

HENRYK JEŚKO

**ANALIZA EKSPRESJI I AKTYWNOŚCI
SYNTAZY TLENKU AZOTU**

I

**POLIMERAZY POLI(ADP-RYBOZY)
W MÓZGU SZCZURA DOROSŁEGO I STAREGO.**

PRACA DOKTORSKA

PROMOTOR

PROF. DR HAB. N. MED. JOANNA STROSZNAJDER

ZAKŁAD KOMÓRKOWEJ TRANSDUKCJI SYGNAŁU

INSTYTUT MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ

IM. M. MOSSAKOWSKIEGO

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

WARSZAWA 2006

**PANI PROFESOR JOANNIE B. STROSZNAJDER,
PROMOTOROWI NINIEJSZEJ PRACY
SKŁADAM SERDECZNE PODZIĘKOWANIA
ZA WSKAZANIE TEMATU, OPIEKĘ I CENNE RADY W PRZEBIEGU BADAŃ.**

**PANU DOKTOROWI ROBERTOWI STROSZNAJDEROWI
SKŁADAM PODZIĘKOWANIA
ZA POMOC OKAZANĄ W REALIZACJI ZAPLANOWANYCH BADAŃ.**

**KOLEŻANKOM I KOLEGOM Z ZAKŁADU
DZIĘKUJĘ ZA CENNE DYSKUSJE
I WSPÓLPRACĘ PODCZAS REALIZACJI NINIEJSZEJ PRACY.**

**PRACE PRZEDSTAWIONE W NINIEJSZYM OPRACOWANIU ZOSTAŁY
SFINANSOWANE PRZEZ GRANT MINISTERSTWA NAUKI I INFORMATYZACJI
NR 2P05A 029 27
ORAZ PBZ-MIN-001/PO5/16**

**WYNIKI ZAMIESZCZONE W NINIEJSZEJ ROZPRAWIE ZOSTAŁY CZĘŚCIOWO
OPUBLIKOWANE W NASTĘPUJĄCYCH PRACACH:**

Strosznajder RP, Jesko H, Adamczyk A. [2005] Effect of aging and oxidative/genotoxic stress on poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity in rat brain. *Acta Biochim. Pol.* 52: 909-914.

Strosznajder JB, Jesko H, Zambrzycka A, Eckert A, Chalimoniuk M [2004] Age-related alteration of activity and gene expression of endothelial nitric oxide synthase in different parts of the brain in rats. *Neurosci. Lett.* 370: 175-179.

Jesko H, Chalimoniuk M, Strosznajder JB [2003] Activation of constitutive nitric oxide synthase(s) and absence of inducible isoform in aged rat brain. *Neurochem. Int.* 42: 315-322.

Strosznajder JB, Jesko H, Strosznajder RP [2000] Effect of amyloid beta peptide on poly(ADP-ribose) polymerase activity in adult and aged rat hippocampus. *Acta Biochim. Pol.* 47: 847-854.

Spis treści

Indeks skrótów	9
Wstęp	13
1. Teorie starzenia	13
Teorie ewolucyjne	14
Teoria akumulacji mutacji somatycznych i teoria wolnorodnikowa	16
Mechanizmy uszkodzenia wolnorodnikowego i systemy obronne	18
2. Fizjologiczne starzenie mózgu	19
Degeneracja i obumieranie komórek, zmiany ilościowe w strukturach mózgu starczego	20
Zmiany w połączeniach synaptycznych	22
Zmiany w układach neuroprzekaźnikowych	22
Syntazy tlenu azotu i ich udział w procesie starzenia	27
Polimeraza poli(ADP-rybozy)	46
Cel pracy	56
Metody	57
1. Zwierzęta doświadczalne	57
2. Materiały i odczynniki	57

3. Układy doświadczalne	59
4. Metody biochemiczne i molekularne	60
5. Opracowanie statystyczne wyników	66
Wyniki	67
1. Wpływ starzenia na ekspresję i aktywność izoform NOS	67
2. Poziom uszkodzenia wolnorodnikowego składników błon komórkowych oraz aktywacja czynnika transkrypcyjnego NF- κ B	80
3. Wpływ starzenia na ekspresję oraz aktywność PARP-1	86
Dyskusja	93
Podsumowanie wyników i wnioski	104
Streszczenie	106
Literatura	115

INDEKS SKRÓTÓW

7-Ni	- 7-nitroindazol
A β	- amyloid beta
AD	- choroba Alzheimera
AMPA	- kwas α -amino-3-hydroksy-5-metyloizoksazolopropionowy
AMPAr	- receptor AMPA
ANOVA	- analiza wariancji
AP-1	- białko aktywujące-1, czynnik transkrypcyjny
AP-2	- czynnik transkrypcyjny wiążący promotor genu PARP-1
ATP	- adenozynotryfosforan
BER	- naprawa DNA przez wycinanie zasad
BRCT	- motyw C-końcowy BRCA1
BSA	- albumina bydlęca
CaM	- kalmodulina
cAMP	- cykliczny adenozynomonofosforan
CA1	- cornu Ammonis 1, część składowa hipokampa
cGK	- kinaza białkowa G, PKG
cGMP	- cykliczny guanozynomonofosforan
cNOS	- konstytutywne izoformy syntazy tlenku azotu (nNOS i eNOS)
COX-2	- cyklooksygenaza-2
CREB	- czynnik transkrypcyjny
DBD	- domena wiążąca DNA
DMSO	- dimetylosulfotlenek
DNA-PK	- kinaza białkowa zależna od DNA

DTT	- ditiotreitól
ECL	- wzmochnona chemiluminescencja
EDTA	- kwas etylenodiaminotetraoctowy
eNOS	- śródbłónkowa (III) izoforma syntazy tlenku azotu
EPSP	- pobudzający potencjał postsynaptyczny
FAD	- dinukleotydz flawoadeninowy
FMN	- mononukleotydz flawoadeninowy
GAPDH	- dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
GF109203X	- <i>Bisindolylnaleimide I</i> , inhibitor PKC
GFAP	- białkowy marker obecności komórek glejowych
GLY-B	- miejsce wiążące glicynę receptora NMDA
GSH	- glutation zredukowany
GTP	- guanozynotryfosforan
H-7	- inhibitor kinaz białkowych o powinowactwie do PKC i PKA
H-8	- inhibitor kinaz białkowych o powinowactwie do PKA i PKG
H-9	- inhibitor kinaz białkowych o powinowactwie do PKG i PKA
HMG	- białka o wysokiej mobilności [elektroforetycznej]
IFN- γ	- interferon γ
IgG	- immunoglobulina G
IKK	- kinaza I κ B
I κ B	- inhibitor NF- κ B
iNOS	- indukowalna (II) izoforma syntazy tlenku azotu
LTD	- długotrwałe osłabienie synaptyczne
LTP	- długotrwałe wzmochnienie synaptyczne
MDA	- dialdehyd malonowy

MNNG	- N-metylo-N ['] -nitro-N-nitrozoguanidyna
mtNOS	- mitochondrialna syntaza tlenku azotu
NAD	- dinukleotyd nikotynamidoadeninowy
NADPH	- fosforan dinukleotydu nikotynamidowego, forma zredukowana
NER	- naprawa DNA przez wycinanie nukleotydów
NF-κB	- jądrowy czynnik κB (czynnik transkrypcyjny)
NFT	- sploty neurofibrylarne
NIK	- kinaza indukująca NF-κB
NLS	- sygnał lokalizacji jądrowej
NMDA	- N-metylo D-asparaginian
NMDAr	- receptor NMDA
NNLA	- N-nitro L-arginina
nNOS	- neuronalna (I) izoforma syntazy tlenku azotu
NO	- tlenek azotu; skrót tożsamy ze wzorem sumarycznym
NOS	- syntaza tlenku azotu
nw	- sygnał niewykrywalny
OUN	- ośrodkowy układ nerwowy
P1	- frakcja jądrowa
P2	- frakcja błonowa
PAR	- poli(ADP-ryboza)
PARP-1	- poli(ADP-rybozo) polimeraza-1
PBS	- bufor fosforanowy
PBS-T	- PBS z 0,05% zawartością Tween-20
PCD	- programowana śmierć komórki
PCR	- reakcja łańcuchowa polimerazy
PD	- choroba Parkinsona
PDE	- fosfodiesteraza

PKA	- kinaza białkowa zależna od cAMP
PKB	- kinaza białkowa B
PKC	- kinaza białkowa C
PKG	- kinaza białkowa zależna od cGMP
PLA2	- fosfolipaza A2
RT-PCR	- reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją
S2	- nadsącz 2 - frakcja cytozolowa
SDS	- siarczan dodecyłu
SDS-PAGE	- elektroforeza białek w warunkach denaturujących
SEM	- średni błąd standardowy
sGC	- rozpuszczalna cyklaza guanylanowa
SOD	- dysmutaza ponadtlenkowa
Sp-1	- czynnik transkrypcyjny wiążący promotor genu PARP-1
SPF	- wolny od specyficznych patogenów
SSB DNA	- jednoniciowe przerwy DNA
TBARS	- substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym
TCA	- kwas trójchlorooctowy
TF	- czynnik transkrypcyjny
TNF	- czynnik martwicy nowotworu
vPARP	- vault PARP, białko wykazujące aktywność PARP
XRCC1	- <i>X-Ray Cross-complementing-1</i> , białko strukturalne kompleksu naprawy DNA BER
YY1	- Yin-Yang 1, czynnik transkrypcyjny

WSTĘP.

1. Teorie starzenia

Złożoność procesu starzenia powoduje trudności nie tylko w ustaleniu jego przyczyn, lecz nawet w spójnym opisanu wszystkich jego objawów i ustaleniu, które z nich mają znaczenie pierwotne, a które są skutkami lub ubocznymi procesami o nikłym znaczeniu. Stworzono liczne teorie starzenia, które można orientacyjnie podzielić na dwie grupy: teorie ewolucyjne usiłują wyjaśnić genezę zjawiska, inne natomiast mają za zadanie opisać jego mechanizmy. Wiele spośród przytoczonych poniżej teorii nie wyklucza się wzajemnie, często uzupełniają się one lub stanowią próbę spojrzenia z innej strony na podobnie pojmowane zjawisko.

Starzenie nie jest procesem uniwersalnym. Są go pozbawione organizmy jednokomórkowe rozmnażające się przez podział symetryczny. Natomiast u organizmów, które wykazują objawy starzenia, może ono mieć skrajnie różny przebieg. Niektóre spośród organizmów podlegających starzeniu osiągają wiek ponad stu lat, podczas gdy wykazujące porównywalny stopień złożoności, spokrewnione z nimi gatunki starzeją się wielokrotnie szybciej. Znany jest problem różnicowania długości życia ptaków oraz zbliżonych do nich wielkością i tempem metabolizmu ssaków. Wielkie różnicowanie wykazują również same ssaki, często przywołuje się przykład myszy i nietoperzy. Ogromne różnice mogą również występować w ramach tego samego gatunku: larwy dauer glebowych nicieni (*Caenorhabditis elegans*) żyją wielokrotnie dłużej od postaci dorosłej, która wykazuje objawy starzenia już po około dwu tygodniach. Doświadczenia przeprowadzone w ciągu ostatnich dwu dekad wykazały, że możliwa jest zmiana długości życia nawet w obrębie tego samego stadium rozwojowego, dostarczając cennego materiału badawczego i

argumentów zarówno zwolennikom teorii środowiskowej jak genetycznej determinacji długości życia.

Teorie ewolucyjne starzenia

Wbrew dawniejszym poglądom o starzeniu jako aktywnie sterowanym procesie adaptacyjnym (teoria Weismanna z r. 1891) obecnie uważa się, iż ewolucyjna geneza procesu starzenia wiąże się z zanikiem oddziaływania siły doboru naturalnego wraz ze wzrostem wieku organizmów. Zauważono, że w warunkach naturalnych starzenie manifestuje się rzadko, gdyż przeciętnie osobniki zazwyczaj giną przed osiągnięciem odpowiedniego wieku w wyniku działania czynników losowych takich jak drapieżnictwo czy choroby.

Teoria osłabienia nacisku selekcyjnego z wiekiem organizmu [Medawar, 1952]. Prawdopodobieństwa dożycia późnego wieku w warunkach naturalnych jest niskie. Dobór naturalny działa więc na nowe allele genów tym słabiej im później ujawniają się efekty ich działania. Stąd mutacje, których negatywny wpływ objawia się powyżej pewnej granicznej wartości wieku nie byłyby dostatecznie silnie eliminowane i utrwałyby się z pewną częstotliwością. W ten sposób w populacjach gromadziłyby się mutacje, nie manifestujące się w normalnych warunkach, których efektem byłoby wystąpienie objawów starzenia o ile osobniki znalazłyby się w środowisku umożliwiającym odpowiednio długie przeżycie.

Teoria antagonistycznej plejotropii.

Teoria ta jest rozwinięciem teorii Medawara [1952]. Zakłada ona, że w toku ewolucji mogą być promowane geny o działaniu plejotropowym, zwiększające przystosowanie organizmów w młodym wieku kosztem obniżenia jego

sprawność w późniejszym [Williams, 1957]. Ich wczesne, pozytywne działanie ujawni się bowiem w większej liczbie osobników niż późne, niekorzystne. Często przywołuje się przykład antagonizmu między inwestowaniem energii w produkcję potomstwa a jak najdłuższym utrzymaniem możliwości sprawnego funkcjonowania własnego organizmu: sztuczny dobór w kierunku późnego dojrzewania płciowego daje w wyniku osobniki długowieczne, które w warunkach naturalnych zostałyby wyparte z populacji przez krócej żyjące, lecz płodniejsze.

Teoria jednorazowego ciała.

Według tej teorii organizm wielokomórkowy jest jedynie środkiem mającym umożliwić przetrwanie komórkom linii płciowej [Kirkwood, 1977; Kirkwood i Holliday, 1979]. Ponieważ kluczowe dla zachowania gatunku jest utrzymanie ciągłości przekazywania informacji genetycznej z pokolenia na pokolenie, bardzo wcześnie w rozwoju osobnika zostają wyznaczone te jego komórki, które dadzą początek komórkom rozrodczym. Cała reszta organizmu ze swymi rozbudowanymi funkcjami ma za zadanie jedynie umożliwić przekazanie genów przy optymalnym wydatku energii. Jej komórki nie zapewnią sobie żadnej kontynuacji, jest ona "ślepym zaułkiem". Stąd ewolucyjny sukces odniosą te gatunki, które w optymalny sposób zbilansują wydatki na utrzymanie sprawności somy tak, aby nie zużywać więcej energii niż to konieczne dla uzyskania odpowiedniej liczby potomstwa. Efektem byłoby istnienie procesu starzenia wynikającego z suboptymalnego funkcjonowania aparatu naprawy komórek somatycznych, natomiast komórki linii płciowej miałyby zapewnioną ochronę wystarczającą aby przetrwać i dać początek następnym osobnikom.

Teoria akumulacji mutacji somatycznych i teoria wolnorodnikowa

Założeniem obu teorii jest, że przyczyną starzenia organizmu jest akumulacja uszkodzeń DNA i innych makromolekuł przez wysoce reaktywne produkty pośrednie metabolizmu tlenowego-głównie wolne rodniki [Harman, 1956; Medawar, 1952]. Powoduje to stopniowe obniżanie jakości białek, funkcjonowania błonowych systemów receptorowych, rozprzęganie łańcucha oddechowego prowadzące do deficytu energii i dalszej eskalacji uszkodzenia wolnorodnikowego. Szybko narastające zmiany zachodziłyby przede wszystkim w genomie mitochondrialnym, usytuowanym w bezpośrednim sąsiedztwie najważniejszego źródła wolnych rodników i gorzej chronionym przez białka strukturalne oraz aparat naprawczy.

W 1956 Harman wskazał na analogie między objawami starzenia i działaniem promieniowania jonizującego. Ponieważ wiadano już o możliwości powstawania rodnika hydroksylogowego w wyniku radiolizy wody i zdawano sobie sprawę z możliwości występowania tego rodnika w organizmach żywych, Harman wywnioskował, że rodnik ten może odgrywać znaczną rolę w procesie starzenia. Jako możliwe źródło jego powstawania *in vivo* wymienił enzymatyczne reakcje redoks. Najprawdopodobniejszym źródłem destruktywnych wolnych rodników miały być według niego zawierające żelazo białka zaangażowane w metabolizm tlenowy. Wszystkie te założenia zostały później potwierdzone doświadczalnie. Pierwszym bezpośrednim dowodem roli wolnych rodników w organizmach żywych było oczyszczenie w 1969 dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), enzymu metabolizującego anion ponadtlenkowy $\cdot\text{O}_2^-$ i następnie dużej grupy innych enzymów zaangażowanych w usuwanie tych związków [Yu, 1994]. Przy użyciu SOD jako detektora $\cdot\text{O}_2^-$ stwierdzono, że głównym źródłem oksydantów w organizmie są mitochondria [Chance i wsp., 1979]. To odkrycie dostarczyło wyjaśnienia tzw. *rate-of-living theory*, według której tempo procesu starzenia jest proporcjonalne do szybkości

metabolizmu: czynnikiem łączącym oba procesy okazał się sam metabolizm tlenowy, a ściślej jego uboczny produkt, wolne rodniki [Beckman i Ames, 1998]. Obecnie ocenia się, że „wyciek” wolnych rodników z łańcucha oddechowego stanowi ok. 0,1% zużywanego tlenu [Hansford i wsp., 1997]. Później ustalono, że znaczącym źródłem oksydantów może też być metabolizm kwasów tłuszczowych w peroksosomach, reakcje cytochromu P450 i aktywność komórek odpornościowych. Peroksosomy posiadają znaczne ilości katalazy, wobec czego powstający podczas β -oksydacji kwasów tłuszczowych nadtlenek wodoru (H_2O_2) powinien być wydajnie zmiatany. Przypuszcza się jednak iż w określonych sytuacjach, takich jak intensywne proliferacja, może następować zanik obecności katalazy w peroksosomach i uwalnianie nadtlenku wodoru [Beckman i Ames, 1998]. Mikrosomalny cytochrom P450 metabolizuje toksyny z użyciem NADPH, jednak może też katalizować redukcję O_2 do $\cdot O_2^-$. Przypuszcza się, że ta uboczna reakcja może być „ceną” za możliwość detoksyfikacji niektórych szkodliwych związków [Beckman i Ames, 1998]. Komórki odpornościowe produkują natomiast mieszaninę oksydantów i wolnych rodników, m. in. $\cdot O_2^-$, H_2O_2 i $NO\cdot$ w celu zniszczenia komórek docelowych; negatywne znaczenie tej reakcji miałyby się ujawniać przede wszystkim w przypadku chronicznych stanów zapalnych. Do innych, bardziej specyficznych tkankowo źródeł wolnych rodników i oksydantów należą oksydaza monoaminowa deaminująca dopaminę z uwolnieniem nadtlenku wodoru, oraz syntaza tlenu azotu (NOS).

Z wiekiem obserwuje się zaburzenia homeostazy jonów wapnia w neuronach. Wzrasta ich stężenie spoczynkowe w cytoplazmie, co może prowadzić do zwiększenia aktywności zależnych od wapnia enzymów, w tym konstytutywnych izoform syntazy tlenu azotu i nasilenia stresu wolnorodnikowego.

Hipoteza starzenia zależnego od tlenu azotu

W hipotezie starzenia zależnego od tlenku azotu [McCann 1997; McCann i wsp., 1998] zaproponował rolę NO w uszkodzeniu ośrodkowego układu nerwowego. Akumulacja uszkodzeń spowodowanych fizjologicznymi procesami sygnalizacji zależnej od tlenku azotu w połączeniu z powtarzającą się indukcją iNOS w wyniku stymulacji cytokinami produkowanymi w zakażonych narządach mogłyby prowadzić do uszkodzeń neuronów i gleju w hipokampie, podwzgórzu, przednim płacie przysadki i szyszynce. Miałyby to prowadzić do obserwowanych w starzeniu w warunkach naturalnych zmian poznawczych i zaburzeń hormonalnych.

Mechanizmy uszkodzenia wolnorodnikowego i systemy obronne.

Celem ataku wolnorodnikowego *in vivo* są wszystkie najważniejsze makromolekuły komórkowe.

- Lipidy ulegają "autoksydacji"-propagującej się liniowo reakcji tworzenia rodników lipidowych. Zmniejsza ona płynność błony zaburzając funkcjonowanie zanurzonych w niej białek, ponadto produkty peroksydacji lipidów wykazują właściwości toksyczne i mogą być mutagenne [Chen i Yu, 1994; McCracken i wsp., 2000; Niedernhofer i wsp., 2003].
- Oksydacyjne uszkodzenia kwasów nukleinowych obejmują addukty przyłączone do zasad azotowych i grup cukrowych, utlenione zasady azotowe, jedno- i dwuniciowe przerwy i połączenia krzyżowe z białkami [Cooke i wsp., 2003; Kino i Sugiyama, 2005; Slupphaug i wsp., 2003].
- Oksydacja białek może prowadzić do modyfikacji aminokwasów (w tym uszkodzenia aminokwasów zawierających metale) fragmentacji molekuł białkowych oraz do połączeń krzyżowych wewnątrz lub pomiędzy białkami prowadzących do powstawania agregatów [Davies, 2005]. Oksydacja łańcuchów bocznych powoduje zmiany konformacyjne i zaburza funkcję

enzymów. Wolnorodnikowe uszkodzenie białek może także powodować uwolnienie żelaza z ich centrów aktywnych, co dalej może aktywować stres oksydacyjny [Keyer i wsp., 1995; Liochev i Fridovich, 1994].

Do molekuł o działaniu antyoksydacyjnym należą enzymy i uzyskiwane z pokarmu związki niskocząsteczkowe [Ames i wsp., 1995; Yu, 1994]. Przykłady obejmują:

- Związki niskocząsteczkowe:
 - Hydrofilowe zmiatacze wolnych rodników-askorbinian, mocznik i glutation (GSH).
 - Lipofilowe zmiatacze takie jak flawonoidy, tokoferole, karotenoidy i ubichinol.
- Enzymy:
 - Dysmutaza ponadtlenkowa, SOD dysmutująca $\cdot\text{O}_2^-$ do H_2O_2 .
 - Katalaza i peroksydaza glutationowa konwertujące H_2O_2 do H_2O .
 - Enzymy redukujące utlenione zmiatacze niskocząsteczkowe-reduktaza GSH, reduktaza dehydroaskorbinianu i utrzymująca grupy tiolowe reduktaza tioredoksyny.
 - Aktywności utrzymujące redukujące środowisko komórkowe-dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa regenerująca NADPH.

2. Fizjologiczne starzenie mózgu.

Starzeniu ośrodkowego układu nerwowego (OUN) zazwyczaj towarzyszą zmiany morfologiczne i funkcjonalne, wyrażające się spadkiem możliwości intelektualnych, zaburzeniami motorycznymi oraz występowaniem zmian upośledzających funkcje społeczne, a nawet podstawowe funkcje fizjologiczne organizmu. Za znaczny odsetek tych zjawisk odpowiedzialne są jednak choroby które towarzyszą starzeniu. Wiek jest głównym czynnikiem ryzyka udarów i

chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimera (AD) i Parkinsona (PD), ponadto na stan mózgu wpływają np. procesy zapalne toczące się na obwodzie, które poprzez działanie czynników prozapalnych i uszkodzenie bariery krew-mózg wywierają patologiczny wpływ na funkcjonowanie OUN. Badania fizjologicznego procesu starzenia w oderwaniu od czynników środowiskowych takich jak infekcje ujawniły, że zmiany zachodzące z wiekiem u osobników zdrowych są zdecydowanie bardziej subtelne i w stosunkowo niewielkim stopniu upośledzają funkcję mózgu. Udoskonalenie technik badawczych, w tym metod oceny ilości i morfologii komórek nerwowych wykazało słabsze niż uzyskiwano w poprzednich dziesięcioleciach uszkodzenia tkanki nerwowej i wykazały modyfikację właściwości neuronów [Calhoun i wsp., 1998; Himeda i wsp., 2005] przy znacznie mniejszej niż poprzednio sądzono utracie ich liczby.

Degeneracja i obumieranie komórek, zmiany ilościowe w strukturach mózgu starczego

Wraz z wiekiem następuje spadek masy mózgowia. Obserwuje się zmniejszenie rozmiarów pewnych kluczowych obszarów mózgu. Zmiany te zaznaczają się najsilniej w hipokampie i płatach czołowych kory. Pomiedzy 30. i 90. rokiem życia objętość hipokampa spada o 35%, kory mózgu o 14%, a substancji białej o 26% [Esiri et al., 1997; Jernigan et al., 2001]. Towarzyszy temu zwiększenie objętości komór.

Hipokamp i kora nowa, struktury kluczowe dla procesów uczenia, są selektywnie wrażliwe na wpływ starzenia [przegląd w Hof i Morrison, 2004]. Zmianom morfologicznym często towarzyszy umiarkowane zaburzenie czynności poznawczych [Albert, 1996; Gallagher i Rapp, 1997; Rapp i wsp., 1996]. W przeciwieństwie do choroby Alzheimera, związane z wiekiem

upośledzenie pamięci jest głównie związane z zaburzeniami procesów przekazywania, nie zaś z masową utratą komórek [Morrison i Hof, 1997]. Według nowszych badań liczba neuronów u człowieka ulega obniżeniu o ok. 10% [Pakkenberg i Gundersen, 1997]. Spada odsetek dużych neuronów piramidowych, wśród których są neurony syntetyzujące podstawowy przekazywany pobudzający-glutaminian; częściowo za zjawisko to odpowiedzialna jest ich atrofia. Utratę i/lub atrofię komórek nerwowych następującą w sposób bardzo ograniczony i wybiórczy obserwuje się w niektórych regionach kory, hipokampie i jądrze migdałowatym [Smith i wsp., 2004; Peters i wsp., 1998a]. W niektórych neuronach gromadzi się lipofuscyna zawierająca produkty oksydacji białek i lipidów, co może odzwierciedlać obniżającą się zdolność komórek do eliminacji uszkodzonych molekuł i obniżenie odporności na stres oksydacyjny. Obserwuje się powstawanie w ciałach neuronów niewielkich ilości splotów neurofibrylarnych-NFT, jednak ich obecność jest ograniczona do hipokampa, jądra migdałowatego i kory węchowej. Procesowi starzenia towarzyszy występowanie w przestrzeni międzykomórkowej substancji szarej złogów amyloidowych składających się ze amyloidowego jądra otoczonego zdegenerowanymi neurytami o zaburzonym cytoszkielecie oraz z licznymi białkami towarzyszącymi. Są one w niewielkiej liczbie obecne również w zdrowych mózgach. W starzeniu są także obserwowane złogi amyloidu β ($A\beta$) w ścianach naczyń krwionośnych oraz ciała Hirano, podłużne struktury, które tworzą się stopniowo z wiekiem dookoła komórek piramidowych hipokampa i, podobnie jak NFT, zawierają białka cytoszkieletu.

Zmiany w połączeniach synaptycznych.

W procesie starzenia obserwuje się proces utraty synaps, co może mieć duże znaczenie w upośledzeniu neurotransmisji [Masliah i wsp., 1993; Terry i Katzman, 2001]. Analogicznie do procesów degeneracji neuronów, w przebiegu fizjologicznego starzenia również drzewka dendrytyczne neuronów piramidowych podlegają regresji z wiekiem w wybranych rejonach i warstwach kory mózgu u ludzi i naczelnych [Anderson i Rutledge, 1996; Duan i wsp., 2003; Jacobs i wsp., 1997]. Zmiany wskazujące na degenerację i 30-60% spadek gęstości synaps zaobserwowano u małp w korze przedczołowej, szczególnie w warstwie 1 [Peters i wsp., 1998b]. Inne badania na małpach wykazały 50% spadek ilości synaps komórek piramidowych kory przedczołowej u małp [Nimchinsky i wsp., 2002]. U ludzi notowano spadek o 46% [Jacobs i wsp., 1997]. Zmniejsza się liczba dendrytów neuronów piramidowych małpiej kory tworzących długie, korowo-korowe projekcje [Duan i wsp., 2003]. Zmniejszenie drzewek dendrytycznych neuronów wydaje się być zjawiskiem specyficznym dla pewnych struktur i niekiedy może być kompensowane przez procesy regeneracyjne [Coleman i Flood, 1987; Flood i wsp., 1987a,b]. W wielu regionach hipokampa i kory czołowej gęstość synaps nie zmienia się nawet jeśli pochodzą one od neuronów z regionów gdzie obserwuje się utratę komórek [Lippa i wsp., 1992; Scheff i wsp., 2001].

Zmiany w układach neuroprzekaźnikowych.

Proces starzenia zaburza funkcję licznych układów przekaźnikowych, w tym cholinergicznego i monoaminergicznego dających projekcje z neuronów podstawy przodomózgowia i pnia mózgu [Arnsten, 1999]. Starzenie powoduje spadek poziomu acetylocholino, dopaminy i noradrenaliny w korze mózgu małp i szczurów. Stwierdzono, że podawanie agonistów ich receptorów oraz

inhibitorów degradacji acetylocholiny zmniejsza zaburzenia poznawcze [Arnsten, 1999].

Obserwowano zmiany poziomu receptora NMDA w korze przedczołowej starych małp [Bai i wsp., 2004] wiążące się z zaburzeniami funkcji synaps w tym rejonie. Obniżeniu ulega poziom AMPAr i NMDAr w neuronach tworzących długie, korowo-korowe połączenia między skroniową i czołową korą asocjacyjną [Hof i wsp., 2002]. W głębokich warstwach kory i w substancji białej stwierdzono degenerację zmielinizowanych aksonów korelująca z osłabieniem orientacji przestrzennej [Peters i wsp., 2000].

Poziom podjednostki NR1 receptora NMDA w warstwie drobinowej zakrętu zębatego starych makaków, najbardziej w miejscu przyjmującym projekcje z kory węchowej, podczas gdy nie stwierdza się zmian innych markerów synaptycznych i dendrytycznych [Morrison i Hof, 1997; Gazzaley i wsp., 1996]. Brak utraty neuronów w korze węchowej [Morrison i Hof, 1997; Gazzaley i wsp., 1996] i synaps w tym rejonie hipokampa [Peters i wsp., 1996] sugeruje zmiany biochemiczne w wybranych synapsach. Efekt starzenia na poziom NR1 wydaje się być specyficzny gatunkowo, nie obserwowano go np. u szczurów [Adams i wsp., 2001]. Obserwuje się jednak inne zmiany ekspresji podjednostek NMDAr u szczurów i myszy [Clayton i wsp., 2002; Magnusson i wsp., 2000] oraz zaburzenie procesów przekąźnictwa zależnych od wapnia [Foster i Kumar, 2002].

Starzenie dotyka też struktur presynaptycznych. W szczurzym hipokampie notowano spadek poziomu białka synaptofizyny wybiórczo w aksonach wchodzących do zakrętu zębatego, którego stopień korelował z zaburzeniami pamięci przestrzennej [Smith i wsp., 2000]. Wybiórcze zaburzenia w zakręcie zębatym obserwowano zarówno u szczurów jak małp i ludzi [Small i wsp., 2004].

Glutaminian jest najbardziej rozpowszechnionym neuroprzebieżnikiem pobudzającym. Neurony glutaminianergiczne występują licznie w OUN, szczególnie w korze, hipokampie i mózdku [Fagg i Foster, 1983; Cotman i wsp., 1987; Peinado and Mora, 1986].

Glutaminian jest syntetyzowany w presynaptycznych mitochondriach [Fonnum, 1993]. Uwolniony do szczeliny synaptycznej jest pobierany przez komórki glejowe i tam metabolizowany do glutaminy [Norenberg and Martı́nez-Hernandez, 1979; Fonnum, 1993], która dyfunduje przez przestrzeń międzykomórkową do neuronów, gdzie jest ponownie używana do syntezy glutaminianu.

Transportery glutaminianu o wysokim powinowactwie są obecne głównie w astrocytach otaczających synapsy glutamatergiczne [Gegelashvili i Schousboe, 1998; Seal i Amara, 1999]. Stanowią one główny mechanizm usuwający glutaminian ze szczeliny synaptycznej i stąd regulujący trwanie sygnału glutaminianergicznego [Rothstein et al., 1996; Gegelashvili and Schousboe, 1998; Seal and Amara, 1999]. Funkcja tych transporterów zależna jest od gradientów stężeń jonów sodu i potasu [Gegelashvili and Schousboe, 1998; Seal and Amara, 1999]. Zaburzenie gradientu stężeń tych jonów może doprowadzać do odwrócenia kierunku działania transporterów i niekontrolowanego wycieku glutaminianu [Attwelli wsp., 1993; Nicholls, 1993].

Badania nad stężeniem glutaminianu w starzeniu mózgu wskazują na jego spadek w hipokampie i korze przedczołowej [Banay-Schwartz i wsp., 1989; Dawson et al., 1989; Fornieles et al., 1986; Saransaari i Oja, 1995; Strolin-Benedetti i wsp., 1990; 1991; Wallace and Dawson, 1990], przy braku zmian w wielu innych regionach, np. w korze ciemieniowej i skroniowej [Fornieles et al., 1986; Banay-Schwartz et al., 1989]. Ponieważ w wykonanych badaniach nie różnicowano puli neuroprzebieżnikowej tego aminokwasu, która stanowi ok. 20-

30% całości [Fonnum, 1993], od puli metabolicznej, nie wiadomo w jakim stopniu zmiana ta może wpływać na jakość transmisji glutaminianergicznej.

Badania zewnątrzkomórkowego poziomu glutaminianu w warunkach spoczynkowych i wpływem czynników depolaryzujących (prowadzone na synaptosomach i skrawkach mózgu jak również *in vivo*-np. mikrodiagonalizacja) nie wykazały jednoznacznych zmian. Istnieją jednak dane sugerujące, że wzrasta progowa wartość pobudzenia koniecznego do uwolnienia glutaminianu w mózgu starczym [Cobo et al., 1993].

Pobieranie glutaminianu do astrocytów w starczej korze mózgu i prądkowiu jest obniżone o 20-30% u szczurów i o 70-80% u myszy [Najerahim i wsp., 1990; Saransaari and Oja, 1995; Vatassery et al., 1998; Wheeler i Ondo, 1986], nie jest natomiast zmienione w hipokampie [Gilad et al., 1990; Najerahim et al., 1990; Palmer et al., 1994].

Receptor NMDA (N-metylo-D-asparaginianu) jest pentamerycznym kanałem jonowym zaangażowanym głównie w plastyczność neuronalną. NMDAR są obecne w dużych ilościach w hipokampie (zwłaszcza w warstwie CA1), korze mózgu, jądrach podstawnych, w przegrodzie i jądrze migdałowatym.

Poza związaniem kwasu L-glutaminowego do otwarcia kanału receptora NMDA konieczne jest m. in. związanie do miejsca GLY-B glicyny, która pełni rolę koagonisty [Johnson i Ascher, 1987] oraz depolaryzacja błony komórkowej usuwająca blok magnezowy [Ascher i Johnson, 1994].

Otwarty NMDAR przewodzi znaczne ilości jonów wapnia, który ma kluczowe znaczenie w zjawisku długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP), będącego modelem procesów uczenia się i pamięci. Wyniki doświadczeń na gryzoniach pozbawionych genów poszczególnych podjednostek oraz badań z użyciem antagonistów wskazują, że NMDAR grają ważną rolę na etapie inicjacji w zjawiskach uczenia, pamięci (w tym przestrzennej) oraz w LTP [m. in. Tsien i wsp., 1996; Davis i wsp., 1993]. Antagoniści receptora NMDA i uszkodzenie

genów podjednostek NR1 hamują inicjację LTP [Bashir i wsp., 1991; Bashir i wsp., 1994; Morris i wsp., 1986; Tsien i wsp., 1996; Harris i wsp., 1984].

Zmiana poziomu receptorów NMDA jest często obserwowanym przejawem starzenia układu glutaminianergicznego. Starzenie w zróżnicowanym stopniu dotyka ich populacji w różnych rejonach i różnie moduluje ekspresję poszczególnych podjednostek. Prowadzi to do zmian zarówno jakościowych jak ilościowych w przekaźnictwie zależnym od NMDAr, co może być przyczyną występujących u starych zwierząt zaburzeń pamięci. Spadek gęstości tych receptorów o 20-50% obserwowano u myszy i szczurów w hipokampie, prążkowi i większości rejonów kory niezależnie od szczepu zwierząt [Castorina et al., 1994; Cimino et al., 1993; Cohen and Muller, 1992; Magnusson and Cotman, 1993; Mitchell and Anderson, 1998; Miyoshi et al., 1990; Nicolle et al., 1996; Petersen and Cotman, 1989; Serra et al., 1994; Tamaru et al., 1991; Wenk et al., 1991]. Znotowano również spadek odpowiedzi NMDAr [Baskys et al., 1990; Cepeda et al., 1996; Gonzales et al., 1991]. Z wiekiem zmienia się działanie miejsc modulatorowych [Cohen and Muller, 1992; Miyoshi et al., 1990; Piggott et al., 1992]. Spadek gęstości receptorów NMDA w hipokampie koreluje z obniżeniem zdolności uczenia się [Magnusson, 1998a].

Badania nad wpływem wieku na ekspresję poszczególnych podjednostek NMDAr są mniej zaawansowane, sugerują jednak, że poza spadkiem poziomu zmienia się również skład podjednostkowy NMDAr, co może modyfikować ich właściwości w tym odpowiedzi na ligandy i związki modulujące.

Spadek wiązania ligandów przez receptory NMDA zaobserwowano u różnych gatunków gryzoni i u małp [Kito i wsp., 1990; Magnusson i Cotman, 1993; Wenk i wsp., 1991]. Badania wykazały, że za ten spadek odpowiedzialne jest obniżenie całkowitej ilości miejsc wiążących. Większość badań nie wykazała zmian powinowactwa do agonistów i antagonistów tego miejsca. Obserwowane

w starzeniu zmiany ilości miejsc wiążących NMDA są niejednorodne przestrzennie. W większości publikacji w korze mózgu myszy i szczurów obserwowano większy spadek miejsc wiążących niż w hipokampie [Castorina i wsp., 1994; Magnusson i Cotman, 1993; Tamaru i wsp., 1991].

Zmiany właściwości elektrofizjologicznych NMDAr w starzeniu są prawdopodobnie wysoce zróżnicowane przestrzennie. Właściwości elektrofizjologiczne receptora NMDA, podobnie jak wiązanie ligandów, są silniej zaburzone w korze niż w hipokampie [Castorina i wsp., 1994;; Magnusson i Cotman, 1993; Tamaru i wsp., 1991]. U starych szczurów zanotowano spadek odpowiedzi na NMDA w korze czołowo-ciemieniowej [Baskys i wsp., 1990] i obniżenie pobudzających potencjałów postsynaptycznych (EPSP) w hipokampie [Barnes i wsp., 1997]. Wpływ zmian receptora NMDA na LTP i procesy uczenia i pamięci u starzejących się zwierząt został opisany w pracy przeglądowej [Magnusson, 1998b].

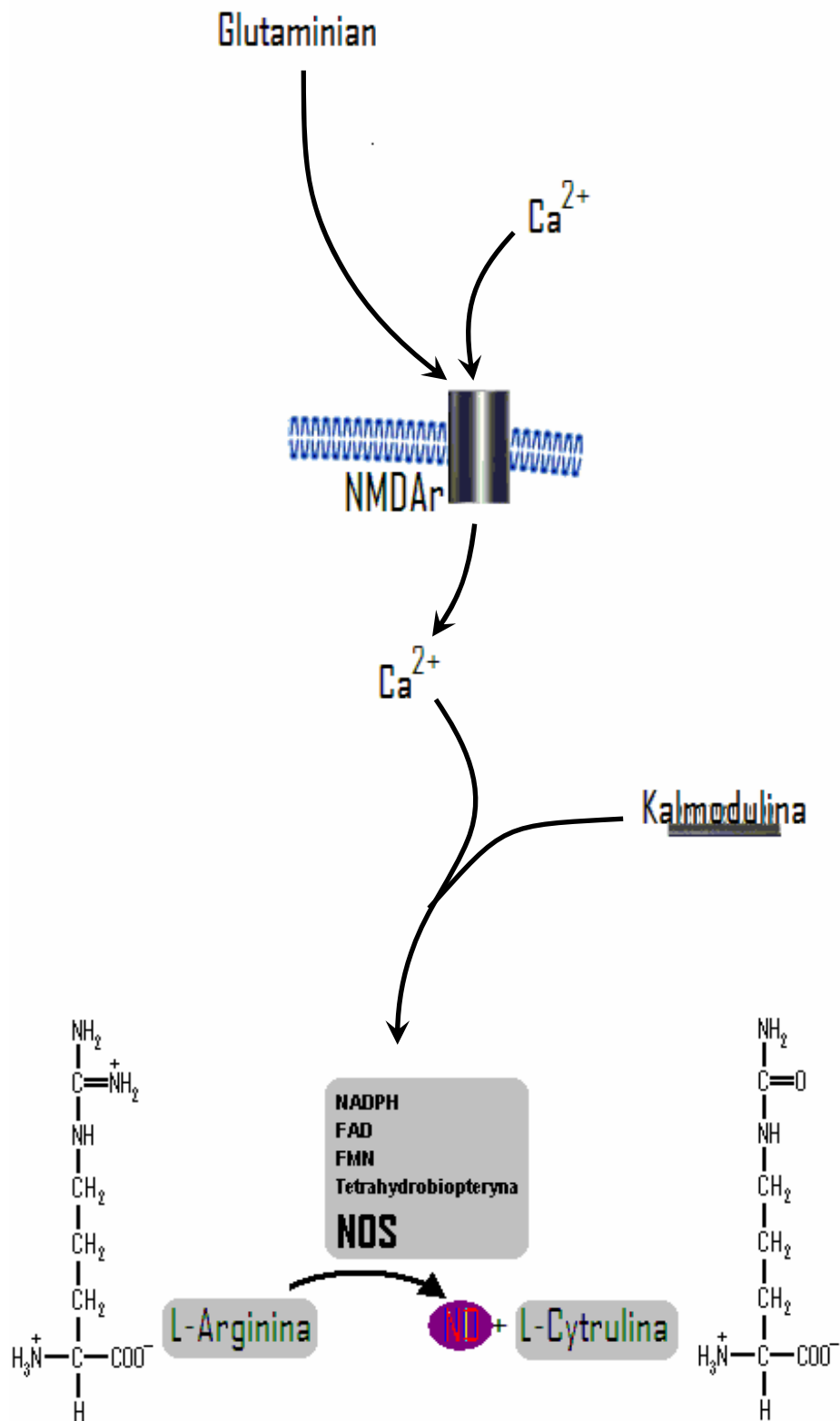
Syntazy tlenu azotu i ich udział w procesie starzenia.

NO, cząsteczka pełniąca rolę przekaźnika w procesach przekaźnictwa informacji wewnątrz i pomiędzy komórkami jest produktem reakcji katalizowanej przez izoformy homodimerycznego enzymu-syntazy tlenu azotu (Nitric Oxide Synthase, NOS; E.C. 1.14.13.39).

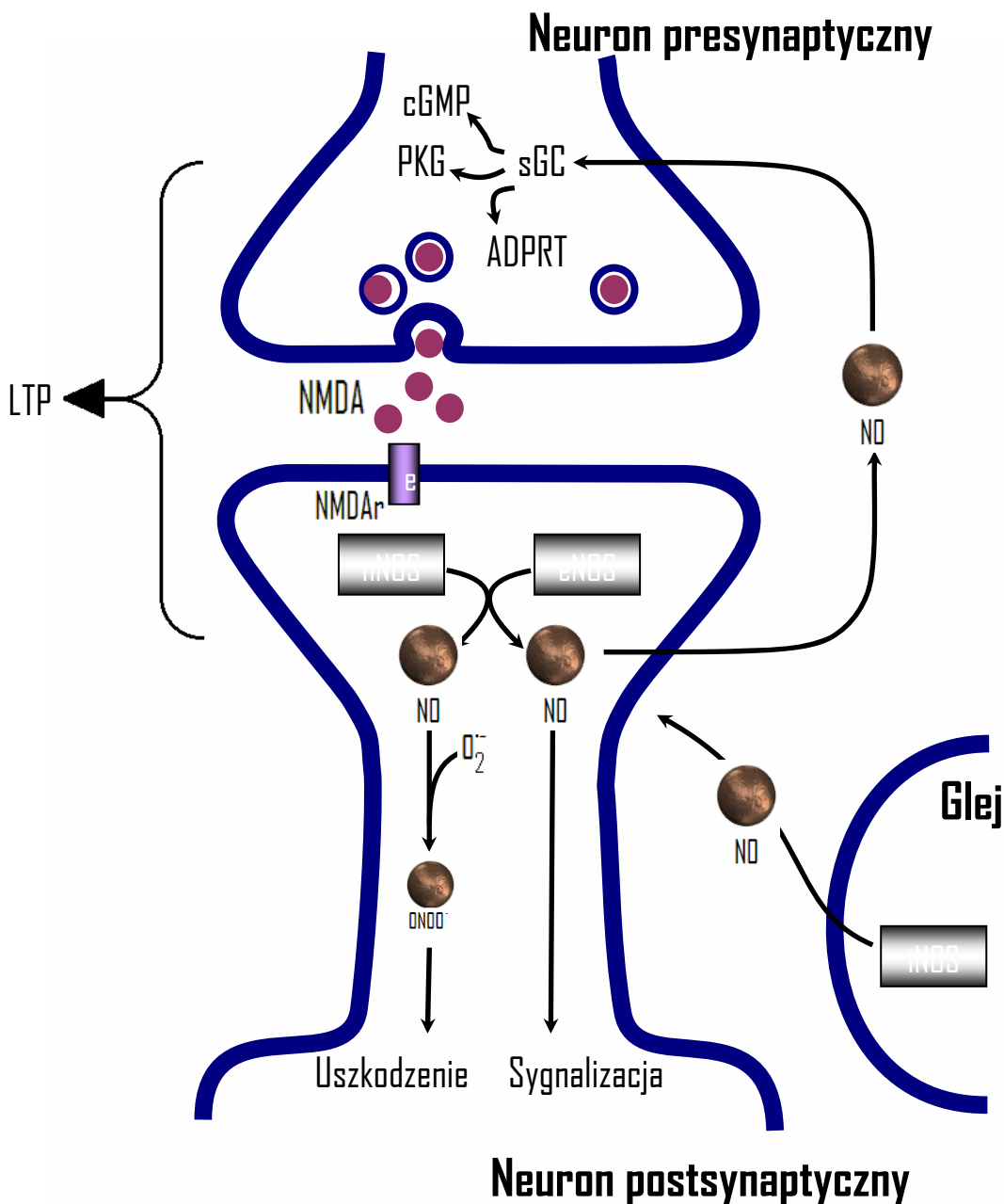
Enzym ten wykazuje homologię do cytochromu P450. Do aktywności syntaz tlenu azotu konieczne są domeny: C-końcową redukująca (wiążąca NADPH, FAD i FMN), centralnie położona domena wiążąca kalmodulinę i N-końcowa utleniająca (wiążąca hem, tetrahydrobiopterynę i argininę). Maksymalna szybkość syntezy NO jest ograniczona przez tempo dostarczania elektronów do hemu przez domenę redukującą. Obecność kalmoduliny w centralnej domenie

jest potrzebna do wydajnego przenoszenia elektronów z kofaktorów związanych przez domenę redukującą na hem.

Istnieją trzy podstawowe izoformy syntazy tlenu azotu. Indukowana iNOS trwale wiąże kalmodulinę i nie reaguje na wahania stężenia jonów wapnia; odgrywa ona rolę głównie w zjawiskach odpornościowych. Konstytutywne izoformy: neuronalna i śródbłonkowa (odpowiednio: nNOS i eNOS) są zależne od sygnalizacji wapniowej i syntetyzują stosunkowo małe ilości NO odgrywającego rolę w zjawiskach plastyczności synaptycznej i regulacji przepływu krwi. Obie izoformy są obecne w neuronach mózgu [Bredt i wsp., 1991; Dinerman i wsp., 1994]. NO w mózgu pełni rolę zwrotnego przekaźnika niosącego informację z części post- do presynaptycznej zakończeń nerwowych. Jest również wtórnym przekaźnikiem w części postsynaptycznej. Odgrywa znaczną rolę w LTP-długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym w hipokampie i długotrwałym osłabieniu synaptycznym (Long Term Depression, LTD) w mózdzku; może być zaangażowany w procesy uczenia i pamięci.



Ryc. 1. Schemat zależnej od receptora NMDA aktywacji NOS.



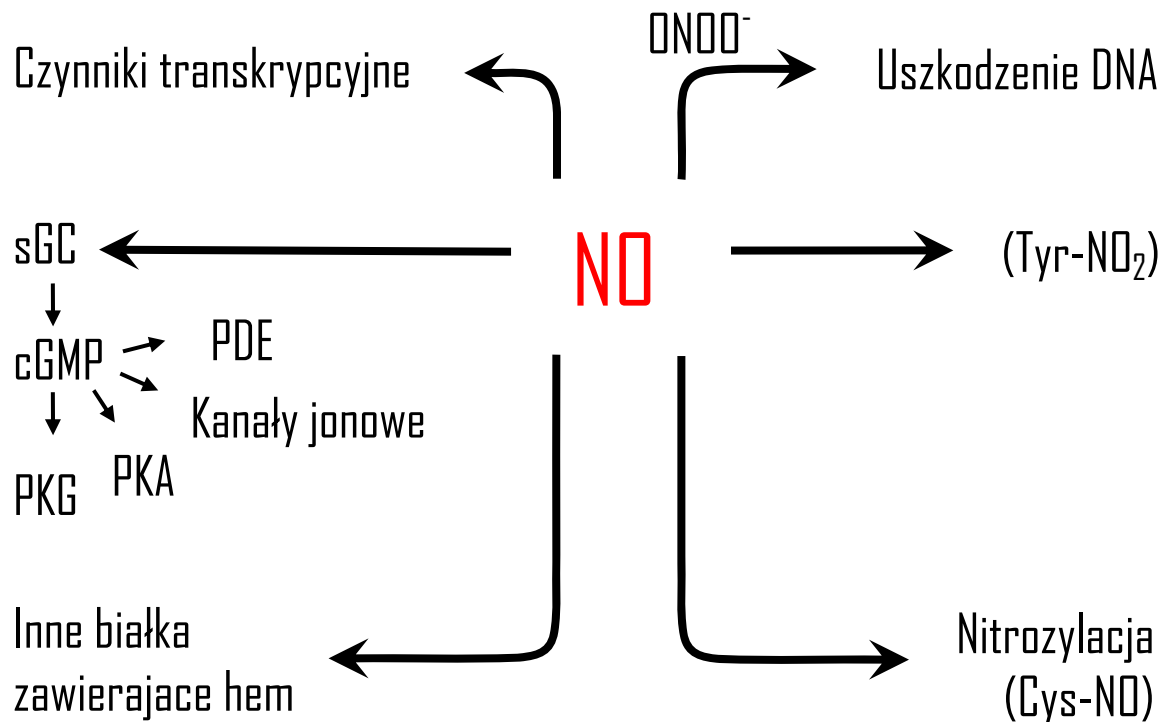
Ryc. 2. Rola tlenku azotu w ośrodkowym układzie nerwowym.

Neuronalna izoforma NOS (nNOS) została wykryta w neuronach i astrocytach [Togashi i wsp., 1997]. Za pośrednictwem białek gęstości postsynaptycznej nNOS jest związane z kompleksem receptora NMDA, dzięki czemu jest silnie aktywowana przez jony wapnia napływające po otwarciu NMDAr. Najlepiej poznanym receptorem NO jest rozpuszczalna izoforma cykazy guanylanowej

(sGC), która produkując cGMP reguluje aktywność m. in. kinazy białkowej G (PKG).

Fizjologia

Patologia



Ryc. 3. Udział tlenu azotu w fizjologii i patologii komórki.

Regulacja nNOS.

Wzrost $[Ca^{2+}]$ powyżej pewnego poziomu powoduje inhibicję cyklazy guanylanowej [Knowles, 1989] będącej najlepiej poznanym receptorem NO, aktywuje również fosfodiesterazę cGMP [Mayer, 1992]. Ponadto wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia aktywuje zależną od Ca^{2+} i kalmoduliny kinazę białkową II, która fosforylując NOS zmniejsza jej aktywność [Bredt i wsp., 1992; Nakane i wsp., 1991].

W regulacji nNOS uczestniczą także inne kinazy. PKC moduluje jej aktywację zależną od receptorów NMDA [Marin i wsp., 1992], prawdopodobnie poprzez zmianę jej wrażliwości na jony wapnia [Okada, 1995], jednak nie jest jasne, czy jej wpływ jest aktywujący, czy inhibujący [Bredt, 1992; Brune i Lapetina, 1991; Nakane, 1991].

Oczyszczona nNOS jest także fosforylowana przez cAMP-zależną i cGMP-zależną kinazę białkową [Bredt i wsp., 1992; Brune i Lapetina, 1991; Dinerman i wsp., 1994]. Nie jest jasne jak miałyby to wpływać na jej funkcję [Bredt i wsp., 1992; Brune i Lapetina, 1991].

Inhibitory kinaz tyrozynowych hamują aktywność nNOS, sugerując, że jest ona substratem i dla tej grupy kinaz [Rodriguez i wsp., 1994].

nNOS jest defosforylowana przez zależną od Ca^{2+} i kalmoduliny fosfatazę kalcyneurynę [Dawson i wsp., 1993; Steiner i wsp., 1992]. Powoduje to wzrost jej aktywności.

Tak jak wiele innych enzymów NOS podlega zwrotnej inhibicji przez swój produkt-tlenek azotu, lecz nie przez cytrulinę [Hu i El-Fakahany, 1995; Rengasamy i Johns, 1993; Rogers i Ignarro, 1992]. Podobną inhibicję obserwuje się w przypadku iNOS [Assreuy i wsp., 1993].

NO wpływa na uwalnianie neurotransmiterów [Guevara-Guzman i wsp., 1994], neuropeptydów i hormonów [Garry i wsp., 1994; Karanth i wsp., 1993; Rettori i wsp., 1992]. Niektóre z tych efektów mogą być interpretowane jako mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego: NO hamuje aktywujący nNOS wzrost stężenia wapnia w wyniku aktywacji receptora NMDA [Manzoni O, Bockaert, 1993; Garry i wsp., 1994] i innych typów metabotropowych [Clementi i wsp., 1995; Ormandy i Jope, 1989] i jonotropowych receptorów. W przypadku receptora NMDA zachodzi to prawdopodobnie przez wpływ na miejsce regulatorowe

receptora wrażliwe na stan redoks [Lipton i wsp., 1993]. NOS reguluje także na stężenie wapnia wewnątrz komórek [Hu i El-Fakahany, 1996], jednak wyniki są niejasne i nie umożliwiają wyciągnięcia wniosków co do ewentualnej roli tego zjawiska w autoregulacji NOS.

Tlenek azotu może przekraczać błony lipidowe i przez to oddziałuje zarówno na komórki go syntetyzujące jak sąsiednie. Ograniczeniem dla jego dyfuzji jest przede wszystkim wysoka reaktywność; jego okres półtrwania wynosi zaledwie kilka sekund. NO posiada jeden niesparowany elektron, jest wolnym rodnikiem. Łatwo oddaje lub przyjmuje więc elektron, tworząc odpowiednio NO^+ lub NO^- .

- NO reaguje z kationami metali przejściowych takimi jak Fe^{2+} hemoglobiny. NO wchodzi w interakcję z żelazem niektórych enzymów mitochondrialnych, co prowadzi do inhibicji oddychania [Stadtler i wsp., 1991]. NO wiąże także Fe(III)-hem [Stamler i wsp., 1992], kompleks ten jest jednak niestabilny i uwalnia NO^+ .
- NO^+ . NO^+ może być obecny w roztworach wodnych, jednak w układach biologicznych jego główną formą są związki z grupami nitrozyłowymi. Związki z grupami nitrozyłowymi mogą powstawać w reakcjach NO_2 z tiolami i aminami, [Kosaka i wsp., 1989] lub dwusiarczkami [Pryor i wsp., 1982]. Najważniejszą formą związków z grupami nitrozylowym są S-nitrozotiole, które mogą spontanicznie uwalniać NO [Dawson i wsp., 1992].
- Biologiczne znaczenie NO^- jest słabiej poznane. Sugeruje się, że ta stosunkowo trwała forma NO może stanowić swego rodzaju rezerwuar umożliwiający przedłużone działanie NO [Murphy i Sies, 1991].

NO może aktywować rozpuszczalną izoformę cyklazy guanylanowej (sGC), a także reagować z licznymi białkami prowadząc m. in. poprzez ich S-nitrozylację do zmian ich aktywności. W przypadku nadmiernej aktywacji przez jony Ca^{2+}

napływające przez receptory glutaminianu izoforma ta może brać udział w wolnorodnikowym uszkodzeniu tkanek [Elibol i wsp., 2001; Harukuni, 1999].

eNOS, pierwotnie obserwowany w śródbłonku naczyń krwionośnych gdzie reguluje przepływ krwi, jest również obecny w astrocytach [Wiencken i Casagrande, 1999] i neuronach hipokampa [Dinerman i wsp., 1994].

Indukowalna syntaza NO (iNOS) nie reaguje na wahania stężenia wapnia. Pełni rolę głównie w układzie odpornościowym. Poza niszczeniem drobnoustrojów izoforma ta jest współodpowiedzialna za wzrost uwalniania NO obserwowany w chorobach neurodegeneracyjnych [Lee i wsp., 1999; Liberatore et al., 1999]. Zgodnie z hipotezą starzenia mózgu zależnego od tlenku azotu [McCann 1997; McCann i wsp., 1998], wywołane powtarzającymi się infekcjami organizmu i krążącymi we krwi cytokinami indukcje iNOS może odgrywać kluczową rolę również w starzeniu mózgu. NO posiada umiarkowaną reaktywność, jednak produkty jego oddziaływania z innymi wolnymi rodnikami mogą powodować kumulujące się uszkodzenia i prowadzić do degeneracji neuronów i gleju hipokampa, podwzgórza czy szyszynki. Prowadziłoby to do narastających z wiekiem zaburzeń procesów poznawczych i wydzielania hormonów.

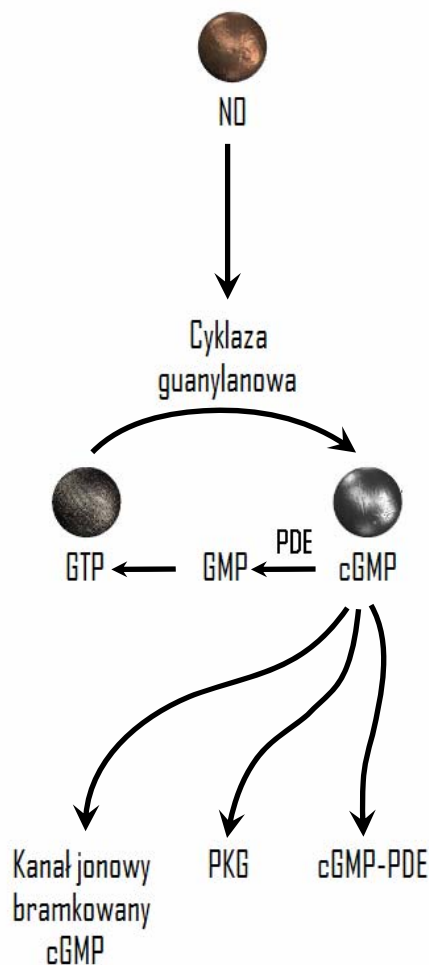
Klasyczne poglądy zakładają obecność konstytutywnych izoform syntazy tlenku azotu w cytoplazmie i przy błonie komórkowej. W ostatnich latach opublikowano jednak szereg prac wskazujących na istnienie enzymów syntetyzujących NO we frakcji mitochondrialnej. Wykazywano reakcję przeciwciał przeciwko eNOS z mitochondriami szczura z różnych tkanek włączając mózg [Kobzik i wsp., 1995; Lacza i wsp., 2001]. Ustalono, że izoforma o właściwościach eNOS jest silnie związana z zewnętrzną (cytoplazmatyczną) stroną zewnętrznej błony mitochondrialnej [Gao i wsp., 2004]. Ustalono więc iż eNOS może przyłączać się do mitochondriów, jednak nie jest białkiem *stricto* mitochondrialnym.

Istnieje jednak szereg publikacji wskazujących na istnienie izoformy związanej z wewnętrzną błoną mitochondrialną. Ma to być białko syntetyzujące NO i cytrulinę z argininy, zależne od wapnia i wrażliwe na klasyczne inhibitory NOS [Ghafourifar i Richter, 1997]. Zależność od wapnia powoduje, że wzrost Ca^{2+} wewnątrz mitochondriów aktywuje mtNOS, co prowadzi do spadku zużycia tlenu przez mitochondria i ich potencjału transbłonowego. NO w fizjologicznych stężeniach może kompetycyjnie, odwracalnie i zależnie od stężenia wiązać oksydazę cytochromu c i inhibować przepływ elektronów w łańcuchu oddechowym, tym samym redukując konsumpcję O_2 , gradient potencjału i w efekcie syntezę ATP [Ghafourifar i Richter, 1997; Ghafourifar i wsp., 2001; Ghafourifar i Richter, 1999; Giulivi, 1998; Schweizer i Richter, 1994]. Inhibicja mtNOS intensyfikuje oddychanie i budowę potencjału, co wskazuje, że w typowej sytuacji mtNOS stale redukuje zużycie tlenu i potencjał transbłonowy w mitochondriach szczurzego serca [Ghafourifar and Richter. (1997)]. Obniżanie mitochondrialnego potencjału transbłonowego przez mtNOS powoduje osłabienie pobierania wapnia, a więc mtNOS reguluje mitochondrialną homeostazę wapnia za pośrednictwem pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego [Ghafourifar i Richter, 1999].

Białko oczyszczone z mitochondriów szczurzej wątroby miało 100% homologii do nNOS i 21% z iNOS [Elfering i wsp., 2002]. Późniejsze badania wykazały zanik aktywności mtNOS u myszy nNOS^{-/-}, lecz nie eNOS^{-/-} lub iNOS^{-/-}, potwierdzając związek mtNOS z nNOS [Kanai i wsp., 2001]. Inne badania wykazały, że w mózgu szczura mtNOS to 144kDa zależna od wapnia forma nNOS związana z wewnętrzną błoną mitochondrialną, różna od 157-kDa cytoplazmatycznego nNOS [Riobo i wsp., 2002]. Zaobserwowano też 70-kDa białko reagujące z przeciwciałami przeciwko nNOS, ale nie przeciwko eNOS czy iNOS w mitochondriach mysiego mózgu [Lacza i wsp., 2003]; przypuszcza się, że był to fragment artefaktycznie uwolniony podczas izolacji [Ghafourifar i

Cadenas, 2005]. Inna grupa pokazywała 147-kDa zależny od wapnia mtNOS związany z wewnętrzną błoną mitochondrialną i reagujący z przeciwciałami przeciwko nNOS [Lores-Arnaiz i wsp., 2004]. Obecność izoformy o właściwościach zbliżonych do nNOS w mitochondriach potwierdzają także inne publikacje [Elfering et al. (2002); Holmqvist and Ekstrom (1997); Kanai et al. (2004)].

Anion ponadtlenkowy powstaje w wyniku utraty elektronów w łańcuchu oddechowym. Anion ten jest umiarkowanie reaktywny, ale szybko reaguje z produkowanym też w mitochondriach NO. Ocenia się, że 15% anionu ponadtlenkowego generowanego w mitochondriach tworzy nadtlendioazotyn, podczas gdy 85% jest dysmutowane do H₂O₂ [Cadenas i wsp., 2001; Poderoso i wsp., 1999]. Istnieją publikacje potwierdzające, że aktywność mtNOS powoduje powstawanie nadtlendioazotynu [Boveris i wsp., 2002; Bringold i wsp., 2000], indukuje stres oksydacyjny i aktywuje apoptozę, także neuronów [Dennis i Bennett, 2003; Ghafourifar i wsp., 1999]. Do syntezy nadtlendioazotynu jest zużywany znaczący procent NO produkowanego w mitochondriach [Dedkova i wsp., 2004; Kanai i wsp., 2004; Lacza i wsp., 2001], a mtNOS został nawet nazwany syntazą nadtlendioazotynu [Groves, 1999]. W mitochondriach znaleziono modyfikacje białek wskazujące na obecność stresu nitrozacyjnego [Aulak i wsp., 2004; Marcondes i wsp., 2001].



Ryc. 4. Rozpuszczalna cyklaza guanylanowa jako „receptor” tlenu azotu.

Rozpuszczalna cyklaza guanylanowa (sGC), „klasyczny” receptor tlenu azotu. Aktywacja rozpuszczalnej cyklazy guanylanowej była pierwszą poznaną rolą NO jako drugorzędowego przekaźnika sygnału. Cyklaza guanylanowa (GC) należy do rodziny dimerycznych enzymów katalizujących konwersję GTP do cGMP. Wrażliwa na tlenek azotu izoforma "rozpuszczalna" jest heterodimerem składającym się z podjednostek α i β , każdy o masie ok. 70-80kDa. Heterodimeryzacja jest konieczna dla przejawienia aktywności katalitycznej i wrażliwości na stymulujący wpływ NO [Lucas i wsp., 2000].



Ryc. 5. Schemat cząsteczki rozpuszczalnej cyklicznej guanylanowej.

Według Hobbs [1997], zmienione.

Monomer sGC α lub β posiada N-końcową domenę wiążącą hem, wymagany dla aktywacji sGC przez NO, centralnie położoną domenę dimeryzacji i C-końcową domenę katalityczną. Hem związany z heterodimerem sGC ma, w odróżnieniu od wielu innych białek, większe powinowactwo dla NO niż dla tlenu; związanie tlenu powoduje inaktywację enzymu, a obecność związków redukujących zwiększa ją. Do hemu sGC może się też wiązać tlenek węgla, jednak powoduje to zaledwie 4-krotną aktywację enzymu w porównaniu ze 100-200x aktywacją przez NO [Stone i Marletta, 1994]. Dimer posiada tylko jedno miejsce wiążące substrat/katalityczne, współtworzone przez określone aminokwasy domen katalitycznych podjednostek α i β [Liu i wsp., 1997; Lucas i wsp., 2000].

sGC podlega ekspresji w niemal wszystkich komórkach ssaków. W mózgu stwierdzono ekspresję $\alpha 2$ i $\beta 1$ [Harteneck i wsp., 1991; Nakane i wsp., 1990]. Dimer $\alpha 1/\beta 1$ ma wyższą aktywność katalityczną niż $\alpha 1/\beta 2$. Uważa się, że ekspresja $\beta 2$ i wypieranie przez nią $\beta 1$ z dimerów może stanowić jeden z mechanizmów regulacji aktywności sGC. Również obecność w dimerze podjednostki $\alpha 2$ zmniejsza aktywność katalityczną. Odkryto także podjednostki $\alpha 3$ i $\beta 3$ o słabiej poznanym znaczeniu. Dodatkowo w przypadku niektórych podjednostek może zachodzić alternatywne składanie, niekiedy dając podjednostki inhibujące enzym [Behrends i wsp., 1995].

Istnieją dwa typy motywów wiążących cGMP: jeden z nich jest obecny w izoformach PKG i kanałach jonowych bramkowanych cyklicznymi nukleotydami, drugi natomiast w zależnych od cGMP fosfodiesterazach.

Kinaza zależna od cGMP (PKG lub cGK) należy do rodziny kinaz serynowo-treoninowych. U ssaków poznano 2 geny-prkg1 dla cytozolowej PKG 1 (cGKI) i prkg2 kodujący błonową PKG 2 (cKGII), przy czym kinaza I ma 2 warianty powstające w wyniku alternatywnego składania A lub α i B lub β różniące się N końcem. Aktywacja PKG następuje w stężeniach cGMP sub- i mikromolarnych [Hofmann, 2005].

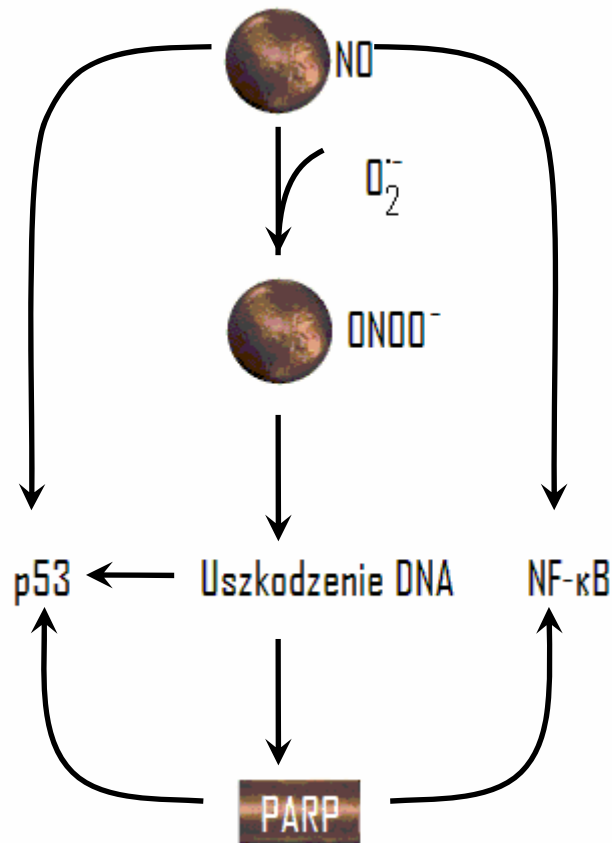
PKG zawierają N-końcową domenę A, domenę regulatorową R i domenę katalityczną C [Hofmann, 2005]. Wszystkie PKG mają w N-końcowej domenie miejsce dimeryzacji, miejsce autoinhibicji (aktywowane w nieobecności cGMP), miejsce autofosforylacji (autofosforylacja w obecności cGMP zwiększa aktywność enzymu) i miejsce regulujące wewnątrzkomórkową lokalizację enzymu. Domena regulatorowa ma 2 miejsca wiążące cGMP z wysokim i z niskim powinowactwem PKG 1A wykazuje najwyższe powinowactwo dla cGMP, najniższe natomiast PKG 2. Zajęcie obu miejsc domeny regulatorowej przez cGMP uwalnia domenę katalityczną od związanej z nim sekwencji autoinhibującej (pseudosubstratowej) położonej na N końcu. Umożliwia to autofosforylację i wzrost aktywności PKG [Hofmann, 2005]. N-końcowa część kinazy zawiera również sekwencję określającą lokalizację wewnątrzkomórkową oraz suwak leucynowy umożliwiający homodimeryzację.

PKG I przypisuje się rolę regulatora cytozolowego stężenia jonów wapnia. Fosforyluje ona *in vitro* i *in vivo* receptor IP₃ oraz substrat G będący inhibitorem fosfataz. Innym prawdopodobnym substratem jest zależna od wapnia cytozolowa PLA2 [Lucas i wsp., 2000].

Najwyższy poziom PKG 1 w mózgu stwierdzono w mózdzku i hipokampie. PKG 1A i B znajdują się głównie w cytozolu. Ich sekwencje na N-końcu różnią się do siebie, co umożliwia interakcje z odmiennymi grupami białek. PKG 2 w mózgu podlega ekspresji w jądrach podkorowych [Hofmann, 2005]. Jest zakotwiczona do błony komórkowej za pośrednictwem mirystylacji N-końca. Pomimo ekspresji PKG 2 w mózgu uszkodzenie jej genu nie powoduje dramatycznych skutków [Werner i wsp., 2004] w przeciwieństwie do PKG 1 [Feil i wsp., 2003]. cGKI β jest zaangażowane w LTP w hipokampie [Arancio i wsp., 2001; Kleppisch i wsp., 2003]. W neuronach Purkiniego w mózdzku posiadających wysoki poziom cGKI α kinaza ta jak się przypuszcza może uczestniczyć w LTD [Feil i wsp., 2003; Hofmann, 2005].

U ssaków zidentyfikowano co najmniej 10 rodzin fosfodiesteraz regulowanych przez cGMP. PDE z rodzin 1, 2, 3 i 10 nie wykazują silnej specyficzności, PDE z rodzi 5, 6 i 9 wykazują wybiórczość względem cGMP, a pozostałe-względem cAMP. cGMP reguluje PDE poprzez 1) bezpośrednią aktywację, 2) współzawodnictwo o miejsce wiążące z cAMP i 3) poprzez wiązanie miejsc regulacji allosterycznej (np. bezpośrednia stymulacja albo stymulacja aktywującej PDE fosforylacji przez PKG).

NF- κ B jest czynnikiem transkrypcyjnym wrażliwym na tlenek azotu oraz na stan redox. Ten dimeryczny TF został odkryty w 1986 w limfocytach B jako białko aktywujące transkrypcję lekkiego łańcucha immunoglobuliny kappa. Regulacji przez NF- κ B podlegają m. in. geny cytokin, receptorów błony komórkowej, enzymów antyoksydacyjnych i iNOS [Moynagh, 2005]. Typowy (prototypowy) skład nieaktywnego NF- κ B znajdującego się w cytoplazmie to heterotrimer p50, p65 (RelA) i I κ B (α lub β).



Ryc. 6. Rola tlenku azotu i produktów jego reakcji z innymi wolnymi rodnikami w uszkodzeniu DNA i aktywacji czynników transkrypcyjnych.

W zależności od etapu cyklu komórkowego ekspresji mogą podlegać inne podjednostki NF-κB wiążące DNA, np. p52, c-Rel i RelB oraz inne podjednostki hamujące-IκB, np. Bcl-3 [Moynagh, 2005].

W stanie nieaktywnym NF-κB znajduje się w cytozolu, związany z inhibitorami należącymi do rodziny I-κB. Aktywacja zachodzi poprzez indukcję dysocjacji IκB. Zdarzeniem koniecznym do dysocjacji IκB od NF-κB jest fosforylacja i ubiquitynacja IκB. Dimer p50-p65 podlega translokacji do jądra i aktywuje geny zawierające w 5'-elementach regulujących sekwencję 5'-GGGPuNNPy-PyCC-3' (Pu-puryna; Py-pirymidyna; N-dowolna zasada). Fosforylacji IκB na serynach 32 i 36 dokonuje kompleks kinazy IκB [IKK] składający się z 2

podjednostek katalitycznych IKK α i IKK β oraz podjednostki regulatorowej IKK γ . Samo IKK jest aktywowane przez fosforylację podjednostki katalitycznej IKK β , a kandydatami do roli czynnika *upstream* dla IKK są: MAPKKK-1 [Mattson, 2005] oraz kinaza indukująca NF- κ B NIK. Obserwuje się również autofosforylację IKK na kilku C-końcowych serynach. Autofosforylacja redukuje aktywność IKK i może stanowić mechanizm regulacji zwrotnej.

Doświadczalne wyłączenie genów p50 i p65 powoduje złożone zaburzenia wielu organów (uszkodzenia wątroby, zmiany odpowiedzi odpornościowej, modyfikacje zjawisk ekscytotoksyczności i neurodegeneracji poniedokrwiennej) [Yu i wsp., 1999]. Wskazuje to na znaczną rolę p65 w rozwoju i na to, że w wielu procesach białka inne niż p50 mogą dimeryzować z nim i zastępować p50. Natomiast brak IKK α albo β jest letalny.

NF- κ B zapobiega apoptozie neuronów *in vivo* i w hodowlach. Pośredniczy on również w antyapoptotycznym efekcie TNF wywieranym na hodowle neuronów i innych komórek. Aktywacja tego czynnika transkrypcyjnego zachodzi w odpowiedzi na cytokiny i czynniki neurotroficzne. NF- κ B jest też aktywowany przez stres oksydacyjny i wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia.

Aktywacja NF- κ B hamuje wczesne etapy apoptozy, chroniąc komórki przed dysfunkcją mitochondriów i produkcją rodników tlenowych. Genami docelowymi w antyapoptotycznym działaniu NF- κ B są m. in. dysmutaza ponadtlenkowa Mn-SOD, białka z rodziny Bcl-2, p53, białka z rodziny inhibitorów apoptozy IAP, iNOS, cyklooksygenaza 2, GFAP i białko wiążące wapń kalbindyna D28k [Kaltschmidt i wsp., 2002; Mattson i wsp., 2005]. Genem docelowym jest też I κ B α .

Aktywacja komórek cytokinami lub wolnymi rodnikami prowadzi do fosforylacji I- κ B za pośrednictwem I- κ B kinazy (IKK) i w efekcie do ubikwitynacji i degradacji I- κ B. Uwolniony NF- κ B przenosi się do jądra i tam

jako homo- albo heterodimer reguluje ekspresję genów. NO może działać za pośrednictwem różnych mechanizmów:

- NO reguluje ścieżki znajdujące się powyżej I κ B, np. aktywuje IKK- α i p21ras.
- NO może zmiatać O₂⁻ hamując powstawanie H₂O₂ i przez to osłabiać aktywację NF- κ B.
- NO stabilizuje mRNA i białko I- κ B i aktywuje jego translokację do jądra, gdzie może hamować wiązanie NF- κ B do DNA.
- NO może hamować wiązanie NF- κ B do DNA poprzez S-nitrozylację kluczowej cysteiny podjednostki p50.

Bodźce stresowe, w wielu przypadkach za pośrednictwem zwiększonego uwalniania NO, prowadzą do stabilizacji czynnika transkrypcyjnego p53 i jego translokacji do jądra. Aktywacja p53 może prowadzić do blokady cyklu komórkowego lub do apoptozy zależnej od cytochromu c i kaspaz. Na temat znaczenia p53 w fizjologii i patologii komórki istnieje bogata literatura przeglądowa [Culmsee i Mattson, 2005; Gomez-Lazaro i wsp., 2004]. W nawiązaniu do relacji pomiędzy p53 a NO należy wspomnieć o inhibicji promotora iNOS przez p53, co wskazuje na ujemne sprzężenie zwrotne pomiędzy p53 i NO.

Tlenek azotu a neurodegeneracja.

Indukcja iNOS jest wynikiem aktywacji NF- κ B, podobnie jak COX-2. Przy użyciu inhibitorów i usunięcia genu iNOS wykazano, że indukcja COX-2 jest w dużym stopniu zależna od aktywności iNOS [Nogawa i wsp., 1998]. Produkowany dzięki COX-2 rodnik nadadtlenkowy może wchodzić w reakcję z NO tworząc nadadtlenoazotyn. Anionorodnik nadadtlenkowy i powstający z niego w reakcji z tlenkiem azotu nadadtlenoazotyn należą do potencjalnie

najniebezpieczniejszych toksyn. Istnieją pewne dane sugerujące, że ONOO⁻ może powstawać nawet przy bazalnym stężeniu jednego z tych związków [Lipton, 1999].

Zarówno anionowa jak i sprotonowana forma nadtlenoazotynu uczestniczą w reakcjach i pokonują dystanse rzędu 0,1mm, a więc mogą wpływać na inne komórki niż te, w których powstały. Spowodowana nadtlenoazotynem akumulacja nitrotyrozyny została udokumentowana we wszystkich formach niedokrwienia mózgu. Związkiem wykazującym cytotoksyczność podczas niedokrwienia jest nadtlenoazotyn, nie zaś sam NO lub ponadtlenek [Xia i wsp., 1996]. Inhibicja syntezy lub zmiatanie któregośkolwiek z tych związków skutecznie hamuje śmierć komórek w różnych modelach [Estevez i wsp., 1998; Dawson i wsp., 1996; Chalimoniuk i Strosznajder 1998b]. U szczurów i gerbili zmiatacze wolnych rodników radykalnie zmniejszały uszkodzenie warstwy CA1 powstałe w wyniku niedokrwienia [Inanami i wsp., 1998; Yamamoto i wsp., 1997].

Znaczenie poszczególnych izoform NOS w procesie neurodegeneracji jest przeciwstawne. nNOS i iNOS przyczyniają się do uszkodzenia, natomiast aktywacja eNOS ma działanie neuroprotektoryjne. W modelach niedokrwienia mózgu inaktywacja genu nNOS niemal o połowę redukuje rozmiar zawału i liczbę komórek ginących w warstwie CA1 hipokampa [Panahian i wsp., 1996]. Silne działanie neuroprotektoryjne w modelach niedokrwienia mózgu wykazują również inhibitory nNOS [Escott i wsp., 1998; Zhang i wsp., 1996]. Natomiast usunięcie genu iNOS wykazuje działanie neuroprotektoryjne, jednak po bardzo długich okresach niedokrwienia [Iadecola i wsp., 1997], co potwierdza obserwację, że indukcja iNOS zachodzi z dużym opóźnieniem w stosunku do niedokrwienia.

Wpływ starzenia na ekspresję i aktywność NOS.

Dotychczas istniejące dane na temat wpływu starzenia na ekspresję i aktywność NOS są niespójne, publikowane wartości wahają się od wzrostu do znaczącej redukcji w różnych częściach mózgu. W mózgu ludzkim Blum-Degen i wsp. [1999] nie zaobserwowali znamienych statystycznie zmian ekspresji lub aktywności NOS. Użyta przez nich procedura mogła wpłynąć na uzyskane wyniki, gdyż podczas własnych badań stwierdzono istotny wpływ przechowywania próbek na poziom aktywności NOS w mózgach dojrzałych i starczych.

W badaniach na starych szczurach Sprague-Dawley Cha i wsp. [1998] obserwowali spadek liczby neuronów barwiących się w reakcji immunologicznej przeciwko nNOS o 30-60% w prążkowie i wzrost w jądrze podwzgórzowym [Cha i wsp., 2000]. Yamada i wsp. [1996] opisał obniżenie liczby komórek w mózgu wykazujących reakcję dla NADPH-diaforazy, biochemicznego markera obecności NOS. W mózdzku spadek poziomu mRNA i białka NOS obserwowali Yu i wsp. [2000]. Wzrost mRNA nNOS w hipokampie starych szczurów stwierdzili La Porta i Comolli [1999]. Indukcję iNOS w starczym mózgu stwierdzali La Porta i Comolli [1999] oraz Vernet i wsp. [1998].

La Porta i Comolli [1999] uzyskali dane świadczące o aktywacji NOS z wiekiem w hipokampie, korze mózgu i mózdzku. Istnieją jednak prace wskazujące na spadek aktywności tego enzymu [Mollace i wsp., 1995; Vallebuona i Raiteri, 1995]. Wszystkie te dane wskazują na wysoką zmienność aktywności NOS i obecności iNOS w zależności od części mózgu, rasy użytych zwierząt i warunków hodowli.

Obserwowano związany z wiekiem spadek zależnej od receptora N-metylo-D-asparaginianu (NMDA) syntezy NO i cyklicznego GMP (cGMP) [Chalimoniuk i Strosznajder, 1998a; Vallebuona i Raiteri, 1995].

Polimeraza poli(ADP-rybozy).

Obserwowany w starzeniu i chorobach neurodegeneracyjnych wzrost uszkodzenia DNA powoduje aktywację enzymu polimerazy poli(ADP-rybozy)-1, PARP-1 (E.C. 2.4.2.30). Jest to silnie konserwowany, dimeryczny enzym obecny konstytutywnie w niemal wszystkich komórkach organizmów jądrowych z wyjątkiem drożdży. PARP-1, pierwszy i najbardziej rozpowszechniony spośród enzymów syntetyzujących poli(ADP-rybozę), jest ok. 1000-aminokwasowym 113-kDa (monomer) białkiem jądrowym zaangażowanym w procesy naprawy DNA, regulację struktury chromatyny, przebiegu cyklu komórkowego i ekspresji genów. Homburg i in. [2000] opublikowali wyniki wskazujące na znaczenie tego enzymu w procesach wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału.

Pomimo że poli(ADP-rybozylacja) została odkryta w latach 60., większości znaczących badań dokonano w ostatnim dziesięcioleciu. Sklonowanie genów PARP-2, PARP-3, tankirazy i innych PARP ukazało znaczenie biologiczne tego małego dotychczas znanego typu modyfikacji posttranslacyjnej i pozwoliło zdefiniować rolę PARP-1 w naprawie DNA i innych procesach komórkowych. PARP-1 jest najpowszechniej występującym enzymem z rodziny polimeraz poli(ADP-rybozy). Jest on odpowiedzialny za syntezę ponad 90% poli(ADP-rybozy) w mózgu [Shieh i wsp., 1998].

Białko enzymu składa się z trzech domen, które można oddzielić przy użyciu ograniczonej proteolizy lub analizując wzór konserwacji ewolucyjnej [Kameshita i in., 1984; de Murcia i in., 1994]. N-końcowa 42-kDa domena zawiera sygnał lokalizacji jądrowej (NLS) i 2 palce cynkowe wiążące DNA. Centralna, 16-kDa domena zawiera 15 konserwowanych ewolucyjnie reszt glutaminianu, które prawdopodobnie są akceptorami poli(ADP-rybozy), oraz przypuszczalnie suwak leucynowy [Uchida i wsp., 1993].

55-kDa część C-końcowa zawiera miejsce wiążące substrat i katalizuje reakcje inicjacji, elongacji i rozgałęziania polimeru.



Ryc. 7. Schemat cząsteczki PARP-1.

NLS-sygnal lokalizacji jądrowej.

Mechanizm działania PARP-1.

W odpowiedzi na stres genotoksyczny stwierdza się wzrost aktywności, natomiast nie obserwuje się indukcji genu PARP-1. Eksperymentalna zmiana poziomu PARP-1 nie poprawia wydajności takich procesów jak naprawa DNA. Ekspresja genu PARP-1 wykazuje natomiast wyraźny profil rozwojowy. Gen ten ma cechy tzw. genów *housekeeping*. Posiada sekwencje wiążące czynniki transkrypcyjne Sp-1 i AP-2 [Potvin i wsp. 1993], co zapewnia tkankowo specyficzną ekspresję. Wykryto również autoregulację ekspresji poprzez wiązanie PARP-1 do sekwencji regulatorowych własnego genu [Oei i wsp., 1994].

Regulacja aktywności.

Aktywność PARP-1 jest silnie uzależniona od obecności uszkodzeń DNA, które powodują jej wzrost o dwa rzędy wielkości. Aktywacja następuje szybko i w odpowiedzi na bardzo małe ilości pęknięć, wcześniej niż możliwe jest ich wykrycie przy użyciu terminalnej transferazy deoksynukleotydów [Zhang et al. 1995a]. Są one rozpoznawane przez drugi z palców cynkowych obecnych w N-końcowej domenie wiążącej DNA (DBD). Pierwszy palec cynkowy powoduje

wtedy allosteryczną aktywację C-końcowej domeny katalitycznej, określanej też jako wiążąca dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (β -NAD⁺). Produktem ubocznym tej reakcji jest inhibujący PARP nikotynamid. Domena katalityczna dokonuje inicjacji reakcji poprzez przyłączenie pierwszej reszty ADP-rybozy do glutaminianu docelowego białka, którym jest najczęściej sam PARP-1. Akceptorami są również PARP-2, histony, p53, NF- κ B (p50, p65) i AP-1, topoisomeraza I, topoisomeraza II, zależna od DNA kinaza białkowa (DNA-PK), polimerazy DNA α i β i białka HMG oraz polimeraza RNA I oraz zależna od Ca²⁺ i Mg²⁺ endonukleaza-w sumie ponad 40 białek jądrowych [D'Amours i wsp., 1999; Krupitza i Cerutti 1989a; b; Mandir i wsp., 2002; Ruscetti et al. 1998; Scovassi i wsp., 1993; Tsai et al. 1992; Yoshihara i wsp., 1983; 1985].

Domena wiążąca β NAD⁺ katalizuje również elongację do długości od kilku do 100-200 reszt, oraz rozgałęzianie polimeru (średnio co ok. 30 reszt). Na długość i wzór rozgałęzienia polimeru ma wpływ typ akceptora i obecność innych białek (np. histonów). Czas półtrwania polimerów jest silnie uzależniony od stanu komórki; w obecności uszkodzonego DNA nie przekracza on minut. W PARP-1 miejsca akceptorowe poli(ADP-rybozy) znajdują się w domenie dimeryzacji, a automodyfikacja powoduje utratę powinowactwa do DNA i inhibicję aktywności katalitycznej.

Klasycznym aktywatorem PARP-1 są przerwy jednej z nici dupleksu DNA. PARP-1 może także wiązać przerwy dwuniciowe. Uszkodzenie DNA mogą powodować wolne rodniki i inne reaktywne związki, które modyfikują zasady azotowe lub przecinają "szkielet" deoksyrybozylowy. Niszczące działanie wykazują również uszkodzone przez nie inne cząsteczki takie jak lipidy lub białka, które mogą reagować z zasadami DNA tworząc addukty.

Istnieją dane o zachodzeniu fosforylacji PARP m. in. przez kinazę białkową zależną od DNA (DNA-PK) i kinazę białkową C (PKC). W procesie dojrzewania oocytów *Xenopus* PARP jest nieaktywny do momentu indukcji ich

progesteronem. Uaktywnienie zachodzi poprzez fosforylację białka głównie na serynach. DNA-PK wiąże się do dwuniciowych pęknięć dupleksu DNA i jest uważana za czynnik konieczny do naprawy tych uszkodzeń. Składa się ona z p460-białka będącego podjednostką katalityczną, oraz białek Ku. Oba składniki DNA-PK są w stanie wiązać dwuniciowe pęknięcia DNA, co prowadzi do aktywacji kinazy. PARP ADP-rybozyluje podjednostkę p460, sam stanowiąc dla niej substrat [Pleschke i wsp., 2000; Ruscetti i wsp., 1998]. ADP-rybozylacja zwiększa aktywność katalityczną kinazy.

Rola PARP-1.

Poli(ADP-rybozylacja) może wpływać na aktywność białek za pośrednictwem następujących mechanizmów:

- Kowalencyjna modyfikacja białka powoduje najczęściej utratę powinowactwa do DNA i/lub inhibicję aktywności. Jest to prawdopodobnie związane z silnym ładunkiem i rozmiarami polimerów, które mogą elektrostatycznie odpychać DNA i wpływać na konformację białka. Zgodnie z hipotezą *histone shuttling* [Realini i Althaus, 1992] PARP miałby w ten sposób dokonywać przejściowego, lokalnego demontażu chromatyny w celu zapewnienia dostępu do uszkodzonego DNA.
- Niekowalencyjne wiązanie poli(ADP-rybozy) przez regulowane białka. Konserwowany ewolucyjnie motyw wiążący PAR jest obecny w wielu kluczowych białkach [Pleschke i wsp., 2000] jak czynniki transkrypcyjne, m. in. p53. Przykładem takiego działania jest rekrutacja kompleksu naprawy DNA przez PARP-1 i PARP-2 [Masson i wsp., 1998; Schreiber i wsp., 2002]. Po wykryciu uszkodzenia DNA PARP dokonuje autorybozylacji, co powoduje związanie z nim białka XRCC1. Następnie XRCC1 służy jako centralny element strukturalny (*scaffold*) dla tworzącego się kompleksu

wycinania zasad BER (*Base Excision Repair*). Mechanizm zapewnia szybką i wydajną naprawę uszkodzeń.

- Niekowalencyjne oddziaływanie PARP-1 z innymi białkami zachodzi za pośrednictwem domen zaangażowanych w interakcje białko-białko. Pierwszym takim modulem, którego obecność w PARP-1 postulowano był suwak leucynowy. Ostatnio zaobserwowano w sekwencji enzymu motyw BRCT.

Regulacja ekspresji genów. Zupełnie oddzielną rolą PARP-1 jest regulacja transkrypcji. W 1997 pokazano, że, w bardzo wąskim przedziale stężeń (stosunków molowych PARP/gen) PARP jest w stanie zwiększać transkrypcję genów klasy II (*in vitro*). Zidentyfikowano go jako składnik funkcjonalny pozytywnego kofaktora 1, czyli kompleksu białkowego wspomagającego działanie aktywatorów transkrypcji genów klasy II. Do przejawienia pozytywnego wpływu PARP nie jest konieczna jego aktywność enzymatyczna.

Wykazano, iż PARP jest w stanie regulować lub współuczestniczyć w aktywności p53 jako czynnika transkrypcyjnego. Inaktywacja PARP-1 prowadzi do drastycznego spadku stabilności p53 [Simbulan-Rosenthal i wsp., 1998; Wang i wsp., 1998], co powoduje defekt transaktywacji genów zależnych od p53. PARP-1 stabilizuje *dziką* (wt) konformację p53 [Wesierska-Gadek i Schmid, 2000] i być może zapobiega jego reeksportowi z jądra, co hamowałoby jego degradację [Wesierska-Gadek i wsp., 2000].

Inne doniesienie mówi o oddziaływaniu PARP-1 z czynnikiem transkrypcyjnym YY1 [Oei et al., 1997].

Czynnik jądrowy κ B (NF- κ B) jest regulowany m. in. przez NO [Togashi i wsp., 1997] i PARP-1. NF- κ B silnie i specyficznie oddziałuje z autopoli(ADP-rybozylowanym) PARP-1 za pośrednictwem motywu niekowalencyjnie wiążącego poli(ADP-rybozę) [Pleschke i in., 2000]. NF- κ B tworzy kompleks z

białkiem PARP-1 w jądrze komórkowym [Hassa i wsp., 2001]. Obecność białka PARP-1 jest konieczna dla aktywacji NF- κ B w odpowiedzi na czynnik martwicy nowotworu TNF- α [Oliver i wsp., 1999]; p65 jest również silnie hamowany poprzez poli(ADP-rybozylację) i podlega wtedy reeksportowi do cytoplazmy, natomiast poli(ADP-rybozylacja) p50 prowadzi do jego aktywacji [Kameoka i wsp., 2000].

Istnieją dane wskazujące na zmianę aktywności NF- κ B z wiekiem [Toliver-Kinsky i wsp., 1997]. Opisane oddziaływania NF- κ B z PARP-1 mogą mieć istotne znaczenie w mechanizmach stresu oksydacyjnego i starzenia.

Degradacja PARP-1 przez kaspazę-3 jest jednym ze wczesnych zdarzeń programowanej śmierci komórki (PCD). Obecność fragmentu 85 kDa jest jednym z markerów tego procesu. PARP-1 utrzymuje za pośrednictwem ADP-rybozylacji w stanie nieaktywnym Ca^{2+} , Mg^{2+} -zależną endonukleazę. Endonukleaza ta jest jednym z enzymów, którym przypisuje się degradację DNA podczas typowej PCD. Wykazane w ostatnim czasie interakcje PARP-1 i PAR z p53 wskazują na możliwość istnienia nieznanymi dotychczas mechanizmów wpływu PARP na przebieg apoptozy [m. in. Schmid i in. 1999, Węsierska-Gądek i in. 1999].

W przypadku masowego uszkodzenia DNA, PARP-1 zużywa większość komórkowej puli βNAD^+ [Mandir i wsp., 2000]. Pociąga to za sobą spadek stężenia ATP koniecznego do resyntezy βNAD^+ , co może powodować obumieranie neuronów, najczęściej na drodze nekrozy [Ha i Snyder, 1999; Moroni i wsp., 2001]. Co więcej, deficyt energii w sytuacji znacznego uszkodzenia komórki może zmieniać już rozpoczęty, wymagający energii proces apoptotyczny w nekrozę [Ha i Snyder, 1999; Herceg i Wang, 1999]. Udział PARP-1 w neurodegeneracji potwierdzają badania z użyciem inhibitorów [Zhang i wsp., 2005] i uszkodzenia genu PARP [Elliasson i wsp., 1997].

Czynnikiem prowadzącym do powstania uszkodzeń DNA może być także gromadzący się w komórce i przestrzeni międzykomórkowej starzejącego się lub Alzheimerowskiego mózgu amyloid β , który poprzez stymulację procesów wolnorodnikowych może powodować aktywację PARP-1 [Adamczyk i wsp., 2005; Love i wsp., 1999, Strosznajder i wsp., 2000].

Rodzina genowa PARP. PARP-1 jest odpowiedzialny za syntezę ponad 90% poli(ADP-rybozy) obecnej w zdrowych komórkach ssaków. PARP-1 jest prekursorem niedawno odkrytej rodziny polimeraz poli(ADP-rybozy). PARP-2, podobnie jak PARP-1 jest aktywowany przez pęknięcia nici DNA, jednak poziom jego ekspresji i aktywności jest zdecydowanie niższy [Schreiber i wsp., 2002]. Oba enzymy są składnikami kompleksu dokonującego naprawy DNA na drodze wycinania zasad (BER) [Masson i wsp., 1988; Schreiber i wsp., 2002]. Pierwsze wyniki na temat innych ostatnio odkrytych polimeraz: PARP-3, Tankirazy-1 i 2 i vPARP nie wskazują na ich udział w naprawie materiału genetycznego.

PARP a starzenie.

Dane dotyczące zmian ekspresji i aktywności PARP-1 z wiekiem są sprzeczne. Messripour i wsp. [1994] wykazali, że poziom białka i aktywność podstawowa PARP w neuronach i astrocytach całego mózgu szczura wzrastają ponad trzykrotnie u zwierząt 30-miesięcznych w porównaniu z 3-miesięcznymi. Wzrostowi temu towarzyszył znacznie zwiększony poziom uszkodzenia DNA, choć niejednakowy w obu typach komórek. W obu grupach wiekowych neurony charakteryzowała znacznie większa ilość białka PARP-1 i jego aktywność w przeliczeniu na zawartość DNA. Wzrost aktywności PARP w starzeniu obserwowali również Bizec i wsp. [1989] w soczewce oka wołu. Salminen i wsp. [1997] zaobserwowali znaczący spadek poziomu białka PARP-1 w

starzejących się replikacyjnie fibroblastach. Podobnie, obniżone były także poziomy komponentów autoantygeny Ku: p70 i p86 i aktywność DNA-PK. W jądrach komórkowych izolowanych z mózgu i wątroby Mishra i Das [1992] otrzymali 30% spadek aktywności podstawowej PARP. Zmniejszeniu uległa intensywność ADP-rybozylacji białek, w tym przede wszystkim białek histonowych. Związany z wiekiem spadek aktywności PARP w mózgu i pozostałych narządach obserwowali również inni badacze [Grube i Bürkle, 1992; Quesada i wsp., 1990].

Maksymalna aktywność PARP koreluje ze średnią i maksymalną długością życia gatunków ssaków [Grube i Bürkle, 1992; Pero i wsp., 1985]. Pomimo kilkukrotnie większej stymulowanej oligonukleotydem maksymalnej aktywności w jednojądrzastych leukocytach młodych osobników gatunków długożyjących Grube i Bürkle nie obserwowali statystycznie znamiennej korelacji pomiędzy zawartością białka enzymatycznego PARP-1 a długością życia. Sugeruje to różnice jakościowe, nie zaś ilościowe, w cząsteczce enzymu. Podobne wnioski wysnuwa się na podstawie badań na ludzkich liniach komórkowych pobranych od osób długowiecznych [Muiras i in. 1998]. Dotychczasowe próby powiązania polimorfizmu genu PARP-1 z długowiecznością nie przyniosły jednak rezultatów.

PARP-1 w neurodegeneracji.

Pęknięcia nici DNA powstające w przebiegu zjawisk neurodegeneracji aktywują PARP. Inhibicja PARP chroni hodowane neurony korowe przed toksycznym działaniem 500 μ M NMDA, powszechnie używanego do wywoływania ekscytotoksyczności w modelach komórkowych i zwierzęcych. W procesie uszkodzenia DNA indukowanego podaniem NMDA istotne znaczenie ma nadtlenoazotyn [Szabo, 1996; Szabo i wsp., 1996; Zingarelli i wsp., 1996].

Sposób w jaki PARP-1 wywołuje degenerację neuronów nie jest dokładnie zbadany. Powszechną hipotezą jest wywołana masowym uszkodzeniem DNA nadmierna aktywacja PARP-1, która miałaby prowadzić do wyczerpania NAD i w konsekwencji spadku stężenia ATP. Faktycznie, sztuczne wprowadzenie SSB prowadzi do wyczerpania energii [Szabo i wsp., 1996]. Inhibicja albo uszkodzenie genu PARP-1 redukuje spadek stężenia βNAD^+ w niedokrwieniu [Endres i wsp., 1997]. Wykazano wyjątkowo skuteczne zmniejszenie rozmiarów zawału o 45-85% oraz utraty neuronów warstwy CA1 hipokampa po przejściowym niedokrwieniu dzięki inhibicji lub wyłączeniu genu PARP-1 [Eliasson i wsp., 1997; Endres i wsp., 1997; Lo i wsp., 1998; Takahashi i wsp., 1997; Strosznajder i wsp., 2003].

Drugim mechanizmem wyjaśniającym ochronne działanie inhibitorów PARP-1 może być jego udział w funkcji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [Won i wsp., 2006]. Oddziaływanie PARP-1 z NF- κ B może stanowić nowy mechanizm wspólny dla wielu chorób, w których mają miejsce zjawiska zapalne [Ha i Snyder, 2000; Haskó i wsp., 2002]. Myszy PARP-1^{-/-} są odporne na szok septyczny [podanie LPS; Oliver i wsp., 1999]. Zaburzenie zależnej od NF- κ B syntezy TNF- α i IFN- γ prowadzi u myszy PARP-1^{-/-} do blokady indukcji genu iNOS w makrofagach, likwidując jedno z najważniejszych źródeł wolnych rodników. Podobną rolę PARP-1 może odgrywać w niedokrwieniu mózgu, gdzie również obserwuje się indukcję NF- κ B, syntezę TNF- α i indukcję lub aktywację różnych izoform NOS.

PARP-1 jest atrakcyjnym obiektem badań gerontologicznych. Dotychczas był on jednak badany w oderwaniu od wielu wpływających na niego procesów. Nie zbadano wpływu starzenia na fosforylację PARP-1, pomimo że wiadomo, iż taka modyfikacja może zachodzić in vitro i in vivo. Nie przeprowadzono też próby skorelowania zmian aktywności PARP-1 z aktywnością NOS ani nie

analizowano roli, jaką w tym procesie może odgrywać wrażliwy na stres oksydacyjny, oddziałujący z PARP-1 czynnik transkrypcyjny NF- κ B. Obecne w literaturze rozbieżności nie pozwalają na ocenę w jakim stopniu zmiany podstawowej aktywności PARP są spowodowane zmianami poziomu NO, jednego z podstawowych czynników mogących wpływać na przeżycie i funkcjonowanie neuronów.

CEL.

Celem pracy było zbadanie aktywności i ekspresji poszczególnych izoform syntazy tlenu azotu w mózgu dojrzałym i starczym zwierząt wolnych od patogenów oraz określenie udziału NO w stresie oksydacyjnym i w aktywności polimerazy poli(ADP-rybozy). Na cel ten składają się następujące cele szczegółowe:

- Zbadanie wpływu starzenia na aktywność i ekspresję NOS w różnych częściach mózgu szczura rasy Wistar. Określenie udziału poszczególnych izoform enzymu w syntezie NO. Próba korelacji aktywności NOS i ekspresji białek pro- i antyapoptotycznych u zwierząt dorosłych i starych.
- Badanie stresu oksydacyjnego poprzez pomiar wolnorodnikowego uszkodzenia lipidów i jądrowej translokacji podjednostki p65 czynnika transkrypcyjnego NF- κ B.
- Zbadanie ekspresji oraz aktywności PARP-1 w różnych częściach mózgu szczurów dorosłych i starych. Korelacja tych zmian z aktywnością podstawową NOS. Zbadanie odpowiedzi PARP-1 w mózgu dojrzałym i starczym na stres oksydacyjny.

METODY.

1. Zwierzęta doświadczalne.

Do doświadczeń używano szczury rasy Wistar, samce, z hodowli prowadzonej przez IMDIK PAN. Zwierzęta utrzymywane były za barierą i spełniały wymagania kategorii SPF (*specific pathogen-free*). Zwierzęta w wieku 3-4 miesięcy i masie ciała 200-250g były traktowane jako dorosłe, zwierzęta w wieku 12-14 miesięcy o masie ciała ok. 250g jako stare dorosłe, zwierzęta w wieku 24-27 miesięcy o masie ciała ponad 300g jako stare.

2. Materiały i odczynniki.

2-1. Odczynniki. Znakowane radioizotopowo substraty: [U-¹⁴C] β-NAD o aktywności specyficznej 248mCi/mmol i [¹⁴C] L-argininę o aktywności specyficznej 360mCi/mmol, przeciwciało przeciw mysim Ig połączone z peroksydazą chrzanową, reagenty do ECL uzyskano z firmy Amersham, Buckinghamshire, UK, przeciwciała przeciwko PARP-1 i poli(ADP-rybozie) oraz odczynniki biochemiczne w tym nieznakowane radiologicznie substraty enzymów i peptydy amyloidu β-z firmy Sigma, St. Louis, USA, bisdimetylo-MDA-z firmy Avocado Heysham, UK, standardy masy molekularnej białek-z firmy BioRad, Hercules, USA, zestaw inhibitorów proteaz z firmy Boehringer, Mannheim, Niemcy, odczynniki nieorganiczne z firmy POCh Gliwice, Polska.

2-2. Przygotowanie odczynników. Uzyskany komercyjnie neurotoksyczny peptyd amyloidu β 25-35 zawieszono w wodzie bidestylowanej w stężeniu 2,5 mM i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 7 dni celem agregacji. Po rozdzieleniu na małe porcje przechowywany był w temperaturze -20⁰C.

10 mM roztwór bisdimetylo-MDA w 1% (obj./obj.) H₂SO₄ przetrzymywano 2 godziny w temperaturze pokojowej. Otrzymany roztwór 10 mM MDA przechowywano w temp. 4⁰C.

2-3. Preparatyka części mózgu. Mózg był izolowany bezpośrednio po dekapitacji. Preparatykę części mózgu wykonywano na chłodzonej lodem szalce Petri`ego. Wyizolowane: hipokamp, kora mózgu, prążkowie i mózdzek były oczyszczane z naczyń i istoty białej.

2-4. Otrzymywanie skrawków. Materiałem wyjściowym była kora mózgu, hipokamp i mózdzek. Skrawki o wymiarach 0,35mm x 0,35mm otrzymywano przez cięcie części mózgu wyizolowanych w sposób opisany powyżej w aparacie McIlwaina. W zależności od doświadczenia skrawki były zawieszane w buforze Krebsa-Ringera pozbawionym wapnia i magnezu, równoważonym karbogenem (95% O₂, 5% CO₂) zawierającym 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 10 mM glukozę, preinkubowane 90min. w 37⁰C celem stabilizacji funkcji receptorów NMDA i po uzupełnieniu CaCl₂ używane do pomiarów biochemicznych.

2-5. Otrzymywanie 10% homogenatu. Wyizolowane części mózgu homogenizowano w 50mM Tris-HCl pH 7.4 z 0.32 M sacharozą i zestawem inhibitorów proteaz Boehringer "Complete™ EDTA free" zawierającego odwracalne i nieodwracalne inhibitory proteaz (do pomiarów aktywności NOS) lub 10mM Tris-HCl pH 7,4 z 0,25M sacharozą, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT i zestawem inhibitorów „Complete” (do pozostałych doświadczeń). Używano homogenizator szklany typu Dounce, wykonując 13 przesuwów tłokiem luźnym. Homogenat był używany do badań lub do otrzymywania frakcji podkomórkowych.

2-6 Otrzymywanie frakcji podkomórkowych. Świeżo otrzymany homogenat wirowano w 800 g przez 4 minuty w temperaturze 4⁰C. Osad frakcji jądrowej (P1) zawieszano w ½ objętości buforu do homogenizacji i używano do pomiarów aktywności PARP oraz do badań immunochemicznych metodą Western-blotu.

Nadsącz wirowano 10 min. przy 17000g dla otrzymania zgrubnie oczyszczonej frakcji cytozolowej (S2) i błonowej (P2). Skrócenie procedury otrzymywania tych frakcji miało na celu uniknięcie zmian aktywności NOS podczas długich wirowań typowo stosowanych dla otrzymania cytozolu.

3. Układy doświadczalne

3-1. Badanie wpływu aktywacji receptora glutaminianergicznego typu NMDA i zewnątrzkomórkowego amyloidu β na aktywność PARP i NOS

Skrawki badanej części mózgu zawieszono w buforze Krebsa-Ringera, pH 7,4 rozdzielano na porcje o objętości 400μl i stabilizowano 90 minut w temperaturze 37⁰C, po czym dodawano CaCl₂ do końcowego stężenia 1 mM. Następnie w odpowiednich momentach dodawano badane czynniki: 100μM NMDA i 1mM glutaminian, 1 μM glicyna, 100μM NNLA, 1mM spermina, 25μM amyloid β₂₅₋₃₅. Skrawki inkubowano w temperaturze 37⁰C przez 15-30 minut w zależności od warunków doświadczenia. Po zhomogenizowaniu w homogenizatorach szklanych materiał używano do oznaczeń biochemicznych i immunochemicznych.

3-2. Badanie wpływu stresu wolnorodnikowego i genotoksycznego na aktywność PARP

Frację P1 hipokampa preinkubowano przez 5 minut w 37⁰C i następnie inkubowano 1,5 minuty w obecności 25μM FeCl₂ i 10μM askorbinianu. Następnie prowadzono radioizotopowy pomiar aktywności PARP w sposób opisany poniżej.

Frację P1 hipokampa dojrzałego i starczego preinkubowano 15 minut w 37⁰C a następnie inkubowano 5 minut w 37⁰C w obecności 50μM MNNG w DMSO (końcowe stężenie DMSO 0,5%). Pomiar nagromadzonej poli(ADP-rybozy) metodą Western-blot prowadzono w sposób opisany poniżej. Materiał kontrolny inkubowany był w obecności 0,5% DMSO.

4. Metody biochemiczne i molekularne

4-1. Pomiar mRNA.

Izolację całkowitego RNA przeprowadzono używając odczynnika TRI-reagent firmy Sigma zgodnie z instrukcją producenta. Odwrotną transkrypcję wykonano w końcowej objętości 20μl używając 5μg całkowitego RNA, 1500 jednostek odwrotnej transkryptazy AMV, 0.5μg oligo(dT)₅ jako odcinka startowego i deoksynukleotydów w stężeniu 1mM każdy w cyklu: 1h 42⁰C i 5 min 99⁰C, następnie produkt został schłodzony do 4⁰C. Łańcuchową reakcję polimerazy PCR prowadzono zgodnie z zaleceniami producenta zestawu, mieszanina reakcyjna zawierała w końcowej objętości 50 μl: 5μg cDNA, Taq PCR Master Mix i 20 pmol każdego z odcinków starterowych dla nNOS, iNOS lub GAPDH. Po wstępnej denaturacji 5 min w 94⁰C następowały 33 cykle: 1 min 94⁰C, 2 min 60⁰C, 3 min 72⁰C. Następnie próbki zostały schłodzone do 4⁰C. Na każdą ścieżkę 2% żelu agarozowego zawierającego bromek etydyny nałożono 10 μl produktu PCR i 2 μl buforu do próbek. Elektroforezę prowadzono przy napięciu 100V. mRNA GAPDH (pozytywna kontrola), iNOS i nNOS mierzono densytometrycznie.

4-2. Oznaczanie poziomu białek metodą immunochemiczną (Western-blot).

Białka poddawano denaturacji przez ogrzanie 5 minut w 95⁰C w buforze do próbek zawierającym β -merkaptoetanol. 50 μ g białka rozdzielano w temperaturze 4⁰C na 7,5% (PARP-1, poli(ADP-ryboza)) lub 10% (NF- κ B p65) denaturującym żelu poliakrylamidowym z SDS. Po rozdzieleniu przy napięciu 170 V w chłodzonym lodem aparacie "Mini Protean II" firmy Bio Rad białka przenoszono na błonę nitrocelulozową Hybond C Extra metodą tzw. "mokrego transferu" przy użyciu przystawki do transferu tej samej firmy, przy napięciu 100V w buforze węglanowym Dunn'a. Stosowano standardy masy molekularnej białek BioRad 50-204kDa (Prestained SDS-PAGE Standards High Range). Jakość transferu sprawdzano przy użyciu barwnika Ponceau S.

Oznaczanie białka PARP-1.

Błonę z przetransferowanymi białkami blokowano 1h w temperaturze pokojowej w 1% BSA w PBS-T, a następnie inkubowano przez noc w roztworze monoklonalnego przeciwciała reagującego z PARP-1 w rozcieńczeniu 1/500 (Sigma, klon C-2-10) w 0,5% BSA w temperaturze 4⁰C i trzykrotnie płukano 5 minut w PBS-T. Następnie inkubowano 1h w temperaturze pokojowej w roztworze 1/2500 drugorzędowego przeciwciała przeciwko mysim IgG znakowanego peroksydazą chrzanową (Amersham) w 5% mleku odtłuszczonym i przemywano trzykrotnie w PBS-T i raz w PBS.

Oznaczanie Poli(ADP-rybozy).

Przeniesione na błonę białka blokowano przez noc w 5% mleku odtłuszczonym w PBS-T w temperaturze 4⁰C, inkubowano 2h w 1/400 roztworze monoklonalnego przeciwciała reagującego z poli(ADP-rybozą)-Sigma w 0,25% mleku i trzykrotnie płukano 15 minut w PBS-T. Następnie inkubowano 1h w roztworze 1/4000 drugorzędowego przeciwciała przeciwko mysim IgG znakowanego peroksydazą chrzanową (Amersham) w 0,25% mleku odtłuszczonym, przemywano trzykrotnie w PBS-T i raz w PBS.

Oznaczanie p65.

Błonę po transferze białek blokowano 15h w 5% mleku odtłuszczonym w PBS-T (nietypowo wysoka zawartość Tween-20 0,1%) w temperaturze 4⁰C, inkubowano przez noc w 1/100 roztworze poliklonalnego przeciwciała anty-p65 (Sigma) w 5% mleku w 4⁰C i trzykrotnie płukano 5 minut w PBS-T. Następnie inkubowano w temperaturze pokojowej 1h w roztworze 1/8000 drugorzędowego przeciwciała przeciwko króliczym IgG znakowanego peroksydazą chrzanową (Sigma) w 5% mleku odtłuszczonym, przemywano trzykrotnie w PBS-T i raz w PBS.

Oznaczanie β -aktyny.

Błony nitrocelulozowe odmywano z roztworów przeciwciał przez 30 minut w temperaturze pokojowej w buforze 50mMgGlicyna-HCl pH 2,0, 1% SDS i płukano pięciokrotnie w PBS-T. Następnie blokowano 1h w 5% mleku w PBS-T i inkubowano w temperaturze pokojowej w 1/400 roztworze pierwszorzędowego przeciwciała przeciwko β -aktynie w 0,1% odtłuszczonej albuminie bydlęcej. Po trzykrotnym przemyciu PBS-T membranę inkubowano w temperaturze pokojowej 1h w roztworze 1/5000 drugorzędowego przeciwciała przeciwko mysim IgG znakowanego peroksydazą chrzanową (Amersham) w 5% mleku odtłuszczonym, przemywano trzykrotnie w PBS-T i raz w PBS.

Błony ze związanymi przeciwciałami inkubowano 3 minuty w roztworze odczynników do chemiluminescencji ECL, a następnie poddawano ekspozycji przez noc w kasecie Hypercassette używając kliszy Kodak BioMax. Wywołane klisze analizowano densytometrycznie przy użyciu programu TotalLab 1.1 firmy Phoretix. Ekspresję białek wyrażano jako stosunek sygnału odpowiednich prążków do sygnału β -aktyny.

4-3. Oznaczanie aktywności enzymatycznej polimerazy poli(ADP-rybozy)

Pomiar aktywności PARP-1 przez oznaczanie poziomu poli(ADP-rybozy) metodą Western-blot. Mieszanina reakcyjna zawierała 200 μ M β NAD⁺, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl₂, 5mM ditiotreitrol (DTT) i 200 μ g białka frakcji jądrowej lub homogenatu w końcowej objętości 100 μ l. Próbę ślepą stanowił materiał inkubowany w mieszaninie nie zawierającej β NAD⁺. Reakcję prowadzono 1 minutę w 37°C i zatrzymywano równą objętością denaturującego buforu do próbek zawierającego β -merkaptotanol. Western-blot wykonywano w sposób opisany powyżej.

Pomiar aktywności PARP-1 metodą radioizotopową. Aktywność podstawowa PARP-1 mierzona była według Uedy i wsp. [1982; 1991] i Strosznajder i wsp. [2000]. Metoda ta wykrywa aktywność enzymatyczną wszystkich polimeraz poli(ADP-rybozy), ponieważ ponad 97% poli(ADP-rybozy) obecnej w nie transformowanych komórkach mózgu ssaków jest produktem PARP-1 [Shieh i wsp., 1998], metoda ta służy w tym przypadku do oznaczania PARP-1. Mieszanina reakcyjna zawierała 200 μ M [*Ade*-U ¹⁴C] NAD 2x10⁵ d.p.m., 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl₂, 5mM ditiotreitrol (DTT) i 200 μ g białka frakcji jądrowej lub homogenatu w końcowej objętości 100 μ l.

Reakcję prowadzono 1 minutę w 37°C i zatrzymywano 0.8 ml zimnego 25% kwasu trójchlorooctowego (TCA). Po 30min. w 4°C wytrącone białka zbierano pod zmniejszonym ciśnieniem na sączkach Whatman GF/B, przemywano 15 ml 5% TCA i suszono. Radioaktywność mierzona była w liczniku scyntylicyjnym LKB Wallac 1409 w 7ml scyntyлятора Braya.

Pomiar wpływu kinaz białkowych na aktywność PARP-1 w obecności inhibitorów: GF109203X lub wortmaniny.

Frację P1 hipokampa preinkubowano 15 minut w 37°C w obecności 1 lub 10µM inhibitora kinazy białkowej C, GF109203X lub 20µM wortmaniny, inhibitora kinaz z rodziny PI3-K. Następnie pomiar aktywności PARP-1 prowadzono metodą radioizotopową w sposób opisany powyżej. Materiał kontrolny stanowiły próby inkubowane w obecności 2% DMSO używanego do rozpuszczania inhibitorów.

4-4. Pomiar aktywności NOS.

Mieszaninę reakcyjną zawierającą w końcowej objętości 300µl 50mM Tris-HCl pH 7.4, $2,8 \times 10^5$ dpm [U-¹⁴C] L-argininę, 100µM, 2mM CaCl₂, 1µM kalmodulinę, 15µM FAD, 10µM tetrahydrobiopterynę, 1mM NADPH, 1mM EDTA, 1mM ditiotreitoli i ok. 200µg białka inkubowana była 20min w 37°C. Po zatrzymaniu reakcji 1ml 100mM Tris pH 5.5 z 10mM EDTA białka były usuwane poprzez wirowanie. Produkt reakcji, [¹⁴C] cytrulina izolowana była 1ml H₂O na kolumnach Dowex™ 50WX-8 2x. Radioaktywność 0,5ml próby mierzona była w 8ml scyntyлятора Braya w liczniku scyntylicyjnym LKB Wallac 1409.

Określenie udziału poszczególnych izoform syntaz tlenu azotu w uwalnianiu

NO.

Dla zbadania aktywności iNOS preinkubowano homogenaty 10 min. w 30⁰C w obecności 100μM N-nitro-L-argininy (NNLA) hamującej aktywność obu konstytutywnych izoform NOS lub w nieobecności Ca²⁺ i kalmoduliny. Dla zbadania aktywności eNOS pomiary prowadzone były w obecności 10μM 7-nitroindazolu, inhibitora preferencyjnie blokującego nNOS.

Badanie wpływu kinaz i fosfataz białkowych na aktywność NOS.

Wpływ kinaz białkowych na aktywność NOS oceniany był poprzez 10 min. inkubację homogenatu lub cytozolu w 30⁰C w obecności 10μM inhibitorów kinaz: H-7, H-8, H-9 lub 50μM inhibitora fosfataz białkowych ortowanadzianu sodu. Następnie pomiar aktywności NOS prowadzony był w mieszaninie reakcyjnej wzbogaconej o 10mM MgCl₂ i 50μM ATP.

4-5. Oznaczanie stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS)

Poziom dialdehydu malonowego i innych produktów wolnorodnikowego uszkodzenia lipidów reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) mierzony był wg Asakawy i Matsushite [1980]. Dialdehyd malonowy, który w materiale biologicznym istnieje głównie w postaci pochodnych jest przeprowadzany do postaci wolnej poprzez ogrzewanie w 100⁰C w niskim pH. Tak otrzymany MDA reaguje z dodanym do środowiska inkubacyjnego kwasem tiobarbiturowym tworząc kompleks o maksimum absorpcji w 532-535 nm.

Po wytrąceniu białka homogenatu 1 ml 30% kwasu trójchlorooctowego i krótkiej homogenizacji w homogenizatorze szklanym, dodawano 0,1 ml 5M HCl, wirowano 3000 rpm przez 10 minut i do nadsącza dodawano 1 ml 0,75% kwasu tiobarbiturowego w 0,1M NaOH, następnie ogrzewano preparat w 100⁰C

przez 15 minut i mierzono absorpcję nadsącza przy długości fali 535 nm. Odczyt prowadzono względem próby ślepej odczynnikowej. Poziom TBARS w próbach przeliczano z krzywej standardowej MDA.

Badanie wpływu zewnątrzkomórkowej obecności peptydu 25-35 amyloidu β na poziom uszkodzenia wolnorodnikowego lipidów

150 μ l skrawków otrzymanych w sposób opisany wcześniej dopełniano tym samym buforem do końcowej objętości 1 ml, stabilizowano 30 minut w 37⁰C i inkubowano z 25 μ mol/l peptydem A β ₂₅₋₃₅ 60 minut w 37⁰C, następnie wykonywano pomiar stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS).

4-6. Pomiar zawartości białka w preparatach

Poziom białka oznaczano według Lowry`ego w spektrofotometrze Shimadzu przy długości fali 655 nm. Jako standardy stosowano wolną od kwasów tłuszczowych albuminę z surowicy wołu w zakresie stężeń do 10mg/ml.

5. Opracowanie statystyczne wyników.

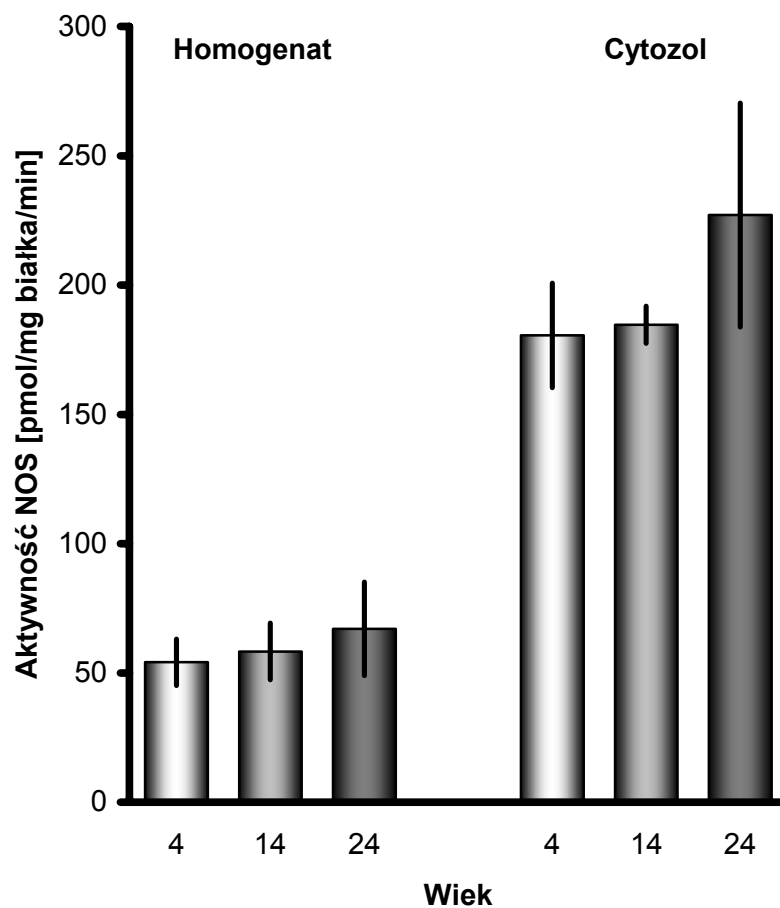
Wyniki wyrażane były w wartościach bezwzględnych lub jako % wartości kontrolnej. Podane wartości są średnią z minimum trzech doświadczeń każde w trzech powtórzeniach (o ile nie podano inaczej) \pm średni błąd standardowy (SEM). Znamienność statystyczną różnic oceniano przy użyciu testu t Studenta lub analizą wariancji (ANOVA) z użyciem testu post-hoc Newmana-Keulsa. Za znamienne statystycznie uznawano wyniki przy poziomie istotności $p < 0,05$.

WYNIKI.

1. Wpływ starzenia na ekspresję i aktywność izoform NOS.

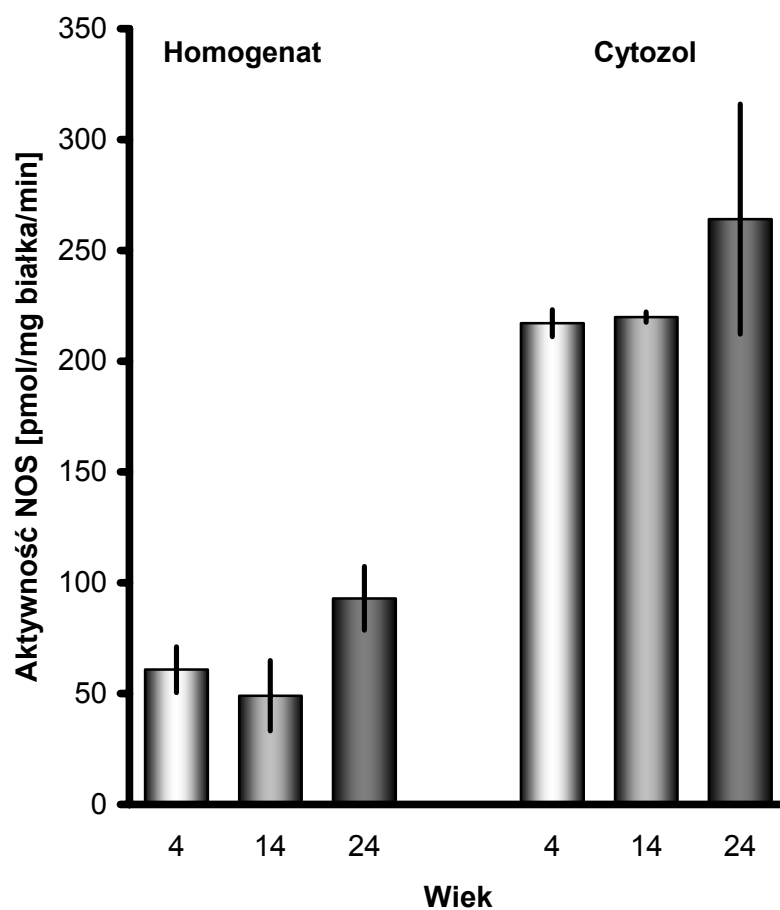
Aktywność syntaz tlenku azotu badano metodą radioizotopową po podaniu substratu [^{14}C] L-argininy w homogenatach, frakcji cytozolowej i błonowej. Badania prowadzono w hipokampie, korze mózgu i mózdzku szczurów rasy Wistar dorosłych, dorosłych starych i starych (odpowiednio 3-4, 14, i 24-27 miesięcy). Stwierdzono, że aktywność enzymu oznaczana w obecności jonów wapnia i kalmoduliny była wzbogacona we frakcji cytozolowej w stosunku do homogenatu ok. 3,3-3,6-krotnie. Najwyższą aktywność obserwowano w mózdzku ($p < 0,01$ względem wartości uzyskanych w hipokampie i w korze mózgu, zarówno dla frakcji cytozolowej jak homogenatu). Aktywność specyficzna we frakcji błon była niższa niż w homogenacie.

Zaobserwowano wzrost aktywności całkowitej syntaz tlenku azotu w mózdzku starczym w porównaniu z dojrzałym. Wzrost ten był znamieny statystycznie w cytozolu (148% poziomu kontrolnego). W hipokampie i korze mózgu nie stwierdzono statystycznie znamiennych zmian, chociaż w tkankach starczych dała się zaobserwować tendencja wzrostowa.



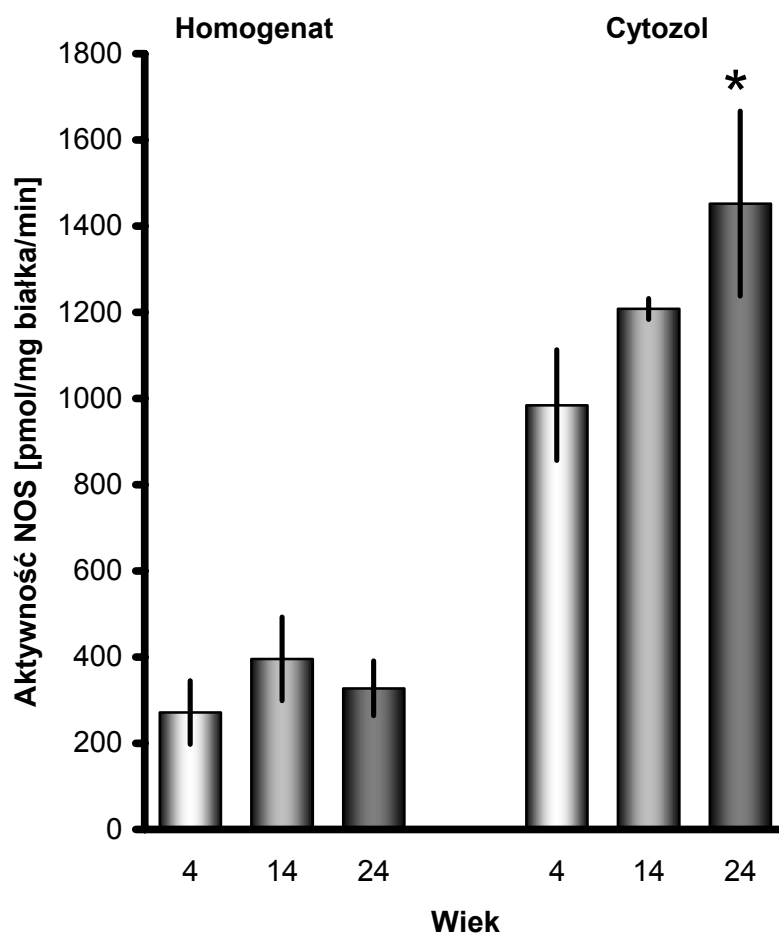
Ryc. 8.

Aktywność podstawowa NOS w hipokampie w procesie starzenia. Wyniki są średnią z 3-6 doświadczeń w 3 powtórzeniach \pm S.E.M. z wyjątkiem zwierząt 14-miesięcznych, gdzie są średnią z 2 doświadczeń prowadzonych w 3 powtórzeniach.



Ryc. 9.

Aktywność podstawowa NOS w korze mózgu. Wyniki są średnią z 3-7 doświadczeń w 3 powtórzeniach \pm S.E.M. z wyjątkiem zwierząt 14-miesięcznych, gdzie są średnią z 2 doświadczeń prowadzonych w 3 powtórzeniach.

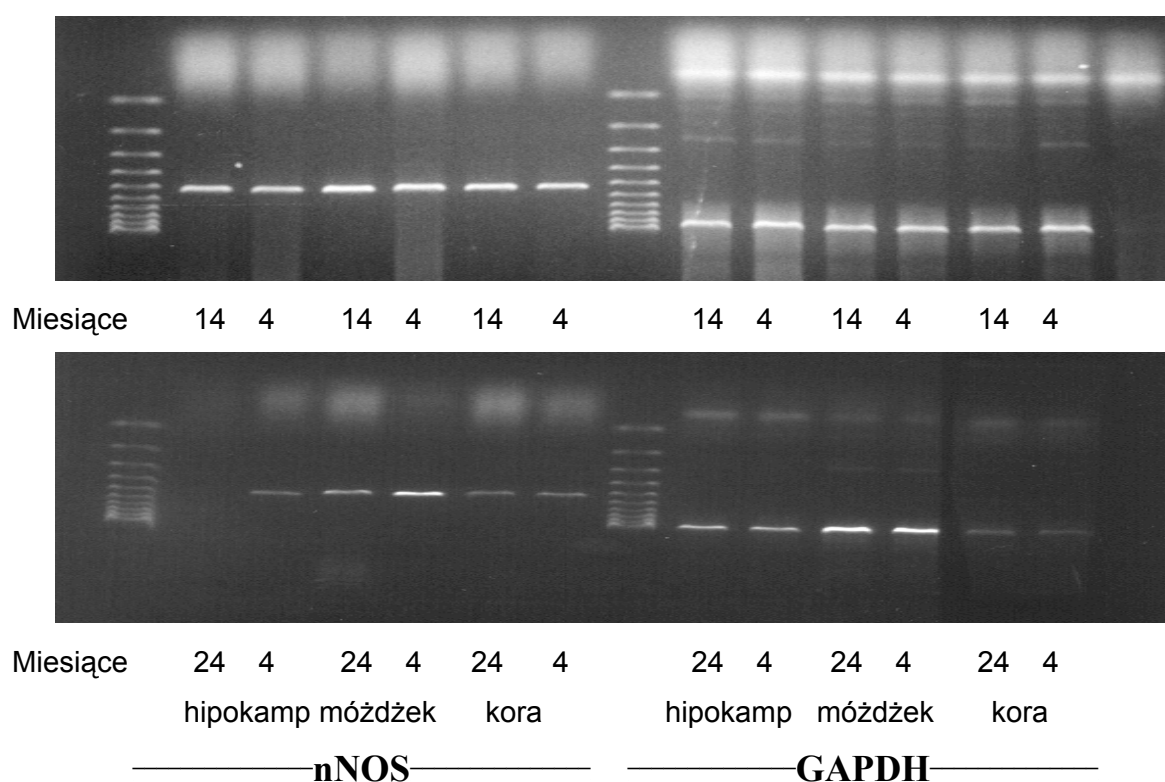


Ryc. 10.

Zmiany aktywności podstawowej NOS w mózdzku. Wyniki są średnią z 3-8 doświadczeń \pm S.E.M. w 3 powtórzeniach z wyjątkiem zwierząt 14-miesięcznych, gdzie są średnią z 2 doświadczeń.

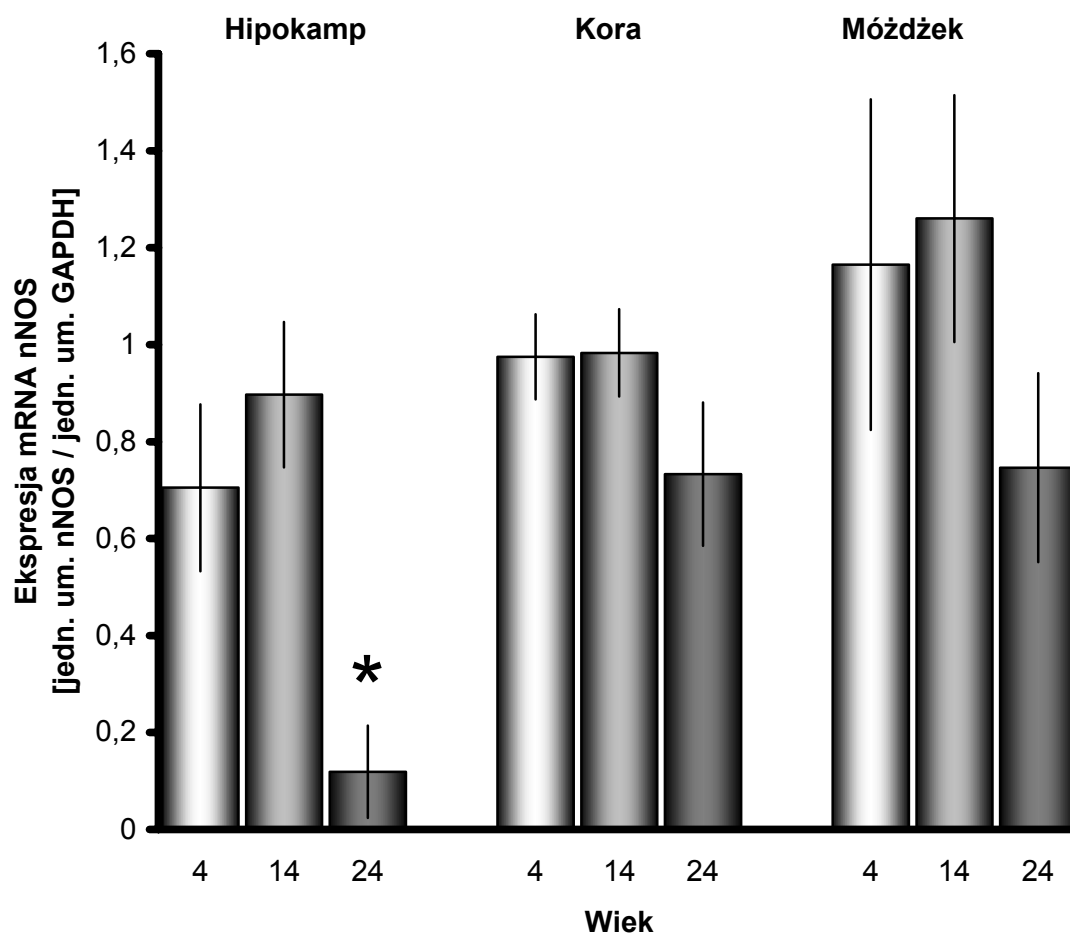
* $p < 0,05$, ANOVA z testem post-hoc Newmanna-Keulsa.

Badanie poziomu mRNA dla izoformy neuronalnej NOS metodą RT-PCR wykazało znaczący spadek mRNA nNOS w starczym hipokampie do 17% kontroli, natomiast w innych badanych częściach mózgu poziom mRNA był nieznamienne niższy. Wyniki wskazują na obniżenie ekspresji izoformy neuronalnej na poziomie mRNA i wzrost aktywności specyficznej. Stosunek aktywności NOS do poziomu mRNA nNOS był wysoce znamienne podwyższony w starczym hipokampie i mózdku, odpowiednio 7- i 2-krotnie. W wieku 14 miesięcy stosunek ten był nie zmieniony względem kontroli.



Ryc. 11.

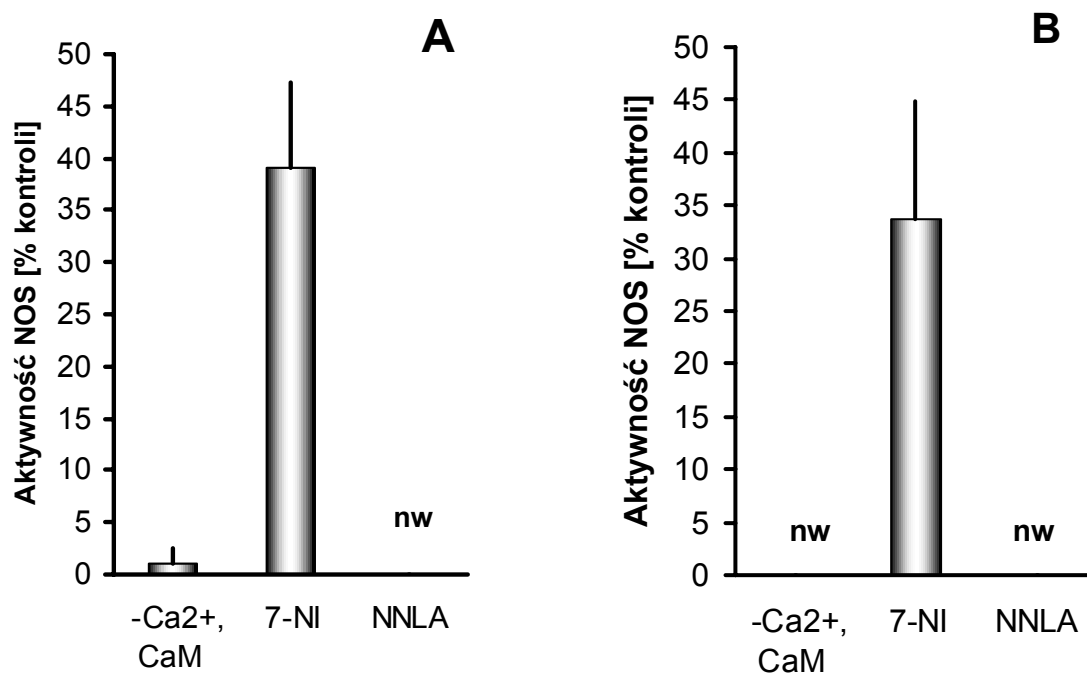
Zmiany poziomu mRNA nNOS w hipokampie, korze i mózdku dojrzałym, 14-miesięcznym i starczym. Pokazano wynik przykładowego doświadczenia.



Ryc. 12.

Zmiany poziomu mRNA nNOS w hipokampie, korze i mózdzku dojrzałym, 14-miesięcznym i starszym. Wyniki są średnią z 3 doświadczeń \pm S.E.M.

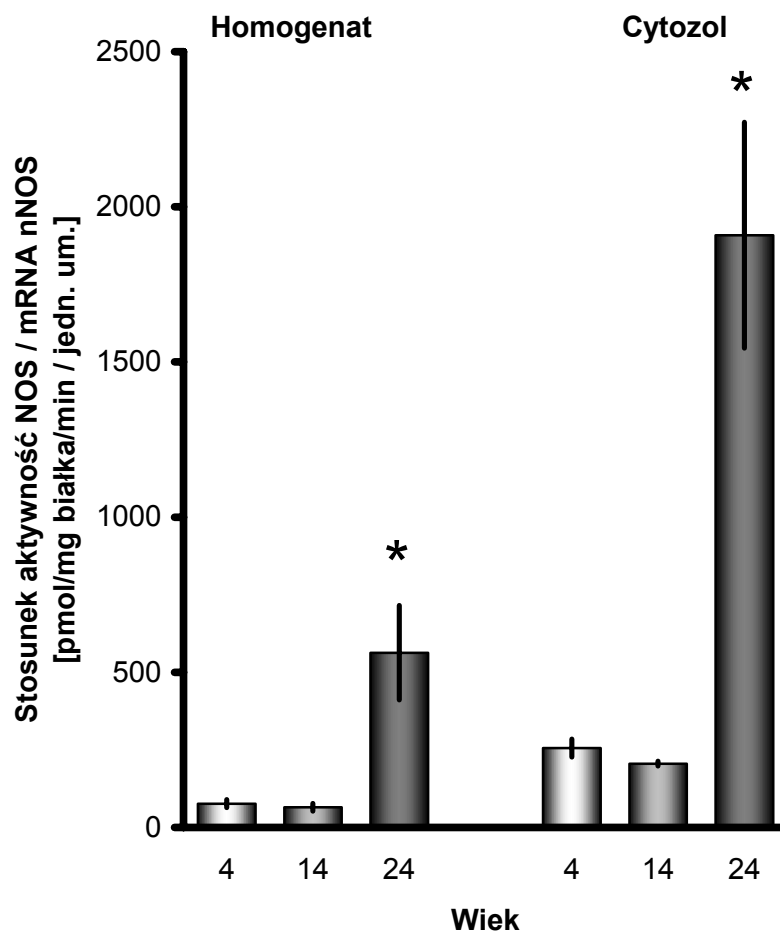
* $p < 0,05$, ANOVA z testem post-hoc Newmanna-Keulsa.



Ryc. 13.

Aktywność podstawowa izoform NOS w korze mózgu dojrzałego (A) i starczego (B). Wyniki są średnią z 3-4 doświadczeń \pm S.E.M. w 3 powtórzeniach (7-Ni-A, B), 2 doświadczeń \pm S.E.M. w 3 powtórzeniach (-Ca²⁺, CaM-A) lub pochodzą z przykładowego doświadczenia w 3 powtórzeniach.

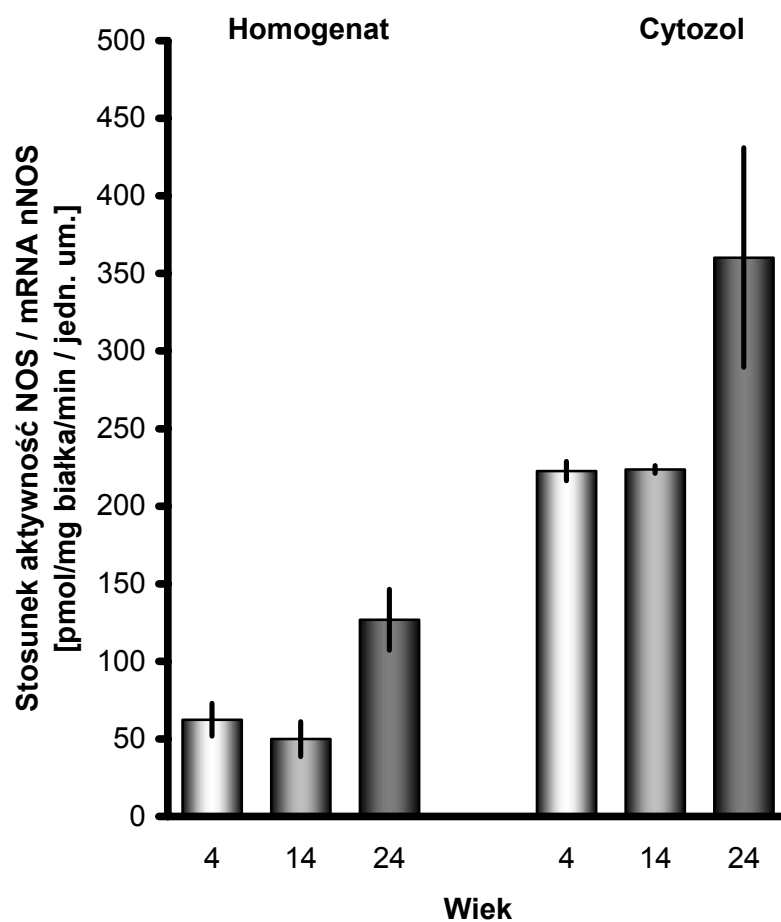
nw – niewykrywalne.



Ryc. 14.

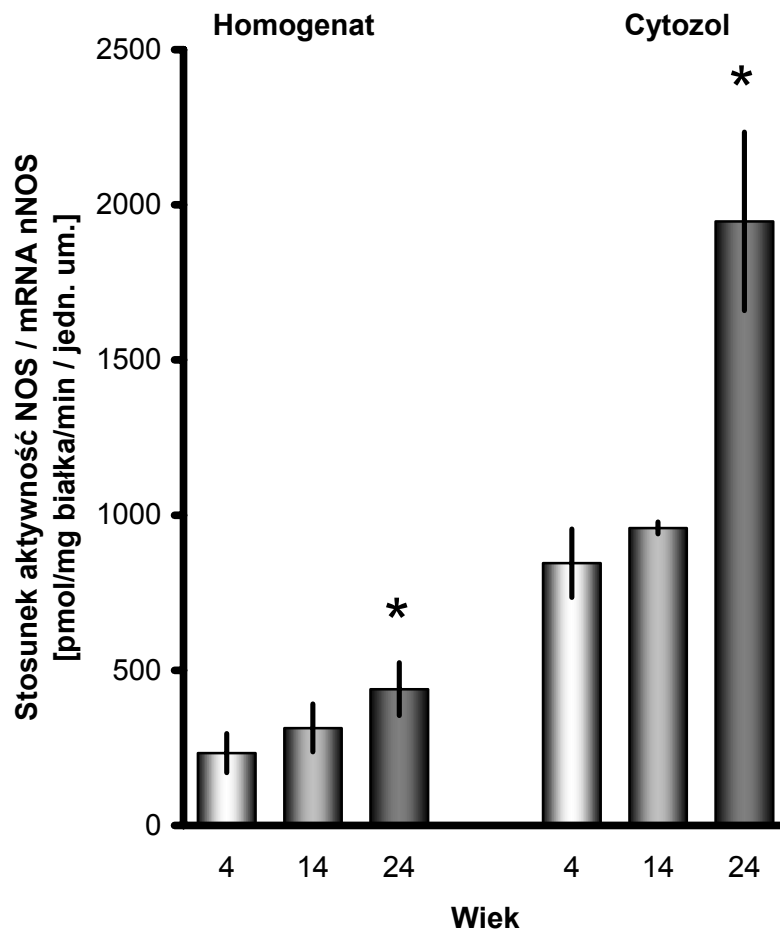
Stosunek aktywności podstawowej NOS do poziomu mRNA nNOS w hipokampie.

* $p < 0,05$, ANOVA z testem post-hoc Newmanna-Keulsa.



Ryc. 15.

Stosunek aktywności podstawowej NOS do poziomu mRNA nNOS w korze mózgu.

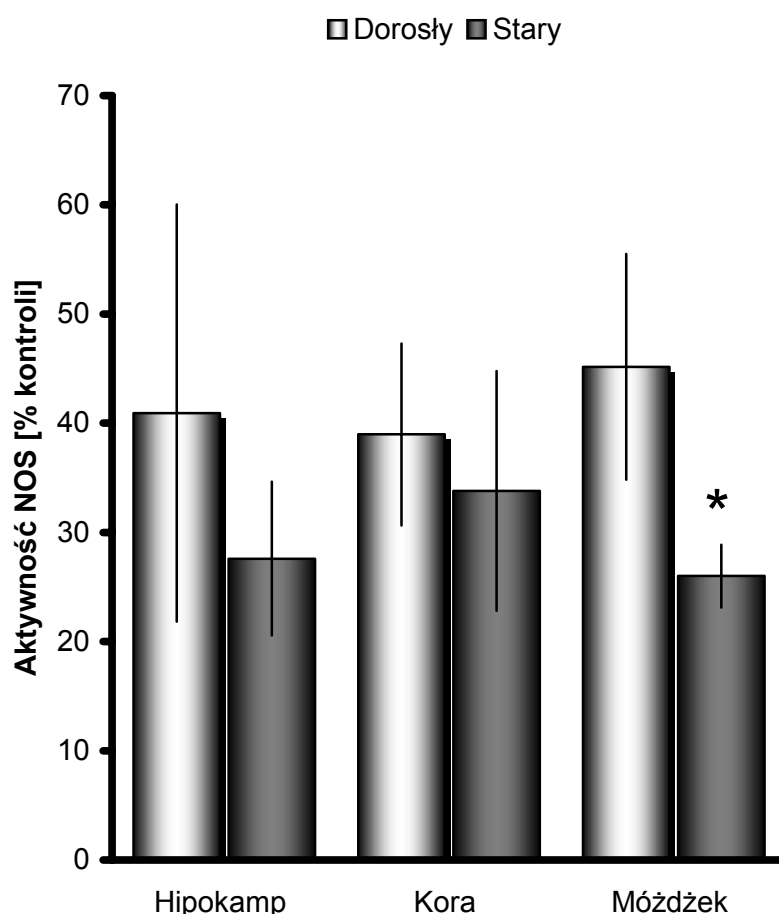


Ryc. 16.

Stosunek aktywności podstawowej NOS do poziomu mRNA nNOS w mózdku.

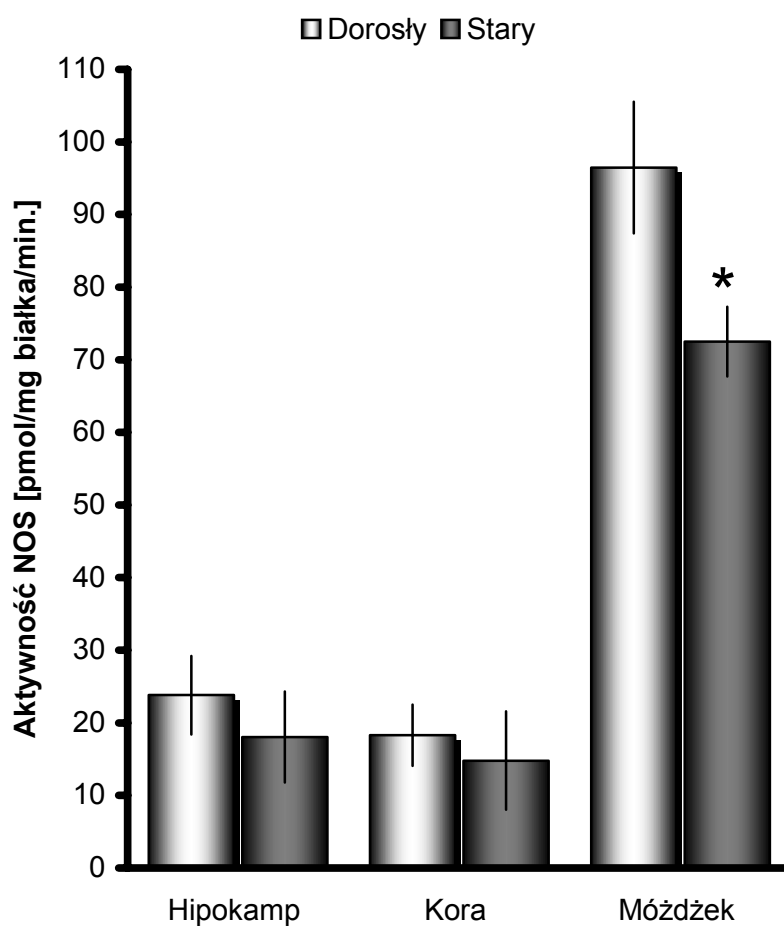
* $p < 0,05$, ANOVA z testem post-hoc Newmanna-Keulsa.

Pomiary aktywności NOS przy użyciu radioaktywnego substratu-argininy w obecności 7-nitroindazolu, inhibitora NOS wykazującego preferencję względem nNOS wskazują na 38-45% udział eNOS w całkowitej syntezie tlenku azotu w hipokampie, korze i mózdzku. W częściach mózgu starczego był on niższy i wynosił 26-33% całkowitej syntezy NO. Również aktywność bezwzględna eNOS była niższa we wszystkich badanych częściach mózgu, przy czym spadek ten osiągnął znamienność statystyczną wyłącznie w starczym mózdzku (58% kontroli).



Ryc. 17. Zmiany udziału izoformy śródbłonkowej w całkowitej aktywności podstawowej NOS w poszczególnych częściach starczego mózgu. Wyniki są średnią z 3-5 doświadczeń w 3 powtórzeniach \pm S.E.M..

* $p < 0,05$, test t Studenta.



Ryc. 18.

Zmiany aktywności podstawowej eNOS w poszczególnych częściach starczego mózgu. Wyniki są średnią z 3-5 doświadczeń w 3 powtórzeniach \pm S.E.M.

* $p < 0,05$, test t Studenta.

Badanie poziomu mRNA indukowalnej izoformy NOS metodą RT-PCR dało wynik negatywny (wyniki nie pokazywane). Pomiary syntezy NO w nieobecności kalmoduliny i jonów wapnia lub w obecności inhibitora obu izoform konstytutywnych enzymu, 100 μ M N-Nitro-L-Argininy, nie wykazały aktywności iNOS w hipokampie, korze i mózdzku. Aktywność ta była niewykrywalna zarówno w dojrzałym jak i starym mózgu.

Wpływ kinaz i fosfataz białkowych na aktywność konstytutywną NOS badano podając inhibitory kinaz H-7, H-8 i H-9 oraz inhibitory fosfataz: ortowanadzan sodu i cyklosporynę. W badaniach prowadzonych w zakładzie stwierdzono 15-20% znamienne zmiany konstytutywnej aktywności NOS w obecności tych inhibitorów w poszczególnych częściach mózgu dojrzałego [Jesko i wsp., 2003]. W mózgu starym w obecności inhibitorów kinaz i fosfataz autor niniejszej pracy zaobserwował niższe, nieznamienne zmiany (wyniki nie prezentowane).

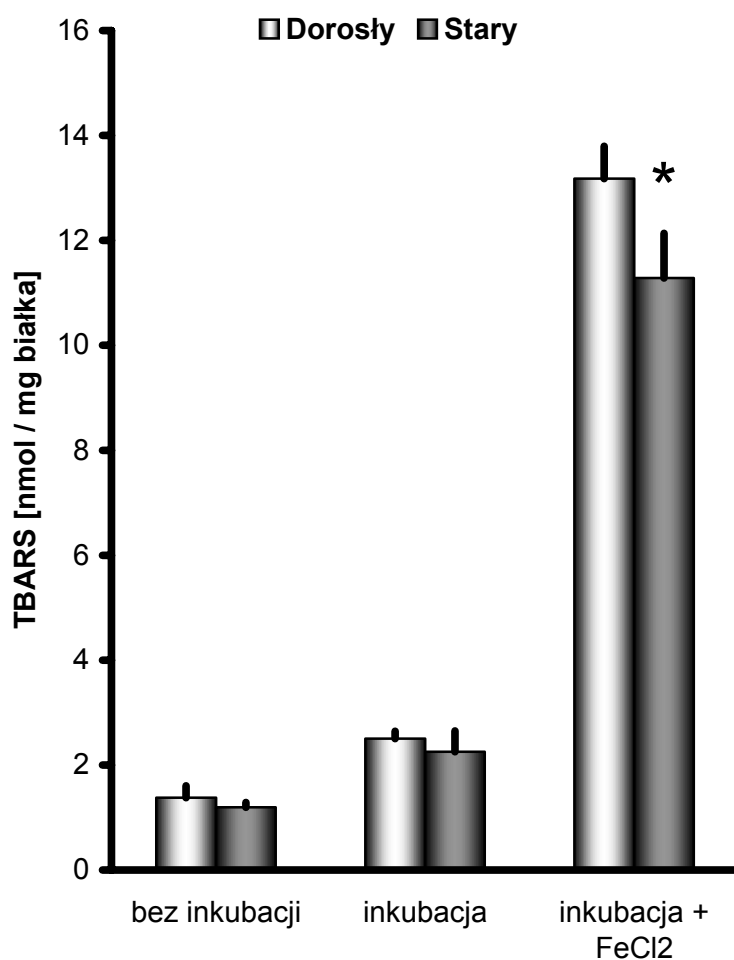
2. Poziom uszkodzenia wolnorodnikowego składników błon komórkowych oraz aktywacja czynnika transkrypcyjnego NF-κB.

Badanie poziomu podstawowego TBARS w różnych częściach mózgu dojrzałego i starczego nie wykazały statystycznie znamiennych różnic między tkanką dojrzałą i starczą. Natomiast w obecności jonów żelaza obserwowano statystycznie znamienne aczkolwiek niewielkie obniżenie poziomu TBARS w porównaniu z odpowiednimi częściami mózgu dojrzałego (wykresy 19, 20 i 21). Podanie NNLA nie miało wpływu na poziom TBARS w mózdzku dojrzałym ani starczym (odp. 100% i 98% wartości kontrolnej). Tempol zmniejszał poziom TBARS o ok. 50% w mózdzku dojrzałym i starczym, co świadczy o istotnej roli O_2^- w peroksydacji lipidów (wyniki nie prezentowane). W celu określenia zdolności prooksydacyjnej poszczególnych części mózgu przeprowadzono pomiary akumulacji TBARS po 15 i 60 min. inkubacji *in vitro*. W hipokampie po 60 min. stwierdzono akumulację półtorakrotnie wyższą niż w mózdzku i trzykrotnie wyższą niż w korze mózgu. Wiek nie miał znamiennego wpływu na wzrost TBARS w żadnej z części mózgu. Podanie inhibitorów NOS, N-nitro-L-argininy lub 7-Nitroindazolu nie miało wpływu na akumulację TBARS.

Wiek [miesiące]	Akumulacja TBARS [nmol/mg białka]		
	Hipokamp	Kora mózgu	Mózdzek
3-4	1,04±0,59 (n=5)	0,28±0,09 (n=5)	0,63±0,37 (n=5)
14	0,85±0,51 (n=4)	0,43±0,35 (n=4)	0,71±0,34 (n=4)
24-27	1,00±0,55 (n=3)	0,33±0,08 (n=3)	0,41±0,05 (n=5)

Tabela 1.

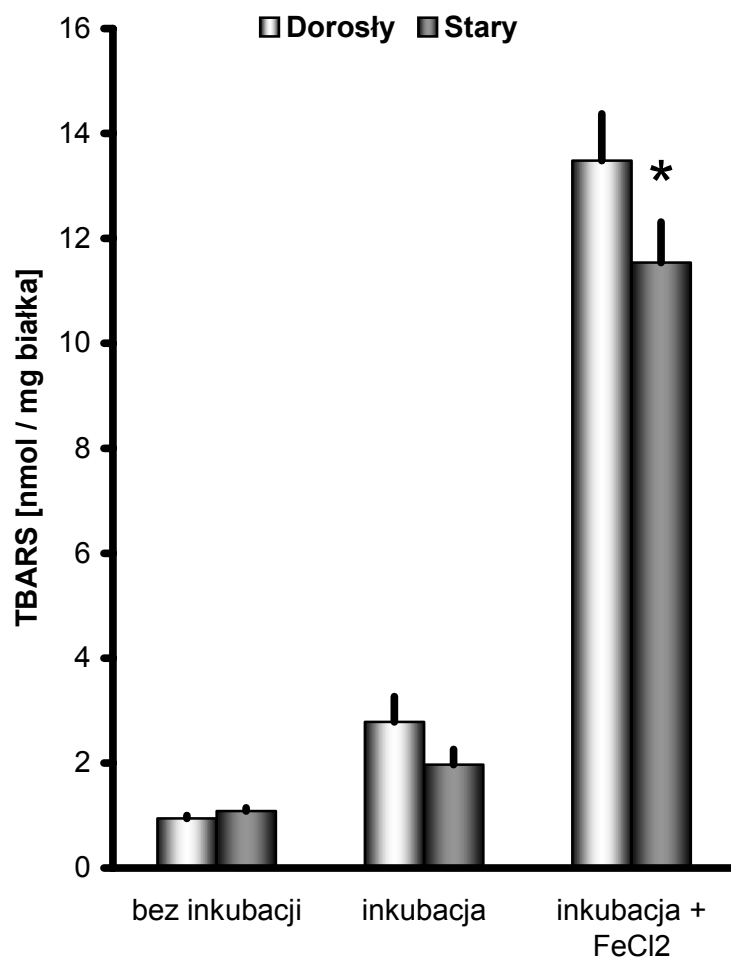
Akumulacja *in vitro* substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w poszczególnych częściach starzejącego się mózgu w wyniku 60-minutowej inkubacji. Wyniki są średnią z 3-5 doświadczeń w 3 powtórzeniach ± S.E.M.



Ryc. 19.

Akumulacja *in vitro* substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w dojrzałym i starym hipokampie w wyniku 15-minutowej inkubacji. Wyniki są średnią z 3-4 doświadczeń w 3 powtórzeniach \pm S.E.M.

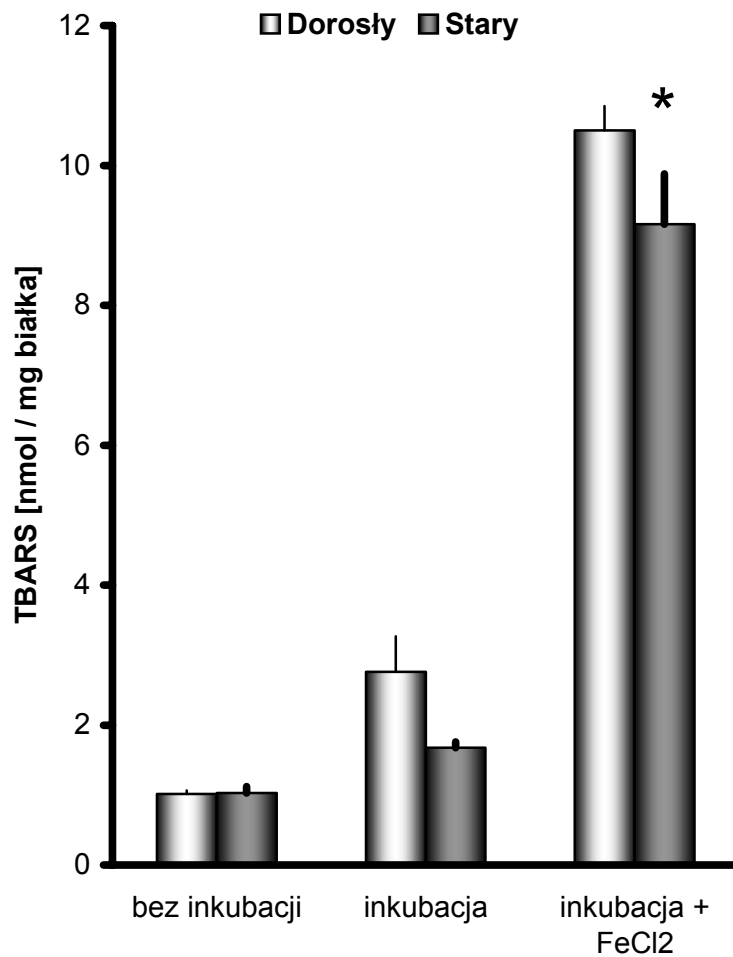
* $p < 0,05$, ANOVA z testem post-hoc Newmana-Keulsa.



Ryc. 20.

Akumulacja *in vitro* substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w korze mózgu dojrzałego i starczego w wyniku 15-minutowej inkubacji. Wyniki są średnią z 3-4 doświadczeń w 3 powtórzeniach \pm S.E.M.

* $p < 0,05$, ANOVA z testem post-hoc Newmanna-Keulsa.



Ryc. 21.

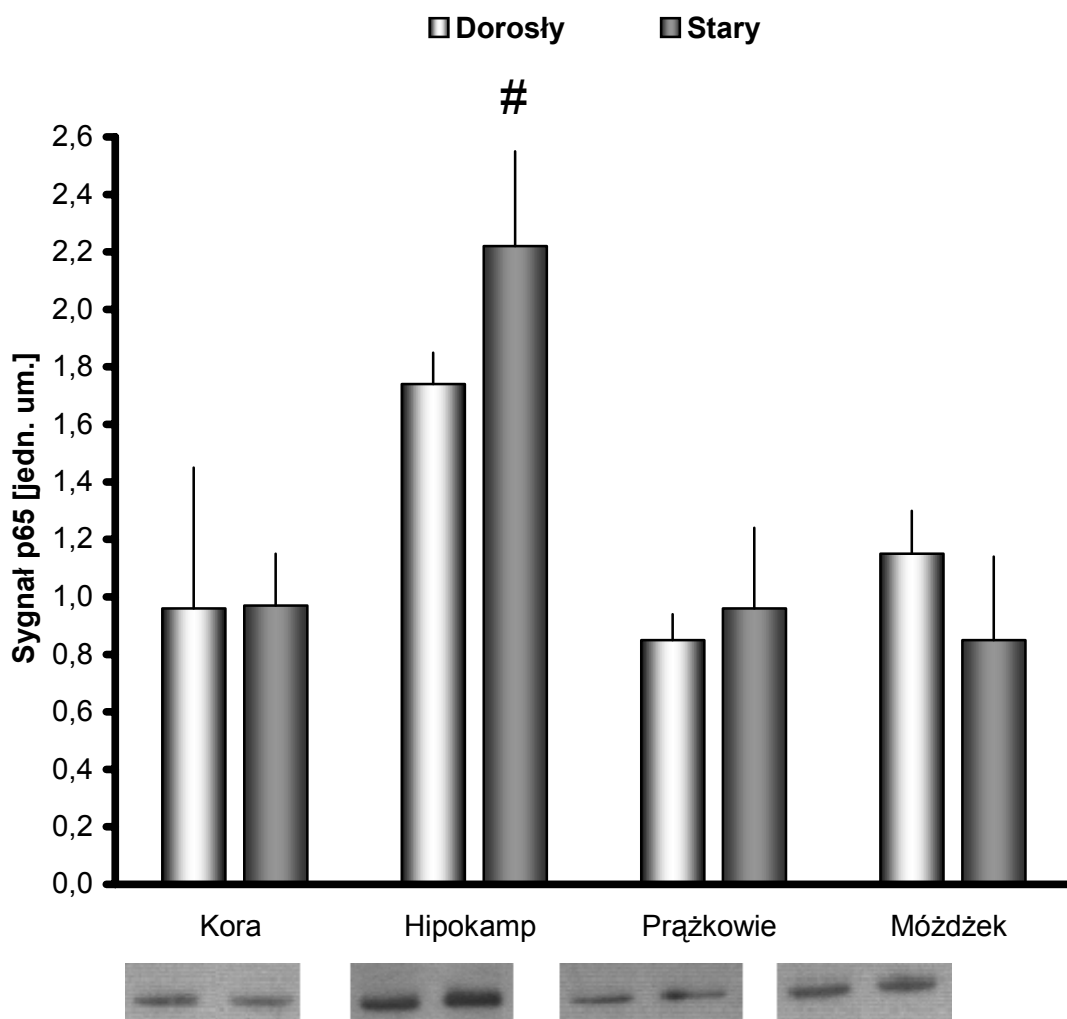
Akumulacja *in vitro* substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w dojrzałym i starym mózdzku w wyniku 15-minutowej inkubacji. Wyniki są średnią z 3-4 doświadczeń w 3 powtórzeniach \pm S.E.M.

* $p < 0,05$, ANOVA z testem post-hoc Newmanna-Keulsa.

Warunki dośw.	Związki	Akumulacja TBARS [nmol/mg białka]			
		Kora starcza		Mózdzek starczy	
0		0,94	±0,28	1,15	±0,30
15min. ink.	Kontrola	1,34	±0,37	2,01	±0,08
15min. ink.	NNLA	1,37	±0,38	1,97	±0,24
15min. ink.	7-Ni	1,34	±0,37	2,14	±0,07

Tabela 2.

Wpływ tempolu oraz inhibitorów konstytutywnych izoform syntazy tlenu azotu na poziom substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w mózdzku i korze mózgu starczego. Wyniki są średnią z 3 doświadczeń w 3 powtórzeniach ± S.E.M.



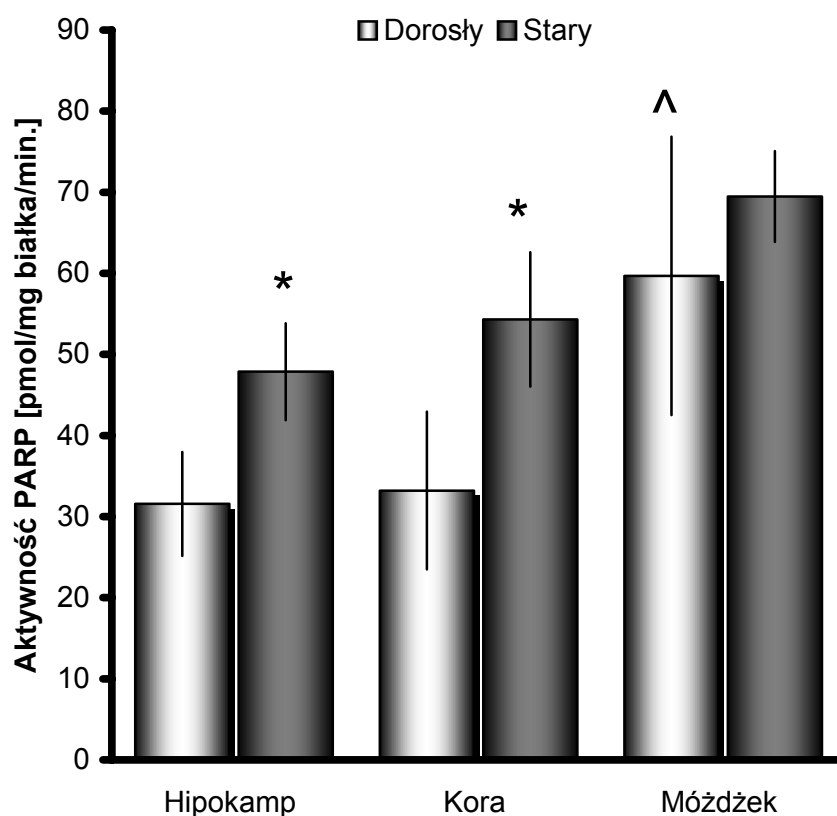
Ryc. 22.

Poziom białka NF- κ B p65 we frakcji jądrowej części mózgu dojrzałego i starczego oznaczony metodą Western blot. Wartości są średnią z 4 doświadczeń \pm SEM.

[#] $p < 0,06$ w stosunku do dorosłych, test t Studenta.

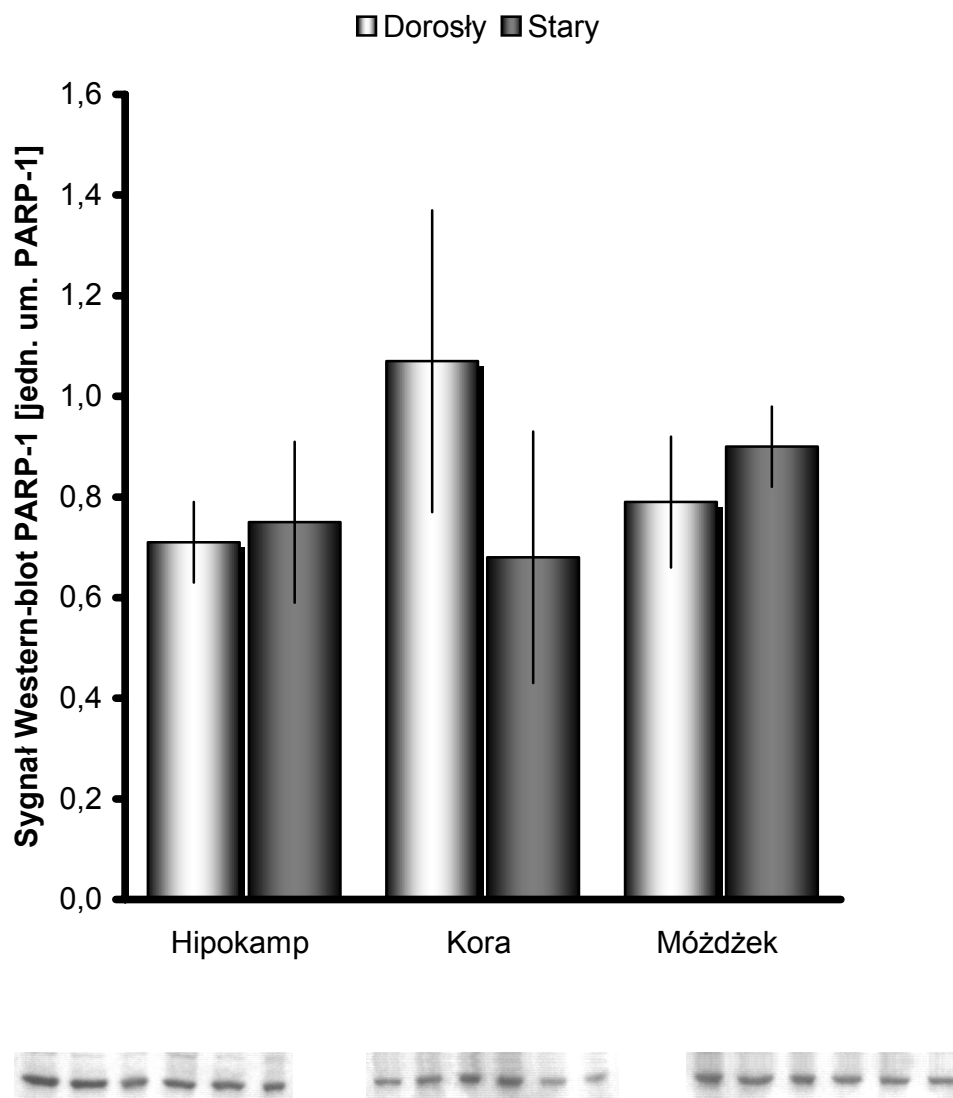
3. Wpływ starzenia na ekspresję oraz aktywność PARP-1.

Pomiary konstytutywnej aktywności PARP-1 w częściach mózgu dojrzałego i starczego prowadzono metodą radiochemiczną mierząc włączanie poli(ADP-rybozy) do białek jądrowych przy użyciu radioaktywnego substratu [Ade- $U^{14}C$] NAD. W mózgach dojrzałych stwierdzono znamienne ($p < 0,01$) wyższą aktywność PARP-1 w mózdzku w porównaniu z hipokampem i korą mózgu, co może być odbiciem wyższej syntezy NO we frakcji cytozolowej mózdzku. Wykazano znamienne statystycznie wzrost aktywności enzymu w starczym hipokampie o 52% i korze mózgu o 64% w porównaniu do tkanki dojrzałej. W mózdzku zaobserwowano nieznamienne tendencję wzrostową.

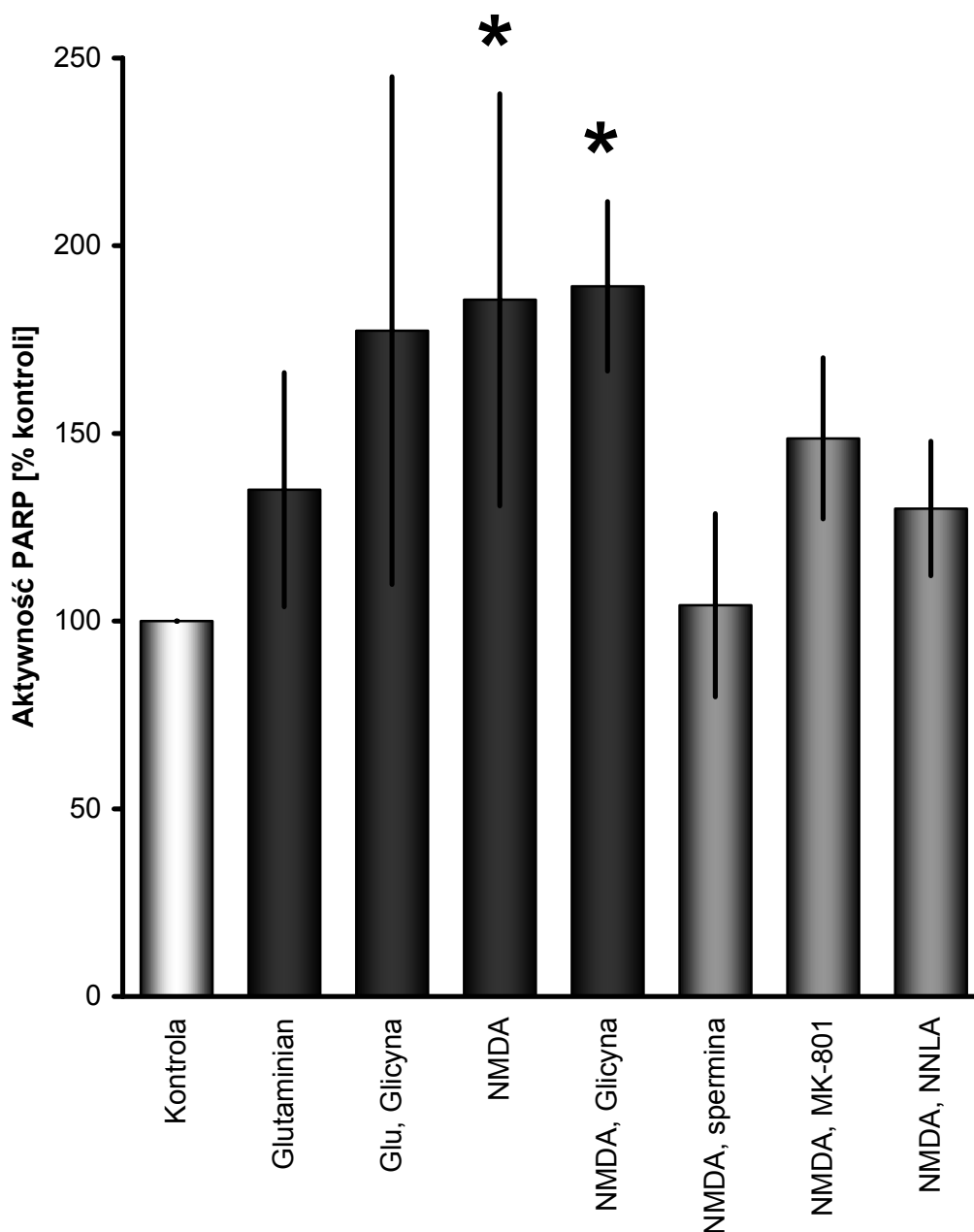


Ryc. 23. Aktywność podstawowa PARP-1 w poszczególnych częściach starzejącego się mózgu. Wyniki są średnią z 3-5 doświadczeń w 3 powtórzeniach \pm S.E.M.. * $p < 0,05$, test t Studenta. ^ $p < 0,01$ względem dojrzałego hipokampa i kory, test t Studenta.

We wszystkich badanych częściach mózgu dojrzałego poziom białka PARP-1 osiągał zbliżone wartości. Poziom białka PARP-1 nie wykazał znaczących zmian w tkance starczej.

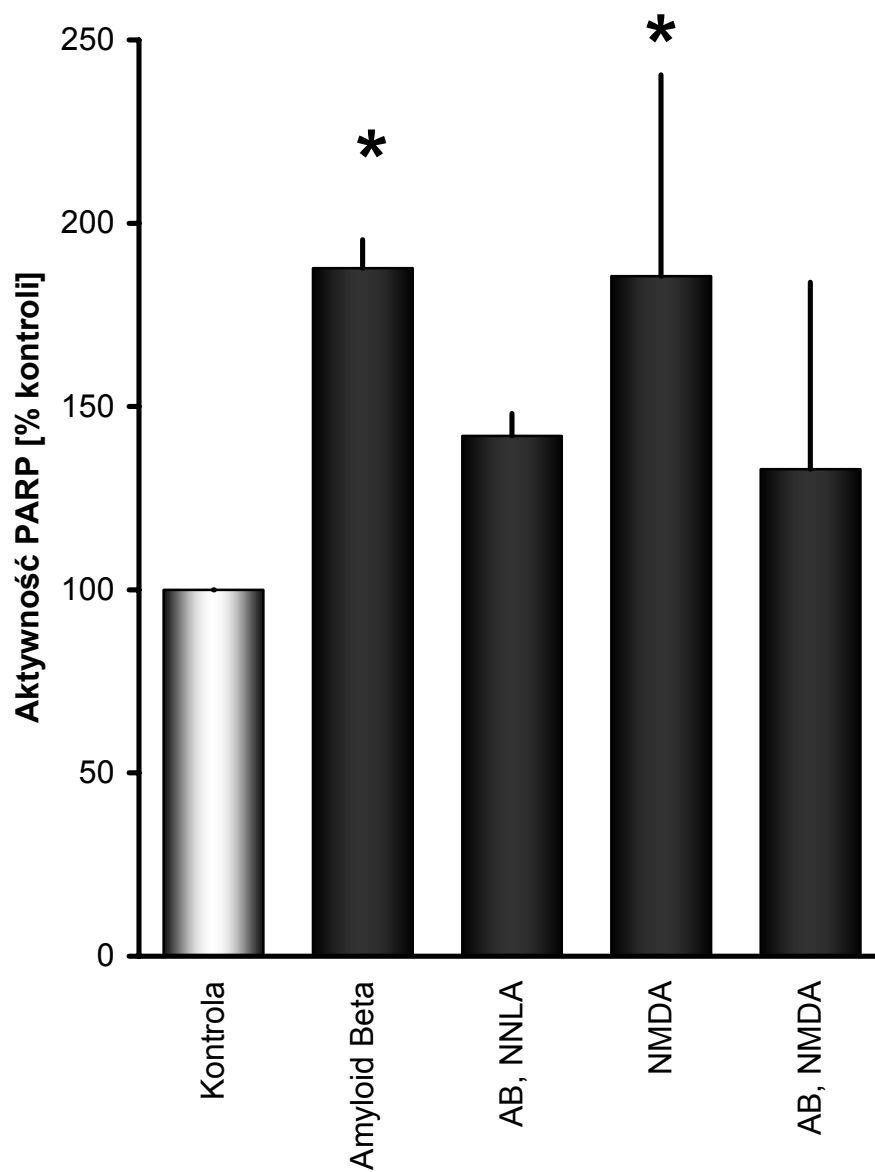


Ryc. 24. Poziom białka PARP-1 w poszczególnych częściach mózgu starczego. Badania prowadzono metodą immunochemiczną (Western-blot). Wyniki są średnią z 3 doświadczeń \pm S.E.M..



Ryc. 25. Wpływ aktywacji receptora NMDA na aktywność PARP-1 w hipokampie dojrzałym mierzona metodą radioizotopową. Wyniki są średnią z 4 doświadczeń \pm S.E.M. (NMDA), 3 doświadczeń (NMDA+Glicyna), 2 doświadczeń (NMDA+MK-801, NMDA+NNLA) lub są wynikiem przykładowego doświadczenia w 3 powtórzeniach (NMDA+spermina, Glutaminian, Glutaminian+glicyna).

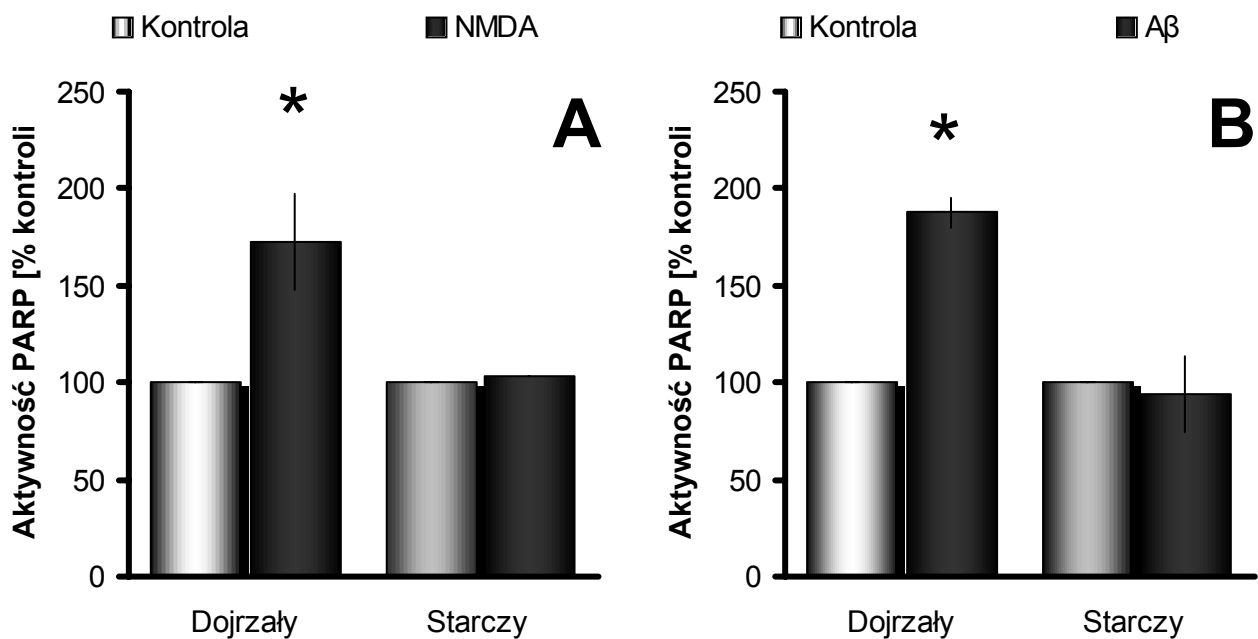
* $p < 0,05$, test t Studenta.



Ryc. 26. Wpływ peptydu Amyloidu β 25-35 i aktywacji receptora NMDA na aktywność PARP w hipokampie dojrzałym mierzona metodą radioizotopową. Wyniki są średnią z 4 doświadczeń \pm S.E.M. (NMDA).

* $p < 0,05$, test t Studenta.

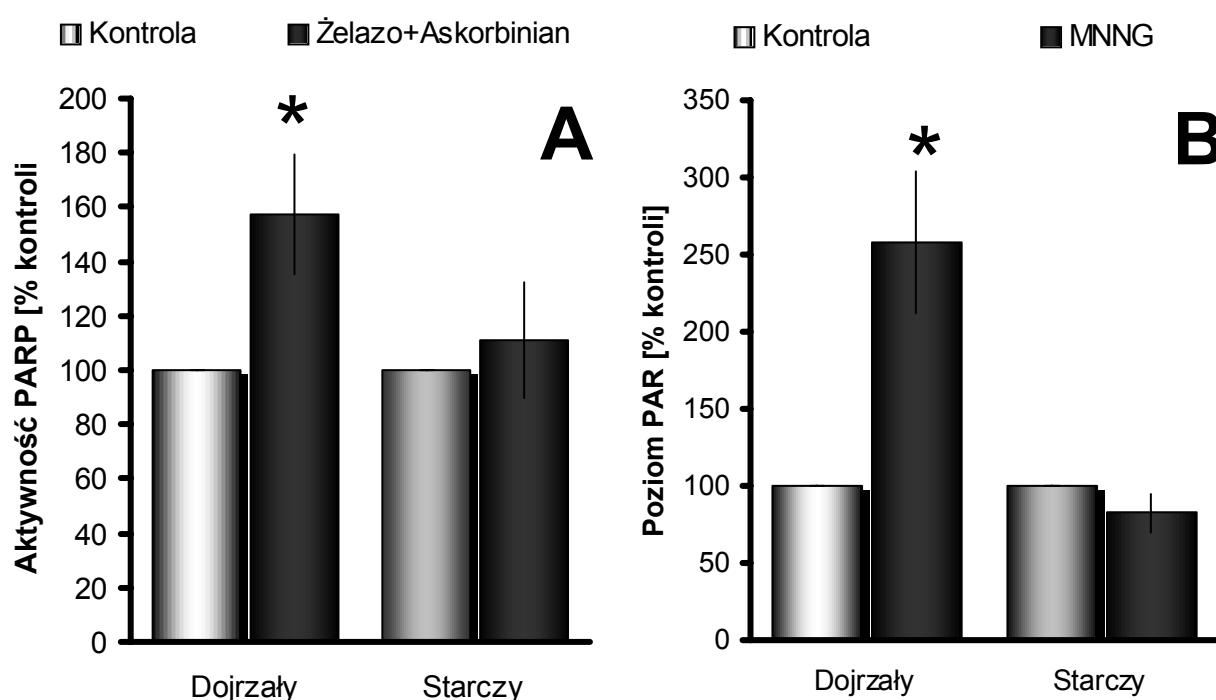
Wzrost aktywności PARP obserwowano wyłącznie w tkance dojrzalej po podaniu NMDA lub neurotoksycznego fragmentu peptydu amyloidu β (odpowiednio o 72 i 87%).



Ryc. 27. Wpływ aktywacji receptora NMDA (A) i wpływ podania Amyloidu β (B) na aktywność PARP-1 w hipokampie dojrzalym i starczym mierzona metodą radioizotopową. Wyniki są średnią z 3-7 doświadczeń \pm S.E.M..

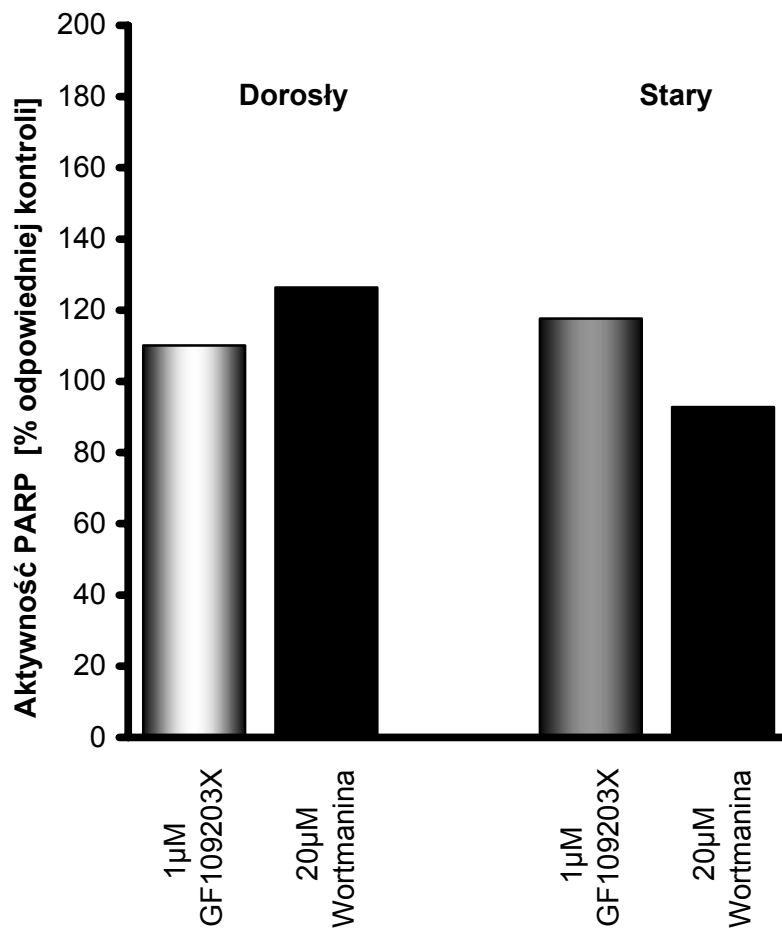
* $p < 0,01$, test t Studenta.

Aktywność PARP-1 w dojrzałym i starczym hipokampie badano w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego podaniem Fe^{2+} i askorbinianu oraz związku alkilującego MNNG. W tkance dojrzałej zaobserwowano wzrost aktywności PARP o 57% po podaniu żelaza i askorbinianu i o 158% po podaniu MNNG. W tkance starczej nie zaobserwowano zmian aktywności enzymu po podaniu wymienionych związków.



Wpływ stresu wolnorodnikowego wywołanego podaniem żelaza i askorbinianu (A) i wpływ podania związku uszkadzającego DNA MNNG (B) na aktywność PARP w hipokampie dojrzałym i starczym mierzona, odpowiednio, metodą radioizotopową i Western-blotem. Wyniki są średnią z 3-4 doświadczeń \pm S.E.M..

* $p < 0,02$, test t Studenta.



Ryc. 29. Aktywność PARP w dojrzałym i starym hipokampie w obecności inhibitorów kinaz i fosfataz białkowych. Wyniki są średnią z 3 (1μM GF109203X w tkance dojrzałej), lub 2 (10μM GF109203X w tkance dojrzałej) doświadczeń w 3 powtórzeniach lub reprezentują przykładowe doświadczenie w 3 powtórzeniach.

DYSKUSJA.

Uszkodzenie wolnorodnikowe należy do najczęściej rozpatrywanych potencjalnych przyczyn starzenia organizmów. Sformułowane w połowie lat 50. XX wieku teorie doczekały się silnego poparcia doświadczalnego. Stwierdzono, że wolne rodniki mogą uszkadzać wszystkie typy makromolekuł: DNA, lipidy i białka. Zaobserwowano korelację wydajności systemów obrony przed uszkodzeniem z długowiecznością, a manipulacje genetyczne powodujące wzrost ekspresji enzymów antyoksydacyjnych wydłużają życie organizmów modelowych. Istnieje bogata literatura dotycząca zmian poziomu wolnych rodników w procesie starzenia. Istotną rolę w modulacji stężenia wolnych rodników odgrywa syntaza tlenu azotu (NOS). Poszczególne izoformy tego enzymu zaangażowane są zarówno w fizjologiczne procesy komunikacji wewnątrz- i międzykomórkowej, jak w reakcje odpornościowe. Nadmierna aktywacja NOS może prowadzić do aktywacji stresu wolnorodnikowego i uszkodzenia DNA, białek i lipidów w sytuacjach patologicznych.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wskazują na wzrost podstawowej aktywności syntazy tlenu azotu w badanych częściach starczego mózgu w porównaniu z tkanką dojrzałą, statystycznie znamiennej w mózdku. W pozostałych częściach mózgu stwierdzono nieznamienną tendencję wzrostową. U zwierząt dorosłych starych, w wieku 12-14 miesięcy, nie stwierdzono zmian aktywności NOS. W związku z tym w późniejszych badaniach skupiono się na analizie materiału uzyskanego ze zwierząt starych.

Oznaczenia syntezy tlenu azotu w nieobecności wapnia i kalmoduliny lub w obecności N-nitro-L-argininy, inhibitora konstytutywnych izoform NOS nie wykazały aktywności indukowalnej izoformy enzymu w mózgu dojrzałym ani starczym. Również próby wykrycia mRNA iNOS za pomocą RT-PCR dały wynik negatywny. Wyniki te wskazują, że postulowana przez McCanna

[McCann, 1997; McCann i wsp., 1998] rola iNOS w starzeniu ośrodkowego układu nerwowego może nie odnosić się do procesu fizjologicznego starzenia *per se*, lecz ew. do towarzyszących mu często patologii. Law i wsp. [2002] obserwowali podwyższoną ekspresję iNOS u starych szczurów Long-Evans, natomiast Liu i wsp. [2004] nie stwierdzili ekspresji ani aktywności iNOS. Ta rozbieżność wyników sugeruje zależność ekspresji iNOS od rasy i/lub stanu zwierząt oraz warunków hodowli [Jesko i wsp., 2003].

W celu oceny udziału izoformy śródbłonkowej w całkowitej aktywności NOS wykonano pomiary syntezy NO w obecności 7-Nitroindazolu, inhibitora wykazującego preferencyjne działanie względem nNOS. Zaobserwowano spadek niewrażliwej na 7-Ni aktywności NOS w mózdku i nieznamiennej tendencji spadkowej w hipokampie oraz korze mózgu. Można przypuszczać, że znaczny wzrost mRNA eNOS [Strosznajder i wsp., 2004] może być adaptacyjną reakcją starzejącego się mózdku na obniżenie aktywności tej izoformy. Podwyższenie poziomu mRNA nie prowadzi do zmian ekspresji białka, co sugeruje zaburzenia na etapie translacji [Strosznajder i wsp., 2004]. Pomimo niezmienionego poziomu białka synteza NO niewrażliwa na 7-Ni była niższa w mózdku starczym niż dorosłym. Sugeruje to zmianę aktywności specyficznej eNOS z wiekiem. Może ona być wywołana przez związane ze stresem oksydacyjnym obniżenie jakości białka lub modyfikacje posttranslacyjne enzymu. Wpływ modyfikacji posttranslacyjnych na aktywność NOS w starzeniu był obserwowany przez wielu autorów [Fulton i wsp., 1999; La Porta i Comolli, 1999; Smith i Hagen, 2003]. Badania wykazały, że fosforylacja przez Akt (kinazę białkową B) na serynie 1179 aktywuje eNOS [Fulton i wsp., 1999]. Wiadomo, że w starzeniu spada aktywność licznych kinaz, w tym PKA, PKC i PKG, natomiast aktywność fosfataz wzrasta [Foster i wsp., 2001; Norris i wsp., 1998; Pascale i wsp., 1998]. Aktywność Akt/PKB i poziom ufosforylowania eNOS jest obniżony w starczych naczyniach krwionośnych [Smith i Hagen,

2003]. Możliwe jest, że podobny spadek aktywności Akt lub innej kinazy może być odpowiedzialny za obniżenie aktywności specyficznej eNOS w starczym mózgu.

Liu i wsp. [2003] wykazali obniżenie białka eNOS w zakręcie zębatym hipokampa, natomiast uwalnianie NO było wyższe. Ten sam zespół zaobserwował wzrost syntezy NO w korze przedczołowej starych szczurów [Liu i wsp., 2004] przy nie zmienionej ekspresji białka nNOS i eNOS, co koresponduje z wynikami własnymi.

Mając na uwadze dane dotyczące znaczenia eNOS w plastyczności neuronalnej obniżenie jej aktywności w mózdku może w istotny sposób wpływać na funkcjonowanie starczego mózgu. [Doreulee i wsp., 2003; Haul i wsp., 1999; Rickard i wsp., 1999] Mózdzek, który, jak pierwotnie uważano, wykazuje jedynie plastyczność związaną z uczeniem zadań ruchowych [Augustin i wsp., 2001], bierze również udział w klasycznym warunkowaniu i rozpoznawaniu mowy [Bracha i wsp., 2000; Mathiak i wsp., 2004]. Ponadto badania mechanizmów działania NO wykazały, że wpływa on na aktywność czynnika transkrypcyjnego CREB i ekspresję antyapoptotycznego białka Bcl-2 [Ciani i wsp., 2002]. Ekspresja c-fos i jun B wzrasta w odpowiedzi na aktywację zależnego od NO szlaku sygnalizacji cGMP [Haby i wsp., 1994]. Powyższe dane oraz wyniki Chalimoniuk i Strosznajder [1998a] wykazujące wzrost aktywności fosfodiesterazy cGMP w starczym mózgu prowadzący do znamienego spadku stężenia cGMP, pomimo wzrostu aktywności cyklazy guanylanowej wskazują, że stwierdzone zmiany ekspresji i aktywności eNOS mogą znacząco wpływać na działanie ścieżek przekazywania sygnału w starczym mózgu.

Malejący z wiekiem udział eNOS w rosnącej całkowitej syntezie NO dodatkowo wskazuje na wzrost aktywności nNOS w starczym mózgu. Pomiary mRNA tej izoformy wykazały jednak obniżenie ekspresji genu nNOS, co sugeruje

aktywację procesów kompensacyjnych, zabezpieczających mózg przed nadmierną aktywacją enzymu. Jednocześnie fakt iż wszystkie związki konieczne do zajścia reakcji podawano w optymalnej ilości w medium inkubacyjnym wskazuje, że za wzrost aktywności specyficznej nie jest odpowiedzialna dostępność substratu ani kofaktorów. W tej sytuacji najbardziej prawdopodobnym źródłem zmian aktywności wydaje się modyfikacja posttranslacyjna enzymu i/lub oddziaływania z innymi białkami. W pomiarach aktywności NOS w obecności inhibitorów najlepiej zbadanych kinaz i fosfataz białkowych, o których wiadomo, iż modyfikują NOS stwierdzono wcześniej niewielkie, 10-15% różnice w aktywności bazalnej, nie uzyskały one znamienności w tej serii badań. Fakt iż izoformy NOS są substratem dla całej gamy kinaz oraz innych enzymów modyfikujących białka wskazuje jednak, że nie można wykluczyć modyfikacji posttranslacyjnej jako źródła zmian aktywności nNOS w procesie starzenia.

Dostępne dotychczas w literaturze dane na temat wpływu starzenia na nNOS oraz całkowitą syntezę tlenku azotu są sprzeczne. Blum-Degen i wsp. [1999] nie zaobserwowali zmian w poziomie białka i aktywności NOS w badanych częściach ludzkiego mózgu. Pomiarzy były jednak prowadzone na próbkach składowanych przez pewien czas w temperaturze -80°C . Aktywność NOS w mózgu badana po odmrożeniu próbek ulega w takich warunkach zaburzeniu w stopniu zróżnicowanym zależnie od wieku [Jesko i wsp., 2003].

W różnych rejonach kory mózgu starych szczurów Sprague-Dawley Cha i wsp. [1998] zaobserwowali 30-60% spadek ilości neuronów nNOS-immunoreaktywnych. Ta sama grupa badawcza stwierdziła spadek immunoreaktywności nNOS w prążkowiu i *substantia innominata* i wzrost w jądrze podwzgórzowym [Cha i wsp., 2000]. Spadek ilości neuronów wykazujących reakcje na NADPH diaforazę zaobserwowali również Yamada i

wsp. [1996]. Badania Yu i wsp. [2000] wykazały natomiast zależny od wieku spadek mRNA i białka nNOS w mózdzku.

Wzrost aktywności NOS w starczym hipokampie, korze mózgu i w mózdzku stwierdzili natomiast La Porta i Comolli [1999]. Jednocześnie zaobserwowali oni wzrost mRNA zarówno dla iNOS jak nNOS w hipokampie dorosłych starych i starych szczurów Sprague-Dawley w porównaniu z dorosłymi. Indukcję iNOS obserwowano również w podwzgórzach starych szczurów Brown-Norway [Vernet i wsp., 1998]. Badania Mollace i wsp. [1995] oraz Vallebuona i Raiteri [1995] wykazały natomiast spadek aktywności NOS w hipokampie. Przytoczone rozbieżne dane wskazują na znaczne zróżnicowanie zmian aktywności NOS i indukcji iNOS, zależne prawdopodobnie od szeregu czynników takich jak rasy zwierząt i warunków hodowli, metod izolacji i składowania materiału. W badaniach stresu wolnorodnikowego w procesie starzenia istnieje konieczność wykonywania pomiarów NOS dla każdego użytego modelu, gdyż dotychczasowe dane literaturowe nie dostarczają jednoznacznych podstaw do wnioskowania na temat kierunku związanych z wiekiem zmian NOS.

W badaniach prowadzonych wcześniej w zakładzie zanotowano znamienne wyższą aktywność NOS w hipokampie, korze mózgu i w mózdzku [Chalimoniuk i Strosznajder, 1998a]. Badania nad zależnymi od wieku zmianami aktywności NOS przeprowadzono wtedy na populacji zwierząt hodowanych bez bariery. Zwierzęta użyte do obecnych doświadczeń były utrzymywane za barierą i należały do kategorii SPF (*specific pathogen free*). Uzyskane wyniki sugerują, że zmiany warunków hodowli i stany zapalne oraz różnice żywienia zwierząt mogą wpływać na aktywność NOS w mózgu.

Stres oksydacyjny, definiowany jako stan braku równowagi między produkcją i usuwaniem wolnych rodników [Sies, 1985] może być powodowany zarówno

wzmocnionym powstawaniem ROS jak zaburzeniami enzymatycznych i nieenzymatycznych antyoksydantów. Zaobserwowano, że długowieczne gatunki ssaków wykazują stosunkowo wysoki poziom α -tokoferolu, karotenoidów i kwasu askorbinowego we krwi [Cutler, 1991]. Najwyższe stężenia antyoksydantów odnotowuje się u człowieka [Junqueira i wsp., 2004]. Dane uzyskane przez Trichopoulou i wsp. [1999] łączą długowieczność z wysokim poziomem przyswajanych antyoksydantów. Badania prowadzone u stulatków wykazały wyższy niż przeciętny poziom witamin A, C i E [Mecocci i wsp., 2000; Paolisso i wsp. 1998].

Procesowi starzenia często towarzyszy spadek poziomu antyoksydantów takich jak α -tokoferol i β -karoten [Junqueira i wsp., 2004]. Obserwowano związek pomiędzy osłabieniem procesów poznawczych a obniżeniem poziomu witaminy E, α -tokoferolu i karotenoidów [Berr i wsp., 2000; Schmidt i wsp., 1998]. Dane dostępne w literaturze na temat zmian poziomu niskocząsteczkowych zmiataczy wolnych rodników z wiekiem nie są jednak jednoznaczne [Junqueira i wsp., 2004].

Podobnie jak w przypadku związków niskocząsteczkowych, również poziom dysmutazy ponadtlenkowej jest u ludzi wyższy w porównaniu do innych gatunków ssaków [Cutler, 1991]. Ponadto wyższym poziomem peroksydazy glutationowej i Mn-SOD próbuje się tłumaczyć różnicę długości życia kobiet i mężczyzn [Borras i wsp., 2005]. Większość badaczy wskazuje na spadek poziomu SOD, katalazy i peroksydazy glutationowej w starzeniu mózgu i innych narządów zwierząt [Junqueira i wsp. 2004; Cand i Verdeti, 1989; Navarro i wsp., 2004]. U ludzi w większości obserwowano tendencję spadkową, choć wyniki nie są jednoznaczne [Junqueira i wsp., 2004a].

Opisane osłabienie z wiekiem systemów obrony przed wolnymi rodnikami powinno skutkować wzrostem ich poziomu, a co za tym idzie, również uszkodzenia lipidów, białek i DNA.

Popularnymi markerami uszkodzenia lipidów są substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym (TBARS). Uzyskane wyniki wskazują, że podstawowy poziom TBARS mierzony w homogenatach poszczególnych części mózgow starczych nie zmieniał się z wiekiem i był porównywalny we wszystkich badanych częściach mózgu. Podczas inkubacji zaobserwowano wyższą akumulację TBARS w hipokampie w porównaniu z korą mózgu i mózdzkiem. Wzrost poziomu utworzonych TBARS obserwowano zarówno w tkance dojrzałej jak starczej poddawanej dodatkowo inkubacji *in vitro* lub działaniu jonów Fe^{2+} . Na uwagę zasługuje fakt, że nie zaobserwowano znamienych zmian poziomu TBARS po podaniu inhibitorów NOS: NNLA lub 7-Ni. Uzyskane wyniki wskazują na brak udziału obserwowanego w starczym mózdzku wzrostu uwalniania tlenu azotu i, ogólniej, na brak istotnego uszkodzenia lipidów błonowych w procesie starzenia. Inhibujący TBARS wpływ tempolu, mimetyka SOD wskazuje natomiast na udział rodnika hydroksylogowego w procesie uszkodzeń komponenty lipidowej błon.

Dane dostępne w literaturze są sprzeczne [Kristofikova i wsp., 1995]. Część autorów obserwowała wzrost z wiekiem poziomu TBARS i innych markerów wolnorodnikowego uszkodzenia [Fukui i wsp., 2001; Kasapoglu i Ozben, 2001; Navarro i Boveris, 2004; Savitha i wsp., 2005]. Wyniki są zależne od użytej tkanki, gatunku i rasy zwierząt. Junqueira i wsp. [2004] wykazali znamieny, 20-45% wzrost TBARS u ludzi w wieku powyżej 50 lat, podobnie jak Cherubini i wsp. [2001]. Inne badania nie wykazały natomiast znaczących zmian poziomu dialdehydu malonowego z wiekiem [Block i wsp. 2003]. Niższy niż u starych ludzi poziom TBARS obserwowano u stulatków [Paolisso i wsp., 1998]. Dostępne dane sugerują, że choć nie zawsze udaje się zaobserwować związany z wiekiem wzrost TBARS i grup karbonylogowych, to możliwy jest udział stale akumulującego się uszkodzenia wolnorodnikowego makromolekuł w procesie starzenia organizmów.

Istnienie stresu wolnorodnikowego (prawdopodobnie zbyt słabego aby uchwycić go metodą TBARS) sugeruje zwiększenie jądrowej puli czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w starczym hipokampie. W pozostałych częściach mózgu nie zaobserwowano znamienych statystycznie różnic między tkanką dojrzałą i starczą. Zmiana ta nie koreluje więc ze wzorem zmian aktywności NOS, co również wskazuje na brak udziału tlenu azotu w wywoływaniu stresu oksydacyjnego w procesie starzenia. Jednocześnie fakt wyższej akumulacji TBARS *in vitro* oraz wyższego jądrowego poziomu NF- κ B właśnie w tej strukturze sugeruje iż hipokamp jest wybiórczo wrażliwy na procesy wolnorodnikowe w przebiegu starzenia. Niższa tendencja prooksydacyjna sugeruje istnienie mechanizmów obronnych w mózgu starczym.

Dane literaturowe opisujące wpływ starzenia na NF- κ B wykazują pewną niejednoznaczność, jednak często powtarzającym się faktem jest wzrost poziomu i/lub aktywności tego czynnika transkrypcyjnego. Sanguino i wsp. [2006] stwierdził wybiórczy wzrost aktywności NF- κ B w korze starych szczurów. Ivory i wsp. [2004] obserwował wysoki, jednak nie reagujący na bodźce stymulujące poziom NF- κ B i I κ B α we frakcji jądrowej obwodowych limfocytów osób starszych. Helenius i wsp. [1996] stwierdzili natomiast wzrost aktywności NF- κ B w jądrach mysich miocytów serca przy jednoczesnym niewielkim wzroście jądrowego poziomu podjednostki NF- κ B p50.

Prowadzone w zakładzie badania metodą Western-blot nie wykazały wykrywalnego poziomu białka p53 w hipokampie dojrzałym i starczym jak również w pozostałych częściach mózgu [Strosznajder i wsp., 2005b]. Zaobserwowany wzrost mRNA p53 może sugerować iż w starczej tkance uruchamiane mogą być procesy adaptacyjne, wpływające na przeżywalność neuronów w zmienionym środowisku.

Jednym z najwcześniejszych i najczulszych wskaźników wolnorodnikowego uszkodzenia DNA jest wzrost aktywności PARP-1. Uzyskane wyniki wskazują na znamieny wzrost aktywności PARP-1 w starczym hipokampie i korze mózgu w porównaniu do tkanki dojrzałej. W mózdku natomiast nie obserwowano znamienych zmian. Podwyższony poziom wolnych rodników i uszkodzenia DNA obserwowany był w starzeniu przez [Ashok i wsp., 1998, Edris i wsp., 1994, Lu i wsp., 1999, Mecocci i wsp., 1993] Wzrost podstawowej aktywności PARP-1 stwierdzał Messripour i wsp.. [1994]. Badacze ci zaobserwowali wyższą aktywność i poziom białka PARP w komórkach neuronalnych i glejowych izolowanych z całego starczego mózgu. Dla wyjaśnienia przyczyn opisanych w niniejszej pracy zmian aktywności oznaczono poziom białka PARP-1 metodą Western-blot. Sygnał nie zmieniał się w starczym hipokampie, korze i mózdku. Wskazuje to, że następuje jakościowa, nie zaś ilościowa zmiana na poziomie białka. Grube i Bürkle [1992] stwierdzili brak korelacji poziomu białka PARP z długością życia przy jednoczesnym silnym związku długości życia z aktywnością enzymu. Gatunki długożyjące wykazywały wyższą aktywność specyficzną.

Dla lepszego zrozumienia wpływu starzenia na PARP-1 dokonano pomiaru aktywności enzymu stymulowanej stresem oksydacyjnym i genotoksycznym. Uzyskane wyniki wskazują na brak aktywacji enzymu w odpowiedzi na stres w mózgu starczym, co może mieć duże znaczenie zarówno dla procesów naprawy DNA jak przebiegu metabolizmu energetycznego. Aktywacja stresu wolnorodnikowego za pośrednictwem otwarcia kanałów NMDAr oraz podaniem amyloidu β jest procesem składającym się z wielu etapów, z których każdy-w tym właściwości receptora, skuteczność wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnalizacyjnych-może podlegać modyfikującemu wpływowi starzenia niezależnie od samego badanego procesu aktywacji PARP-1. Ponadto sam PARP-1 jest elementem docelowym ścieżek sygnalizacyjnych aktywowanych

przez receptory błonowe, co dodatkowo utrudnia interpretację uzyskanych wyników. Obecnie wiadomo, że PARP-1 może odbierać informacje w układzie glutaminianergicznym i cholinergicznym [Homburg i wsp., 2000; Strosznajder i wsp., 2005a]. W prowadzonych badaniach użyto więc czynników bezpośrednio wywołujących stres oksydacyjny i genotoksyczny. Podanie FeCl_2 i askorbinianu miało na celu wywołanie stresu wolnorodnikowego. Obecność tych związków znacząco aktywowała PARP-1 w hipokampie dojrzałym. W starczym hipokampie aktywność enzymu nie różniła się znamienne od aktywności kontrolnej. Przedłużający się stres oksydacyjny wywierał na PARP wpływ hamujący zarówno w hipokampie dojrzałym jak i starczym. Uszkodzenie DNA czynnikiem alkilującym MNNG, podobnie jak podanie żelaza, powodowało wzrost aktywności PARP-1 wyłącznie w hipokampie dojrzałym i nie miało wpływu na podwyższoną w porównaniu z dojrzałym aktywność enzymu. Uzyskane dane wskazują na obniżenie zdolności PARP-1 w starczym hipokampie do odpowiedzi na dodatkowy stres oksydacyjny i genotoksyczny.

Jedną z potencjalnych przyczyn modyfikacji zachowania PARP-1 w starczym mózgu może być modyfikacja posttranslacyjna, względnie niekowalencyjne oddziaływanie ze specyficznymi białkami jądrowymi. Istnieje szereg danych wskazujących na oddziaływanie PARP-1 z kinazami. PARP-1 wiąże zależną od DNA kinazę białkową DNA-PK [Galante i Kohwi-Shigematsu, 2000] i jest przez nią fosforylowany, choć wpływ tej modyfikacji i samej asocjacji na jego aktywność jest niejasny [Ariumi i wsp., 1999]. Z drugiej strony poli(ADP-rybozylacja) podjednostek DNA-PK modyfikuje jej aktywność [Li i wsp., 2004]. PARP-1 jest także substratem kinazy białkowej C [Bauer i wsp., 1992]. W świetle powyższych danych zmiana stopnia ufosforylowania PARP-1 przez którąś z kinaz z wiekiem mogła wyjaśnić obserwowane zaburzenia aktywacji enzymu w starczym hipokampie. Badania aktywności PARP-1 w obecności

inhibitorów kinaz i fosfataz białkowych nie wykazały jednak ich wpływu. Wydaje się najbardziej prawdopodobne, że związane z procesem starzenia uszkodzenie DNA jest odpowiedzialne za aktywację PARP-1.

PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI.

- Badania syntezy NO wykazały najwyższą aktywność cNOS w mózdku dojrzałym. Znamienne niższe, zbliżone wartości uzyskano w korze mózgu i hipokampie. Stwierdzono wzrost specyficznej aktywności cNOS w mózgu starczym, znamienne w mózdku. Nie obserwowano indukcji iNOS zarówno w mózgu dojrzałym jak i starczym.
Analiza aktywności i poziomu mRNA oraz danych dotyczących ekspresji białka nNOS wskazuje na udział mechanizmów regulacyjnych / adaptacyjnych zabezpieczających mózg starczy przed nadmiernymi zmianami aktywności nNOS.
- Aktywność eNOS ulega obniżeniu we wszystkich badanych częściach mózgu starczego statystycznie znamienne w mózdku. W świetle danych literaturowych może to mieć istotne znaczenie w zaburzeniach procesów poznawczych i regulacji krążenia w starczym mózgu.
- Stwierdzono znamienne wyższą akumulację produktów peroksydacji lipidów (TBARS) w hipokampie w porównaniu z innymi badanymi częściami mózgu. Badania peroksydacji lipidów wskazują na brak znamienych różnic pomiędzy częściami mózgow starczych i dojrzałych. Wzrost translokacji p65 do frakcji jądrowej w starczym hipokampie nie koreluje ze zmianami uwalniania NO i jest prawdopodobnie związany z działaniem innych wolnych rodników, które biorą również udział w aktywacji PARP-1.

- Obniżona aktywność prooksydacyjna lipidów w różnych częściach mózgu starczego w porównaniu z dojrzałym może wskazywać na istnienie mechanizmów obronnych w mózgach starczych lub na obniżenie stężenia wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w lipidach błon.
- Stwierdzona najwyższą aktywność PARP-1 w mózdku w porównaniu z innymi badanymi częściami mózgu dojrzałego koreluje z najwyższą aktywnością cNOS.
- Stwierdzono wzrost aktywności podstawowej PARP-1 bez zmian w poziomie białka enzymu w mózgach starczych w porównaniu z dojrzałymi. Statystycznie znamiennej wzrost aktywności enzymu w hipokampie i korze mózgu spowodowany jest najprawdopodobniej większym uszkodzeniem DNA w mózgach starczych.
- Wyniki badań *in vitro* wskazują, że stres oksydacyjny powoduje wzrost aktywności PARP-1 w hipokampie dojrzałym, natomiast pozostaje bez wpływu na podwyższoną już aktywność w tkance starczej. Brak odpowiedzi enzymu może chronić starczy hipokamp przed nadmierną aktywacją PARP-1, jednak równocześnie może ograniczać zdolność do naprawy DNA w warunkach zwiększonego stresu.

STRESZCZENIE.

Akumulacja uszkodzeń DNA i innych makromolekuł przez wolne rodniki należy do najczęściej rozpatrywanych potencjalnych przyczyn starzenia. Do najważniejszych postulowanych czynników destrukcyjnych należą produkty reakcji tlenu azotu (NO) z innymi wolnymi rodnikami. Zaproponowana przez McCann`a [McCann, 1997; McCann i wsp., 1998] hipoteza starzenia zależnego od tlenu azotu postuluje centralną rolę syntaz NO (NOS) w związanym z wiekiem uszkodzeniu ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Hipokamp i kora nowa, struktury kluczowe dla procesów uczenia, są selektywnie wrażliwe na wpływ starzenia.

Proces starzenia zaburza funkcję licznych układów neuroprzekaźnikowych. W hipokampie i korze przedczołowej obserwuje się spadek stężenia glutaminianu. Zmiana poziomu receptorów NMDA (N-metylo-D-asparaginianu; NMDAr), kanałów wapniowych zaangażowanych w zjawiska plastyczności synaptycznej, jest jednym z najbardziej jednoznacznych przejawów starzenia układu glutaminianergicznego. Starzenie w zróżnicowanym stopniu wpływa na ekspresję poszczególnych podjednostek; zaburzenia najsilniej wyrażone są w hipokampie i prążkowie. Prowadzi to do zmian zarówno jakościowych jak ilościowych w przekaźnictwie glutaminianergicznym, co uważane jest za potencjalną przyczynę występujących u starych zwierząt zaburzeń pamięci.

Syntaza tlenu azotu (NOS) jest kluczowym odbiorcą sygnału wapniowego aktywowanego otwarciem kanału NMDAr i odgrywa znaczną rolę w zależnych od tego receptora zjawiskach plastyczności synaptycznej. W przekaźnictwie sygnału uczestniczy neuronalna izoforma NOS (nNOS), jednak **nowe** wyniki wskazują na znaczną rolę izoformy określanej jako śródbłonkowa (eNOS) w zjawiskach uczenia i pamięci.

Najlepiej poznanym receptorem tlenu azotu jest rozpuszczalna cyklaza guanylanowa (sGC), która katalizując reakcję powstawania cGMP reguluje aktywność m. in. kinazy białkowej G (PKG), kanałów jonowych bramkowanych cGMP i fosfodiesteraz cyklicznych nukleotydów.

Sygnal glutaminianergiczny jest wygaszany m. in. przez inhibicję NOS na drodze fosforylacji. NOS jest substratem dla zależnej od Ca^{2+} i kalmoduliny (CaM) kinazy białkowej II. W regulacji nNOS uczestniczy także kinaza białkowa C (PKC), kinaza białkowa zależna od cAMP (PKA) i kinaza białkowa zależna od cGMP (PKG). Istotne znaczenie w aktywacji nNOS ma defosforylacja przez zależną od Ca^{2+} i CaM fosfatazę kalcyneurynę.

Tlenek azotu reaguje z kationami metali przejściowych takimi jak Fe^{2+} hemoglobiny. NO trwale wiąże żelazo niektórych enzymów mitochondrialnych, co prowadzi do inhibicji oddychania. NO może również reagować z licznymi białkami prowadząc do zmian ich aktywności poprzez S-nitrozylację. Bardzo ważna jest reakcja NO z rodnikiem ponadtlenkowym, w wyniku czego dochodzić może do powstawania bardzo reaktywnego nadtlenoazotynu i aktywacji kaskady wolnorodnikowej.

Zarówno fizjologiczna sygnalizacja NO jak również stres wolnorodnikowy wywołany jego nadmiernym uwalnianiem modulują aktywność czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. NF- κ B reguluje ekspresję genów białek pro- i antyapoptotycznych oraz enzymów antyoksydacyjnych i wpływa przez to na ścieżki sygnalizacyjne decydujące o przeżyciu lub śmierci komórki, pośredniczy także w procesach zapalnych. NO może regulować NF- κ B na kilka sposobów, zarówno modulując aktywność ścieżek położonych powyżej, jak hamując jego wiązanie do DNA poprzez S-nitrozylację. Do czynników transkrypcyjnych wrażliwych na wpływ NO należy także białko p53.

Liczne dane literaturowe wskazują na istotne znaczenie NO w fizjologii ośrodkowego układu nerwowego. W procesach patologicznych bardzo ważna

jest interakcja NO z rodnikiem ponadtlenkowym i powstawanie nadtlenoazotynu. Udział NO w procesach starzenia i neurodegeneracji zależy od wielu czynników środowiskowych, stosunku stężeń NO[•] i O₂⁻, pH oraz stanu redoks komórek.

Dotychczas istniejące dane na temat ekspresji i aktywności NOS w starczym układzie nerwowym są niespójne. Wysoka zmienność uzyskanych wyników dotyczących aktywności cNOS i ekspresji iNOS może zależeć od badanych części mózgu, rasy użytych zwierząt i warunków hodowli.

Obserwowany w starzeniu i chorobach neurodegeneracyjnych wzrost uszkodzenia DNA wywołany działaniem wolnych rodników powoduje aktywację jądrowego enzymu polimerazy poli(ADP-rybozy)-1, PARP-1. Enzym ten reguluje kompleks naprawy jednoniciowych pęknięć DNA. Jego aktywacja jest najwcześniejszym sygnałem wskazującym na obecność przerw DNA. PARP-1 jest również zaangażowany w regulację struktury chromatyny, przebiegu cyklu komórkowego i regulację licznych czynników transkrypcyjnych. W ostatnich latach opublikowano wyniki wskazujące na znaczenie tego enzymu w procesach wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału.

Poli(ADP-rybozylacji) przez PARP-1 podlega ponad 40 białek jądrowych, w tym zależna od DNA kinaza białkowa (DNA-PK) uważana za czynnik konieczny do naprawy dwuniciowych pęknięć DNA oraz Ca²⁺, Mg²⁺-zależna endonukleaza. Zarówno supresor nowotworów p53 jak i NF-κB oraz wiele innych białek ulegają poli(ADP-rybozylacji) oraz niekwalencyjnie asocjują z autopoli(ADP-rybozylowanym) PARP-1 za pośrednictwem motywu specyficznego wiążącego poli(ADP-rybozę). PARP-1 podlega natomiast modyfikacji posttranslacyjnej przez DNA-PK i kinazę białkową C (PKC). Opisane oddziaływania NF-κB z PARP-1 mogą mieć istotne znaczenie w mechanizmach stresu oksydacyjnego i starzenia. Wykazano iż doświadczalne

wyłączenie genu PARP-1 zapobiega aktywacji NF- κ B i zmniejsza uszkodzenie tkanek. Ponadto w przypadku masowego uszkodzenia DNA PARP-1 zużywa komórkową pulę β NAD⁺, co może powodować spadek stężenia ATP zużywanego do resyntezy β NAD⁺ i nekrozę.

PARP-1 w zależności od stopnia uszkodzenia DNA bierze udział w naprawie DNA lub odgrywa ważną rolę w procesach obumierania komórek. Jako taki stanowi atrakcyjny obiekt badań gerontologicznych. Dotychczas uzyskane wyniki są jednak niejednoznaczne. Stwierdzono, że maksymalna aktywność PARP koreluje ze średnią i maksymalną długością życia badanych gatunków ssaków. Podobne wnioski wysunięto na podstawie badań na ludzkich liniach komórkowych pobranych od osób długowiecznych.

PARP-1 w ośrodkowym układzie nerwowym był dotychczas badany w oderwaniu od wielu wpływających na niego procesów. W prowadzonych pracach nie uwzględniono wpływu starzenia na aktywność i fosforylację PARP-1 w poszczególnych częściach mózgu. Nie przeprowadzono też próby skorelowania zależnych od wieku zmian aktywności PARP-1 z aktywnością NOS. Ponadto nie analizowano wpływu stresu oksydacyjnego / genotoksycznego na odpowiedź PARP-1 w mózgach starczych. Obecne w literaturze dane nie pozwalają na ocenę w jakim stopniu zmiany podstawowej aktywności PARP-1 w mózgach starczych są spowodowane zmianami poziomu NO, jednego z podstawowych czynników mogących wpływać na przeżycie i funkcjonowanie neuronów.

Celem niniejszej pracy była analiza aktywności i ekspresji poszczególnych izoform syntazy tlenu azotu w mózgu dojrzałym i starczym oraz zbadanie udziału NO w towarzyszącym starzeniu mózgu stresie oksydacyjnym i w aktywności polimerazy poli(ADP-rybozy). Badania prowadzono w hipokampie, korze mózgu oraz mózdzku zwierząt dorosłych, dorosłych starych i starych (odpowiednio 3-4, 14- i 24-miesięcznych) samców szczurów rasy Wistar

wolnych od patogenów (SPF). Używano skrawki, homogenaty oraz frakcje podkomórkowe: jądrową i cytozolową. Ekspresję izoform NOS i PARP-1 badano przy użyciu RT-PCR oraz Western-blot. Translokację podjednostki p65 czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, do jądra komórkowego mierzono metodą Western blot. Wolnorodnikowe uszkodzenie lipidów określano mierząc poziom substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS). Aktywność enzymów oznaczano metodami radiochemicznymi przy użyciu znakowanych izotopowo substratów. Analizę udziału poszczególnych izoform NOS w aktywności całkowitej prowadzono przy użyciu inhibitorów poszczególnych izoform oraz modyfikując skład środowiska reakcyjnego. Odpowiedź PARP-1 na czynniki stresowe oznaczano przy użyciu związków wywołujących stres wolnorodnikowy (aktywacja receptora NMDA, podanie zewnątrzkomórkowych agregowanych peptydów amyloidu β oraz żelaza i askorbinianu) Pomiar wpływu kinaz białkowych na aktywność PARP-1 wykonano podając odpowiednie inhibitory.

Stwierdzono, że całkowita aktywność NOS jest najwyższa w mózdku. Zaobserwowano statystycznie znamienne wzrost w mózdku starczym. Pomiaru wykonane metodą RT-PCR wykazały znaczący spadek mRNA nNOS w starczym hipokampie, natomiast w innych badanych częściach mózgu poziom mRNA był nieznamienne niższy. Stosunek aktywności NOS do poziomu mRNA nNOS był wysoce znamienne podwyższony w starczym hipokampie i mózdku, odpowiednio 7- i 2-krotnie. W wieku 14 miesięcy stosunek ten był nie zmieniony względem kontroli. Pomiaru w obecności N-nitro-L-argininy (NNLA), inhibitora o dużej preferencji dla izoform konstytutywnych, oraz prowadzone w środowisku pozbawionym jonów wapnia i kalmoduliny nie wskazują na obecność aktywności iNOS zarówno w częściach mózgu dojrzałego jak i starczego. Oznaczenia mRNA tej izoformy dały wynik negatywny. Badania

przy użyciu 7-nitroindazolu (7-Ni), inhibitora NOS wykazującego preferencję względem nNOS wskazują na 38-45% udział eNOS w całkowitej syntezie tlenku azotu w hipokampie, korze i mózdzku. W częściach mózgu starczego był on niższy i wynosił 26-33% całkowitej syntezy NO. Również aktywność bezwzględna eNOS była niższa we wszystkich badanych częściach mózgu starczego w porównaniu z dojrzałym, przy czym spadek ten osiągnął znamienność statystyczną wyłącznie w starczym mózdzku. Podsumowując tę część badań należy uznać, że uzyskane wyniki wskazują na wzrost aktywności specyficznej nNOS w mózgach starczych. Najbardziej prawdopodobnym źródłem zmian aktywności nNOS wydaje się modyfikacja posttranslacyjna enzymu. W pomiarach aktywności NOS w obecności inhibitorów kinaz białkowych A, C i G stwierdzano wcześniej niewielkie, 10-15% różnice w aktywności bazalnej, nie uzyskały one jednak znamienności w tej serii badań. Fakt iż izoformy NOS są substratem dla całej gamy kinaz wskazuje jednak, że nie można wykluczyć modyfikacji posttranslacyjnej jako przyczyny zmian aktywności nNOS w procesie starzenia.

W kolejnych badaniach postanowiono ocenić, czy stwierdzony wzrost aktywności NOS może modyfikować zależne od wolnych rodników procesy peroksydacji lipidów. Poziom podstawowy substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w hipokampie, korze mózgu i mózdzku starczym nie zmieniał się w sposób statystycznie znaczący w porównaniu do odpowiednich części mózgu dojrzałego. Podanie NNLA nie miało wpływu na poziom TBARS, również w mózdzku dojrzałym i starczym, a więc w tej części mózgu, gdzie obserwowano statystycznie znamienny wzrost NO. Tempol, związek o właściwościach dysmutazy ponadtlenkowej zmniejszał natomiast istotnie poziom TBARS o ok. 50% w mózdzku dojrzałym i starczym. W celu określenia zdolności prooksydacyjnej poszczególnych części mózgu przeprowadzono pomiary akumulacji TBARS po 60 min. inkubacji *in vitro*. W hipokampie

stwierdzono akumulację TBARS półtorakrotnie wyższą niż w mózdku i trzykrotnie wyższą niż w korze mózgu. Wiek nie miał znamionnego wpływu na poziom wzrostu TBARS w żadnej z badanych części mózgu. Podanie inhibitorów NOS, N-nitro-L-argininy lub 7-Nitroindazolu nie miało również wpływu na poziom akumulacji TBARS. Inhibujący wpływ tempolu, mimetyka SOD na stężenie TBARS wskazuje natomiast na udział rodnika ponadtlenkowego w procesie uszkodzeń komponenty lipidowej błon. Istotny wzrost TBARS po reakcji Fentona (Fe^{2+} + askorninian) potwierdza z kolei istotną rolę rodnika hydroksylogowego w aktywacji peroksydacji lipidów.

Na istnienie w mózgzach starczych podwyższonego stresu wolnorodnikowego, prawdopodobnie zbyt słabego aby uchwycić go metodą TBARS wskazuje natomiast fakt podwyższenia jądrowego poziomu p65, podjednostki czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Wzrost poziomu białka p65 we frakcji jądrowej stwierdzano w hipokampie, nie korelowała więc z przestrzennym wzorem zmian aktywności NOS.

Pomiary konstytutywnej aktywności PARP-1 w poszczególnych częściach mózgu dojrzałego i starczego wykazały znamionnie wyższą aktywność enzymu w mózdku w porównaniu z hipokampem i korą mózgu. Może to być odbiciem wyższej syntezy NO we frakcji cytozolowej mózdzku i prawdopodobnie wyższego poziomu wolnorodnikowego uszkodzenia DNA. Wykazano znamionny statystycznie wzrost aktywności PARP-1 w starczym hipokampie i korze mózgu w porównaniu do tkanki dojrzałej. W mózdku zaobserwowano nieznamionną tendencję wzrostową. Nie zanotowano znamionnych zmian poziomu białka PARP-1 w żadnej części starczego mózgu w porównaniu z dojrzałym.

Podanie agonisty glutaminianergicznego receptora NMDA powodowało znamionną aktywację PARP-1 w hipokampie dojrzałym, częściowo wrażliwą na inhibitory nNOS. Aktywacja ta nie zachodziła w tkance starczej, gdzie poziom

aktywności PARP-1 w obecności NMDA pozostawał na uprzednio podwyższonym w procesie starzenia poziomie kontrolnym. W hipokampie starczym zaobserwowano również brak wzrostu aktywności PARP-1 na peptydy amyloidu β , które w tkance dojrzalej aktywują ten enzym. Dla sprawdzenia uzyskanych wyników przeprowadzono dodatkowe doświadczenia wywołując stres oksydacyjny podaniem jonów żelaza w obecności askorbinianu. Aktywacja PARP-1 w hipokampie dojrzłym osiągnęła znamienność statystyczną, natomiast w tkance starczej poli(ADP-rybozylacja) pozostawała na poziomie kontrolnym, znamienne podwyższonym przez proces starzenia w w porównaniu do wartości kontrolnych w hipokampie dojrzłym.

Jedną z potencjalnych przyczyn braku aktywacji PARP-1 w starczym mózgu może być modyfikacja posttranslacyjna. Istnieje szereg danych wskazujących na oddziaływanie PARP-1 z zależną od DNA kinazą białkową (DNA-PK) i PKC. W świetle powyższych danych zmiana stopnia ufosforylowania PARP-1 przez którąś z kinaz z wiekiem może wyjaśnić obserwowane zmiany odpowiedzi enzymu w starczym hipokampie. Badania aktywności PARP-1 w obecności inhibitorów kinaz i fosfataz białkowych nie wykazały jednak ich wpływu. Wydaje się najbardziej prawdopodobne, że związane z procesem starzenia uszkodzenie DNA jest odpowiedzialne za aktywację PARP-1. Prawdopodobnie osiąga on maksymalną aktywność stymulowany akumulującym się w procesie starzenia uszkodzeniem DNA i enzym nie jest zdolny do dalszej aktywacji. Należy podkreślić, że poziom aktywności podstawowej PARP-1 w hipokampie starczym osiągał wartości zbliżone do obserwowanych w mózgach dojrzłych w przypadku działania stresu oksydacyjnego wywołanego podaniem jonów żelaza i askorbinianu.

Otrzymane wyniki wskazują na wzrost aktywności nNOS w mózgu starczym przy braku indukcji iNOS. Aktywność eNOS ulega obniżeniu, co w świetle danych literaturowych może mieć istotne znaczenie w zaburzeniach procesów

poznawczych i w zmianach regulacji krążenia w starczym mózgu. Badania wskazują, że NO nie wpływa na zależną od wolnych rodników peroksydację lipidów w mózгах dojrzałych ani starczych. Wzrost translokacji p65 do frakcji jądrowej w starczym hipokampie nie koreluje w prosty sposób ze zmianami uwalniania NO, ale świadczyć może o wzroście stresu oksydacyjnego, o czym świadczy aktywacja PARP-1. Stwierdzono wzrost aktywności podstawowej PARP-1 bez zmian w poziomie białka enzymu w mózгах starczych w porównaniu z dojrzałymi, statystycznie znamienne w hipokampie i korze mózgu, spowodowany najprawdopodobniej większym wolnorodnikowym uszkodzeniem DNA w mózгах starczych. Wyniki badań *in vitro* wskazują, że stres oksydacyjny powoduje wzrost aktywności PARP-1 w hipokampie dojrzałym, natomiast pozostaje bez wpływu na podwyższoną już aktywność w mózgu starczym. Brak odpowiedzi enzymu może do pewnego momentu chronić starczy hipokamp przed nadmierną aktywacją PARP-1, jednak równocześnie może ograniczać zdolność do naprawy DNA w warunkach zwiększonego i przedłużającego się stresu.

LITERATURA.

Adamczyk A, Jesko H, Strosznajder RP [2005] Alzheimer's disease related peptides affected cholinergic receptor mediated poly(ADP-ribose) polymerase activity in the hippocampus. *Folia Neuropathol* 43: 139-142.

Adams MM, Shah RA, Janssen WG, Morrison JH [2001] Different modes of hippocampal plasticity in response to estrogen in young and aged female rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 8071–8076

Albert MS [1996] Cognitive and neurobiologic markers of early Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13547–13551

AmesBN, Gold LS, Willett WC [1995] The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 5258–5265

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM [1995] Mitochondrial decay in aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1271, 165-170.

Anderson B, Rutledge V [1996] Age and hemisphere effects on dendritic structure. *Brain* 119, 1983–1990

Arancio O, Antonova I, Gambaryan S, Lohmann SM, Wood JS, Lawrence DS, Hawkins RD [2001] Presynaptic role of cGMP-dependent protein kinase during long-lasting Potentiation. *J. Neurosci.* 21, 143-149.

Ariumi Y, Masutani M, Copeland TD, Mimori T, Sugimura T, Shimotohno K, Ueda K, Hatanaka M, Noda M [1999] Suppression of the poly(ADP-ribose)

polymerase activity by DNA- dependent protein kinase in vitro. *Oncogene* 18: 4616-25

Arnsten AFT [1999] Age-related cognitive deficits and neurotransmitters – the role of catecholamine mechanisms in prefrontal cortical cognitive decline. W: *Cerebral Cortex*, Vol. 14, Neurodegenerative and Age-Related Changes in Structure and Function of Cerebral Cortex: Peters A, Morrison JH (red.), 89–110, Elsevier

Asakawa T, Matsushita S [1980] Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids* 15: 137-140.

Ascher P, Johnson JW [1994] The NMDA receptor, its channel, and its modulation by glycine. W: *The NMDA Receptor*: Collingridge GL, Watkins JC, Oxford University Press, Oxford, UK 177-205.

Ashok BT, Ahmad J, Ali R [1998] Immunochemical detection of oxidative DNA damage in cancer and aging using anti-reactive oxygen species modified DNA monoclonal antibody. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 30: 1367-1377.

Assreuy J, Cunha FQ, Liew FY, Moncada S [1993] Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 108: 833-837.

Attwell D, Barbour B, Szatkowski M [1993] Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* 11: 401–407.

Augustin I, Korte S, Rickmann M, Kretschmar HA, Südhof TC, Herms JW, Brose N [2001] The cerebellum-specific Munc13 isoform Munc13-3 regulates

cerebellar synaptic transmission and motor learning in mice. *J. Neurosci.* 21: 10-17.

Aulak KS, Koeck T, Crabb JW, Stuehr DJ [2004] Dynamics of protein nitration in cells and mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286: H30–H38

Bai L, Hof PR, Standaert DG, Xing Y, Nelson SE, Young AB, Magnusson KR [2004] Changes in the expression of the NR2B subunit during aging in macaque monkeys. *Neurobiol. Aging* 25: 201–208

Banay-Schwartz M, Lajtha A, Palkovits M, [1989] Changes with aging in the levels of amino acids in rat CNS structural elements. 1. Glutamate and related amino acids. *Neurochem. Res.* 14: 555–562.

Barnes CA, Rao G, Shen J [1997] Age-related decrease in the N-methyl-D-aspartateR-mediated excitatory postsynaptic potential in hippocampal region CA1. *Neurobiol Aging* 18, 445-452.

Bashir Z, Alford S, Davies S, Randall A, Collingridge G [1991] Long-term potentiation of NMDA receptor-mediated synaptic transmission in the hippocampus. *Nature* 349: 156-158.

Bashir ZI., Berretta N, Bortolotto ZA, Clark K, Davies CH, Frenguelli BG, Harvey J, Potier B, Collingridge GL [1994] NMDA receptors and long-term potentiation in the hippocampus. W: *The NMDA Receptor*: Collingridge GL, Watkins JC (red.), Oxford University Press, Oxford, UK 294-312.

Baskys A, Reynolds JN, Carlen PL [1990] NMDA depolarizations and long-term potentiation are reduced in the aged rat neocortex. *Brain Res.* 530: 142–146.

Bauer PI, Farkas G, Buday L, Mikala G, Meszaros G, Kun E, Farago A [1992] Inhibition of DNA binding by the phosphorylation of poly ADP-ribose polymerase protein catalysed by protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187:730-736.

Beckman KB, Ames BN [1997] Oxidative Decay of DNA. *J. Biol. Chem.* 272: 19633-19636.

Beckman KB, Ames BN [1998] The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78: 547-581.

Behrends S, Harteneck C, Schultz G, Koesling D [1995] A variant of the alpha2 subunit of soluble guanylyl cyclase contains an insert homologous to a region within adenylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* 270: 21109-21113

Berr C, Balansard B, Arnaud J, Roussel AM, Alperovitch A [2000] Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: the EVA study. *J. Am. Geriatr. Soc.* 48: 1285–1291.

Bizec JC, Klethi P, Mandel P [1989] Regulation of Protein adenosine diphosphate ribosylation in bovine lens during aging. *Ophtalmic Res.* 21: 175-183.

Block G, Dietrich M, Norkus EP, Packer L [2003] Oxidative stress in human populations. W: *Critical Reviews of Oxidative Stress and Aging: Advances in Basic Science, Diagnostics and Intervention*: Cutler RG, Rodriguez H (red.), World Scientific Publishing, Singapore, 870–880.

Blum-Degen D, Heinemann T, Lan J, Pedersen V, Leblhuber F, Paulus W, Riederer P, Gerlach M [1999] Characterization and regional distribution of nitric oxide synthase in the human brain during normal ageing. *Brain Res.* 834: 128-135.

Bohr, VA, Anson RM [1995] DNA damage, mutation and fine structure DNA repair in aging. *Mutat. Res.* 338: 25–34.

Borras C, Gambini J, Gomez-Cabrera MC, Sastre J, Pallardo FV, Mann GE, Vina J [2005] 17beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFkappaB cascade. *Aging Cell.* 4(3): 113-118.

Boveris A, Alvarez S, Navarro A [2002] The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 1186–1193

Bracha V, Zhao L, Irwin KB, Bloedel JR [2000] The human cerebellum and associative learning: dissociation between the acquisition, retention and extinction of conditioned eyeblinks. *Brain Res.* 860: 87-94.

Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR., Snyder SH [1991] Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351: 714-718

Bredt DS, Ferris CD, Snyder SH [1992] Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J. Biol. Chem.* 267: 10976-10981.

Bringold U, Ghafourifar P, Richter C [2000] Peroxynitrite formed by mitochondrial NO synthase promotes mitochondrial Ca²⁺ release. *Free Radic. Biol. Med.* 29: 343–348

Brune B, Lapetina EG [1991] Phosphorylation of nitric oxide synthase by protein kinase A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181: 921-926.

Burkart V, Wang ZQ, Radons J, Heller B, Herceg Z, Stingl L, Wagner EF, Kolb H [1999] Mice lacking the poly(ADP-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozocin. *Nat. Med.* 5: 314-319.

Cadenas E, Poderoso JJ, Antunes F, Boveris A [2001] Analysis of the Pathways of Nitric Oxide Utilization in Mitochondria. *Free Radic. Res.* 33, 747–756

Calhoun ME, Kurth D, Phinney AL, Long JM, Hengemihle J, Mouton PR, Ingram DK, Jucker M [1998] Hippocampal neuron and synaptophysin-positive bouton number in aging C57BL/6 mice. *Neurobiol. Aging* 19: 599-606.

Cand F, Verdetti J [1989] Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats. *Free Radic. Biol. Med.* 7: 59–63.

Castorina M, Ambrosini AM, Pacifici L, Ramacci MT Angelucci L [1994] Age-dependent loss of NMDA receptors in hippocampus, striatum, and frontal cortex of the rat: Prevention by acetyl-L-carnitine. *Neurochem. Res.* 19: 795-798.

Cepeda C, Li Z, Levine MS [1996] Aging reduces neostriatal responsiveness to N-methyl-D-aspartate and dopamine: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience* 73: 733–750.

Cha CI, Uhm MR, Shin DH, Chung YH, Baik SH [1998] Immunocytochemical study on the distribution of NOS-immunoreactive neurons in the cerebral cortex of aged rats. *Neuroreport* 9: 2171-2174.

Cha CI, Sohn SG, Chung YH, Shin C, Baik SH [2000]. Region-specific changes of NOS-IR cells in the basal ganglia of the aged rat. *Brain Research* 854: 239-244.

Chalimoniuk M, Strosznajder J [1998a] Aging modulates nitric oxide synthesis and cGMP levels in hippocampus and cerebellum. Effects of amyloid β peptide. *Mol. Chem. Neuropathol.* 35: 77-95.

Chalimoniuk M, Strosznajder J [1998b] NMDA receptor-dependent nitric oxide and cGMP synthesis in brain hemispheres and cerebellum during reperfusion after transient forebrain ischemia in gerbils: effect of 7-Nitroindazole. *J. Neurosci. Res.* 54: 681-690.

Chance B, Sies H, Boveris A. [1979] Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527-605.

Chen JJ, YU BP [1994] Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. *Free Radic. Biol. Med.* 17: 411–418.

Cherubini A, Zuliani G, Costantini F, Pierdomenico SD, Volpato S, Mezzetti A, Mecocci P, Pezzuto S, Bregnocchi M, Fellin R, Senin U [2001] High vitamin E plasma levels and low low density lipoprotein oxidation are associated with the absence of atherosclerosis in octogenarians. *J. Am. Geriatr. Soc.* 49: 651–654.

Chio KS, Tappel AL [1969] Synthesis and characterization of the fluorescent products derived from malonaldehyde and amino acids. *Biochemistry* 8: 2821–2826.

Ciani E, Guidi S, Bartesaghi R, Contestabile A [2002] Nitric oxide regulates cGMP-dependent cAMP-responsive element binding protein phosphorylation and Bcl-2 expression in cerebellar neurons: implication for a survival role of nitric oxide. *J. Neurochem.* 82: 1282-1289.

Cimino M, Marini P, Cattabeni F, Meldolesi J [1993] [3H]-CGP 39653 mapping of glutamatergic N-methyl-D-aspartate receptors in the brain of aged rats. *Neurosci. Res. Comm.* 12: 31–39.

Clayton DA, Grosshans DR, Browning MD [2002] Aging and surface expression of hippocampal NMDA receptors. *J. Biol. Chem.* 277: 14367–14369.

Clementi E, Vecchio I, Sciorati C, Nistico G [1995] Nitric oxide modulation of agonist-evoked intracellular Ca²⁺ release in neurosecretory PC-12 cells: inhibition of phospholipase C activity via cyclic GMP-dependent protein kinase I. *Mol. Pharmacol.* 47: 517-524.

Cobo M, Exposito I, Mora F [1993] Aging, prefrontal cortex, and amino acid neurotransmitters: differential effects produced by electrical stimulation. *Neurobiol. Aging* 14: 187–190.

Cohen SA, Muller WE [1992] Age-related alterations of NMDA-receptor properties in the mouse forebrain: partial restoration by chronic phosphatidylserine treatment. *Brain Res.* 584: 174–180.

Coleman PD, Flood DG [1987] Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 8: 521–545.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J [2003] Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 17: 1195-1214.

Cotman CW, Monaghan DT, Ottersen OP, Storm-Mathisen J [1987] Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Trends Neurosci.* 10: 273–280.

Culmsee C, Mattson MP [2005] p53 in neuronal apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331: 761-777.

Cutler RG [1991] Antioxidants and aging. *Am. Clin. Nutr.* 53: 373S–379S.

D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG [1999] Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.* 342: 249-268.

Davies MJ [2005] The oxidative environment and protein damage. *Biochim. Biophys. Acta* 1703: 93-109.

Davis S, Markowska AL, Wenk GL, Barnes CA [1993] Acetyl-L-carnitine: Behavioral, electrophysiological, and neurochemical effects. *Neurobiol Aging* 14: 107-115.

Dawson R Jr, Wallace DR, Meldrum MJ [1989] Endogenous glutamate release from frontal cortex of adult and aged rats. *Neurobiol. Aging* 10: 665–668.

Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. [1992] A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann. Neurol.* 32: 297-311.

Dawson VL, Dawson TM, Uhl GR, Snyder SH [1993] Mechanisms of nitric-oxide mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J. Neurosci.* 13: 2651–2661.

Dawson VL, Kizushi VM, Huang PL, Snyder SH, Dawson TM [1996] Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *J. Neurosci.* 16: 2479–2487.

Dedkova EN, Ji X, Lipsius SL, Blatter LA [2004] Mitochondrial calcium uptake stimulates nitric oxide production in mitochondria of bovine vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286: C406–C415

de Murcia G, Schreiber V, Molinete M, Saulier B, Poch O, Masson M, Niedergang C, de Murcia JM [1994] Structure and function of poly(ADP-ribose) Polymerase. *Mol. Cell. Biochem.* 138: 15-24.

Dennis J, Bennett JP Jr. [2003] Interactions among nitric oxide and Bcl-family proteins after MPPC exposure of SH-SY5Y neural cells I: MPPC increases mitochondrial NO and Bax protein. *J. Neurosci. Res.* 72: 76–88

Dinerman JL, Steiner JP, Dawson TM, Dawson V, Snyder SH [1994] Cyclic nucleotide dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase inhibits catalytic activity. *Neuropharmacology* 33(11): 1245-1251.

Doreulee N, Sergeeva OA, Yanovsky Y, Chepkova AN, Selbach O, Gödecke A, Schrader J, Haas HL [2003] Cortico-striatal synaptic plasticity in endothelial nitric oxide synthase deficient mice. *Brain Res.* 964: 159-163.

Duan H, Wearne SL, Rocher AB, Macedo A, Morrison JH, Hof PR [2003] Age-related dendritic and spine changes in corticocortically projecting neurons in macaque monkeys. *Cereb. Cortex* 13: 950-961.

Edris W, Burgett B, Stine OC, Filburn CR [1994] Detection and quantitation by competitive PCR of an age-associated increase in a 4.8-kb deletion in rat mitochondrial DNA. *Mutat. Res.* 316: 69-78

Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C [2002] Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 277: 38079–38086

Eliasson MJL, Sampei K, Mandir AS, Hurn PD, Traystman RJ, Bao J, Pieper A, Wang ZQ, Dawson TM, Snyder SH, Dawson VL [1997] Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat. Med.* 3: 1089-1095

Elibol B, Söylemezoglu F, Unal I, Fujii M, Hirt L, Huang PL, Moskowitz MA, Dalkara T [2001] Nitric oxide is involved in ischemia-induced apoptosis in brain: a study in neuronal nitric oxide synthase null mice. *Neuroscience* 105: 79-86.

Endres M, Wang Z-Q, Namura S, Waeber C, Moskowitz MA [1997] Ischemic injury is mediated by the activation of Poly(ADP-ribose)polymerase. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17: 1143–1151.

Epe B [1996] DNA damage profiles induced by oxidizing agents. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 127: 223–249.

Escott KJ, Beech JS, Haga KK, Williams SCR, Meldrum BS, Bath PMW [1998] Cerebroprotective effect of the nitric oxide synthase inhibitors, 1-(2-trifluoromethylphenyl)imidazole and 7-nitro indazole after transient focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18: 281–287.

Esiri MM, Hyman BT, Beyreuther K, Masters CL [1997] Ageing and Dementia. W: Greenfield's Neuropathology: Graham D, Lantos PL (red.), Arnold, London, 153–233.

Estevez AG, Spear N, Manuel SM [1998] Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation. *J. Neurosci.* 18: 923–931.

Fagg GE, Foster AC [1983] Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience* 9: 701–719.

Feil R, Hartmann J, Luo C, Wolfsgruber W, Schilling K, Feil S, Barski JJ, Meyer M, Konnerth A, De Zeeuw CI, Hofmann F [2003] Impairment of LTD and cerebellar learning by Purkinje cell-specific ablation of cGMP-dependent protein kinase I. *J. Cell Biol.* 163: 295–302.

Flood DG, Guarnaccia M, Coleman PD [1987a] Dendritic extent in human CA2-3 hippocampal pyramidal neurons in normal aging and senile dementia. *Brain Res.* 409: 88–96.

Flood DG, Buell SJ, Horwitz GJ, Coleman PD [1987b] Dendritic extent in human dentate gyrus granule cells in normal aging and senile dementia. *Brain Res.* 402: 205–216.

Fonnum F [1993] Regulation of the synthesis of the transmitter glutamate pool. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 60: 47–57.

Fornieles F, Peinado JM, Mora F [1986] Endogenous levels of amino acid neurotransmitters in different regions of frontal and temporal cortex of the rat during the normal process of aging. *Neurosci. Lett. Suppl.* 26: 150.

Foster TC, Sharrow KM, Masse JR, Norris CM, Kumar A [2001] Calcineurin links Ca²⁺ dysregulation with brain aging. *J. Neurosci.* 21: 4066-4073.

Foster TC, Kumar A [2002] Calcium dysregulation in the aging brain. *Neuroscientist* 8: 297–301

Fukui K, Onodera K, Shinkai T, Suzuki S, Urano S [2001] Impairment of learning and memory in rats caused by oxidative stress and aging, and changes in antioxidative defense systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 928:168-75.

Fulton D, Gratton J-P, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC [1999] Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399: 597-601.

Gallagher M, Rapp PR [1997] The use of animal models to study the effects of aging on cognition. *Annu. Rev. Psychol.* 48: 339–370

Galande S, Kohwi-Shigematsu T [2000] Caught in the act: binding of Ku and PARP to MARs reveals novel aspects of their functional interaction. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 10: 63-72.

Gao S, Chen J, Brodsky SV, Huang H, Adler S, Lee JH, Dhadwal N, Cohen-Gould L, Gross SS, Goligorsky MS [2004] Docking of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) to the mitochondrial outer membrane: a pentabasic amino acid sequence in the autoinhibitory domain of eNOS targets a proteinase K-cleavable peptide on the cytoplasmic face of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279: 15968–15974

Garry MG, Richardson JD, Hargreaves KM [1994] Sodium nitroprusside evokes the release of immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P from dorsal horn slices via nitric oxide-dependent and nitric oxide-independent mechanisms. *J. Neurosci.* 14: 4329-4337.

Gazzaley AH, Siegel SJ, Kordower JH, Mufson EJ, Morrison JH [1996] Circuit-specific alterations of Nmethyl-D-aspartate receptor subunit 1 in the dentate gyrus of aged monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 3121-3125.

Gegelashvili G, Schousboe A [1998] Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Res. Bull.* 45: 233–238.

Ghafourifar P, Richter C [1997] Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett.* 418: 291–296

Ghafourifar P, Richter, C [1999] Mitochondrial nitric oxide synthase regulates mitochondrial matrix pH. *Biol. Chem.* 380: 1025–1028

Ghafourifar P, Schenk U, Klein SD, Richter C [1999] Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. *J. Biol. Chem.* 274: 31185–31188

Ghafourifar P, Bringold U, Klein SD, Richter C [2001] Mitochondrial nitric oxide synthase, oxidative stress and apoptosis. *Biol. Signals Recept.* 10, 57–65

Ghafourifar P, Cadenas E [2005] Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol. Sci.* 26: 190-195

Gilad G.M, Gilad VH, Tizabi Y [1990] Aging and stress-induced changes in choline and glutamate uptake in hippocampus and septum of two rat strains differing in longevity and reactivity to stressors. *Int. J. Dev. Neurosci.* 8: 709–713.

Giulivi C [1998] Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism. *Biochem. J.* 332: 673–679

Gomez-Lazaro M, Fernandez-Gomez FJ, Jordan J [2004] p53: twenty five years understanding the mechanism of genome protection. *J. Physiol. Biochem.* 60: 287-307.

Gonzales RA, Brown LM, Jones TW, Trent RD, Westbrook S, Leslie SW [1991] N-methyl-Daspartate mediated responses decrease with age in Fischer 344 rat brain. *Neurobiol. Aging* 12: 219–225.

Groves JT [1999] Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3: 226–235

Grube K, Burkle A. [1992] Poly(ADP-ribose) polymerase activity in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-specific life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 11759-11763.

Guevara-Guzman R, Emson PC, Kendrick KM [1994] Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. *J. Neurochem.* 62: 807-810.

Ha HC, Snyder SH [1999] Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 13978-13982

Ha HC, Snyder SH [2000] Poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the nervous system. *Neurobiol. Dis.* 7: 225-239.

Haby C, Lisovoski F, Aunis D, Zwiller J [1994] Stimulation of the cyclic GMP pathway by NO induces expression of the immediate early genes c-fos and junB in PC12 cells. *J. Neurochem.* 62: 496-501.

Hansford RG, Hogue BA, Mildaziene V [1997] Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J. Bioenerg. Biomembr.* 29: 89-95.

Harman D [1956] Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol. Biol. Sci.* 11: 298-300.

Harris EW, Ganong A, Cotman CW [1984] Long-term potentiation in the hippocampus involves activation in N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res.* 323: 132-137.

Harteneck C, Wedel B, Koesling D, Malkewitz J, Bohme E, Schultz G [1991] Molecular cloning and expression of a new α -subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the α -subunits of the enzyme. *FEBS Lett.* 292: 217-222.

Harukuni I, Traystman RJ, Kirsch JR [1999] Effect of AR-R 17477, a potent neuronal nitric oxide synthase inhibitor, on infarction volume resulting from permanent focal ischemia in rats. *Crit. Care Med.* 27: 2508-2511.

Haskó G, Mabley JG, Németh ZH, Pacher P, Deitch EA, Szabó C [2002] Poly(ADP-ribose) polymerase is a regulator of chemokine production: relevance for the pathogenesis of shock and inflammation. *Mol. Med.* 8: 283-289.

Hassa PO, Covic M, Hasan S, Imhof R, Hottiger MO [2001] The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF-kappa B coactivator function. *J. Biol. Chem.* 276: 45588-45597.

Haul S, Gödecke A, Schrader J, Haas HL, Luhmann HJ [1999] Impairment of neocortical long-term potentiation in mice deficient of endothelial nitric oxide synthase. *J. Neurophysiol.* 81: 494-497.

Helenius M, Hanninen M, Lehtinen SK, Salminen A [1996] Aging-induced up-regulation of nuclear binding activities of oxidative stress responsive NF- κ B transcription factor in mouse cardiac muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28: 487-498.

Heneka MT, Wiesinger H, Dumitrescu-Ozimek L, Riederer P, Feinstein DL, Klockgether T [2001] Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60: 906-916.

Herceg Z, Wang Z-Q [1999] Failure of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Cleavage by Caspases Leads to Induction of Necrosis and Enhanced Apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 19: 5124-5133

Himeda T, Mizuno K, Kato H, Araki T [2005] Effects of age on immunohistochemical changes in the mouse hippocampus. *Mech. Ageing Dev.* 126: 673-677.

Hobbs AJ [1997] Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol. Sci.* 18: 484-491.

Hof PR, Duan H, Page TL, Einstein M, Wicinski B, He Y, Erwin JM, Morrison JH [2002] Age-related changes in GluR2 and NMDAR1 glutamate receptor subunit protein immunoreactivity in corticocortically projecting neurons in macaque and patas monkeys. *Brain Res.* 928: 175–186

Hof PR, Morrison JH [2004] The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits. *Trends Neurosci.* 27: 607-613.

Hofmann F [2005] The Biology of Cyclic GMP-dependent Protein Kinases. *J. Biol. Chem.* 280: 1-4.

Holmqvist B, Ekstrom P [1997] Subcellular localization of neuronal nitric oxide synthase in the brain of a teleost; an immunoelectron and confocal microscopical study. *Brain Res.* 745: 67–82

Homburg S, Visocek L, Moran N, Dantzer F, Priel E, Asculai E, Schwartz D, Rotter V, Dekel N, Cohen-Armon M [2000] A fast signal-induced activation of Poly(ADP-ribose) polymerase: A novel downstream target of phospholipase C. *J. Cell. Biol.* 150: 293-307.

Hu J, El-Fakahany EE [1996]: Intricate regulation of nitric oxide synthase in neurons. *Cell Signal*. 8: 185-189.

Hu J, el-Fakahany EE [1995] Anomalous increase in nitric oxide synthase activity by certain nitric oxide-generating compounds in intact neuronal cells. *J. Neurochem*. 65: 117-124.

Iadecola C, Zhang FY, Casey R, Nagamaya M, Rose ME [1997] Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J. Neurosci*. 17: 9157–9164.

Inanami O, Watanabe Y, Syuto B, Nakano M, Tsuji M, Kuwabara M [1998] Oral administration of β -catechin protects against ischemia-reperfusion-induced neuronal death in the gerbil. *Free Radical Res*. 29: 359–365.

Ivory K, Martin R, Hughes DA. [2004] Significant presence of terminally differentiated T cells and altered NF-kappaB and I-kappaBalpha interactions in healthy ageing. *Exp Gerontol*. 39:567-576.

Jacobs B, Driscoll L, Schall M [1997] Life-span dendritic and spine changes in areas 10 and 18 of human cortex: a quantitative Golgi study. *J. Comp. Neurol*. 386:661-680.

Jernigan TL, Archibald SL, Fennema-Notestine C, Gamst AC, Stout JC, Bonner J, Hesselink JR [2001] Effects of age on tissues and regions of the cerebrum and cerebellum. *Neurobiol. Aging* 22: 581–594.

Jesko H, Chalimoniuk M, Strosznajder JB [2003] Activation of constitutive Nitric Oxide Synthase(s) and absence of inducible isoform in aged rat brain. *Neurochem. Int.* 42: 315-322.

Johnson JW, Ascher P [1987] Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurones. *Nature* 325: 529-533.

Junqueira VB, Barros SB, Chan SS, Rodrigues L, Giavarotti L, Abud RL, Deucher GP [2004] Aging and oxidative stress. *Mol. Aspects Med.* 25: 5-16

Kaltschmidt B, Linker RA, Deng J, Kaltschmidt C [2002] Cyclooxygenase-2 is a neuronal target gene of NF-kappaB. *BMC Mol. Biol.* 3: 16.

Kameoka M, Ota K, Tetsuka T, Tanaka Y, Itaya A, Okamoto T, Yoshihara K [2000] Evidence for regulation of NF-kappaB by poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem J.* 346: 641-649.

Kameshita I, Matsuda Z, Tanigushi T, Shizuta Y [1984] Poly(ADP-ribose) synthetase, Separation and identification of three proteolytic fragments as the substrate-binding domain, the DNA binding domain, and the automodification domain. *J. Biol. Chem.* 259: 4770-4776.

Kanai AJ, Pearce LL, Clemens PR, Birder LA, VanBibber MM, Choi SY, de Groat WC, Peterson J [2001] Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 14126–14131

Kanai A, Epperly M, Pearce L, Birder L, Zeidel M, Meyers S, Greenberger J, de Groat W, Apodaca G, Peterson J [2004] Differing roles of mitochondrial nitric oxide synthase in cardiomyocytes and urothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286: H13–H21

Karant S, Lyson K, McCann SM [1993] Role of nitric oxide in interleukin 2-induced corticotropin-releasing factor release from incubated hypothalami. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 3383-3385.

Kasapoglu M, Ozben T. [2001] Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. *Exp. Gerontol.* 36: 209-220.

Keyer K, Gort AS, Imlay JA [1995] Superoxide and the production of oxidative DNA damage. *J. Bacteriol.* 177: 6782–6790.

Kino K, Sugiyama H [2005] UVR-induced G-C to C-G transversions from oxidative DNA damage. *Mutat. Res.* 571: 33-42.

Kirkwood TBL [1977] Evolution of ageing. *Nature* 270: 301-304 [cyt. za Kirkwood i Holiday, 1979]

Kirkwood TBL, Holiday R [1979] The evolution of ageing and longevity. *Proc. R. Soc. Lond. B* 205: 531-546.

Kito S, Miyoshi R, Nomoto T [1990] Influence of age on NMDA receptor complex in rat brain studied in in vitro autoradiography. *J. Histochem. Cytochem.* 38: 1725-1731.

Kleppisch T, Wolfsgruber W, Feil S, Allmann R, Wotjak CT, Goebbels S, Nave KA, Hofmann F, Feil R [2003] Hippocampal cGMP-dependent protein kinase I supports an age- and protein synthesis-dependent component of long-term potentiation but is not essential for spatial reference and contextual memory. *J. Neurosci.* 23, 6005-6012

Knott C, Stern G, Wilkin GP [2000] Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol. Cell. Neurosci.* 16: 724-739.

Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S [1989] Formation of Nitric Oxide from L-Arginine in the Central Nervous System: A Transduction Mechanism for Stimulation of the Soluble Guanylate Cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 5159-5162.

Kobzik L, Stringer B, Balligand JL, Reid MB, Stamler JS [1995] Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211: 375–381

Kosaka H, Wishnok JS, Miwa M, Leaf CD, Tannenbaum SR [1989] Nitrosation by stimulated macrophages. Inhibitors, enhancers and substrates. *Carcinogenesis* 10: 563-566.

Kristofikova Z, Klaschka J, Tejkalova H. [1995] Effect of aging on lipid peroxide levels induced by L-glutamic acid and estimated by means of a thiobarbituric acid test in rat brain tissue. *Exp. Gerontol.* 30: 645-657.

Krupitza G, Cerutti P [1989a] Poly(ADP-ribosylation) of histones in intact human keratinocytes *Biochemistry* 28: 4054-4060

Krupitza G, Cerutti P [1989b] ADP-ribosylation of ADPR-transferase and topoisomerase I in intact mouse epidermal cells JB6. *Biochemistry* 28: 2034-2040.

Lacza Z, Puskar M, Figueroa JP, Zhang J, Rajapakse N, Busija DW [2001] Mitochondrial nitric oxide synthase is constitutively active and is functionally upregulated in hypoxia. *Free Radic. Biol. Med.* 31: 1609–1615

Lacza Z, Snipes JA, Zhang J, Horvath EM, Figueroa JP, Szabo C, Busija DW [2003] Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. *Free Radic. Biol. Med.* 35: 1217–1228

La Porta CA, Comolli R [1999] Age-dependent modulation of PKC isoforms and NOS activity and expression in rat cortex, striatum, and hippocampus. *Exp. Gerontol.* 34: 863-874.

Law A, O'Donnell J, Gauthier S, Quirion R [2002] Neuronal and inducible nitric oxide synthase expressions and activities in the hippocampi and cortices of young adult, aged cognitively unimpaired, and impaired Long-Evans rats. *Neuroscience* 112: 267-275.

Lee SC, Zhao ML, Hirano A, Dickson DW [1999] Inducible nitric oxide synthase immunoreactivity in the Alzheimer disease hippocampus: association with Hirano bodies, neurofibrillary tangles, and senile plaques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58: 1163-1169.

Li B, Navarro S, Kasahara N, Comai L [2004] Identification and biochemical characterization of a Werner's syndrome protein complex with Ku70/80 and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J. Biol. Chem.* 279: 13659-13667.

Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, Przedborski S [1999] Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat. Med.* 5: 1403-1409.

Liochev SI, Fridovich I [1994] The role of O₂⁻ in the production of HO₂: in vitro and in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 16: 29–33.

Lippa CF, Hamos JE, Pulaski Salo D, Degennaro LJ, Drachman DA [1992] Alzheimer's disease and aging: effects on perforant pathway perikarya and synapses. *Neurobiol. Aging* 13: 405–411.

Lipton SA, Choi Y-B, Pan ZH, Lei SZ, Chen H-SV, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS [1993] A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364: 626-632.

Lipton P. [1999] Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *Physiol. Rev.* 79: 1431-1568

Liu Y, Ruoho AE, Rao VD and Hurley JH [1997] Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: Modeling and mutational analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 13414-13419.

Liu P, Smith PF, Appleton I, Darlington CL, Bilkey DK [2003] Regional variations and age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the sub-regions of the hippocampus. *Neuroscience* 119: 679-687.

Liu P, Smith PF, Appleton I, Darlington CL, Bilkey DK [2004] Age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the rat prefrontal cortex. *Neurobiol. Aging* 25: 547-552

Lo EH, Bosque-Hamilton P, Meng W [1998] Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase. Reduction of ischemic injury and attenuation of N-methyl-D-aspartate-induced neurotransmitter depletion. *Stroke* 29: 830–836.

Lores-Arnaiz S, D'Amico G, Czerniczyniec A, Bustamante J, Boveris A [2004] Brain mitochondrial nitric oxide synthase: in vitro and in vivo inhibition by chlorpromazine. *Arch. Biochem. Biophys.* 430: 170-177.

Love S, Barber R, Wilcock GK [1999] Increased poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease. *Brain* 122: 247-253.

Lu R, Nash HM, Verdine GL [1997] A mammalian DNA repair enzyme that excises oxidatively damaged guanines maps to a locus frequently lost in lung cancer. *Curr. Biol.* 7: 397–407.

Lu CY, Lee HC, Fahn HJ, Wei YH [1999] Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin. *Mutat. Res.* 423: 11-21.

Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP., Waldman SA [2000] Guanylyl Cyclases and Signaling by Cyclic GMP *Pharmacol. Rev.* 52: 375-413.

Magnusson KR, Cotman CW [1993] Age-related changes in excitatory amino acid receptors in two mouse strains. *Neurobiol. Aging* 14: 197–206.

Magnusson KR [1998a] Aging of glutamate receptors: correlations between binding and spatial memory performance in mice. *Mech. Ageing Dev.* 104: 227–248.

Magnusson KR [1998b] The aging of the NMDA receptor complex. *Front Biosci.* 11: 70-80.

Magnusson KR [2000] Declines in mRNA expression of different subunits may account for differential effects of aging on agonist and antagonist binding to the NMDA receptor. *J. Neurosci.* 20: 1666–1674

Mandir AS, Poitras MF, Berliner AR, Herring WJ, Guastella DB, Feldman A, Poirier GG, Wang ZQ, Dawson TM, Dawson VL [2000] NMDA but not non-NMDA excitotoxicity is mediated by Poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Neurosci.* 20: 8005-8011.

Mandir AS, Simbulan-Rosenthal CM, Poitras MF, Lumpkin JR, Dawson VL, Smulson ME, Dawson TM [2002] A novel in vivo post-translational modification of p53 by PARP-1 in MPTP-induced parkinsonism. *J Neurochem.* 83: 186-192.

Manzoni O, Bockaert J [1993] Nitric oxide synthase activity endogenously modulates NMDA receptors. *J. Neurochem.* 61: 368-370.

Marcondes S, Turko IV, Murad F [2001] Nitration of succinyl-CoA:3-oxoacid CoAtransferase in rats after endotoxin administration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 7146–7151

Marin P, Lafon-Cazal M, Bockaert J [1992] A Nitric Oxide Synthase Activity Selectively Stimulated by NMDA Receptors Depends on Protein Kinase C Activation in Mouse Striatal Neurons. *Eur. J. Neurosci.* 4: 425-432.

Masliah E, Mallory M, Hansen L, DeTeresa R, Terry RD [1993] Quantitative synaptic alterations in the human neocortex during normal aging. *Neurology* 43: 192–197.

Masson M, Niedergang C, Schreiber V, Muller S, Menissier-de Murcia J, de Murcia G [1998] XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 18: 3563-3571.

Masutani M, Suzuki H, Kamada N, Watanabe M, Ueda O, Nozaki T, Jishage K, Watanabe T, Sugimoto T, Nakagama H, Ochiya T, Sugimura T [1999] Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption conferred mice resistant to streptozotocin-induced diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 2301-2304.

Mathiak K, Hertrich I, Grodd W, Ackermann H, [2004] Discrimination of temporal information at the cerebellum: functional magnetic resonance imaging of nonverbal auditory memory. *Neuroimage.* 21: 154-162.

Mattson MP [2005]. NF- κ B in the Survival and Plasticity of Neurons. *Neurochem. Res.* 30: 883–893.

Mayer B, Klatt P, Bohme E, Schmidt K [1992] Regulation of neuronal nitric oxide and cyclic GMP formation by Ca²⁺. *J. Neurochem.* 59: 2024-2029.

McCann, S. M., 1997. The nitric oxide hypothesis of brain aging. *Exp. Gerontol.* 32: 431-440.

McCann SM, Licinio J, Wong ML, Yu WH, Karanth S, Rettorri V [1998] The nitric oxide hypothesis of aging. *Exp. Gerontol.* 33: 813-826.

McCracken E, Valeriani V, Simpson C, Jover T, McCulloch J, Dewar D [2000] The lipid peroxidation by-product 4-hydroxynonenal is toxic to axons and oligodendrocytes. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20: 1529-1536.

Mecocci P; MacGarvey U; Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Wallace DC, Beal, MF [1993] Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann. Neurol.* 34: 609–616.

Mecocci P, Polidori MC, Troiano L, Cherubini A, Cecchetti R, Pini G, Straatman M, Monti D, Stahl W, Sies H, Franceschi C, Senin U [2000] Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 1243–1248.

Medawar PB [1952] *An unresolved problem in biology.* HK Lewis, London [cyt. za *Proc. R. Soc. Lond.* 1979; B205: 531-546].

Messripour M, Weltin D, Rastegar A, Ciesielski L, Kopp P, Chabert M, Mandel P [1994] Age-associated changes of rat brain neuronal and astroglial poly(ADP-ribose) polymerase activity. *J. Neurochem.* 62: 502-506.

Mishra SK, Das BR [1992] (ADP-ribosyl)ation pattern of chromosomal proteins during ageing. *Cell. Mol. Biol.* 38: 457-462.

Mitchell JJ, Anderson KJ [1998] Age-related changes in [3H]MK-801 binding in the Fischer 344 rat brain. *Neurobiol. Aging* 19: 259–265.

Miyoshi R, Kito S, Doudou N, Nomoto T [1990] Age-related changes of strychnine-insensitive glycine receptors in rat brain as studied by in vitro autoradiography. *Synapse* 6: 338–343.

Mollace V, Rodino P, Massoud R, Rotiroti D, Nistico G [1995] Age-Dependent Changes of NO Synthase Activity in the Rat Brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215: 822-827.

Moroni F, Meli E, Peruginelli F, Chiarugi A, Cozzi A, Picca R, Romagnoli P, Pellicciari R, Pellegrini-Giampietro DE [2001] Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors attenuate necrotic but not apoptotic neuronal death in experimental models of cerebral ischemia. *Cell Death Differ.* 8: 921-932.

Morris RGM, Anderson E, Lynch GS, Baudry M [1986] Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319: 774-776.

Morrison JH, Hof PR [1997] Life and death of neurons in the aging brain. *Science* 278: 412–419

Moynagh PN [2005] The NF- κ B pathway. *J. Cell Sci.* 118: 4589-4592.

Muiras ML, Muller M, Schachter F, Burkle A. [1998] Increased poly(ADP-ribose) polymerase activity in lymphoblastoid cell lines from centenarians. *J Mol Med.* 76: 346-354.

M.E. Murphy, H. Sies [1991] Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 10860-10864.

Najerahim A, Francis PT, Bowen DM [1990] Age-related alteration in excitatory amino acid neurotransmission in rat brain. *Neurobiol. Aging* 11: 155–158.

Nakane M, Arai K, Saheki S, Kuno T, Buechler W and Murad F [1990] Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J. Biol. Chem.* 265: 16841-16845.

Nakane M, Mitchell, Forstermann U, Murad F [1991] Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180: 1396-1402.

Nakayama M, Uchimura K, Zhu RL [1998] Cyclooxygenase-2 inhibition prevents delayed death of CA1 hippocampal neurons following global ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10954–10959.

Navarro A, Boveris A. [2004] Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287: R1244-R1249.

Navarro A, Gomez C, Lopez-Cepero JM, Boveris A [2004] Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286: R505-R511.

Nicholls DG [1993] The glutamatergic nerve terminal. *Eur. J. Biochem.* 212: 613–631.

Nicolle MM, Bizon JL, Gallagher M [1996] In vitro autoradiography of ionotropic glutamate receptors in hippocampus and striatum of aged Long-Evans rats: relationship to spatial learning. *Neuroscience* 74: 741–756.

Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ [2003] Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J. Biol. Chem.* 278: 31426-31433.

Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K [2002] Structure and function of dendritic spines. *Annu. Rev. Physiol.* 64: 313–353

Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C [1997] Cyclooxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J. Neurosci.* 17: 2746–2755.

Nogawa S, Forster C, Zhang F, Nagayama M, Ross ME, Iadecola C [1998] Interaction between inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 after cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10966–10971.

Norenberg MD, Martínez-Hernández A [1979] Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* 161: 303–310.

Norris CM, Halpain S, Foster TC [1998] Alterations in the balance of protein kinase/phosphatase activities parallel reduced synaptic strength during aging. *J. Neurophysiol.* 80: 1567–1570.

Oei SL, Herzog H, Hirsch-Kauffmann M, Schneider R, Auer B, Schweiger M [1994] Transcriptional regulation and autoregulation of the human gene for ADP-ribosyltransferase *Mol. Cell. Biochem.* 138: 99-104

Oei SL, Griesenbeck J, Schweiger M, Babich V, Kropotov A, Tomilin N. [1997] Interaction of the transcription factor YY1 with human poly(ADP-ribosyl) transferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240: 108-111.

Oei SL, Griesenbeck J, Schweiger M, Ziegler M [1998]. Regulation of RNA polymerase II-dependent transcription by poly(ADP-ribosyl)ation of transcription factors. *J Biol Chem* 273: 31644-31647.

Okada O [1995] Protein Kinase C Modulates Calcium Sensitivity of Nitric Oxide Synthase in Cerebellar Slices. *J. Neurochem.* 64: 1298-1304.

Oliver FJ, Menissier-de Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de la Rubia G, Stoclet JC, de Murcia G [1999] Resistance to endotoxic

shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J.* 18: 4446-4454.

Ormandy GC, Jope RS [1989] Sodium nitroprusside and guanosine 3',5'-monophosphate (cyclic GMP) inhibit stimulated phosphoinositide hydrolysis in rat cerebral cortical slices. *Neurosci. Lett.* 100: 287-291.

Pakkenberg B, Gundersen HJ [1997] Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. *J. Comp. Neurol.* 384: 312–320.

Palmer AM, Robichaud PJ, Reiter CT [1994] The release and uptake of excitatory amino acids in rat brain: effect of aging and oxidative stress. *Neurobiol. Aging* 15: 103–111.

Panahian N, Yoshida T, Huang PL [1996] Attenuated hippocampal damage after global cerebral ischemia in mice mutant in neuronal nitric oxide synthase. *Neuroscience* 72: 343–354.

Paolisso G, Tagliamonte MR, Rizzo MR, Manzella D, Gambardella A, Varricchio M. [1998] Oxidative stress and advancing age: results in healthy centenarians. *J. Am. Geriatr. Soc.* 46: 833-838.

Pascale A, Noguès X, Marighetto A, Micheau J, Battaini F, Govoni S, Jaffard R [1998] Cytosolic hippocampal PKC and aging: correlation with discrimination performance. *Neuroreport* 9: 725-9.

Peinado JM, Mora F [1986] Glutamic acid as a putative transmitter of the interhemispheric corticocortical connections in the rat. *J. Neurochem.* 47: 15498–16003.

Pero RW, Holmgren K, Persson L [1985] Gamma-Radiation induced ADP-ribosyl transferase activity and mammalian longevity. *Mutat. Res.* 142: 69-73.

Peters A, Rosene DL, Moss MB, Kemper TL, Abraham CR, Tigges J, Albert MS [1996] Neurobiological bases of age-related cognitive decline in the rhesus monkey. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55: 861–874

Peters A, Morrison JH, Rosene DL, Hyman BT. [1998a] Are neurons lost from the primate cerebral cortex during normal aging? *Cereb. Cortex* 8, 295–300

Peters A, Sethares C, Moss MB [1998b] The effects of aging on layer 1 in area 46 of prefrontal cortex in the rhesus monkey. *Cereb. Cortex* 8: 671–684

Peters A, Moss MB, Sethares C [2000] Effects of aging on myelinated nerve fibers in monkey primary visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 419: 364–376

Petersen C, Cotman CW [1989] Strain-dependent decrease in glutamate binding to the N-methyl-D-aspartic acid receptor during aging. *Neurosci. Lett.* 104: 309–313.

Pieper AA, Brat DJ, Krug DK, Watkins CC, Gupta A, Blackshaw S, Verma A, Wang ZQ, Snyder SH [1999] Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 3059-3064.

Piggott MA, Perry EK, Perry RH, Court JA [1992] [3H]MK-801 binding to the NMDA receptor complex, and its modulation in human frontal cortex during development and aging. *Brain Res.* 588: 277–286.

Pleschke JM, Kleczkowska HE, Strohm M, Althaus FR [2000]-Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J. Biol. Chem.* 275: 40974-40980.

Poderoso JJ, Lisdero C, Schopfer F, Riobo N, Carreras MC, Cadenas E, Boveris A [1999] The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol. *J. Biol. Chem.* 274: 37709–37716

Potvin F, Roy RJ, Poirier G, Guerin SL [1993] The US-1 element from the gene encoding rat poly(ADP-ribose) polymerase binds the transcription factor Sp1. *Eur. J. Biochem.* 215: 73-80

Pryor WA, Church DF, Govindan CK, Crank G [1982] Oxidation of thiols by nitric oxide and nitrogen dioxide: synthetic utility and toxicological implications. *J. Org. Chem.* 47: 156-159.

Quesada P, Faraone-Mennella MR, Jones R, Malanga M, Farina B. [1990] ADP-ribosylation of nuclear proteins in rat ventral prostate during ageing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170: 900-907.

Rapp, P.R. et al. [1996] Learning and memory for hierarchical relationships in the monkey: effects of aging. *Behav. Neurosci.* 110, 887–897

Realini CA, Althaus FR [1992] Histone shuttling by poly(ADP-ribosylation). *J. Biol. Chem.* 267: 18858-18865.

Rengasamy A, Johns RA [1993] Regulation of nitric oxide synthase by nitric oxide. *Mol. Pharmacol.* 44: 124-128.

Rettori V, Gimeno M, Lyson K, McCann SM [1992] Nitric oxide mediates norepinephrine-induced prostaglandin E2 release from the hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 11543-11546.

Rickard NS, Gibbs ME, Ng KT [1999] Inhibition of the endothelial isoform of nitric oxide synthase impairs long-term memory formation in the chick. *Learn. Mem.* 6: 458-466.

Riobo NA, Melani M, Sanjuan N, Fiszman ML, Gravielle MC, Carreras MC, Cadenas E, Poderoso JJ [2002] The modulation of mitochondrial nitric oxide synthase activity in rat brain development. *J. Biol. Chem.* 277, 42447–42455

Rodriguez J, Quignard J-F, Fagni L, Lafon-Cazal M, Bockaert J [1994] Blockade of nitric oxide synthesis by tyrosine kinase inhibitors in neurones. *Neuropharmacology* 33: 1267-1274.

Rogers NE, Ignarro LJ [1992] Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide formed from L-arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189: 242-249.

Rosenquist TA, Zharkov DO, Grollman AP [1997] Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 7429–7434.

Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kunczi RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF [1996] Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16: 675–688.

Ruscetti T, Lehnert BE, Halbrook J, Le Trong H, Hoekstra MF, Chen DJ, Peterson SR [1998] Stimulation of the DNA-dependent protein kinase by poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Biol. Chem.* 273: 14461-14467.

Salminen A, Helenius M, Lahtinen T, Korhonen P, Tapiola T, Soininen H, Solovyan V. [1997] Down-regulation of Ku autoantigen, DNA-dependent protein kinase, and poly(ADP-ribose) polymerase during cellular senescence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238: 712-716.

Sanguino E, Roglans N, Rodriguez-Calvo R, Alegret M, Sanchez RM, Vazquez-Carrera M, Laguna JC [2006] Ageing introduces a complex pattern of changes in several rat brain transcription factors depending on gender and anatomical localization. *Exp. Gerontol.* 41: 372-379.

Saransaari P, Oja SS [1995] Age-related changes in the uptake and release of glutamate and aspartate in the mouse brain. *Mech. Ageing Dev.* 81: 61–71.

Savitha S, Tamilselvan J, Anusuyadevi M, Panneerselvam C [2005] Oxidative stress on mitochondrial antioxidant defense system in the aging process: role of DL-alpha-lipoic acid and L-carnitine. *Clin. Chim. Acta* 355: 173-80.

Scheff SW, Price DA, Sparks DL [2001] Quantitative assessment of possible age-related change in synaptic numbers in the human frontal cortex. *Neurobiol. Aging* 22: 355–365.

Schmid G, Wang ZQ, Węsierska-Gądek J [1999] Compensatory expression of p73 in PARP-deficient mouse fibroblasts as response to a reduced level of regularly spliced wild-type p53 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255: 399-405.

Schmidt R, Hayn M, Reinhart B, Roob G, Schmidt H, Schumacher M, Watzinger N, Launer LJ [1998] Plasma antioxidants and cognitive performance in middle-aged and older adults: results of the Austrian stroke prevention study. *J. Am. Geriatr. Soc.* 46: 1407–1410.

Schreiber V, Ame J-C, Dolle P, Schultz I, Rinaldi B, Fraulob V, Menissier-de Murcia J, Murcia G [2002] Poly(ADP-ribose) Polymerase-2 (PARP-2) Is Required for Efficient Base Excision DNA Repair in Association with PARP-1 and XRCC1. *J. Biol. Chem.* 277: 23028-23036.

Schweizer M, Richter C [1994] Nitric oxide potently and reversibly deenergizes mitochondria at low oxygen tension. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204: 169–175

Scovassi AI, Mariani C, Negroni M, Negri C, Bertazzoni U [1993] ADP-ribosylation of nonhistone proteins in HeLa cells: modification of DNA topoisomerase II. *Exp. Cell Res.* 206: 177-181.

Seal RP, Amara SG [1999] Excitatory amino acid transporters: a family in flux. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 431–456.

Serra M, Ghiani CA, Foddi MC, Motzo C, Biggio G [1994] NMDA receptor function is enhanced in the hippocampus of aged rats. *Neurochem. Res.* 19: 483-487.

Shieh WM, Ame JC, Wilson MV, Wang ZQ, Koh DW, Jacobson MK, Jacobson EL [1998] Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *J. Biol. Chem.* 273: 30069-30072.

Sies, H [1985] Oxidative Stress: Introductory Remarks. W: Sies, H. (red.), *Oxidative Stress*. Academic Press, USA, 1–7.

Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Ding R, Bhatia K, Smulson ME [1998] Prolongation of the p53 Response to DNA Strand Breaks in Cells Depleted of PARP by Antisense RNA Expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253: 864-868.

Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE [2003] The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat. Res.* 531: 231-251.

Slupska MM, Baikalov C, Luther WM, Chiang JH, Wei YF, Miller JH [1996] Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the *Escherichia coli*

mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J. Bacteriol.* 178: 3885–3892.

Small SA, Chawla MK, Buonocore M, Rapp PR, Barnes CA [2004] Imaging correlates of brain function in monkeys and rats isolates a hippocampal subregion differentially vulnerable to aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 7181–7186

Smith TD, Adams MM, Gallagher M, Morrison JH, Rapp PR [2000] Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats. *J. Neurosci.* 20: 6587–6593

Smith DE, Rapp PR, McKay HM, Roberts JA, Tuszynski MH [2004] Memory impairment in aged primates is associated with focal death of cortical neurons and atrophy of subcortical neurons. *J. Neurosci.* 24: 4373–4381

Smith AR, Hagen TM [2003] Vascular endothelial dysfunction in aging: loss of Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and partial restoration by (R)-alpha-lipoic acid. *Biochem. Soc. Trans.* 31: 1447-1449.

Stadler J, Billiar TR, Curran RD, Stuehr DJ, Ochoa JB, Simmons RL [1991] Effect of exogenous and endogenous nitric oxide on mitochondrial respiration of rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 260: C910-C916.

Stadtman ER, Oliver CN [1991] Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J. Biol. Chem.* 266: 2005–2008.

Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J [1992] Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258: 1898-1902.

Starke-Reed PE, Oliver CN [1989] Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* 275: 559–567.

Steiner JP, Dawson TM, Fotuhi M, Glatt CE, Snowman AM, Cohen N, Snyder SH [1992] High brain densities of the immunophilin FKBP colocalized with calcineurin. *Nature* 358: 584-587.

Stone JR, Marletta MA [1994] Soluble guanylate cyclase from bovine lung: Activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 33: 5636-5640.

Strolin-Benedetti M, Cini M, Fusi R, Marrari P, Dostert P [1990] The effects of aging on MAO activity and amino acid levels in rat brain. *J. Neural Transm.* 29: 259–268.

Strolin-Benedetti M, Ruso A, Marrari P, Dostert P [1991] Effects of aging on the content in sulfur-containing amino acids in rat brain. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* 86: 191–203.

Strosznajder JB, Jęśko H, Strosznajder RP [2000] Effect of amyloid beta peptide on poly(ADP-ribose) polymerase activity in adult and aged rat hippocampus. *Acta Biochim. Pol.* 47: 847-854.

Strosznajder RP, Gadamski R, Czapski GA, Jesko H, Strosznajder JB [2003] Poly(ADP-ribose) polymerase during reperfusion after transient forebrain ischemia: its role in brain edema and cell death. *J. Mol. Neurosci.* 20: 61-72.

Strosznajder JB, Jęsko H, Zambrzycka A, Eckert A, Chalimoniuk M [2004] Age-related alteration of activity and gene expression of endothelial nitric oxide synthase in different parts of the brain in rats *Neurosci. Lett.* 370: 175–179.

Strosznajder RP, Jesko H, Adamczyk A [2005a] Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a novel nuclear target for cholinergic receptor signaling in the hippocampus. *J. Physiol. Pharmacol.* 56 Suppl 4: 209-213.

Strosznajder RP, Jesko H, Adamczyk A [2005b] Effect of aging and oxidative/genotoxic stress on poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity in rat brain. *Acta Biochim. Pol.* 52: 909-914.

Szabo C [1996] DNA strand breakage and activation of poly-ADP ribosyltransferase: a cytotoxic pathway triggered by peroxynitrite. *Free Radical Biol. Med.* 21: 855–869.

Szabo C, Zingarelli B, O’connor M, Salzman AL [1996] DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity in macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 1753–1758.

Szweda LI, Uchida K, Tsai L, Stadtman ER [1993] Inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal. Selective modification of an active-site lysine. *J. Biol. Chem.* 268: 3342–3347.

Takahashi K, Greenberg JH, Jackson P, Maclin K, Zhang J [1997] Neuroprotective effects of inhibiting poly (ADPribose) synthetase on focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17: 1137–1142.

Tamaru M, Yoneda Y, Ogita K, Shimizu J, Nagata Y [1991] Age-related decreases of the N-methyl-D-aspartate receptor complex in the rat cerebral cortex and hippocampus. *Brain Res.* 542: 83–90.

Terry RD, Katzman R [2001] Life span and synapses: will there be a primary senile dementia? *Neurobiol. Aging* 22: 347–348.

Togashi H, Sasaki M, Frohman E, Taira E, Ratan RR, Dawson TM, Dawson VL [1997] Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kappaB activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 2676-2680.

Toliver-Kinsky T, Papaconstantinou J, Perez-Polo J [1997] Age-associated alterations in hippocampal and basal forebrain nuclear factor kappa B activity. *J. Neurosci. Res.* 48: 580-587.

Trichopoulou A., Lagiou P., Papas A.M [1999] Mediterranean diet: are antioxidants central to its benefits. W: Papas, A.M. (red.): *Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health.* CRC Press, Washington, 107–118.

Tsai YJ, Aoki T, Maruta H, Abe H, Sakagami H, Hatano T, Okuda T, Tanuma S [1992] Mouse mammary tumor virus gene expression is suppressed by

oligomeric ellagitannins, novel inhibitors of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *J. Biol. Chem.* 267: 14436-14442.

Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S [1996] The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87: 1327-1338.

Uchida K, Hanai S, Ishikawa K, Ozawa Y, Uchida M, Sugimura T, Miwa M [1993] Cloning of cDNA encoding *Drosophila* poly(ADP-ribose) polymerase: leucine zipper in the auto-modification domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 3481-3485.

Ueda K., Kawaichi M, Hayaishi O [1982] Poly(ADP-ribose) synthetase; w: Hayaishi O, Ueda K (red.): *ADP-Ribosylation reactions: Biology and medicine*, Academic Press, New York 117-155.

Ueda K, Inagawa J, Kido T, Banasik M, Das BR [1991] Improved assays of Poly(ADP-ribose) metabolizing enzymes (abstract). W: Paul Mandel International Meeting on (ADP-ribosyl)ation Reactions, Quebec, Canada (May 3-June 2) 33c.

Vallebuona F, Raiteri M [1995] Age-related changes in the NMDA receptor/nitric oxide/cGMP pathway in the hippocampus and cerebellum of freely moving rats subjected to transcerebral microdialysis. *Eur. J. Neurosci.* 7: 694-701.

Vatassery GT, Lai JCK, Smith W, Quach HT [1998] Aging is associated with a decrease in synaptosomal glutamate uptake and an increase in the susceptibility of synaptosomal vitamin E to oxidative stress. *Neurochem. Res.* 23:, 121–125.

Vernet D, Bonavera JJ, Swerdloff RS, Gonzalez-Cadavid NF, Wang C [1998] Spontaneous expression of inducible nitric oxide synthase in the hypothalamus and other brain regions of aging rats. *Endocrinology* 139: 3254-3261.

Wallace DR, Dawson R, Jr [1990] Effect of age and monosodium-L-glutamate (MSG) treatment on neurotransmitter content in brain regions from male Fischer-344 rats. *Neurochem. Res.* 5: 889–898.

Wang X, Ohnishi K, Takahashi A, Ohnishi T [1998] Poly(ADP-ribosylation) is required for p53-dependent signal transduction induced by radiation. *Oncogene* 17: 2819-2825.

Wenk G, Walker LC, Price DL, Cork LC [1991] Loss of NMDA, but not GABA-A, binding in the brains of aged rats and monkeys. *Neurobiol. Aging* 12: 93–98.

Werner C, Raivich G, Cowen M, Strekalova T, Sillaber I, Buters JT, Spanagel R, Hofmann F [2004] Importance of NO/cGMP signalling via cGMP-dependent protein kinase II for controlling emotionality and neurobehavioural effects of alcohol. *Eur. J. Neurosci.* 20: 3498-3506.

Węsierska-Gądek J, Wang Z-Q, Schmid G [1999] Reduced stability of regularly spliced but not alternatively spliced p53 protein in PARP-deficient mouse fibroblasts. *Cancer Res.* 59: 28-34.

Wesierska-Gadek J, Schmid G [2000] Overexpression of Poly(ADP-ribose) Polymerase delays the release of rat cells from p53-mediated G1 checkpoint. *J. Cell. Biochem.* 80: 85-103.

Węsierska-Gądek J, Elmar Bohrn E, Herceg Z, Wang Z-Q, Wurzer G [2000] Differential susceptibility of normal and PARP knock-out mouse fibroblasts to proteasome inhibitors. *J. Cell. Biochem.* 78: 681-696.

Wheeler DD, Ondo IG [1986] Time course of the aging of the high affinity L-glutamate transporter in rat cortical synaptosomes. *Exp. Gerontol.* 21: 159–168.

Williams GC [1957] Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. *Evolution* 11: 398-411.

Won JH, Im HT, Kim YH, Yun KJ, Park HJ, Choi JW, Lee KT [2006] Anti-inflammatory effect of buddlejasaponin IV through the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages via the NF-kappaB inactivation. *Br. J. Pharmacol.* 148: 216-25.

Xia Y, Dawson VL Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL [1996] Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6770–6774.

Yamada K, Noda Y, Komori Y, Sugihara H, Hasegawa T, Nabeshima, T [1996] Reduction in the number of NADPH-diaphorase-positive cells in the cerebral cortex and striatum in aged rats. *Neuroscience Research* 24: 393-402.

Yamamoto T, Yuki S, Watanabe T, Mitsuka M, Saito K, Kogure K [1997] Delayed neuronal death prevented by inhibition of increased hydroxyl radical formation in a transient cerebral ischemia. *Brain Res.* 762: 240–242.

Yoshihara K, Tanaka Y, Kamiya T [1983] Ca²⁺, Mg²⁺-dependent endonuclease and ADP-ribosylation. *Princess Takamatsu Symp* 13: 183-193.

Yoshihara K, Itaya A, Tanaka Y, Ohashi Y, Ito K, Teraoka H, Tsukada K, Matsukage A, Kamiya T [1985] Inhibition of DNA polymerase alpha, DNA polymerase beta, terminal deoxynucleotidyl transferase, and DNA ligase II by poly(ADP-ribosylation) reaction in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128: 61-67.

Yu BP [1994] Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74: 139–162.

Yu Z, Zhou D, Bruce-Keller AJ, Kindy MS, Mattson MP [1999] Lack of the p50 subunit of nuclear factor-kappaB increases the vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic injury. *J. Neurosci.* 19: 8856-8865.

Yu W, Juang S, Lee J, Liu T, Cheng J [2000] Decrease of neuronal nitric oxide synthase in the cerebellum of aged rats. *Neurosci. Lett.* 291: 37-40.

Zhang J, Pieper A, Snyder SH [1995a] Poly(ADP-ribose) synthetase activation: an early indicator of neurotoxic DNA damage. *J. Neurochem.* 65: 1411-1414.

Zhang ZG, Reif D, J Macdonald [1996] ARL 17477, a potent and selective neuronal NOS inhibitor decreases infarct volume after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16: 599–604.

Zhang Y, Zhang X, Park TS, Gidday JM [2005] Cerebral endothelial cell apoptosis after ischemia-reperfusion: role of PARP activation and AIF translocation. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 25: 868-877.

Zingarelli B, O'connor M, Wong H, Salzman AL, Szabo C [1996] Peroxynitrite mediated DNA strand breakage activates poly ADP ribosyl synthetase and causes cellular energy depletion in macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 156: 350–358.