrialnej – receptorem obwodowym (PBR – periferal benzodiazepine receptor). Receptor PBR zlokalizowany jest w zewnętrznej błonie mitochondrialnej i wchodzi w skład kompleksu MPT. Nasze wyniki są zgodne z obserwacjami poczynionymi przez Stoebner i wsp., którzy zaobserwowali, że komórki Jurkat, nieposiadające receptora PBR, po transfekcji wektorem z genem PBR, nabywały znaczącej oporności na uszkodzenie wywołane H_2O_2, czy UV (Stoebner i wsp. 2001). Na udział receptorów PBR w ochronie przed uszkodzeniem wolnorodnikowym wykazuje również wyższa ekspresję PBR w komórkach odpowiedzialnych za funkcję antyoksydacyjną (monocyty), niż w limfocytach. Aktywacja PBR powoduje nagłe i krótkotrwałe otwarcie MPT. Krótkotrwałe otwarcie, w odróżnieniu do długotrwałego nie prowadzi do wycieku białek proapoptotycznych i śmierci komórek (Kroemer i wsp. 1998), ale poprzez oddziaływanie na VDAC może wpływać na zwiększenie polaryzacji błony mitochondrialnej.

http://rcin.org.pl

Peryferyczne receptory dla benzodiazepin wpływają również na syntezę steroidów. Przeciwzapalne działanie leku poprzez oddziaływanie z PBR i zwiększenie syntezy sterydów może również wpływać na neuroprotekcyjne działanie Diazepamu w ischemii (Wilms i wsp. 2003).

- Ocena działania protekcyjnego Diazepamu na neurony rejonu CA1 w modelu przejściowej ischemii przodomózgowia u myszoskoczka mongolskiego

W naszych doświadczeniach wykazano, że Diazepam podany i.p. 30 i 90 minut po reperfuzji działa protekcyjnie w stosunku do neuronów rejonu CA1 w modelu przejściowej ischemii przodomózgowia u myszoskoczka mongolskiego. Również badania *in vitro* potwierdziły korzystne działanie tego leku.

Efekt hipotermiczny, wyeliminowany w naszych badaniach *in vitro*, w eksperymentalnym modelu zwierzęcym niewątpliwie może stanowić ważną składową działania protekcyjnego Diazepamu. Wiadomo, że sama hipotermia w eksperymentalnym modelu zwierzęcym uogólnionej ischemii zastosowana w czasie epizodu niedokrwienia, lub tuż po przywróceniu krążenia, wykazuje działanie protekcyjne. Obserwacje dotyczące przeżycia neuronów po ischemii i zastosowaniu hipotermii z opóźnieniem w stosunku do epizodu niedokrwienia są jednak bardzo różne (Detrich i wsp. 1993, Boris-Moller i wsp. 1989, Busto i wsp. 1987, Shuaib i wsp. 1992, Colbourne i wsp. 1994, Colbourne i wsp. 1995, Coimbra i wsp. 1992).

W naszej pracy potwierdziliśmy, że Diazepam znacznie obniża temperaturę ciała (z $36,6C^0$ do $29C^0$). Ten spadek temperatury utrzymuje się przez okres ok. 5 godzin. Niektórzy autorzy tłumaczą ochronne działanie Diazepamu jedynie tym efektem (Davies i wsp. 2004). W cytowanej pracy, po podaniu Diazepamu i utrzymywaniu stałej temperatury ciała u zwierząt, nie odnotowano w rejonie CA1 hipokampa znaczącego efektu ochronnego. Ponadto, jak podają autorzy, działanie ochronne wywołane podaniem Diazepamu nie różniło się od wyników uzyskanych po indukcji samej hipotermii. Całkowicie różne wyniki badań przedstawił Dowdwe i wsp. Opisał on istotne zwiększenie liczby przetrwałych neuronów w modelu ischemii ogniskowej u szczurów po zastosowaniu Diazepamu w warunkach normotermii (Dowdwe i wsp. 1999). Wiadomo również, że domózgowe podanie Diazepamu nie powoduje hipotermii, a jednak obniża śmierć neuronów (Schwartz-Bloom i wsp. 1995).

W naszych doświadczeniach zrezygnowaliśmy z badania efektu Diazepamu w normotermii ze względu na trudności natury metodycznej. Porównaliśmy natomiast efekt

http://rcin.org.pl

Diazepamu z efektem ochronnym otrzymanym po zastosowaniu hipotermii zewnątrzpochodnej o podobnym nasileniu. Hipotermia zewnątrzpochodna zastosowana przez nas zarówno po 20 min. po reperfuzji, jak również tuż po ischemii nie wykazała równie znamiennego efektu ochronnego, co podanie Diazepamu powodujące podobny efekt hipotermiczny. Brak wyraźnego działania ochronnego hipotermii w naszych doświadczeniach, może być spowodowany kilkoma czynnikami: [a)] czasem trwania hipotermii, [b)] samymi warunkami eksperymentu, [c)] błędem związanym z niewłaściwą klasyfikacją neuronów o nietypowych cechach morfologicznych, które przetrwały epizod niedokrwienia (opisaną w dalszej części rozdziału).

Hipotermia polekowa, powstała po podaniu Diazepamu, obniża temperaturę ciała na okres 5 godzin, po czym temperatura stopniowo powraca do stanu wyjściowego. Tymczasem z piśmiennictwa wiadomo, że ochronne działanie hipotermii zewnątrzpochodnej wymaga długotrwałego obniżenia temperatury przez co najmniej 12-24 godziny.

Powtarzanie pomiarów temperatury *per rectum* przez dłuższy czas jest stresujące i może pogłębiać neurotoksyczne efekty samej ischemii. Podanie Diazepamu wywołuje sedację i ułatwia zwierzętom znoszenie pomiarów.

Wśród neuronów, które wykazały uszkodzenie ischemiczne, występowały również takie, które posiadały jasną cytoplazmę, jądro o nieregularnym kształcie położone obwodowo, z rozmytą chromatyną. Ich klasyfikacja może być problematyczna, co udokumentowano na Ryc. 39. Podobny obraz chromatolizy neuronów obserwowany był po przedłużonej do 2 dni hipotermii przez Colbourne'a i wsp. (1999), a także po zastosowaniu niektórych antagonistów NMDA przez Warnera i wsp. (1991). Takie nieprawidłowe, ale żywe neurony w rejonie CA1 hipokampa obserwuje się przez co najmniej 4 tygodnie (Okazaki i wsp.1993). W wykonanych badaniach elektrofizjologicznych na ostrych skrawkach hipokampa uzyskanych ze zwierząt po ischemii i częściowej protekcji, komórki o cechach morfologicznych opisanych powyżej słabiej odpowiadały na bodźce z zewnątrz (Okazaki i wsp.1993). Los takich komórek jest niejasny. Po 6 miesiącach od ischemii w rejonie CA1 hipokampa nie obserwuje się komórek o takich cechach morfologicznych, co może oznaczać powrót tych neuronów do stanu fizjologicznego lub też ich eliminację. W pracach Schwartza i wsp. (1995) i Coulbourne'a i wsp. (1999) nie znaleziono w tych komórkach cech apoptozy. W modelu niedokrwienia mózgu u myszoskoczka mongolskiego Kirino i wsp. opisali neurony wykazujące różne cechy morfologiczne w wyniku ischemii mózgu (Kirino i wsp. 1982, Kirino i wsp. 1986). Między innymi w rejonie CA2 obserwowano komórki obrzęknięte, z jądrem rozmytym i położonym obwodowo. Ten typ zmian opisano jako „reactive changes" (RC) i porównano do

http://rcin.org.pl

chromatolizy. Po 21 dniach obserwowane wcześniej zmiany w budowie morfologicznej komórek są niewidoczne, a komórki przeżywają. Yamashima (1998) zaobserwował podobny obraz w rejonie CA1 hipokampa u gerbila. Centralna chromatoliza neuronów była również obserwowana w rejonie CA1 hipokampa w modelu ischemii u naczelnych po podaniu inhibitorów katepsyny (Tsuchiya i wsp. 1999). W naszych doświadczeniach oceniając cytoarchitekturę rejonu CA1 hipokampa myszoskoczka mongolskiego po zastosowaniu hipotermii zewnątrzpochodnej obserwowano dość wyraźny zarys rejonu, z bardziej regularnym ułożeniem neuronów w stosunku do rejonu CA1 hipokampa u zwierząt poddanych ischemii bez leczenia. Dokonując jednak oceny liczbowej komórek przetrwałych epizod niedokrwienia zaobserwowaliśmy w wiekszości neuronów średniego stopnia centralną chromatolizę. Jeżeli więc uznamy, że komórki o zmienionych cechach morfologicznych przeżywają, to w naszych badaniach liczba neuronów w rejonie CA1 po ischemii, w warunkach hipotermii jest znamiennie większa od liczby przetrwałych neuronów po ischemii bez dodatkowego leczenia.

Długie utrzymywanie niskiej temperatury ciała (31^0C-33^0C) może wywołać poważne działania uboczne w postaci zaburzenia rytmu, wykrzepianie, oraz zaburzenia krążenia w okresie ogrzewania. Ze względu na wielokierunkowe działanie Diazepamu, zastosowanie leku w miejsce zewnątrzpochodnej hipotermii, umożliwia osiągnięcie równoważnej neuroprotekcji przy krótszym czasie obniżonej temperatury ciała. Ponadto dzięki działaniu sedatywnemu leku znosi uboczne efekty hipotermii takie jak drżenia, czy stres. Shuaib i wsp. podkreślają w swojej pracy, że umiarkowana hipotermia w kombinacji z protekcją farmakologiczną jest bardziej efektywna niż sama hipotermia w modelu przejściowej ischemii (Shuaib i wsp. 1993).

Drugą istotną składową działania ochronnego Diazepamu na neurony po ischemii może być jego działanie związane z aktywacją transmisji hamującej poprzez oddziaływanie na receptor GABA A. W licznych pracach w modelu ischemii uogólnionej u myszoskoczka mongolskiego jak i w modelu ischemii ogniskowej u szczurów autorzy tłumaczyli działanie neuroprotekcyjne Diazepamu aktywacją receptora GABA A i wywołaną hiperpolaryzacją błony neuronów (Johansen i wsp. 1991, Shwartz i wsp. 1994 i Shwartz i wsp. 1995, Baldwin i wsp. 1993). Podczas ischemii poziom ekspresji receptora GABA A obniża się (Alicke i wsp. 1995) i podanie Diazepamu może mieć działanie kompensacyjne. Również wydaje się, że lek podany zaraz po epizodzie niedokrwienia nie wykazuje działania protekcyjnego (Sternau i wsp. 1989). Autorzy tłumaczą to wysyceniem dostępnych receptorów przez nadmiernie uwalniany w czasie ischemii (a także zaraz po niej) kwas γ-aminomasłowy. Dochodzi do jego

http://rcin.org.pl

akumulacji w przestrzeni zewnątrzkomórkowej w związku z zahamowaniem wychwytu zwrotnego zależnego od ATP, a pośrednio z deficytem energetycznym w komórce. Gdy następuje wysycenie receptora GABA A kwasem γ-aminomasłowym Diazepam nie wykazuje działania ochronnego (Tallman i wsp. 1980). Po ischemii poziom kwasu γ-aminomasłowego szybko spada. W związku z tymi obserwacjami Diazepam należy podawać, gdy stężenie kwasu γ-aminomasłowego powróci do podstawowego poziomu, czyli po ok. 30 min od reperfuzji. Wtedy lek może podtrzymywać aktywację receptora GABA A, zwiększać napływ jonów chlorkowych i w efekcie polaryzowć błonę komórkową.

Ochronne działanie Diazepamu było dotychczas wiązane głównie z opisanymi powyżej dwoma mechanizmami jego działania (hipotermicznym i sedatywnym). Wyniki naszych badań wskazują na istnienie dodatkowego mechanizmu ochronnego działania Diazepamu, związanego z bezpośrednim oddziaływaniem leku na błonę mitochondriów.

W prezentowanych przez nas badaniach *in vitro*, pomimo wykluczenia efektu hipotermicznego leku, obserwowaliśmy silne hamowanie wypływu cytochromu c i aktywacji kaspazy 3 po uszkodzeniu wolnorodnikowym lub ekscytotoksycznym i podaniu Diazepamu. Ponadto, bezpośredni efekt uszczelniający leku na błonę mitochondriów został uwidoczniony w naszych badaniach *in situ* na wyizolowanych mitochondriach poddanych działaniu TBH. Lek podany jednoczasowo, lub z opóźnieniem w stosunku do zainicjowania uszkodzenia wolnorodnikowego, znacząco zmniejszał wypływ cytochromu c.

Mechanizm oddziaływania Diazepamu na błonę mitochondrialną może być związany z opisywanym wcześniej receptorem PBR i działaniem leku poprzez ten receptor na regulację megakanału w mitochondriach. Prawdopodobnie Diazepam łącząc się z PBR działa w sposób analogiczny do CsA, blokując MTP, hamując wypływu cytochromu c oraz dalszą aktywację kaskady kaspaz. Według niektórych autorów zaobserwowany wzrost ekspresji PBR pomiędzy 3 a 7 dniem po reperfuzji może również prowadzić do nasilenia biosyntezy steroidów, a w konsekwencji może wpływać na ograniczenie reakcji zapalnej towarzyszącej procesowi niedokrwienia (Rao i wsp. 2001, Wilms i wsp. 2003).

W ostatnim czasie Diazepam przeszedł jako jeden z nielicznych leków do III fazy badań klinicznych http://www.strokecenter.org/trials. W badaniu EGAZI uczestniczyło 7 krajów w tym Polska. Badania rozpoczęto w 1999 roku, a zakończono w 2003 roku. Do programu zostało zakwalifikowanych 880 pacjentów, u których wystąpił ostry incydent niedokrwienia w ciągu ostatnich 12 godzin przed hospitalizacją. Chorzy otrzymywali 10mg diazepamu zaraz po przyjęciu do szpitala, a następnie 3x 10mg/dobę. Już podczas opracowywania moich wyników, w 2006 roku, opublikowano pierwsze dane z tych badań, w

http://rcin.org.pl

których podkreślono korzystny wpływ Diazepamu w ostrych epizodach niedokrwienia mózgu, oraz w udarze ogniskowym o etiologii zatorowej (embolic infarct). Podkreślono równocześnie, że u pacjentów z zawałem krwotocznym mózgu lek działał niekorzystnie, nasilając powikłania udaru pod postacią zapalenia płuc i zwiększając śmiertelność wśród chorych (Lodder i wsp. 2006).

http://rcin.org.pl

VII. WNIOSKI

1. Hodowla organotypowa skrawków hipokampa szczura (HOC) wydaje się być dobrym i powtarzalnym modelem do badań przesiewowych związków o potencjalnym działaniu neuroprotekcyjnym.
2. Opracowany model uszkodzenia wolnorodnikowego i ekscytotoksycznego w skrawkach HOC odwzorowuje zmiany zachodzące podczas epizodu niedokrwiennego *in situ*, dotyczące zarówno specyficznej lokalizacji uszkodzenia w rejonie CA1 hipokampa jak i opóźnionego czasu wystąpienia zmian.
3. Spośród badanych związków: CsA i Diazepam wykazują działanie protekcyjne w stosunku do neuronów sektora CA1, zarówno w uszkodzeniu wolnorodnikowym i ekscytotoksycznym *in vitro* jaki i uszkodzeniu ischemicznym *in vivo*
   - znaczącą komponentą mechanizmu protekcyjnego działania CsA jest uszczelnienie kanałów MTP w mitochondriach, zmniejszenie wypływu cytochromu c i aktywacji kaspazy 3.
   - za efekt neuroprotekcyjny Diazepamu odpowiedzialne jest, poza mechanizmem sedatywnym i hipotermicznym, także jego bezpośrednie „uszczelniające" oddziaływanie na błonę mitochondrialną.
4. Minocyklina, związek o szeroko dyskutowanym działaniu neuroprotekcyjnym w wielu chorobach neurodegeneracyjnych o przewlekłym przebiegu, w naszych doświadczeniach, pomimo zaobserwowanych pozytywnych efektów *in vitro*, nie wykazał ochronnego działania na neurony w przebiegu niedokrwienia przodomózgowia u myszoskoczka mongolskiego
5. Dalsze badania mające na celu porównanie działania neuroprotekcyjnego CsA i Diazepamu mogą przyczynić się do wyboru optymalnego postępowania terapeutycznego w zespołach chorobowych powikłanych ischemią. W świetle naszych wyników Diazepam wydaje się być obecnie najlepszym lekiem neuroprotekcyjnym, typowanym do dalszych badań klinicznych.

http://rcin.org.pl

VIII. PIŚMIENNICTWO

1. Alblas CL, Beneder PR, Bulens C. ransient global amnesia: indications for a syndrome involving cerebral venous stasis Ned Tijdschr Geneeskd. 2006 Jul 29;150(30):1685-8.

2. Alicke B, Schwartz-Bloom RD. Rapid down-regulation of GABAA receptors in the gerbil hippocampus following transient cerebral ischemia. J Neurochem. 1995 Dec;65(6):2808-11.

3. Aronson AL. Pharmacotherapeutics of the newer tetracyclines.J Am Vet Med Assoc. 1980 May 15;176(10 Spec No):1061-8.

4. Arvin KL, Han BH, Du Y, Lin SZ, Paul SM, Holtzman DM. Minocycline markedly protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. Ann Neurol. 2002 Jul;52(1):54-61.

5. Axelrod J. Studies on benzodiazepine receptors.Adv Biochem Psychopharmacol. 1980;21:277-83.

6. Bai H, Konat GW. Hydrogen peroxide mediates higher order chromatin degradation. Neurochem Int. 2003 Jan;42(2):123-9.

7. Banati RB, Kreutzberg GW. Flow cytometry: measurement of proteolytic and cytotoxic activity of microglia.Clin Neuropathol. 1993 Sep-Oct;12(5):285-8. Review.

8. Bantubungi K, Jacquard C, Greco A, Pintor A, Chtarto A, Tai K, Galas MC,Tenenbaum L, Deglon N, Popoli P, Minghetti L, Brouillet E, Brotchi J, Levivier M, Schiffmann SN, Blum D. Minocycline in phenotypic models of Huntington's disease. Neurobiol Dis. 2005 Feb;18(1):206-17.

9. Basile AS, Klein DC, Skolnick P. Characterization of benzodiazepine receptors in the bovine pineal gland:evidence for the presence of an atypical binding site. Brain Res. 1986 Nov;387(2):127-35.

10. Benavides J, Dubois A, Gotti B, Bourdiol F, Scatton B. Cellular distribution of omega 3 (peripheral type benzodiazepine) binding sites in the normal and ischaemic rat brain: an autoradiographic study with the photoaffinity ligand [3H]PK 14105. Neurosci Lett. 1990 Jun 22;114(1):32-8.

11. Benavides J, Quarteronet D, Imbault F, Malgouris C, Uzan A, Renault C, Dubroeucq MC, Gueremy C, Le Fur G. Labelling of "peripheral-type" benzodiazepine binding sites in the rat brain by using [3H]PK 11195, an isoquinoline carboxamide derivative: kinetic studies and autoradiographic localization.J Neurochem. 1983 Dec;41(6):1744-50.

12. Benjamins JA, Nedelkoska L, George EB. Protection of mature oligodendrocytes by inhibitors of caspases and calpains. Neurochem Res. 2003 Jan;28(1):143-52.

13. Bergstedt K, Wieloch T Changes in insulin-like growth factor 1 receptor density after transient cerebral ischemia in the rat. Lack of protection against ischemic brain damage following injection of insulin-like growth factor 1. J Cereb Blood Flow Metab. 1993 Sep;13(5):895-8.

http://rcin.org.pl

14. Beurdeley-Thomas A, Miccoli L, Oudard S, Dutrillaux B, Poupon MF. The peripheral benzodiazepine receptors: a review. J Neurooncol. 2000;46(1):45-56.

15. Bonelli RM, Hodl AK, Hofmann P, Kapfhammer HP. Neuroprotection in Huntington's disease: a 2-year study on minocycline.Int Clin Psychopharmacol. 2004 Nov;19(6):337-42.

16. Boris-Moller F, Wieloch T. The effect of 4 beta-phorbol-12,13-dibutyrate and staurosporine on the extracellular glutamate levels during ischemia in the rat striatum. Mol Chem Neuropathol. 1998 Aug-Dec;35(1-3):133-47.

17. Braestrup C, Squires RF. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H)diazepam binding. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Sep;74(9):3805-9.

18. Brana C, Benham C, Sundstrom L.A method for characterising cell death in vitro by combining propidium iodide staining with immunohistochemistry. Brain Res Brain Res Protoc. 2002 Oct;10(2):109-14.

19. Brogden RN, Speight TM, Avery GS.Drugs. Minocycline: A review of its antibacterial and pharmacokinetic properties and therapeutic use. 1975;9(4):251-91.

20. Buchan A, Pulsinelli WA. Hypothermia but not the N-methyl-D-aspartate antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. J Neurosci. 1990 Jan;10(1):311-6.

21. Busto R., Dietrich W.D., Globus M.Y. i wsp. The importance of brain temperature in cerebral ischemic injury. Stroke 1989; 20: 1113-1114.

22. Butcher SP, Henshall DC, Teramura Y, Iwasaki K, Sharkey J. Neuroprotective actions of FK506 in experimental stroke: in vivo evidence against an antiexcitotoxic mechanism. J Neurosci. 1997 Sep 15;17(18):6939-46.

23. Carayon P, Portier M, Dussossoy D, Bord A, Petitpretre G, Canat X, Le Fur G,Casellas P. Involvement of peripheral benzodiazepine receptors in the protection of hematopoietic cells against oxygen radical damage.Blood. 1996 Apr 15;87(8):3170-8.

24. Cardell M, Wieloch T. Time course of the translocation and inhibition of protein kinase C during complete cerebral ischemia in the rat. J Neurochem. 1993 Oct;61(4):1308-14.

25. Casaccia-Bonnefil P, Benedikz E, Rai R, Bergold PJ. Excitatory and inhibitory pathways modulate kainate excitotoxicity in hippocampal slice cultures. Neurosci Lett. 1993 May 14;154(1-2):5-8.

26. Chelli B, Lena A, Vanacore R, Pozzo ED, Costa B, Rossi L, Salvetti A,Scatena F, Ceruti S, Abbracchio MP, Gremigni V, Martini C. Peripheral benzodiazepine receptor ligands: mitochondrial transmembrane potential depolarization and apoptosis induction in rat C6 glioma cells.Biochem Pharmacol. 2004 Jul 1;68(1):125-34.

27. Chen M, Ona VO, Li M, Ferrante RJ, Fink KB, Zhu S, Bian J, Guo L, Farrell LA,Hersch SM, Hobbs W, Vonsattel JP, Cha JH, Friedlander RM. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. Nat Med. 2000 Jul;6(7):797-801.

http://rcin.org.pl

28. Chinnaiyan AM. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. Neoplasia. 1999 Apr;1(1):5-15.

29. Chinopoulos C, Adam-Vizi V. Depolarization of in situ mitochondria by hydrogen peroxide in nerve terminals. Ann N Y Acad Sci. 1999;893:269-72.

30. Chinopoulos C, Tretter L, Adam-Vizi V. Depolarization of in situ mitochondria due to hydrogen peroxide-induced oxidative stress in nerve terminals: inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase. J Neurochem. 1999 Jul;73(1):220-8.

31. Chinopoulos C, Tretter L, Adam-Vizi V. Reversible depolarization of in situ mitochondria by oxidative stress parallels a decrease in NAD(P)H level in nerve terminals. Neurochem Int. 2000 May;36(6):483-8.

32. Christophe M, Nicolas S. Mitochondria: a target for neuroprotective interventions in cerebral ischemia-reperfusion. Curr Pharm Des. 2006;12(6):739-57.

33. Coimbra C, Wieloch T. Hypothermia ameliorates neuronal survival when induced 2 hours after ischaemia in the rat. Acta Physiol Scand. 1992 Dec;146(4):543-4.

34. Coimbra C, Wieloch T. Moderate hypothermia mitigates neuronal damage in the rat brain when initiated several hours following transient cerebral ischemia. Acta Neuropathol (Berl). 1994;87(4):325-31.

35. Colbourne F, Corbett D. Delayed and prolonged post-ischemic hypothermia is neuroprotective in the gerbil.Brain Res. 1994 Aug 22;654(2):265-72.

36. Colbourne F, Corbett D. Delayed postischemic hypothermia: a six month survival study using behavioral and histological assessments of neuroprotection.J Neurosci. 1995 Nov;15(11):7250-60.

37. Colbourne F, Sutherland G, Corbett D.Postischemic hypothermia. A critical appraisal with implications for clinical treatment.Mol Neurobiol. 1997 Jun;14(3):171-201. Review.

38. Cornet S, Spinnewyn B, Delaflotte S, Charnet C, Roubert V, Favre C, Hider H,Chabrier PE, Auguet M. Lack of evidence of direct mitochondrial involvement in the neuroprotective effect of minocycline. Eur J Pharmacol. 2004 Nov 28;505(1-3):111-9.

39. Crain BJ, Westerkam WD, Harrison AH, Nadler JV.Selective neuronal death after transient forebrain ischemia in the Mongolian gerbil: a silver impregnation study.Neuroscience. 1988 Nov;27(2):387-402.

40. Crockard A, Iannotti F, Hunstock AT, Smith RD, Harris RJ, Symon L.Cerebral blood flow and edema following carotid occlusion in the gerbil.Stroke. 1980 Sep-Oct;11(5):494-8.

41. Crompton M, Costi A, Hayat L.Evidence for the presence of a reversible Ca2+-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. Biochem J. 1987 Aug 1;245(3):915-8.

42. Davies LM, MacLellan CL, Corbett DR, Colbourne F. Post-ischemic diazepam does not reduce hippocampal CA1 injury and does not improve hypothermic neuroprotection after forebrain ischemia in gerbils. Brain Res. 2004 Jul 9;1013(2):223-9.

http://rcin.org.pl

43. Dawson TM, Steiner JP, Dawson VL, Dinerman JL, Uhl GR, Snyder SH. Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Nov 1;90(21):9808-12.

44. Debanne D, Guerineau NC, Gahwiler BH, Thompson SM. Physiology and pharmacology of unitary synaptic connections between pairs of cells in areas CA3 and CA1 of rat hippocampal slice cultures. J Neurophysiol. 1995 Mar;73(3):1282-94.

45. Diguet E, Fernagut PO, Wei X, Du Y, Rouland R, Gross C, Bezard E, Tison F. Deleterious effects of minocycline in animal models of Parkinson's disease and Huntington's disease.Eur J Neurosci. 2004 Jun;19(12):3266-76.

46. Diguet E, Gross CE, Tison F, Bezard E. Rise and fall of minocycline in neuroprotection: need to promote publication of negative results.Exp Neurol. 2004 Sep;189(1):1-4.

47. Diguet E, Rouland R, Tison F. Minocycline is not beneficial in a phenotypic mouse model of Huntington's disease. Ann Neurol. 2003 Dec;54(6):841-2.

48. Dłużniewska J, Sarnowska A, Beręsewicz M, Johnson I, Srai SK, Ramesh B, Goldspink G, Gorecki DC, Zabłocka B. A strong neuroprotective effect of the autonomous C-terminal peptide of IGF-1 Ec (MGF) in brain ischemia.FASEB J. 2005 Nov;19(13):1896-8.

49. Domańska-Janik K, Bong P, Bronisz-Kowalczyk A, Zając H, Zabłocka B. AP1 transcriptional factor activation and its relation to apoptosis of hippocampal CA1 pyramidal neurons after transient ischemia in gerbils. J Neurosci Res. 1999 Sep 15;57(6):840-6.

50. Domańska-Janik K, Bronisz-Kowalczyk A, Zając H, Zablocka B. Interrelations between nuclear-factor kappa B activation, glial response and neuronal apoptosis in gerbil hippocampus after ischemia. Acta Neurobiol Exp (Wars). 2001;61(1):45-51.

51. Domańska-Janik K, Bużanska L, Dłużniewska J, Kozłowska H, Sarnowska A, Zabłocka B. Neuroprotection by cyclosporin A following transient brain ischemia correlates with the inhibition of the early efflux of cytochrome C to cytoplasm. Brain Res Mol Brain Res. 2004 Feb 5;121(1-2):50-9.

52. Domańska-Janik K, Zabłocka B, Zalewska T, Zając H. Phosphorylation of protein kinase C substrate proteins in rat hippocampal slices--effect of calpain inhibition. Acta Neurobiol Exp (Wars). 1998;58(4):247-52.

53. Domanska-Janik K, Zalewska T. Effect of brain ischemia on protein kinase C. J Neurochem. 1992 Apr;58(4):1432-9.

54. Domańska-Janik K. Niedokrwienie OUN-molekularne mechanizmy smierci neuronów. Farmacja Polska. 2000; 56(10): 488-496

55. Domercq M, Matute C. Neuroprotection by tetracyclines. Trends Pharmacol Sci. 2004 Dec;25(12):609-12.

56. Drake M, Friberg H, Boris-Moller F, Sakata K, Wieloch T. The immunosuppressant FK506 ameliorates ischaemic damage in the rat brain. Acta Physiol Scand. 1996 Oct;158(2):155-9.

http://rcin.org.pl

57. Duszczyk M, Gadamski R, Ziembowicz A, Danysz W, Łazarewicz JW. NMDA receptor antagonism does not inhibit induction of ischemic tolerance in gerbil brain in vivo.Neurotox Res. 2005;7(4):283-92.

58. Empey PE, McNamara PJ, Young B, Rosbolt MB, Hatton J. Cyclosporin A disposition following acute traumatic brain injury. J Neurotrauma. 2006 Jan;23(1):109-16.

59. Erecinska M, Silver IA. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. Prog Neurobiol. 1990;35(4):245-96.

60. Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. J Cell Physiol. 2000 Jan;182(1):41-9.

61. Friberg H, Ferrand-Drake M, Bengtsson F, Halestrap AP, Wieloch T. Cyclosporin A, but not FK506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. J Neurosci. 1998 Jul 15;18(14):5151-9.

62. Gabler WL, Smith J, Tsukuda N. Comparison of doxycycline and a chemically modified tetracycline inhibition of leukocyte functions.Res Commun Chem Pathol Pharmacol. 1992 Nov;78(2):151-60.

63. Gadamski R, Mossakowski MJ. Asymmetric damage of the CA1 sector of Ammon's horn after short-term forebrain ischemia in Mongolian gerbils.Neuropatol Pol. 1992;30(3-4):209-19.

64. Gahwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM. Organotypic slice cultures: a technique has come of age. Trends Neurosci. 1997 Oct;20(10):471-7.

65. Galeffi F, Sinnar S, Schwartz-Bloom RD. Diazepam promotes ATP recovery and prevents cytochrome c release in hippocampal slices after in vitro ischemia. J Neurochem. 2000 Sep;75(3):1242-9.

66. Gavish M, Vega S, Zamir D. NMR study of the diluted-magnetic-semiconductor alloys Cd1-xFexTe.Phys Rev B Condens Matter. 1993 Jul 15;48(4):2191-2199.

67. Goldberg MP, Choi DW. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture:calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. J Neurosci. 1993 Aug;13(8):3510-24.

68. Golub LM, Ramamurthy NS, Llavaneras A, Ryan ME, Lee HM, Liu Y, Bain S, Sorsa T A chemically modified nonantimicrobial tetracycline (CMT-8) inhibits gingival matriks metalloproteinases, periodontal breakdown, and extra-oral bone loss in ovariectomized rats.Ann N Y Acad Sci. 1999 Jun 30;878:290-310.

69. Goni-Allo B, Ramos M, Jordan J, Aguirre N. In vivo studies on the protective role of minocycline against excitotoxicity caused by malonate or N-methyl-d-aspartate. Exp Neurol. 2005 Feb;191(2):326-30.

70. Guerin C, Laterra J, Masnyk T, Golub LM, Brem H. Selective endothelial growth inhibition by tetracyclines that inhibit collagenase. Biochem Biophys Res Commun. 1992 Oct 30;188(2):740-5.

http://rcin.org.pl

71. Hagerdal M, Harp J, Nilsson L, Siesjo BK. The effect of induced hypothermia upon oxygen consumption in the rat brain. J Neurochem. 1975 Feb;24(2):311-6.

72. Hu ZJ, Wang SM, Wang YH, Huang XL. Quantitative assessment of the degree of deep venous reflux of the lower extremities. Asian J Surg. 2003 Apr;26(2):108-11.

73. Ide T, Morikawa E, Kirino T. An immunosuppressant, FK506, protects hippocampal neurons from forebrain ischemia in the mongolian gerbil. Neurosci Lett. 1996 Feb 9;204(3):157-60.

74. Ide T, Morikawa E, Kirino T. An immunosuppressant, FK506, protects hippocampal neurons from forebrain ischemia in the mongolian gerbil. Neurosci Lett. 1996 Feb 9;204(3):157-60.

75. Imberti R, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporin A and trifluoperazine. J Pharmacol Exp Ther. 1993 Apr;265(1):392-400.

76. Imberti R, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ.Synergism of cyclosporin A and phospholipase inhibitors in protection against lethal injury to rat hepatocytes from oxidant chemicals.Res Commun Chem Pathol Pharmacol. 1992 Oct;78(1):27-38.

77. Jayakumar AR, Panickar KS, Norenberg MD. Effects on free radical generation by ligands of the peripheral benzodiazepine receptor in cultured neural cells. J Neurochem. 2002 Dec;83(5):1226-34.

78. Johansen FF, Christensen T, Jensen MS, Valente E, Jensen CV, Nathan T, Lambert JD, Diemer NH. Inhibition in postischemic rat hippocampus: GABA receptors, GABA release, and inhibitory postsynaptic potentials. Exp Brain Res. 1991;84(3):529-37.

79. Jorda EG, Jimenez A, Verdaguer E, Canudas AM, Folch J, Sureda FX, Camins A, Pallas M. Evidence in favour of a role for peripheral-type benzodiazepine receptor ligands in amplification of neuronal apoptosis. Apoptosis. 2005 Jan;10(1):91-104.

80. Kamińska B, Gaweda-Walerych K, Zawadzka M. Molecular mechanisms of neuroprotective action of immunosuppressants--facts and hypotheses. J Cell Mol Med. 2004 Jan-Mar;8(1):45-58.

81. Kim JJ, Accili D. Signalling through IGF-1 and insulin receptors: where is the specificity? Growth Horm IGF Res. 2002 Apr;12(2):84-90.

82. Kirino T, Sano K. Fine structural nature of delayed neuronal death following ischemia in the gerbil hippocampus.Acta Neuropathol (Berl). 1984;62(3):209-18.

83. Kirino T, Sano K. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia.Acta Neuropathol (Berl). 1984;62(3):201-8.

84. Kirino T, Tamura A, Sano K. A reversible type of neuronal injury following ischemia in the gerbil hippocampus.Stroke. 1986 May-Jun;17(3):455-9.

85. Kirino T, Tamura A, Sano K. Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia.Acta Neuropathol (Berl). 1984;64(2):139-47.

http://rcin.org.pl

86. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia.Brain Res. 1982 May 6;239(1):57-69.

87. Kirino T. Ischemic tolerance. J Cereb Blood Flow Metab. 2002 Nov;22(11):1283-96.

88. Kirino Y, Shimizu H. Ca2+-induced Ca2+ release from fragmented sarcoplasmic reticulum: a comparison with skinned muscle fiber studies.J Biochem (Tokyo). 1982 Oct;92(4):1287-96.

89. Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, Handa N, Fukunaga R, Kimura K, Mikoshiba K, et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. Brain Res. 1990 Sep 24;528(1):21-4.

90. Kontos HA. Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willis lecture. Stroke. 2001 Nov;32(11):2712-6.

91. Kraus RL, Pasieczny R, Lariosa-Willingham K, Turner MS, Jiang A, Trauger JW. Antioxidant properties of minocycline: neuroprotection in an oxidative stress assay and direct radical-scavenging activity. J Neurochem. 2005 Aug;94(3):819-27.

92. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. Nat Med. 2000 May;6(5):513-9.

93. Kroemer G. The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways.Cell Death Differ. 1998 Jun;5(6):547.

94. Kroon AM, Dontje BH, Holtrop M, Van den Bogert C. The mitochondrial genetic system as a target for chemotherapy: tetracyclines as cytostatics. The mitochondrial genetic system as a target for chemotherapy: tetracyclines as cytostatics.

95. Łazarewicz J. Pobudzające aminokwasy w niedokrwieniu mózgu. Farmacja Polska. 2000; 56(10): 476-487

96. Łazarewicz JW, Salinska E, Speina E, Gadamski R. Effects of MK-801 and ganglioside GM1 on postischemic prostanoid release and hippocampal lesion in gerbil brain. Acta Neurobiol Exp (Wars). 1994;54(4):293-305.

97. Łazarewicz JW, Ziembowicz A, Matyja E, Stafiej A, Zieminska E.Homocysteine-evoked 45Ca release in the rabbit hippocampus is mediated by both NMDA and group I metabotropic glutamate receptors: in vivo microdialysis study. Neurochem Res. 2003 Feb;28(2):259-69.

98. Lazzarini R, Maiorka PC, Liu J, Papadopoulos V, Palermo-Neto J. Diazepam effects on carrageenan-induced inflammatory paw edema in rats: role of nitric oxide. Life Sci. 2006 May 22;78(26):3027-34. Epub 2006 Jan 24.

99. Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. Nature. 1999 Jun 24;399(6738 Suppl):A7-14.

100. Lees KR. Neuroprotection is unlikely to be effective in humans using current trial designs: an opposing view. Stroke. 2002 Jan;33(1):308-9.

101. Leist M, Nicotera P. The shape of cell death.Biochem Biophys Res Commun. 1997 Jul 9;236(1):1-9. Review.

http://rcin.org.pl

102. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis.J Exp Med. 1997 Apr 21;185(8):1481-6.

103. Leist M, Volbracht C, Kuhnle S, Fava E, Ferrando-May E, Nicotera P. Caspase-mediated apoptosis in neuronal excitotoxicity triggered by nitric oxide.Mol Med. 1997 Nov;3(11):750-64.

104. Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition and the calcium, oxygen and pH paradoxes: one paradox after another.Cardiovasc Res. 1999 Dec;44(3):470-3. Review.

105. Leventhal L, Sortwell CE, Hanbury R, Collier TJ, Kordower JH, Palfi S. Cyclosporin A protects striatal neurons in vitro and in vivo from 3-nitropropionic acid toxicity.J Comp Neurol. 2000 Oct 2;425(4):471-8.

106. Lin S, Wei X, Xu Y, Yan C, Dodel R, Zhang Y, Liu J, Klaunig JE, Farlow M, Du Y. Minocycline blocks 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity and free radical production in rat cerebellar granule neurons.Life Sci. 2003 Feb 21;72(14):1635-41.

107. Liu QY, Schaffner AE, Li YX, Dunlap V, Barker JL. Upregulation of GABAA current by astrocytes in cultured embryonic rat hippocampal neurons. J Neurosci. 1996 May 1;16(9):2912-23.

108. Liu XF, Fawcett JR, Thorne RG, Frey WH 2nd. Non-invasive intranasal insulin-like growth factor-I reduces infarct volume and improves neurologic function in rats following middle cerebral artery occlusion. Neurosci Lett. 2001 Aug 3;308(2):91-4.

109. Lodder J, van Raak L, Hilton A, Hardy E, Kessels A; EGASIS Study Group. Diazepam to improve acute stroke outcome: results of the early GABA-Ergic activation study in stroke trial. a randomized double-blind placebo-controlled trial. Cerebrovasc Dis. 2006;21(1-2):120-7. Epub 2005 Dec 9.

110. Loscher W, Wlaz P, Szabo L.Focal ischemia enhances the adverse effect potential of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in rats. Neurosci Lett. 1998 Jan 2;240(1):33-6.

111. Mackay KB, Loddick SA, Naeve GS, Vana AM, Verge GM, Foster AC. Neuroprotective effects of insulin-like growth factor-binding protein ligand inhibitors in vitro and in vivo. J Cereb Blood Flow Metab. 2003 Oct;23(10):1160-7.

112. Mariak Z, Łysoń T., Rudziński W. Hypothermia as a neuroprotective agent. Neurologia i Neurochirurgia Polska 2004; 38, 1: 51–54

113. Matsushima K, Hakim AM. Transient forebrain ischemia protects against subsequent focal cerebral ischemia without changing cerebral perfusion. Stroke. 1995 Jun;26(6):1047-52.

114. Miyachi Y, Yoshioka A, Imamura S, Niwa Y. Effect of antibiotics on the generation of reactive oxygen species. J Invest Dermatol. 1986 Apr;86(4):449-53.

115. Moss J, Garrison S, Oppenheimer NJ, Richardson SH. NAD-dependent ADP-ribosylation of arginine and proteins by Escherichia coli heat-labile enterotoxin. J Biol Chem. 1979 Jul 25;254(14):6270-2.

http://rcin.org.pl

116. Mukhin AG, Papadopoulos V, Costa E, Krueger KE. Mitochondrial benzodiazepine receptors regulate steroid biosynthesis.Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Dec;86(24):9813-6.

117. Muller D, Wang C, Skibo G, Toni N, Cremer H, Calaora V, Rougon G, Kiss JZ. PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. Neuron. 1996 Sep;17(3):413-22.

118. Nagano I, Shiote M, Murakami T, Kamada H, Hamakawa Y, Matsubara E, Yokoyama M, Moritaz K, Shoji M, Abe K. Beneficial effects of intrathecal IGF-1 administration in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Neurol Res. 2005 Oct;27(7):768-72.

119. Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell. 1997 Feb 7;88(3):355-65.

120. Nakase H, Heimann A, Uranishi R, Riepe MW, Kempski O. Early-onset tolerance in rat global cerebral ischemia induced by a mitochondrial inhibitor. Neurosci Lett. 2000 Aug 25;290(2):105-8.

121. Nichols RA, Suplick GR, Brown JM. Calcineurin-mediated protein dephosphorylation in brain nerve terminals regulates the release of glutamate. J Biol Chem. 1994 Sep 23;269(38):23817-23.

122. Nieminen AL, Petrie TG, Lemasters JJ, Selman WR. Cyclosporin A delays mitochondrial depolarization induced by N-methyl-D-aspartate in cortical neurons: evidence of the mitochondrial permeability transition. Neuroscience. 1996 Dec;75(4):993-7.

123. Nieminen AL, Saylor AK, Tesfai SA, Herman B, Lemasters JJ. Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. Biochem J. 1995 Apr 1;307 (Pt 1):99-106.

124. Nishinaka Y, Sugiyama S, Yokota M, Saito H, Ozawa T. Protective effect of FK506 on ischemia/reperfusion-induced myocardial damage in canine heart. J Cardiovasc Pharmacol. 1993 Mar;21(3):448-54.

125. Nurse S, Corbett D. Neuroprotection after several days of mild, drug-induced hypothermia. J Cereb Blood Flow Metab. 1996 May;16(3):474-80.

126. Ogura K., Takayasu M., Dacey R.G. Effects of hypothermia and hyperthermia on the reactivity of rat intracerebral arterioles in vitro. J Neurosurg 1991; 75: 433-439.

127. Okazaki M., Neill K., Crain B., Nadler J. Loss and recovery of synaptic response in hippocampal area CA1 partially protected from ischemic damage. Soc. Neurosci. Abstr. 19, 1668

128. Ouyang YB, Tan Y, Comb M, Liu CL, Martone ME, Siesjo BK, Hu BR. Survival- and death-promoting events after transient cerebral ischemia: phosphorylation of Akt, release of cytochrome C and Activation of caspase-like proteases. J Cereb Blood Flow Metab. 1999 Oct;19(10):1126-35.

129. Pastorino JG, Simbula G, Gilfor E, Hoek JB, Farber JL. Protoporphyrin IX, an endogenous ligand of the peripheral benzodiazepine receptor, potentiates induction of the mitochondrial permeability transition and the killing of cultured hepatocytes by rotenone. J Biol Chem. 1994 Dec 9;269(49):31041-6.

http://rcin.org.pl

130. Pera J. Tolerancja mózgu na niedokrwienie. Postępy Biologii Komórki. 2005; 32(2) 151-167.

131. Pi R, Li W, Lee NT, Chan HH, Pu Y, Chan LN, Sucher NJ, Chang DC, Li M, Han Y. Minocycline prevents glutamate-induced apoptosis of cerebellar granule neurons by differential regulation of p38 and Akt pathways. J Neurochem. 2004 Dec;91(5):1219-30.

132. Pias EK, Aw TY. Early redox imbalance mediates hydroperoxide-induced apoptosis in mitotic competent undifferentiated PC-12 cells. Cell Death Differ. 2002 Sep;9(9):1007-16.

133. Power C, Henry S, Del Bigio MR, Larsen PH, Corbett D, Imai Y, Yong VW, Peeling J.Intracerebral hemorrhage induces macrophage activation and matriks metalloproteinases. Ann Neurol. 2003 Jun;53(6):731-42.

134. Preston E, Foster DO. Evidence for pore-like opening of the blood-brain barrier following forebrain ischemia in rats. Brain Res. 1997 Jun 27;761(1):4-10.

135. Preston E, Webster J. A two-hour window for hypothermic modulation of early events that impact delayed opening of the rat blood-brain barrier after ischemia. Acta Neuropathol (Berl). 2004 Nov;108(5):406-12. Epub 2004 Sep 4.

136. Pringle AK, Iannotti F, Wilde GJ, Chad JE, Seeley PJ, Sundstrom LE. Neuroprotection by both NMDA and non-NMDA receptor antagonists in in vitro ischemia. Brain Res. 1997 Apr 25;755(1):36-46.

137. Pringle AK, Sundstrom LE, Wilde GJ, Williams LR, Iannotti F. Brain-derived neurotrophic factor, but not neurotrophin-3, prevents ischaemia-induced neuronal cell death in organotypic rat hippocampal slice cultures. Neurosci Lett. 1996 Jun 28;211(3):203-6.

138. Pulsinelli WA, Waldman S, Rawlinson D, Plum F. Moderate hyperglycemia augments ischemic brain damage: a neuropathologic study in the rat. Neurology. 1982 Nov;32(11):1239-46.

139. Raghavendra V, Kaur G, Kulkarni SK. Anti-depressant action of melatonin in chronic forced swimming-induced behavioral despair in mice, role of peripheral benzodiazepine receptor modulation.Eur Neuropsychopharmacol. 2000 Dec;10(6):473-81.

140. Raghavendra V, Singh V, Kulkarni SK, Agrewala JN. Melatonin enhances Th2 cell mediated immune responses: lack of sensitivity to reversal by naltrexone or benzodiazepine receptor antagonists. Mol Cell Biochem. 2001 May;221(1-2):57-62.

141. Rao VL, Bowen KK, Rao AM, Dempsey RJ. Up-regulation of the peripheral-type benzodiazepine receptor expression and [(3)H]PK11195 binding in gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. J Neurosci Res. 2001 Jun 1;64(5):493-500.

142. Rao VL, Bowen KK, Rao AM, Dempsey RJ.Up-regulation of the peripheral-type benzodiazepine receptor expression and [(3)H]PK11195 binding in gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia.J Neurosci Res. 2001 Jun 1;64(5):493-500.

143. Ray AM, Owen DE, Evans ML, Davis JB, Benham CD. Caspase inhibitors are functionally neuroprotective against oxygen glucose deprivation induced CA1 death in rat organotypic hippocampal slices. Brain Res. 2000 Jun 9;867(1-2):62-9.

http://rcin.org.pl

144. Rothman SM, Olney JW. Excitotoxicity and the NMDA receptor-still lethal after eight years. Trends Neurosci. 1995 Feb;18(2):57-8.

145. Rytter A, Cardoso CM, Johansson P, Cronberg T, Hansson MJ, Mattiasson G, Elmer E, Wieloch T. The temperature dependence and involvement of mitochondria permeability transition and caspase activation in damage to organotypic hippocampal slices following in vitro ischemia. J Neurochem. 2005 Nov;95(4):1108-17

146. Saikumar P, Dong Z, Patel Y, Hall K, Hopfer U, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury.Oncogene. 1998 Dec 31;17(26):3401-15.

147. Saikumar P, Dong Z, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury.Oncogene. 1998 Dec 24;17(25):3341-9.

148. Sakata A, Tamai I, Kawazu K, Deguchi Y, Ohnishi T, Saheki A, Tsuji A. In vivo evidence for ATP-dependent and P-glycoprotein-mediated transport of cyclosporin A at the blood-brain barrier. Biochem Pharmacol. 1994 Nov 16;48(10):1989-92.

149. Sanchez Mejia RO, Ona VO, Li M, Friedlander RM. Minocycline reduces traumatic brain injury-mediated caspase-1 activation, tissue damage, and neurological dysfunction. Neurosurgery. 2001 Jun;48(6):1393-9; discussion 1399-401.

150. Sarnowska A. Application of organotypic hippocampal culture for study of selective neuronal death. Folia Neuropathol. 2002;40(2):101-6.

151. Schubert A. Side effects of mild hypothermia. J Neurosurg Anesthesiol 1995; 7: 139-147.

152. Schwartz RD, Huff RA, Yu X, Carter ML, Bishop M. Postischemic diazepam is neuroprotective in the gerbil hippocampus Brain Res. 1994 May 30;647(1):153-60.

153. Schwartz RD, Yu X, Katzman MR, Hayden-Hixson DM, Perry JM. Diazepam, given postischemia, protects selectively vulnerable neurons in the rat hippocampus and striatum.J Neurosci. 1995 Jan;15(1 Pt 2):529-39.

154. Schwartz-Bloom RD, McDonough KJ, Chase PJ, Chadwick LE, Inglefield JR, Levin ED. Long-term neuroprotection by benzodiazepine full versus partial agonists after transient cerebral ischemia in the gerbil. J Cereb Blood Flow Metab. 1998 May;18(5):548-58.

155. Shuaib A, Ijaz S, Kalra J, Code W. During repetitive forebrain ischemia, post-ischemic hypothermia protects neurons from damage.Can J Neurol Sci. 1992 Nov;19(4):428-32.

156. Shuaib A, Sochocka E, Code W, Hertz L. Hypothermia protects astrocytes during ischemia in cell culture.Neurosci Lett. 1992 Oct 26;146(1):69-71.

157. Shuaib A, Sochocka E, Ishaqzay R, Hertz L, Code WE. Protective effect of hypothermia during ischemia in neural cell cultures.Neurochem Res. 1993 Jun;18(6):663-5.

158. Smith DL, Woodman B, Mahal A, Sathasivam K, Ghazi-Noori S, Lowden PA, Bates GP, Hockly E. Minocycline and doxycycline are not beneficial in a model of Huntington's disease. Ann Neurol. 2003 Aug;54(2):186-96.

http://rcin.org.pl

159. Steiner JP, Dawson TM, Fotuhi M, Glatt CE, Snowman AM, Cohen N, Snyder SH. High brain densities of the immunophilin FKBP colocalized with calcineurin. Nature. 1992 Aug 13;358(6387):584-7.

160. Stephenson DT, Schober DA, Smalstig EB, Mincy RE, Gehlert DR, Clemens JA. Peripheral benzodiazepine receptors are colocalized with activated microglia following transient global forebrain ischemia in the rat.J Neurosci. 1995 Jul;15(7 Pt 2):5263-74.

161. Stoebner PE, Carayon P, Casellas P, Portier M, Lavabre-Bertrand T, Cuq P, Cano JP, Meynadier J, Meunier L. Transient protection by peripheral benzodiazepine receptors during the early events of ultraviolet light-induced apoptosis. Cell Death Differ. 2001 Jul;8(7):747-53.

162. Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue.J Neurosci Methods. 1991 Apr;37(2):173-82.

163. Szewczyk A, Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target. Pharmacol Rev. 2002 Mar;54(1):101-27.

164. Tallman JF, Gallager DW, Mallorga P, Thomas JW, Strittmatter W, Hirata F, Targonski PV, Schiebel NE, Lucchinetti CN Minocycline-associated Idiopathic Intracranial Hypertension In A Patient Presenting To The Emergency Department. Internet J Emergency and Intensive Care Medicine. 2002 Volume 6 Number 1.

165. Thompson CL, Pollard S, Stephenson FA. Developmental regulation of expression of GABAA receptor alpha 1 and alpha 6 subunits in cultured rat cerebellar granule cells. Neuropharmacology. 1996;35(9-10):1337-46.

166. Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinanen R, Koistinaho J.Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. J Neurosci. 2001 Apr 15;21(8):2580-8.

167. Tikka T, Usenius T, Tenhunen M, Keinanen R, Koistinaho J. Tetracycline derivatives and ceftriaxone, a cephalosporin antibiotic, protect neurons against apoptosis induced by ionizing radiation. J Neurochem. 2001 Sep;78(6):1409-14.

168. Tikka TM, Koistinaho JE. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. J Immunol. 2001 Jun 15;166(12):7527-33.

169. Tisherman S.A., Rodriguez A., Safar P. Therapeutic hypothermia in traumatology. Surg Clin North Am 1999; 79: 1269-1289.

170. Traynor BJ, Bruijn L, Conwit R, Beal F, O'Neill G, Fagan SC, Cudkowicz ME. Neuroprotective agents for clinical trials in ALS: a systematic assessment. Neurology. 2006 Jul 11;67(1):20-7.

171. Tsuchiya K, Kohda Y, Yoshida M, Zhao L, Ueno T, Yamashita J, Yoshioka T, Kominami E, Yamashima T. Postictal blockade of ischemic hippocampal neuronal death in primates using selective cathepsin inhibitors. Exp Neurol. 1999 Feb;155(2):187-94.

172. Tsuji A, Tamai I, Sakata A, Tenda Y, Terasaki T. Restricted transport of cyclosporin A across the blood-brain barrier by a multidrug transporter, P-glycoprotein. Biochem Pharmacol. 1993 Sep 14;46(6):1096-9.

http://rcin.org.pl

173. Tsuji M, Wilson MA, Lange MS, Johnston MV. Minocycline worsens hypoxic-ischemic brain injury in a neonatal mouse model.Exp Neurol. 2004 Sep;189(1):58-65.

174. Uchino H, Elmer E, Uchino K, Li PA, He QP, Smith ML, Siesjo BK. Amelioration by cyclosporin A of brain damage in transient forebrain ischemia in the rat. Brain Res. 1998 Nov 23;812(1-2):216-26.

175. Uchino H, Elmer E, Uchino K, Lindvall O, Siesjo BK. Cyclosporin A dramatically ameliorates CA1 hippocampal damage following transient forebrain ischaemia in the rat. Acta Physiol Scand. 1995 Dec;155(4):469-71.

176. Uchino H, Ishii N, Shibasaki F. Calcineurin and cyclophilin D are differential targets of neuroprotection by immunosuppressants CsA and FK506 in ischemic brain damage. Acta Neurochir Suppl. 2003;86:105-11.

177. Uchino H, Minamikawa-Tachino R, Kristian T, Perkins G, Narazaki M, Siesjo BK,Shibasaki F. Differential neuroprotection by cyclosporin A and FK506 following ischemia corresponds with differing abilities to inhibit calcineurin and the mitochondrial permeability transition. Neurobiol Dis. 2002 Aug;10(3):219-33.

178. Vachon P, Beaudry F, Marier JF, Ste-Marie L, Montgomery J. Cyclosporin A in blood and brain tissue following intra-carotid injections in normal and stroke-induced rats. Brain Res. 2002 Jul 5;943(1):1-8.

179. Vincent AM, Feldman EL. Control of cell survival by IGF signaling pathways. Growth Horm IGF Res. 2002 Aug;12(4):193-7.

180. Vincent AM, Mobley BC, Hiller A, Feldman EL. IGF-1 prevents glutamate-induced motor neuron programmed cell death. Neurobiol Dis. 2004 Jul;16(2):407-16.

181. Wang CX, Yang T, Noor R, Shuaib A. Delayed minocycline but not delayed mild hypothermia protects against embolic stroke. BMC Neurol. 2002 Apr 18;2:2.

182. Wang CX, Yang T, Shuaib A. Effects of minocycline alone and in combination with mild hypothermia in embolic stroke. Brain Res. 2003 Feb 14;963(1-2):327-9.

183. Wang X, Zhu S, Drozda M, Zhang W, Stavrovskaya IG, Cattaneo E, Ferrante RJ, Kristal BS, Friedlander RM. Minocycline inhibits caspase-independent and -dependent mitochondrial cell death pathways in models of Huntington's disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Sep 2;100(18):10483-7. Epub 2003 Aug 20.

184. Warner MA, Nadler JV, Crain BJ. Effects of NMDA receptor antagonists and body temperature in the gerbil carotid occlusion model of transient forebrain ischemia.Prog Clin Biol Res. 1990;361:409-14.

185. Warner MA, Neill KH, Nadler JV, Crain BJ. Regionally selective effects of NMDA receptor antagonists against ischemic brain damage in the gerbil. J Cereb Blood Flow Metab. 1991 Jul;11(4):600-10.

186. Wells JE, Hurlbert RJ, Fehlings MG, Yong VW. Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. Brain. 2003 Jul;126(Pt 7):1628-37. Epub 2003 Jun 4.

http://rcin.org.pl

187. Whiteman M, Halliwell B. Prevention of peroxynitrite-dependent tyrosine nitration and inactivation of alpha1-antiproteinase by antibiotics. Free Radic Res. 1997 Jan;26(1):49-56.

188. Wilms H, Claasen J, Rohl C, Sievers J, Deuschl G, Lucius R. Involvement of benzodiazepine receptors in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases: evidence from activated microglial cells in vitro. Neurobiol Dis. 2003 Dec;14(3):417-24.

189. Xu L, Fagan SC, Waller JL, Edwards D, Borlongan CV, Zheng J, Hill WD, Feuerstein G, Hess DC. Low dose intravenous minocycline is neuroprotective after middle cerebral artery occlusion-reperfusion in rats. BMC Neurol. 2004 Apr 26;4:7.

190. Xu L, Fagan SC, Waller JL, Edwards D, Borlongan CV, Zheng J, Hill WD, Feuerstein G, Hess DC. Low dose intravenous minocycline is neuroprotective after middle cerebral artery occlusion-reperfusion in rats.BMC Neurol. 2004 Apr 26;4:7.

191. Yakovlev AG, Faden AI. Mechanisms of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies. NeuroRx. 2004 Jan;1(1):5-16.

192. Yamashima T, Kohda Y, Tsuchiya K, Ueno T, Yamashita J, Yoshioka T, Kominami E. Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based on 'calpain-cathepsin hypothesis'. Eur J Neurosci. 1998 May;10(5):1723-33.

193. Yan YP, Sailor KA, Vemuganti R, Dempsey RJ. Insulin-like growth factor-1 is an endogenous mediator of focal ischemia-induced neural progenitor proliferation. Eur J Neurosci. 2006 Jul;24(1):45-54.

194. Yoshimoto T, Siesjo BK. Posttreatment with the immunosuppressant cyclosporin A in transient focal ischemia. Brain Res. 1999 Aug 28;839(2):283-91.

195. Yoshimoto T, Uchino H, He QP, Li PA, Siesjo BK. Cyclosporin A, but not FK506, prevents the downregulation of phosphorylated Akt after transient focal ischemia in the rat. Brain Res. 2001 Apr 27;899(1-2):148-58.

196. Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hokfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Dec 22;95(26):15769-74.

197. Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hokfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Dec 22;95(26):15769-74.

198. Yrjanheikki J, Tikka T, Keinanen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Nov 9;96(23):13496-500.

199. Yukie M, Yamaguchi K, Yamashima T. Impairments in recognition memory for object and for location after transient brain ischemia in monkeys. Rev Neurosci. 2006;17(1-2):201-14.

http://rcin.org.pl

200. Zabłocka B, Łukasiuk K, Łazarewicz JW, Domańska-Janik K. Modulation of ischemic signal by antagonists of N-methyl-D-aspartate, nitric oxide synthase, and platelet-activating factor in gerbil hippocampus.J Neurosci Res. 1995 Feb 1;40(2):233-40.

201. Zalewska T, Ziemka-Nalecz M, Sarnowska A, Domanska-Janik K. Involvement of MMPs in delayed neuronal death after global ischemia. Acta Neurobiol Exp (Wars). 2002;62(2):53-61.

202. Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, Kim BY, Ona V, Li M, Sarang S, Liu AS, Hartley DM, Wu DC, Gullans S, Ferrante RJ, Przedborski S, Kristal BS, Friedlander RM. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. Nature. 2002 May 2;417(6884):74-8.

203. Zhu YG, Chen XC, Chen ZZ, Zeng YQ, Shi GB, Su YH, Peng X. Curcumin protects mitochondria from oxidative damage and attenuates apoptosis in cortical neurons. Acta Pharmacol Sin. 2004 Dec;25(12):1606-12.

http://rcin.org.pl

IX. STRESZCZENIE

Niedokrwienie mózgu jest obecnie jedną z wiodących przyczyn zgonów w Polsce. Nawet krótkotrwałe zatrzymanie krążenia wynikające z zaburzeń rytmu serca, czy mikrozatoru powoduje poważne zaburzenia czynnościowe układu nerwowego, oraz utratę integralności strukturalnej mózgu. Ze względu na rozległość problemu, jak również epidemiologię udaru, od wielu lat prowadzone są liczne badania na całym świecie nad patofizjologią i podłożem molekularnym zmian zachodzących podczas ostrej niewydolności krążenia mózgowego w tkance nerwowej. W minionej dekadzie, nazwanej "dekadą mózgu" zgromadzono olbrzymią wiedzę dotyczącą patomechanizmów ischemicznego uszkodzenia OUN. Niestety zdobyte informacje do dnia dzisiejszego nie doprowadziły do opracowania skutecznych metod leczenia udaru niedokrwiennego. W przeciągu tych lat w badaniach przedklinicznych wiele substancji wykazało znaczące działanie neuroprotekcyjne. Niestety wyniki te nie znalazły swojego odzwierciedlenia w postępach w leczeniu. Obecnie prowadzonych jest ok. 70 międzynarodowych, dużych badań klinicznych dotyczących oceny działania neuroprotekcyjnego różnych związków w udarze mózgu. Dotychczas żaden z tych leków nie został zatwierdzony jako skuteczny środek neuroprotekcyjny. Ta sytuacja wskazuje na duży rozdźwięk pomiędzy wiedzą o mechanizmach śmierci neuronów, możliwościami modulowania ich na poziomie (sub)komórkowym, a praktycznymi osiągnięciami klinicznymi.

Dotychczas poznano mechanizmy uszkodzenia komórek związane z ostrą fazą uszkodzenia ischemicznego, jednak wydaje się, że nie są one podatne na leczenie farmakologiczne. W ostrym okresie niedokrwienia jedynym postępowaniem protekcyjnym jest przyspieszenie reperfuzji. Jednak ciągle wielkim wyzwaniem terapeutycznym jest zapobieganie tzw. opóźnionej śmierci komórek nerwowych. Do obszarów, w których można zaobserwować opóźnioną śmierć komórek należą rejony szczególnie wrażliwe na ischemię (rejon CA1 hipokampa, II i IV warstwa kory, komórki Purkinjego w móżdżku), oraz tak zwany obszar "półcienia" (ischemic penumbra) graniczący z ogniskiem, o upośledzonym przepływie krwi.

Głównym celem leczenia farmakologicznego niedokrwienia mózgu jest neuroprotekcja w omawianych powyżej obszarach. Aby wprowadzić do kliniki efektywne leczenie zatrzymujące opóźnioną śmierć komórek, niezbędne jest przebadanie dużej liczby wyselekcjonowanych związków w warunkach najbliższych do tych, które występują w trakcie lub po ischemii.

http://rcin.org.pl

Celem pracy było wprowadzenie efektywnego i powtarzalnego modelu badawczego *in vitro*, który by dobrze odwzorowywał uszkodzenia powstające w wyniku niedokrwienia mózgu i pozwolił na szybką, wstępną selekcję związków o działaniu neuroprotekcyjnym. W naszych doświadczeniach do przesiewowych badań *in vitro* zastosowaliśmy model organotypowej hodowli skrawków hipokampa szczura (HOC). Do ważnych zalet HOC należy m.in. zachowanie regionalnej cytoarchitektury i połączeń neuronalnych, które nie występują w pierwotnych hodowlach mieszanych komórek glejowo-neuronalnych. Przeprowadzając doświadczenia w organotypowej hodowli skrawków hipokampa można w dość precyzyjny sposób śledzić procesy zachodzące w tkance po uszkodzeniu, zarówno pod względem specyficzności regionalnej, jak również nasilenia i dynamiki przebiegu zmian.

Do realizacji badań będących przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej opracowaliśmy w HOC dwa modele uszkodzenia: wolnorodnikowe - indukowane 30μM tert-butylhydroperoxide (TBH) i ekscytotoksyczne - indukowane 100μM NMDA. Zarówno uszkodzenie wolnorodnikowe jak i ekscytotoksyczne indukują procesy zachodzące podczas niedokrwienia, prowadzące do opóźnionej śmierci neuronów.

W opracowanych modelach badaliśmy sześć związków o potencjalnym działaniu ochronnym (Cyklosporynę A, FK506, Diazepam, MK801, IGF-1 i Minocyklinę).

W badaniach *in vitro* przeprowadzono:

- ocenę morfometryczną przeżycia komórek w sektorze CA1 hipokampa przy pomocy barwienia jodkiem propidyny.
- analizę immunocytochemiczną w celu ustalenia lokalizacji cytochromu c w komórce oraz miejsca aktywacji kaspazy 3 po uszkodzeniu wolnorodnikowym lub ekscytotoksycznym i zastosowanej neuroprotekcji
- półilościową ocenę poziomu cytochromu c we frakcji cytoplazmatycznej oraz aktywnej formy kaspazy 3 w homogenatach ze skrawków hipokampa poddanych uszkodzeniu wolnorodnikowemu lub ekscytotoksycznemu i zastosowanej neuroprotekcji metodami immunobiochemicznymi
- immunoenzymatyczny, ilościowy pomiar:
  - cytochromu c we frakcji cytoplazmatycznej oraz aktywnej formy kaspazy 3 w homogenatach uzyskanych ze skrawków hipokampa, poddanych uszkodzeniu wolnorodnikowemu lub ekscytotoksycznemu i zastosowanej neuroprotekcji
  - wypływu cytochromu c z wyizolowanych mitochondriów po uszkodzeniu wolnorodnikowym i zastosowanej neuroprotekcji

http://rcin.org.pl

W naszych badaniach wykazaliśmy, że zastosowanie Diazepamu (5μM), Minocykliny (30μM) i CsA (0,25μM) w uszkodzeniu wolnorodnikowym oraz ekscytotoksycznym zmniejszyły o ponad połowę liczbę martwych neuronów rejonu CA1 w stosunku do liczby martwych neuronów po uszkodzeniu. Najwyraźniejszy efekt neuroprotekcyjny w obu typach uszkodzenia uzyskano po podaniu do hodowli CsA.

Ponieważ w praktyce klinicznej od epizodu niedokrwienia do możliwości podania pacjentowi leku protekcyjnego mija przeważnie dłuższy okres, sprawdzono również, czy badane substancje zachowają swoje zdolności ochronne, gdy zostaną podane z opóźnieniem w stosunku do czynnika uszkadzającego. Najbardziej obiecujące wyniki uzyskano po podaniu Diazepamu. Jego zdolności neuroprotekcyjne można było obserwować nawet po podaniu leku 90 minut od indukcji uszkodzenia.

W prezentowanych przez nas badaniach *in vitro* obserwowaliśmy również silne hamowanie wypływu cytochromu c i aktywacji kaspazy 3 przez wymienione związki wykazujące neuroprotekcję w uszkodzeniu wolnorodnikowym lub ekscytotoksycznym. Dlatego też w kolejnych eksperymentach oceniono bezpośredni wpływ Diazepamu, Minocykliny i CsA na zahamowanie proapoptotycznego szlaku mitochondrialnego w uszkodzeniu wolnorodnikowym. Diazepam i CsA podane jednoczasowo, lub z opóźnieniem w stosunku do zainicjowanego uszkodzenia były w stanie zahamować wypływ cytochromu c z wyizolowanych z mózgu szczura mitochondriów. Takiego efektu nie obserwowaliśmy po podaniu Minocykliny.

W celu weryfikacji wyników otrzymanych w doświadczeniach *in vitro* w HOC, przebadano działanie wybranych związków na modelu (5') przejściowej ischemii przodomózgowia u myszoskoczka mongolskiego. W modelu tym możliwe jest stosunkowo proste wywołanie wybiórczego uszkodzenia neuronów w rejonie CA1 hipokampa prowadzącego do tzw. opóźnionej śmierci neuronów.

W badaniach tych przeprowadzono:

- analizę histochemiczną w celu oceny morfologicznej i morfometrycznej przetrwałych po epizodzie niedokrwiennym neuronów w rejonie CA1 hipokampa
- identyfikację metodą TUNEL komórek apoptotycznych w skrawkach hipokampa po wywołaniu epizodu niedokrwienia mózgu i podaniu Minocykliny

W modelu przejściowej (5') ischemii przodomózgowia po podaniu zwierzętom CsA lub Diazepamu obserwowano znaczne zwiększenie przeżycia neuronów w rejonie CA1 w stosunku do ischemii nieleczonej. Minocyklina natomiast nie wykazała takiego działania

http://rcin.org.pl

ochronnego na neurony rejonu CA1 hipokampa, natomiast działała uszkadzająco na komórki zakrętu zębatego.

W kolejnych doświadczeniach staraliśmy się wyjaśnić czy ochronny mechanizm działania Diazepamu *in vivo* może być związany z zaobserwowanym efektem hipotermicznym występującym po podaniu tego związku. W tym celu po ischemii poddaliśmy zwierzęta hipotermii zewnątrzpochodnej o głębokości i czasie trwania odpowiadającym hipotermii polekowej. Zastosowana przez nas hipotermia zewnątrzpochodna nie wykazała równie znamiennego efektu ochronnego, jaki obserwowaliśmy po podaniu Diazepamu powodującego podobny efekt hipotermiczny.

Powyższe wyniki badań pozwalają na sformułowania następujących wniosków:

1. Hodowla organotypowa skrawków hipokampa szczura (HOC) wydaje się być dobrym i powtarzalnym modelem do badań przesiewowych związków o potencjalnym działaniu neuroprotekcyjnym.
2. Opracowany model uszkodzenia wolnorodnikowego i ekscytotoksycznego w skrawkach HOC pozwala śledzić zmiany zachodzące podczas epizodu niedokrwiennego *in situ*, dotyczące zarówno specyficznej lokalizacji uszkodzenia w rejonie CA1 hipokampa jak i opóźnionego czasu wystąpienia zmian.
3. Spośród badanych związków: CsA i Diazepam wykazują działanie protekcyjne w stosunku do neuronów sektora CA1, zarówno w uszkodzeniu wolnorodnikowym i ekscytotoksycznym *in vitro* jak i uszkodzeniu ischemicznym *in vivo*
   - znaczącą komponentą mechanizmu protekcyjnego działania CsA jest uszczelnienie kanałów MTP w mitochondriach, zmniejszenie wypływu cytochromu c i aktywacji kaspazy 3.
   - za efekt neuroprotekcyjny Diazepamu odpowiedzialne jest, poza mechanizmem sedatywnym i hipotermicznym, także jego bezpośrednie „uszczelniające" oddziaływanie na błonę mitochondrialną.
4. Minocyklina, związek o szeroko dyskutowanym działaniu neuroprotekcyjnym w wielu chorobach neurodegeneracyjnych o przewlekłym przebiegu, w naszych doświadczeniach, pomimo zaobserwowanych pozytywnych efektów *in vitro*, zastosowana *in vivo* nie wykazała ochronnego działania na neurony w przebiegu niedokrwienia przodomózgowia u myszoskoczka mongolskiego

http://rcin.org.pl

5. Dalsze badania mające na celu bardziej szczegółowe porównanie działania neuroprotekcyjnego CsA i Diazepamu mogą przyczynić się do wyboru optymalnego postępowania terapeutycznego w zespołach chorobowych powikłanych ischemią. W świetle naszych wyników Diazepam wydaje się być obecnie najlepszym lekiem neuroprotekcyjnym, typowanym do dalszych badań klinicznych.

http://rcin.org.pl