

34

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

TOM 25 1998

Suplement nr 11

Redaktor Leszek Kaczmarek

NEURODEGENERACJA

Postępy Biologii Komórki

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Quarterly of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology, the Polish UNESCO Net, and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology, partially supported by the Committee for Scientific Research (KBN)

Redaguje Kolegium – Editors:

Szczepan BILINSKI (biologia rozwoju, embriologia, cytoszkielet, połączenia międzykomórkowe – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jerzy KAWIAK (immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),

Wincenty KILARSKI (mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jacek KUŹNICKI (biologia molekularna, biochemia – *Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, 02-097 Warszawa, ul. Pasteura 3*),

Jan MICHEJDA (szlaki informacyjne, błony komórek, energetyka komórki – *Zakład Bioenergetyki UAM, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*),

Maria OLSZEWSKA (komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*),

Maciej ZABEL (histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chałubińskiego 6a*)

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI, Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA, Lech WOJTCZAK

Adres Redakcji – Editorial Office: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, Poland, tel. 8340 344, fax 8340470.

Recenzenci rocznika PBK są publikowani w zeszycie 4.

Referees of the volume are published in issue 4.

© Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – Foundation for Cell Biology and Molecular Biology

Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests to the publisher for permission should be addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

OD REDAKCJI

Wydanie Suplementu 11 /1998 „Postępów Biologii Komórki” jest związane z XXVIII Konferencją Szkoleniową Biologii Komórki – tradycyjnie organizowaną przez zarządy: Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików oraz Polskiego Towarzystwa Anatomicznego i Redakcję „Postępów Biologii Komórki”.

Konferencja odbędzie się dnia 5 grudnia 1998 roku w Warszawie, w sali wykładowej im. L. Pankiewicza, w Anatomicum Akademii Medycznej przy ul. Chałubińskiego 5. Początek obrad o godz. 10.00.

Warszawa, listopad 1998

Organizatorzy



PRZEDMOWA

LESZEK KACZMAREK

Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej PAN

Prace nad wyjaśnieniem istoty zjawisk neurodegeneracji – śmierci komórek nerwowych od kilku lat znalazły się wśród dominujących kierunków badawczych neurobiologii. Są tego przynajmniej dwie zasadnicze przyczyny. Pierwsza to oczywiste znaczenie społeczne problemu. Schorzenia o podłożu neurodegeneracyjnym, takie jak: choroba Alzheimera, Parkinsona, a także wylewy i powypadkowe uszkodzenia mózgu należą do najbardziej upośledzających życie, a przez to społecznie najbardziej kosztownych, również w sposób wymierny finansowo. Choroby te są udziałem głównie ludzi w podeszłym wieku. Oczywiście starzenie się społeczeństw najbogatszych krajów przyczyniło się do zwrócenia uwagi na ten, znany przecież od bardzo dawna, problem. Z drugiej strony nastąpił ostatnio olbrzymi postęp w badaniach neurobiologicznych. Ich charakterystyczną cechą stała się integracja w postaci neuronauki (ang. *neuroscience*) o przestrzeni badań tak rozległej, że obejmującej techniki rekombinacji DNA *in vitro* oraz *in vivo* czy też nieinwazyjne obrazowanie mózgu człowieka, żeby wspomnieć tylko dwa spektakularne przykłady. Poznanie biologicznego podłoża schorzeń neurodegeneracyjnych stało się w tych warunkach zarówno jednym z głównych celów neuronauki, jak i umożliwiło jej zrozumienie społeczne i wsparcie finansowe, czego wyrazem jest podjęta przez Kongres USA inicjatywa „Dekady mózgu”.

Niniejszy zeszyt „Postępów Biologii Komórki” (suplement 11) zawiera materiały przygotowane na konferencję poświęconą neurodegeneracji (5.12.1998 r., Warszawa). Do udziału w konferencji została zaproszona grupa badaczy, którzy w swojej pracy podejmują zagadnienia neurodegeneracji. Sposób ich podejścia odzwierciedla współczesne nurty w tej dziedzinie – z jednej strony dyskutują oni różne aspekty problemu, z drugiej zaś można znaleźć bardzo wiele wspólnego w tych prezentacjach.

Docent Maria Barcikowska opisuje złożoność choroby Alzheimera. Jest to schorzenie, które stało się symbolem badań nad śmiercią komórek nerwowych. Olbrzymi

wysiłek jest skierowany na wyjaśnienie istoty tej choroby. Wykład M. Barcikowskiej uświadamia nam, jak wiele zaangażowania wkłada się w ten problem, ale i jak wiele pozostało do zrobienia. Ważnym wnioskiem z badań ostatnich lat jest sugestia, że w rozwoju tej choroby olbrzymie znaczenie ma tzw. ekscytotoksyczność. Nazwa ta jest niedłacznie związana z nadaktywnością określonego układu neuroprzekazników – aminokwasów pobudzających w mózgu. Dopiero w latach osiemdziesiątych przyjęto bez zastrzeżeń, że powszechnie występujący aminokwas – kwas glutaminowy jest głównym neuroprzekaznikiem pobudzającym neurony mózgu. Wkrótce przypisano mu kolejną ważną rolę – neuromodulacyjny udział w procesach plastycznych, w tym zjawiskach pamięci i uczenia się. Okazało się też, że nadmiar tego neuroprzekaznika ma zgubny wpływ na neurony.

Ostatnich kilka lat to żywiołowy rozwój badań nad mechanizmami śmierci komórkowej. Postęp w biologii molekularnej umożliwił rozszerzenie wachlarza kryteriów rozpoznawania różnych rodzajów tej śmierci, a zwłaszcza wskazał na powszechność aktywnego udziału metabolizmu komórkowego, w szczególności zaś zjawisk ekspresji genów w tzw. śmierci apoptotycznej. Oryginalnie używano dychotomicznego rozróżnienia procesów degeneracyjnych w komórce – nekroza oznaczała śmierć o charakterze pasywnym, a apoptoza określała śmierć samobójczą. Dzisiaj takie proste rozróżnienie na jedynie dwa dobrze wyróżnialne rodzaje nie jest do utrzymania – mamy raczej do czynienia z całą gamą różnych obrazów i mechanizmów śmierci komórkowej. Niewątpliwie do takiego rozumienia problemu przyczyniły się badania neurodegeneracji, o której różnych morfologicznych obliczach wiadomo było od dawna. Docent Bożena Kamińska wraz z mgr Magdaleną Stańczyk starają się w swoim artykule uporządkować naszą obecną wiedzę na temat molekularnych aspektów neurodegeneracji. Autorki zwracają uwagę na znaczenie nadaktywności układu aminokwasów pobudzających jako zewnątrzkomórkowej przyczyny śmierci neuronalnej. Skupiają się jednak na procesach wewnątrzkomórkowych, wskazując na ich wspólne cechy występujące w różnych modelowych sytuacjach doświadczalnych.

Najbardziej powszechnym wspólnym elementem neurodegeneracji badanej na poziomie biologii molekularnej komórki jest udział cytoplazmatycznego wapnia w aktywowaniu różnych szlaków sygnałowych i metabolicznych. Problem ten jest przedstawiony w pracy prof. Jacka Kuźnickiego i dr Moniki Puzianowskiej-Kuźnickiej. W swoim artykule pokazują oni z jednej strony różnorodność procesów komórkowych zależnych od wapnia, a istotnych dla neurodegeneracji, a z drugiej strony przedstawiają wielość sytuacji, w których dochodzi do nadmiernego podwyższenia cytoplazmatycznego stężenia wapnia w neuronach, czego konsekwencją jest śmierć tych komórek.

W ostatnim czasie w badaniach neurodegeneracji, a zwłaszcza tej o podłożu apoptozy bardzo wiele uwagi poświęca się mitochondriom. Doktor Ewa Magdalena Urbańska i prof. Waldemar Andrzej Turski przedstawiają bardzo istotny aspekt

tego zagadnienia. Skupiając się nad substancjami, które zaburzają pracę mitochondriów, autorzy pokazują, jak można wytłumaczyć dramatyczne dla neuronów konsekwencje zaburzeń oddychania tlenowego w kontekście ekscytotoksyczności. Warto zwrócić uwagę, że ta droga rozumowania może prowadzić do wytłumaczenia istoty choroby Parkinsona. Autorzy podejmują także problem drgawkogenego działania toksyn mitochondrialnych – oczywiście trzeba w tym miejscu pamiętać o roli aminokwasów pobudzających w procesach powstawania drgawek.

Ostatni artykuł dr Izabeli Figiel opisuje narzędzie badawcze, bez którego nasza wiedza o neurodegeneracji byłaby znacznie uboższa – hodowle komórek nerwowych *in vitro*. Istnieje kilka rodzajów takich hodowli różniących się zarówno źródłem zastosowanego materiału biologicznego, jak też sposobem prowadzenia hodowli. Warto o tych różnicach pamiętać, albowiem mają one istotne znaczenie dla ogólności wyciąganych wniosków. Trzeba jednak podkreślić, że zjawisko neurotoksycznego działania aminokwasów pobudzających ma charakter uniwersalny.

Życząc Państwu pozytywnej lektury niniejszego zeszytu, chciałbym bardzo serdecznie podziękować wszystkim Autorom za przyjęcie zaproszenia do udziału w sesji i napisanie zawartych w tym tomie prac.

CHOROBA ALZHEIMERA JAKO PRZYKŁAD SCHORZENIA NEURODEGENERACYJNEGO

ALZHEIMERS DISEASE AS AN EXAMPLE OF NEURODEGENERATIVE PROCESS

Maria BARCIKOWSKA

Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Streszczenie: Choroba Alzheimer'a jest najczęstszą przyczyną otępienia w wieku podeszłym. Rozpoznanie tego schorzenia wymaga współwystępowania typowego obrazu klinicznego i neuropatologicznego. Obraz morfologiczny choroby Alzheimer'a charakteryzuje się obecnością bardzo licznych amyloidowych blaszek starczych, a także zwyrodnieniem neurofibrilarnym neuronów, które stanowią agregaty patologicznie fosforylowanego białka tau. Beta-amyloid jest patologicznym fragmentem białka prekursorowego (APP). Przyczyną zaniku neuronów poza obecnością włóknienkowych złogów wewnątrz- i zewnątrzneuronalnych są: apoptoza, procesy zapalne, wolne rodniki, działanie aminokwasów pobudzających i tlenu azotu. Znane jest już kilka chromosomów, które kodują białka i enzymy biorące udział w patogenezie choroby. Są to chromosomy: 21,14,1,12, a także rozpoznano jedyny poza wiekiem czynnik ryzyka dla zachorowania, jakim jest występowanie izoformy 4 apolipoproteiny E kodowanej na chromosomie 19.

Słowa kluczowe: APP, β -amyloid, białko tau, otępienie

Summary: Alzheimers disease (AD) is thought to be the most common form of dementia in senility. Two lesions have become recognized as the pathological hallmarks of Alzheimers disease: plaques are composed primarily of β -amyloid protein which is the part of the much larger amyloid precursor protein APP and must be cleaved out of the parent protein through proteolytic processing. Tangles are intracellular accumulations of neurofibrillar elements within the cytoplasm. A major component of tangles is abnormally phosphorylated tau. Atrophy on neurons are caused not only by β -amyloid and pathological tau, but also by apoptosis, free radicals, NO and cytokines, as well as excitotoxic degeneration. Mutations of three genes have been identified so far which can cause early onset of AD gene on chromosome 21 for APP, chromosome 14 and 1 for presenilins 1 and 2, and gen on chromosom 12 for late onset. Only one, besides age known risk factors for AD is Apo E isoform 4, coded on chromosom 19.

Key words: APP, β -amyloid, tau protein, dementia

WSTĘP

Wyniki badań epidemiologicznych dotyczących występowania otępienia są zbliżone w różnych krajach. W Europie, częstość otępienia w grupie wiekowej 65–74 lat wynosi 1–2%; pomiędzy 75 a 84 rokiem życia – 4%, zaś po ukończeniu 85 lat choruje 10% populacji [6]. Badania w programie EURODEM wykazały częstość występowania otępienia w grupie wiekowej 75–79 lat na 5,7%; 80–84 lata – 12,4%; a pomiędzy 85–89 na 21% [20]. Wyniki badań epidemiologicznych z Rochester Minnesota, USA prowadzone w systemie longitudinalnym (USA) świadczą o wyraźnym narastaniu otępienia z wiekiem [11]. Najczęściej (w 55% przypadków) otępienie spowodowane jest przez chorobę Alzheimera (chA); w 25% przyczyną otępienia są zmiany naczyniopochodne, w 15% są to przypadki mieszane, w których współistnieją oba te procesy, w 8% przyczyną demencji są inne czynniki, takie jak zaburzenia metaboliczne, hormonalne, uszkodzenia toksyczne i zmiany ogniskowe w ośrodkowym układzie nerwowym (oun)-guz lub krwiak.

OBRAZ MORFOLOGICZNY CHOROBY ALZHEIMERA

Błazki starcze (BS) i zwyrodnienie neurofibrylarne (ang. *neurofibrillary tangles* – NFT) w mózgu, zostały opisane na przełomie XIX i XX wieku. BS opisali po raz pierwszy Bloq i Marinesco [2], a NFT w roku 1907 roku Alzheimer [1] posługując się impregnacją srebrową. Według klasycznych opisów amyloid to substancja zewnątrzkomórkowa, wykazująca takie właściwości jak wielocukry. Obecnie wiemy, że amyloid to grupa molekularna różnych silnie glikozylowanych białek mających wspólne właściwości fizykochemiczne: znaczny odsetek struktur β -fałdowych w budowie II-rzędowej cząstki, dwułomność w świetle spolaryzowanym po zabarwieniu czerwieńią Kongo i fluorescencję w barwieniu tioflawiną S. Natomiast amyloid rozproszony nie ma kształtu uformowanej blaszki starczej (BS). Według Probst [17] stanowi on początkową fazę amyloidogenezy w oun. Znane są przypadki obecności amyloidu „rozproszonego” już po 4 godz. od urazu [15,19].

Grupa Terrego [20] sugeruje natomiast, że powodem otępienia nie jest zanik neuronów w następstwie odkładania się amyloidu i zmian w cytoskeletonie komórki, lecz wyłącznie znaczne zmniejszenie liczby neuronalnych połączeń synaptycznych [12,13]. Ci sami autorzy dowodzą, że zmiany patologiczne synaps wyprzedzają pojawianie się zmian typowych dla chA. Ubytek liczby połączeń synaptycznych, w tym przede wszystkim cholinergicznych, łączy się ściśle z tak zwaną „cholinergiczną” teorią choroby Alzheimera. Przedmiotem szczególnego zainteresowania jest zajęcie przez proces patologiczny hipokampa i okolicy parahipokampalnej. Dowodów na kluczową rolę hipokampa w zaburzeniach neurotransmitterowych, do-

tyczących głównie metabolizmu acetylocholin, w patogenezie choroby Alzheimera dostarczają między innymi obserwacje kliniczne. Stwierdzono, że przy umiarkowanie nasilonym zaniku hipokampa istnieją szanse poprawy klinicznej po leczeniu preparatami z grupy inhibitorów acetylocholinesterazy. Przy znacznym zaniku szanse terapeutyczne już nie istnieją [18]. Obecność złogów amyloidowych w hipokampie świadczy o większym zaawansowaniu procesu, przeciwnie niż obecność neuronów z cechami zwyrodnienia neurofibrilarnego [4]. Bowen [3] wykazał, że w przebiegu choroby Alzheimera spada w mózgu zawartość acetylotransferazy cholinowej i acetylocholin, sugerując związek tego zjawiska ze zwyrodnieniem neurofibrilarnym w neuronach jądra Meynerta [22]. Bardzo istotny jest także fakt, że w chorobie Alzheimera poza spadkiem stężenia acetylocholin występuje ponadto deficyt innych substancji przekazywających, takich jak: noradrenalina, serotonina, dopamina, GABA i innych biologicznie aktywnych związków, takich jak: somatostatyna, neuropeptyd Y, substancja P. Pewne nadzieje wiąże się z grupą substancji uznanych za czynniki wzrostu. Jest znanym faktem, że czynnik wzrostu nerwów NGF (ang. *nerve growth factor*) bierze udział w rozwoju i zachowaniu biologicznej integralności szeregu ugrupowań neuronalnych, w tym ośrodkowych neuronów cholinergicznym [14], a ich zanik związany jest z niedostatkami NGF. Warto przy tym podkreślić, że NGF wykryto pierwotnie w neuronach hipokampa i kory nowej, a zatem w polach projekcji komórek jądra Meynerta. W blaszce starczej poza NGF stwierdzono również obecność innych substancji troficznych, takich jak: czynnik wzrostu naskórki – EGF (ang. *Epidermal Growth Factor*), mózgowopochodny czynnik troficzny – BDNF (ang. *Brain Derived Neurotrophic Factor*), neurotrofina 3/4, a także zasadowy czynnik troficzny fibroblastów – bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*). Ostatnie lata przyniosły koncepcję wiązania zaniku neuronów w chorobie Alzheimera z toksycznym działaniem tlenku azotu (NO), a jeszcze wcześniej z toksycznym wpływem aminokwasów pobudzających i zaburzeniami wewnątrzkomórkowej homeostazy jonów wapnia. Wiadomo przy tym, że rozpuszczalny fragment A β jest czynnikiem obronnym przeciw działaniu kwasu glutaminowego, a także bezpośrednio obniżającym poziom jonów wapnia wewnątrz komórki. Pewna liczba neuronów ginie także w mechanizmie zaprogramowanej śmierci komórki – apoptozie.

Poza skupiskami amyloidu w mózgu bardzo ważną rolę odgrywa, współwystępująca z nim, degeneracja neuronów, zwana zwyrodnieniem neurofibrilarnym. W komórce nerwowej pojawiają się patologiczne białka o szczególnej budowie strukturalnej. Obecność tych struktur początkowo utrudnia pracę neuronu, a w końcu powoduje jego rozpad. Ubytek liczby neuronów makroskopowo przejawia się zanikiem mózgu. Już impregnacje srebrne umożliwiły dokładne scharakteryzowanie zmian patologicznych w obrębie cytoskieletu komórki nerwowej. W wyniku hiperfosforylacji białka tau stanowiącego składnik prawidłowego cytoskieletu komórki nerwowej dochodzi do pojawiania się w jej cytoplazmie zmian o cechach zwyrodnienia neurofibrilarnego. NFT występuje głównie wewnątrzkomórkowo, obser-

wuje się je także w umiejscowieniu zewnątrzkomórkowym. Obraz mikroskopowo-elektronowy został częściowo scharakteryzowany już w latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych [23]. Znane z mikroskopu świetlnego śródneuralne NFT składają się w znacznej części z podwójnych helikalnie skręconych filamentów – PHF (ang. *paired helical filaments*) opisanych po raz pierwszy przez Kidda w 1963 [10].

Białko tau występuje także w obrębie tzw. „nitki neuropilowej” [4]. Nitki neuropilowe – NT (ang. *neuropil threads*) są srebrochłonnymi wypustkami rozsiانymi w neuropilu. W korze najczęściej pojawiają się w dendrytach neuronów komórek piramidowych zawierających NFT. Reakcje immunohistochemiczne z surowicami przeciw ubikwitynie uwidaczniają znacznie mniejszą liczbę NFT zarówno w korze nowej, jak i w hipokampie.

Znanych jest współcześnie kilka skal mających służyć neuropatologicznemu rozpoznaniu chA. Kryteria Khachaturiana [9] przyjęto dla zmian ujawnionych za pomocą impregnacji srebrowej. Nie mogą być one obecnie uznawane za jedyne, w związku z rozwojem znacznie czulszych technik immunohistochemicznych. Obecnie, oprócz kryteriów Khachaturiana, stosowane są także kryteria CERAD (ang. *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*) [7].

ETIOPATOGENEZA

Rozważania na temat etiopatogenezy choroby Alzheimera oparte są na przesłaniu, że pierwotną przyczyną zwyrodnienia neuronów jest odkładanie się złogów A β w neuropilu i wtórne do tego procesy neurodegeneracyjne, być może na skutek neurotoksyczności A β . Tak więc poszukiwania naukowe dotyczą poznawania mechanizmów genetycznych i biochemicznych prowadzących w efekcie do odkładania się włóknikowej formy A β podstawowego składnika blaszek starcznych.

Złogi β -amyloidu (β A), jak już powiedziano, występują pozakomórkowo. β -amyloid odkłada się także w ścianach naczyń mózgowych. Amyloid wchodzący w skład neuropilowych depozytów charakteryzuje się typową, β -fałdową budową strukturalną: która to konformacja powoduje jego oporność na działanie proteaz, jest nierozpuszczalny i na trwałe pozostaje w mózgu. β A o długości 42–43 aminokwasów jest fragmentem znacznie dłuższego białka prekursorowego amyloidu – β APP (*β Amyloid Precursor Protein*). Jest to białko błonowe umocowane w błonie komórkowej właśnie w obrębie β A. N-koniec tego białka jest znacznie dłuższy, następnie znajduje się fragment obejmujący sekwencję β A, a potem fragment C-terminalny, który jest wyraźnie krótszy. Działanie enzymu, zwanego α -sekreazą, (ciągle jeszcze nie wykrytego) powoduje przecięcie białka prekursorowego amyloidu w obrębie β A, w efekcie czego dochodzi do wytworzenia rozpuszczalnych frag-

mentów prekursora. Są one usuwane z mózgu drogą dalszej fizjologicznej degradacji, ale też częściowo wchodzą w skład blaszki starczej. Jeżeli zadziałają (również nie wyizolowane) sekretazy o symbolu: β i γ , dochodzi do uwolnienia fragmentu βA w całości z błony komórkowej. Przyjmuje on następnie konformację β -wałdową i ulega agregacji, tworząc ostatecznie nierozpuszczalne BS. W ich skład wchodzi poza βA , także inne białka, w tym apolipoproteina E, białko tau, $\alpha 1$ -antychymotrypsyna, $\alpha 2$ -makroglobulina, wielocukry. Blaszkę starczą tworzą również komórki astrogleju i mikrogleju. Komórki te są dodatkowym źródłem białka prekursorowego, a także licznych, szkodliwych dla błon komórkowych substancji, takich jak: wolne rodniki, tlenek azotu, cytokiny (interleukina 1 i 6) i białka komplementu. Cytokiny dodatkowo także stymulują amyloidogenezę.

Zwyrodnienie neurofibrylarne natomiast występuje w cytoplazmie neuronu. Tworzą je nierozpuszczalne agregaty patologicznie ufosforylowanego i nieprawidłowo glikozylowanego białka tau o konformacji β -wałdowej. Część z nich jest ubikwitynowana w późniejszym okresie. Obecność zwyrodnienia neurofibrylarnego upośledza początkowo przepływ aksonalny, a w dalszej kolejności prowadzi do rozpadu błony komórkowej neuronu.

W 85% zachorowania na chA są sporadyczne, to znaczy takie, które nie są uwarunkowane defektem znanego genu. Pozostałe 15% jest spowodowane przez błąd genetyczny. W ostatnim okresie uważa się nawet, że można mówić o podłożu genetycznym aż w 50%.

Glenner i Wong w 1984 roku [8] po raz pierwszy określili sekwencję aminokwasową wyekstrahowanego z naczyń opon βA i tym samym zapoczątkowali badania, których celem było zdefiniowanie etiopatogenezy amyloidozy mózgowej, jaką jest chA. Jak powiedziano, βA jest częścią białka prekursorowego amyloidu (βAPP – *amyloid precursor protein*). βAPP występuje w kilku izoformach ($\beta APP695$, $\beta APP 751$, $\beta APP-770$), składający się z 19 eksonów gen znajduje się na chromosomie 21 (21q21). Sekwencja βA jest zawarta w eksonach 16 i 17 genu βAPP . Stwierdzenie, że gen kodujący βAPP znajduje się na chromosomie 21, stanowiło ważną obserwację w kontekście znanego już wówczas faktu pojawiania się amyloidozy mózgowej w przypadkach choroby Downa (trisomii chromosomu 21) i to bardzo wcześnie – już po 25 roku życia. Następne lata przyniosły odkrycia mutacji w obrębie genu dla βAPP będących przyczyną występowania wczesnych, rodzinnych postaci chA. W chwili obecnej znanych jest 6 takich mutacji (VAL717ILE, VAL717PHE, VAL717 GLY, LYS 670ASN, MET 671LEU, ALA 713 THR, GLN665ASP). Należy jednak pamiętać, że są one przyczyną nie więcej niż 1% przypadków o raczej wczesnym czasie zachorowania. Znalezienie mutacji genu βAPP umożliwiło skonstruowanie kilku transgenicznych myszy będących nośicielami genu βAPP człowieka ze znanymi mutacjami w swoim genomie. Myszy transgeniczne stanowią nieoceniony model dla dalszych badań nad patogenezą chA, jej objawami klinicznymi i metodami leczenia. Wśród wielu innych, istnieją sugestie,

że β APP jest białkiem płodowym. Zakłada się przy tym, że jego sprawny i prawidłowy metabolizm zabezpiecza przed odkładaniem się w neuropilu w postaci nierozpuszczalnej o konformacji β -fałdowej. Wcześniejsze wyczerpanie się mechanizmów regulacyjnych metabolizmu amyloidu, np. już około 65 roku życia prowadzi do szybkiego odkładania się amyloidu włóknienkowego w mózgu i pojawiania się klinicznych objawów choroby Alzheimera [21].

W ostatnim czasie opublikowano wyniki badań, które dowodzą także udziału α -synukleiny (jednego z białek presynaptycznych) kodowanych na chromosomie 4, a będącego prekursorem NAC (*precursor of non-amyloid component of Alzheimer's disease amyloid*), wchodzącego w skład blaszek starczych.

Od roku 1993 grupa Alana Rosesa rozpoczęła badania nad wyjaśnieniem roli apolipoproteiny E (Apo E) w patogenezie chA. Jest ona kodowana przez gen na chromosomie 19 (19q13.2) i występuje w trzech różnych izoformach oznaczonych symbolami: 2, 3 i 4. Polimorfizm ten zależy od kodonów 112 i 158, na których znajdują się w przypadku 2-CYS/CYS, dla 3-CYS/ARG i dla 4- ARG/ARG. Badacze tej grupy, a potem wielu innych wykazali, że najwyższe ryzyko (czternastokrotnie częstsze) wystąpienia chA ma miejsce przy obecności dwu alleli APO E 4, a stwierdzenie alleli e2 takie ryzyko znacznie obniża. Spostrzeżenie to nie pozwala jednak na prowadzenie poradnictwa genetycznego wobec braku stuprocentowej pewności, może być natomiast dodatkowym czynnikiem diagnostycznym, a także jednym z dwu poza wiekiem znanym czynnikiem ryzyka dla chA. Polimorfizm Apo E jako czynnik ryzyka dotyczy głównie przypadków późnych, sporadycznych.

Lato 1995 roku przyniosło natomiast dowody udziału w amyloidogenezie dwu kolejnych chromosomów: 14 (14q24.3) i 1 (1q31-34). Znajdują się na nich geny presenilin 1 i 2. Kodują one dwa wysoce homologiczne białka transbłonowe (o długości od 467 do 554 aminokwasów), zawierające średnio 7 domen transbłonowych. Wiadomo, że oba te białka poza ubocznym udziałem w procesach apoptozy, odgrywają bardzo istotną rolę w amyloidogenezie, przyczyniając się, w sposób nie do końca jeszcze poznany, do stymulacji produkcji bardziej amyloidogennych, dłuższych form. Znanych jest już blisko 30 mutacji w obrębie presenilin, których jednostkowa rola patogenetyczna nie jest zdefiniowana, ale wiadomo, że warunkują one pojawianie się przypadków o wczesnym okresie zachorowania. Wykrycie mutacji presenilin ma duże znaczenie w ewentualnym poradnictwie genetycznym, wobec faktu ich autosomalnie dominującego typu dziedziczenia i jak się wydaje bardzo wysokiego procentu, blisko 100% penetracji genu, jak również niewielkiego wpływu czynników środowiskowych na fenotyp. Opisano już pierwszą polską mutację w obrębie chromosomu 14 – jest to mutacja PRO 117 LEU.

W roku 1997 zlokalizowano przez *linkage* kolejny chromosom tym razem 12, na którym znajduje się dotychczas nieodkryty gen biorący udział w patogenezie choroby [16]. Jest to ogromnie interesujące, dlatego że według Tanziego mutacji ulega enzym o nazwie: α 2-makroglobulina. Tym samym byłby to pierwszy dowód

na możliwość patologicznej mutacji w obrębie enzymu, biorącego hipotetyczny udział w degradacji prekursora dla amyloidu. Mutacja ta występuje przede wszystkim u chorych z późnym początkiem choroby. Inna grupa badaczy sugeruje, że patologia na chromosomie 12 dotyczy genu dla LRP (*low-density lipoprotein receptor related protein*), który jest istotnym receptorem dla apolipoproteiny E.

W mózgu osób z chA stwierdzono, również znaczący wzrost uszkodzeń mitochondrialnego DNA w korze czołowej i ciemieniowej.

Badania genetyczne w chA poza wartościami poznawczymi mają na celu także potencjalne możliwości poradnictwa genetycznego w przyszłości.

OBJAWY KLINICZNE CHOROBY ALZHEIMERA

W pierwszej fazie objawy schorzenia nie są charakterystyczne. Są to najczęściej zaburzenia pamięci w niewielkim stopniu utrudniające życie, zaburzenia wzrokowo-przestrzenne, orientacji i niezbyt nasilona apraksja. Niekiedy obserwuje się zaburzenia mowy, czasami będące pierwszym objawem choroby. Zaburzenia te częściej sprawiają wrażenie trudności w odszukaniu słowa, niż przypominają cechy afazji czuciowej lub ruchowej. Chory ma problemy ze sprostaniem codziennym obowiązkom w pracy. Często wyraźnie chudnie nawet do 8 kg. U osób prowadzących do tej pory samochód pojawiają się problemy często zmuszające je do zaprzestania tej czynności. Chorzy krytyczni wobec swego stanu są często depresyjni, niekiedy nie godząc się z narastającą degradacją bywają agresywni. Obserwuje się także typowe narastanie podejrzliwości. Na tym etapie chorzy prawie zawsze są zdolni do samodzielnej egzystencji, chociaż nadzorowania wymagają już ich decyzje finansowe, np. płacenie obowiązkowych świadczeń.

W drugiej fazie choroby pacjenci potrzebują już stałej opieki innej osoby. Mogą być jednak jeszcze kontrolowani w opiece ambulatoryjnej. Zaburzenia pamięci są już bardzo wyraźne, w równym stopniu dotyczą wydarzeń świeżych jak i dotyczących przeszłości. Chory nie zawiaduje już swoimi wydatkami. Przestaje być krytyczny co do własnego wyglądu, wymaga pomocy przy myciu i wyborze właściwego ubrania. Chory obawia się samotności, kontakt z opiekunem staje się jedynym kontaktem ze światem. W tym okresie pojawia się często objaw błądzenia (ang. *wandering*), chory chodzi niespokojnie po domu, nalega na spacer, „nie może usiedzieć” na miejscu. Samodzielne spacery niekiedy kończą się niemożnością trafienia do domu. Często występują omamy wzrokowe i słuchowe. Chory nie poznaje własnego domu. Kobiety nie umieją przygotować nawet najprostszych posiłków. Często pojawiają się: pobudzenie, zaburzenia zachowania i snu w skrajnych przypadkach prowadzące do odwrócenia rytmu dnia i nocy. Chory już nie zawsze wie, kim jest jego opiekun, żona lub córka postrzegane są jako matka. Pojawia się

plącz przymusowy, znacznie rzadziej śmiech. Mowa jest coraz uboższa. Pierwsze zaburzenia oddawania moczu i stolca mogą być jeszcze regulowane systematycznym wyprowadzaniem chorego do toalety przez opiekuna. W badaniu neurologicznym stwierdza się elementy zespołu parkinsonowskiego, jeszcze bez drżenia i wyraźne objawy deliberacyjne, którym towarzyszą: apraksja i narastające zaburzenia wzrokowo-przestrzenne.

Ostatnia, trzecia faza choroby to faza, w której chory traci tzw. „zdolność poruszania się”, przebywa najpierw w pozycji siedzącej w domu, potem w leżącej w łóżku, chociaż nie ma niedowładów, nie mówi, jest karmiony, nie kontroluje zwieraczy. Ginie najczęściej w przebiegu zapalenia płuc.

Kliniczne rozpoznanie kliniczne chA nigdy nie jest, jak już powiedziano, absolutnie pewne. Jednak prowadzone ostatnio badania kliniczno-patologicznie dowodzą prawie 90% swoistości rozpoznań klinicznych [7]. Rozpoznanie chA jest określone dokładnym międzynarodowym protokołem i składa się z wielu elementów oceny. Po pierwsze, w każdym przypadku należy przeprowadzić dokładny wywiad dotyczący współwystępowania objawów nasilonej miażdżycy naczyń (choroba wieńcowa, nadciśnienie, cukrzyca), wykluczyć zatrucia, zespoły niedoborowe, zaburzenia hormonalne, obecności choroby nowotworowej. Każdy chory powinien być oceniony przez neuropsychologa. Badanie to jest szczególnie istotne w okresie początkowym, kiedy drobne, ale charakterystyczne objawy mogą ująć uwagi specjalisty neurologa i psychiatry. Ocena neurologiczna ma duże znaczenie przy wykluczeniu ogniskowych zespołów piramidowych i także w ocenie stadium choroby. Badanie to obejmuje zawsze co najmniej kilka testów przesiewowych, określających stopień degradacji, z których najpowszechniej wykonywanym na świecie jest test MMSE (*Mini Mental State Examination*) [5]. W przypadku nasilonych zaburzeń zachowania, depresji i pobudzenia wskazana jest konsultacja psychiatry.

Badania laboratoryjne, w tym biochemiczne służą wyeliminowaniu innych przyczyn otępienia niż chA. Badania neuroobrazowe; tomografia komputerowa i obrazowanie rezonansem magnetycznym (ang. *magnetic resonans imaging*, MRI) wykluczają możliwość nierozpoznania guza lub przewlekłego krwiaka i umożliwiają określenie stopnia i topografię zaniku (w chA charakterystycznie dotykającego hipokampa i okolicy okołohipokampalnej – części układu limbicznego). Badania te pomagają uwidocznic współistniejącą patologię naczyniową albo wręcz na ich podstawie można rozpoznać otępienie naczyniopochodne. Badanie przepływów SPECT pozwala rozpoznać proces zwyrodnieniowy, zanim widoczny jest zanik nawet, najwcześniej pojawiający się, układu limbicznego. SPECT jest także jedynym badaniem laboratoryjnym, szczególnie w fazie początkowej, pozwalającym podejrzewać rozpoznanie tak zwanych otępień nie-alzheimerowskich, takich jak: choroby Picka i zwyrodnienia czołowo-skroniowego. Najczulszym badaniem jest PET, w Polsce ciągle jeszcze niedostępny, pozwala rozpoznać chA najwcześniej przed okresem pojawiania się zaniku na podstawie oceny zaburzeń metabolizmu glukozy.

LECZENIE CHOROBY ALZHEIMERA

Leczenia przyczynowego choroby Alzheimera jeszcze nie ma. Są jednak leki, które hamują rozwój choroby we względnie łagodnym jej okresie, odsuwając czas, w którym dochodzi do dalszych etapów rozwoju choroby. W tej grupie znajdują się leki podwyższające poziom acetylocholinę. Działają one przez hamowanie enzymów rozkładających acetylocholinę, tym samym podwyższają jej poziom w mózgu. Do tej grupy należą: cognex-takryna, welnakryna, aricept, exelon i me-trifonate. Inna grupa leków działających w pierwszej fazie także objawowo, a nie przyczynowo – to wymiatacze wolnych rodników, których działanie powoduje rozpad błony komórkowej neuronu. Uprzątnięcie więc tych związków przedłuża życie neuronu. Są to selegilina, jumex i duże dawki witaminy E. Istnieją także leki, będące już w ostatniej fazie badań, hamujące pomnożenie pobudzonego mikrogleju, które wtórnie dzięki temu, także wydłużają przeżycie neuronów, powstrzymując ich zanik. Przedstawicielem tej grupy jest propentofilina. Nawet, jeżeli nie ma leku, który może całkowicie wyleczyć chorego, możemy ułatwić mu chorowanie znosząc niektóre objawy. Można leczyć objawy depresji, pobudzenie, zaburzenia snu, objawy zespołu parkinsonowskiego.

Bardzo istotna w chorobie Alzheimera jest ścisła współpraca lekarza z opiekunem, troska o jego zdrowie i samopoczucie. W tym celu należy znać sytuację opiekuna i wskazywać możliwości ułatwień w jego skrajnie ciężkiej sytuacji życiowej. Temu służy także ścisła współpraca lekarza prowadzącego ze stowarzyszeniem opiekunów chorych na chorobę Alzheimera. Rola takich samopomocowych organizacji jest bardzo ważna – stanowiąc nieocenioną pomoc w pracy lekarza prowadzącego pacjentów z chorobą Alzheimera.

PIŚMIENNICTWO

- [1]ALZHEIMER A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Z Psychiatr-Ge-richtl Med* 1907; **64**: 146–148.
- [2]BLOCK R, MARINESCOU I. Sur les lesions et la pathogenie de lepilepsie dite essentielle. *Semm Med* 1892: 445.
- [3]BOWEN DM, SMITH CB, WHITE P, DAVIDSON AN. Neurotransmitter related enzymes and indices of hypoxia in dementia and other abiotrophies. *Brain* 1976; **99**: 459–496.
- [4]BRAAK H, BRAAK E, GRUNDKE-IQBAL I, IQBAL K. Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's disease; a third location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques. *Neurosci Lett* 1986; **65**: 351–355.
- [5]FOLSTEIN MF, FOLSTEIN SE, Mc HUGH PR. Mini Mental State. A practical Method for grading the cognitive sate of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975; **12**: 189–198.
- [6]FRATIGLIONI L. Epidemiology of Alzheimer's disease. Issues of etiology and validity. *Acta Neurol Scand* 87. suppl 1993; **145**: 1–70.

- [7]GEARING M, MIRRA SS, HEDREEN JC, SUMI SM, HANSEN LA, HEYMAN A. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's disease (CERAD), Part X, Neuropathology confirmation of the clinical diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurology* 1995; **45**: 461–466.
- [8]GLENNER GG, WONG CW. Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; **120**: 885–890.
- [9]KHACHATURIAN ZS. Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Arch Neurol* 1985; **42**: 1097–1105.
- [10]KIDD M. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimers disease. *Nature* 1963; **197**: 192–193.
- [11]KOKMEN E, BEARD CM, O'BRIEN PC, OFFORD MS, KURLAND LT. Is the incidence of dementing illness changing? A 25-year time trend study in Rochester, Minnesota (1960–1984). *Neurology* 1993; **43**: 1887–1892.
- [12]LASSMANN H, WEILER R, FISCHER P, BANCHER C, JELLINGER K, FLOOR E, DANIELCZYK W, SEITELBERGER F, WINKLER H. Synaptic pathology in Alzheimer's disease immunological data for markers of synaptic and large dense-core vesicles. *Neuroscience* 1992; **46**: 1–8.
- [13]MASLIAH E, IIMOTO DS, SAITOH T, HANSEN LA, TERRY RD. Increased immunoreactivity of brain spectrin in Alzheimer disease: a marker for synapse loss? *Brain Res* 1990; **531**: 36–44.
- [14]MC GEER PL, MC GEER EG, SUZUKI J, DOLMAN CE, NAGAI T. Aging, Alzheimer's disease, and the cholinergic system of the basal forebrain. *Neurology* 1984; **34**: 741–745.
- [15]McKENZIE JE, GENTLEMAN SM, ROBERTS GW, GRAHAM DI, ROYSTON MC. Increased numbers of β APP-immunoreactive neurones in the entorhinal cortex after head injury. *NeuroReport* 1994; **6**: 161–164.
- [16]PERIAC-VANCE MA, BASS MP, YAMOAKA LH, GASKELL PC, SCOTT WK, TERWEDOW HA, MENOLD MM, CONNEALLY PM, SMAAL GW, VANCE JM, SAUNDERS AM, ROSES AD, HAINES JL. Complete genomic screen in late-onset Familial Alzheimer Disease JAMA. 1997; **278**: 1237–1241.
- [17]PROBST A, BRUNNSCHWEILER H, LAUTENSCHLAGER C, ULRICH J. A special type of senile plaque, possibly an initial stage. *Acta Neuropathol* 1987; **74**: 133–141.
- [18]RIEKKINEN P, SOININEN H, HELKALA EL, PARTANEN K, LAAKSOM, VANHANEN M, RIEKKINEN P. Hippocampal atrophy, acute THA treatment and memory in Alzheimer's disease. *NeuroReport* 1995; **6**: 1297–1300.
- [19]ROBERTS GW, GENTLEMAN SM, LYNCH A, GRAHAM DI. A4 amyloid protein deposition in brain after head trauma. *Lancet* 1991; **338**: 1422–1423.
- [20]SAMUEL W, TERRY RD, DETERESA R, BUTTERS N, MASLIAH E. Clinical correlates of cortical and nucleus basalis pathology in Alzheimer dementia. *Arch Neurol* 1994; **51**: 772–778.
- [21]WEIDEMANN A, KONIG G, BUNKE D, FISCHER P, SALBAUM JM, MASTERS CL, BEYREUTHER K. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 1989; **57**: 115–126.
- [22]WHITEHOUSE P, PRICE DL, CLARK AW, COYLE JT, DELONG MR. Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann Neurol* 1981; **10**: 122–126.
- [23]WIŚNIEWSKI HM, TERRY RD, HIRANO A. Neurofibrillary pathology. *J Neuropathol Exp Neurol* 1970; **29**: 163–176.

MOLEKULARNE MECHANIZMY NEURODEGENERACJI***MOLECULAR MECHANISMS OF NEURODEGENERATION**

BOŻENA KAMIŃSKA, MAGDALENA STAŃCZYK

Pracownia Regulacji Transkrypcji, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii
Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Streszczenie: Szereg danych wskazuje na to, że śmierć komórek nerwowych leży u podłoża procesów neurodegeneracyjnych. Podczas gdy kontrolowana utrata komórek nerwowych ma miejsce i jest niezbędna w trakcie prawidłowego rozwoju układu nerwowego, masywna śmierć komórek w dojrzałym układzie nerwowym, może być odpowiedzialna za zjawiska neurodegeneracji. Podjęto próbę odpowiedzi na pytanie, czy śmierć komórek nerwowych ma charakter aktywnej programowanej śmierci komórek (apoptozy), czy też przeważa nekroza. Dyskutowane są specyficzne mechanizmy śmierci komórek nerwowych uwzględniające swoiste cechy tych komórek, takie jak pobudliwość i występowanie specyficznych kanałów jonowych. Chociaż śmierć komórek nerwowych może być inicjowana przez różnorodne sygnały, takie jak brak czynników wzrostowych i troficznych lub uszkodzenie przez endogenne albo egzogenne toksyny, komórkowy mechanizm realizacji programu śmierci jest dość uniwersalny. W regulacji i wykonaniu procesu apoptozy uczestniczą swoiste proteazy, białka z rodziny Bcl-2 oraz czynniki mitochondrialne. Rola niektórych białek jądrowych w regulacji ekspresji genów zaangażowanych w proces apoptozy jest dyskutowana.

Słowa kluczowe: apoptoza, nekroza, ekscytotoksyczność, kaspazy, białka Bcl-2, Fas ligand

Summary: Loss of nervous system cells from the adult brain underlies the pathology of many neurodegenerative diseases. While moderate cell loss is tolerated and even required to form the developing nervous system, an accelerated rate of cell death in the adult nervous system may be responsible for neurodegeneration processes. The question of whether programmed cell death, such as apoptosis, underlies those processes is discussed. Specific death mechanisms based on unique neuronal features such as excitability and the occurrence of specific channels and enzymes, have been unraveled in the brain. While multiple signals can initiate cell death, such as the removal of an essential growth factors or damage by endogenous or exogenous toxins, mechanisms of execution of cell death have a lot in common. Evolutionary conserved mechanisms involving proteases, Bcl-2-related proteins, and mitochondrial factors participate in the modulation and execution of cell death. The possible involvement of some nuclear proteins in the regulation of apoptosis related genes is discussed.

Key words: apoptosis, necrosis, excitotoxicity, caspases, Bcl-2 proteins, Fas/Fas ligand

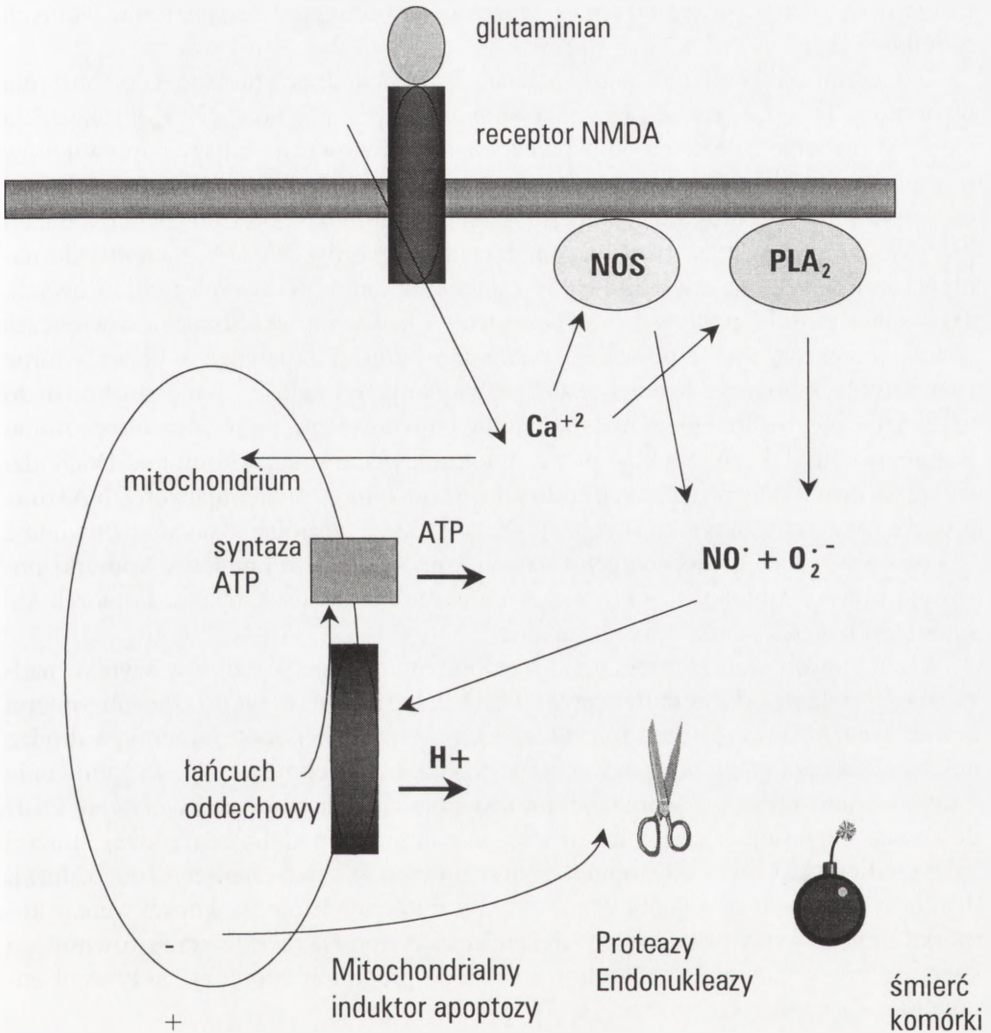
*Praca dofinansowana przez Komitet Badań Naukowych (projekt nr 6 PO4A 037 12)

1. WSTĘP

Większość komórek ma zdolność do samounicestwienia, a program śmierci uruchamiany jest w nich wtedy, gdy stają się niepotrzebne na pewnych etapach rozwoju organizmu (np. śmierć nadliczbowych neuronów w trakcie rozwoju mózgu) lub potencjalnie niebezpieczne (np. śmierć komórek nowotworowych lub zainfekowanych wirusami, usuwanie autoreaktywnych limfocytów w grasicy) [34]. Zaburzenia w regulacji tego programu mogą być odpowiedzialne za występowanie zjawisk patologicznych, w tym niektórych chorób neurodegeneracyjnych, takich jak: ischemia, AIDS, choroba Alzheimera czy Parkinsona [8, 28,36]. Szereg danych wskazuje na to, że u podłoża procesów neurodegeneracyjnych wywołanych niedotlenieniem mózgu, epilepsją bądź w przewlekłych chorobach zwyrodnieniowych, takich jak choroba Alzheimera, Huntingtona bądź Parkinsona, krytyczną rolę odgrywa zjawisko ekscytotoksyczności. Polega ono na nadmiernym pobudzeniu komórek nerwowych przez neuroprzekaźnik pobudzający, glutaminian (GLU) i spowodowanej tym śmierci komórek. Do niedawna sądzono, że w wyniku ekscytotoksyczności komórki umierają biernie w drodze nekrozy. Obecnie wiadomo, że towarzyszy temu także indukcja programowanej śmierci komórek i to właśnie opóźniona śmierć komórek nerwowych może być odpowiedzialna za rozległe zmiany neurodegeneracyjne.

2. ŚMIERĆ KOMÓREK W PROCESACH NEURODEGENERACYJNYCH – APOPTOZA CZY NEKROZA?

W dobrze poznanym modelu neurodegeneracji *in vivo*, czyli eksperymentalnie wywołanym niedotlenieniem mózgu lub hipoglikemii, obserwowano wzrost poziomu glutaminianu w uszkodzonych strukturach. Wyniki badań nad ekscytotoksycznością sugerują, że w czasie rozpadu niektórych komórek nerwowych dochodzi do wypływu ich zawartości do otoczenia oraz uwolnienia zmagazynowanych w pęcherzykach synaptycznych aminokwasów pobudzających – glutaminianu i asparagianu. Nadmierna stymulacja receptorów GLU może prowadzić do śmierci dalszych komórek na zasadzie reakcji łańcuchowej. Wzrost ilości neuroprzekaźnika i w konsekwencji nadmierne pobudzenie receptora GLU prowadzi do napływu jonów wapnia i aktywacji syntazy tlenku azotu (NO) oraz aktywacji fosfolipazy A₂ w komórkach nerwowych (rys. 1). Pobudzenie fosfolipazy A₂ powoduje powstanie m.in. wolnych rodników tlenowych, które uszkadzają funkcje mitochondriów, a zwłaszcza zaburzą działanie łańcucha oddechowego. Dodatkowo powstający równolegle NO



RYSUNEK 1. Postulowany mechanizm ekscytotoksyczności. Nadmierna stymulacja receptorów NMDA przez glutaminian prowadzi do napływu jonów wapnia i aktywacji syntazy tlenku azotu (NO) i fosfolipazy A₂. Powoduje to powstanie wolnych rodników tlenowych, które uszkadzają funkcje mitochondriów i funkcjonowanie łańcucha oddechowego. Powstający równolegle NO tworzy z tlenem toksyczne pochodne, które także upośledzają metabolizm energetyczny mitochondriów

tworzy z tlenem toksyczne pochodne, które także upośledzają metabolizm energetyczny mitochondriów [7]. Wykazano, że zarówno niedobór tlenu, jak też obniżenie poziomu glukozy *in vivo* i *in vitro*, powodują wzrost poziomu wolnych rodników [22].

Zaburzenie metabolizmu energetycznego w mitochondriach prowadzi do obniżenia poziomu ATP i zaburzenia działania błonowych pomp jonowych. Konsekwencją tego jest otwarcie zależnych od napięcia kanałów jonowych i dalszy napływ jonów wapnia do komórek. W badaniach na neuronach w hodowli wykazano, że w zależności od stopnia pobudzenia komórek przez glutaminian może dojść do dwóch sytuacji [3]. W przypadku drastycznego pobudzenia receptorów NMDA dochodzi do napływu jonów wapnia, czemu towarzyszy napływ jonów sodowych i chlorkowych. To pociąga za sobą napływ wody, pęcznienie i lizę komórek. Śmierć ma wówczas charakter nekrotyczny i powoduje tworzenie ogniska zapalnego i liczne wtórne uszkodzenia komórek. Jeżeli bodziec negatywny był słabszy i nie dochodzi do tak drastycznego zaburzenia metabolizmu energetycznego, podwyższenie poziomu wapnia w cytoplazmie indukuje proces programowanej śmierci komórek. Dochodzi wówczas do aktywacji swoistych endonukleaz (enzymów degradujących DNA) oraz proteaz (enzymów degradujących białka), których wspólne działanie powoduje fragmentację jąder komórkowych i całych komórek [33]. Fragmenty komórki pozostają otoczone błoną, dzięki czemu nie dochodzi do uszkodzania komórek sąsiadujących i powstania reakcji zapalnej [22].

W ten sposób stopień zaburzenia metabolizmu energetycznego w wyniku nadmiernego pobudzenia komórek przez GLU determinuje stopień i sposób śmierci komórek nerwowych. Niezależnie od tego, czy komórki nerwowe umierają w drodze nekrozy bądź apoptozy, konsekwencją jest zanik komórek nerwowych i zaburzenie funkcjonowania mózgu. Badania *in vitro* nad śmiercią neuronów pod wpływem GLU dowodzą, że wstępny etap obu procesów może być podobny, a rodzaj śmierci zależy od dawki GLU i od stopnia zaburzenia metabolizmu energetycznego. Jeżeli dochodzi do trwałego zahamowania funkcji mitochondriów, w konsekwencji komórka umiera w wyniku nekrozy. Jeżeli komórki powracają do stanu równowagi energetycznej, dochodzi do indukcji swoistego programu apoptozy: aktywacji endonukleaz i swoistych proteaz [3, 7].

3. WEWNĄTRZKOMÓRKOWA MASZYNERIA ODPOWIEDZIALNA ZA REALIZACJĘ PROGRAMU APOPTOZY

Każda komórka eukariotyczna jest zdolna do apoptozy, tzn. można w niej uruchomić program, który doprowadzi do powstania lub aktywacji kompletu enzymów

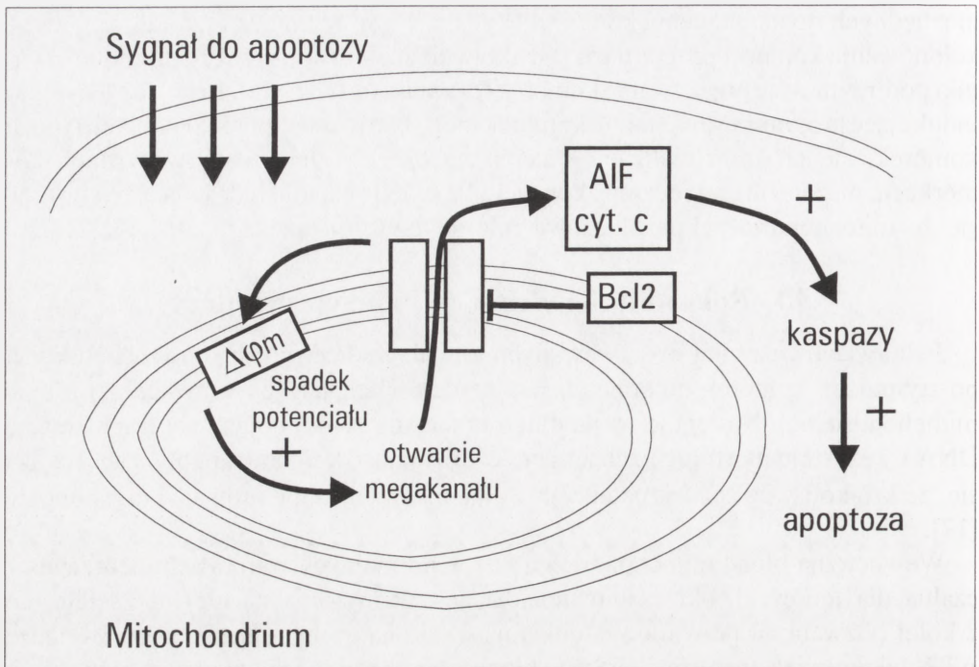
niezbędnych do uśmiercenia komórki. Wydaje się, że w trakcie prawidłowego funkcjonowania komórki program ten jest aktywnie hamowany przez różnorodne czynniki podtrzymujące przeżywanie komórek (czynniki troficzne i wzrostowe). Czynniki indukujące programowaną śmierć komórek mogą być różne w poszczególnych typach komórek, ale program realizacji śmierci przebiega podobnie we wszystkich komórkach, niezależnie od rodzaju aktywacji. W świetle ostatnich doświadczeń wydaje się że mitochondria pełnią kluczową rolę w regulacji apoptozy [15, 17, 21].

3.1. Rola mitochondriów w indukcji apoptozy

Jedną z najwcześniej obserwowanych zmian, zachodzących w mitochondriach po stymulacji komórek do śmierci, jest spadek potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Następuje on na długo przedtem, zanim pojawi się fragmentacja DNA i wszystkie morfologiczne zmiany wyróżniające komórkę apoptyczną. Uważa się, że krótkotrwały spadek potencjału $\Delta\Psi_m$ nieodwracalnie prowadzi do apoptozy [17].

Wewnętrzna błona mitochondrialna jest w normalnych warunkach nieprzepuszczalna dla jonów, dzięki czemu możliwe jest utrzymanie na niej potencjału, co z kolei pozwala na prawidłowe funkcjonowanie łańcucha oddechowego i syntezę ATP. Jakikolwiek „przeciek” przez tę błonę powoduje spadek potencjału błonowego $\Delta\Psi_m$, z którym mamy do czynienia w trakcie apoptozy. Przyczyn tego zjawiska upatruje się w otwarciu megakanalu (ang. *PT pore, permeability transition pore*). Zarówno funkcja fizjologiczna, jak i budowa megakanalu nie jest do końca poznana. Megakanal jest kompleksem białek, w którego skład wchodzi translokaza nukleotydów adeninowych (AdNT), poryna zewnętrznej błony mitochondrialnej oraz prawdopodobnie inne białka. Wnioski dotyczące budowy megakanalu wyciągnięto z oddziaływania białek błonowych z odpowiednimi inhibitorami, takimi jak cyklosporyna A i ADP. Funkcją megakanalu jest prawdopodobnie uwalnianie wapnia z matriks mitochondrialnej lub też „ułatwiony” import białek do wnętrza mitochondrium [40].

Konsekwencją otwarcia megakanalu jest przerwanie łańcucha oddechowego, zaprzestanie syntezy ATP, wypływ jonów wapnia, uwolnienie zapasów zredukowanego glutationu i NAD(P)H₂ oraz zwiększona produkcja anionów. Być może jednak główną funkcją megakanalu jest jego udział w regulacji procesu apoptozy. Otwarcie megakanalu umożliwia swobodny wypływ z mitochondriów białek, które w normalnych warunkach nie mają możliwości znalezienia się na terenie cytoplazmy [32]. Ten niezwykle ważny skutek otwarcia megakanalu może być przyczyną zmian apoptycznych zachodzących w komórce. Do tej pory opisano dwa białka uwalniane przez mitochondria w trakcie otwarcia megakanalu – AIF (ang. *apoptosis inducing factor*) i cytochrom c [25], będące prawdopodobnie induktorami apoptozy.



RYSUNEK 2. Schemat ilustrujący hipotezę dotyczącą udziału mitochondriów w apoptozie. Sygnał indukujący apoptozę dociera do komórki i jest przekazywany do mitochondriów. W krótkim czasie po stymulacji komórek do śmierci, następuje spadek potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, a następnie otwarcie megakanalu i wypływ czynników indukujących apoptozę – AIF i cyt. c. Obydwa uwalniane czynniki mają zdolność do aktywowania kaskady kaspaz. Megakanal jest hamowany przez produkt genu *bcl-2*.

3.1.1. Czynniki indukujący apoptozę (AIF)

Białko zwane czynnikiem indukującym apoptozę (AIF), zostało oczyszczone z komórek ludzkich jako uwalniany przez mitochondria komórek apoptycznych czynnik o masie cząsteczkowej ok. 50 kDa [21]. AIF jest czynnikiem wystarczającym do indukcji apoptozy w izolowanych jądrach komórkowych i prowadzi do niej szybko, w czasie krótszym niż 15 minut. Wyniki badań funkcjonalnych dowodzą, że AIF jest proteazą, której aktywność jest hamowana przez inhibitory proteaz cysteinowych – kaspaz [17]. Wszystkie cechy nowo odkrytego białka wskazują na to, iż może być ono jednym z rzeczywistych czynników odpowiedzialnych za nieodwracalne uruchomienie procesu apoptozy przez aktywację kaskady kaspaz.

3.1.2. Cytochrom c

Obok AIF uwalniany jest z mitochondriów cytochrom c, którego potencjalny udział w apoptozie wydawał się zagadkowy, białko to bowiem jest jednym ze składników łańcucha oddechowego. Li i in. [24] wykazali udział cytochromu c

w aktywacji kaskady kaspaz, która prowadzi do fragmentacji DNA i śmierci komórki. Cytochrom c, który jest uwalniany przez mitochondria komórek pobudzonych do apoptozy, wiąże się z białkiem Apaf1 zmieniając jego konformację. Następnie w procesie zależnym od dATP powstaje kompleks białka Apaf-1 z kaspazą 9. Powstanie kompleksu cyt.c/Apaf1/kaspaza9 pozwala na indukcję proteolitycznych właściwości kaspazy 9, która aktywuje kaspazę 3 i prowadzi do apoptozy [24].

Inne hipotezy na temat udziału mitochondriów w procesie apoptozy dotyczą sposobu uwalniania przez mitochondria cytochromu c [29]. Jedna z nich zakłada udział w tym procesie innego kanału, tworzonego przez białko Bax (białko z rodziny Bcl-2) w zewnętrznej błonie mitochondrialnej [38]. Uwolnienie cytochromu c w takich warunkach nie wiązałoby się ze spadkiem potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej.

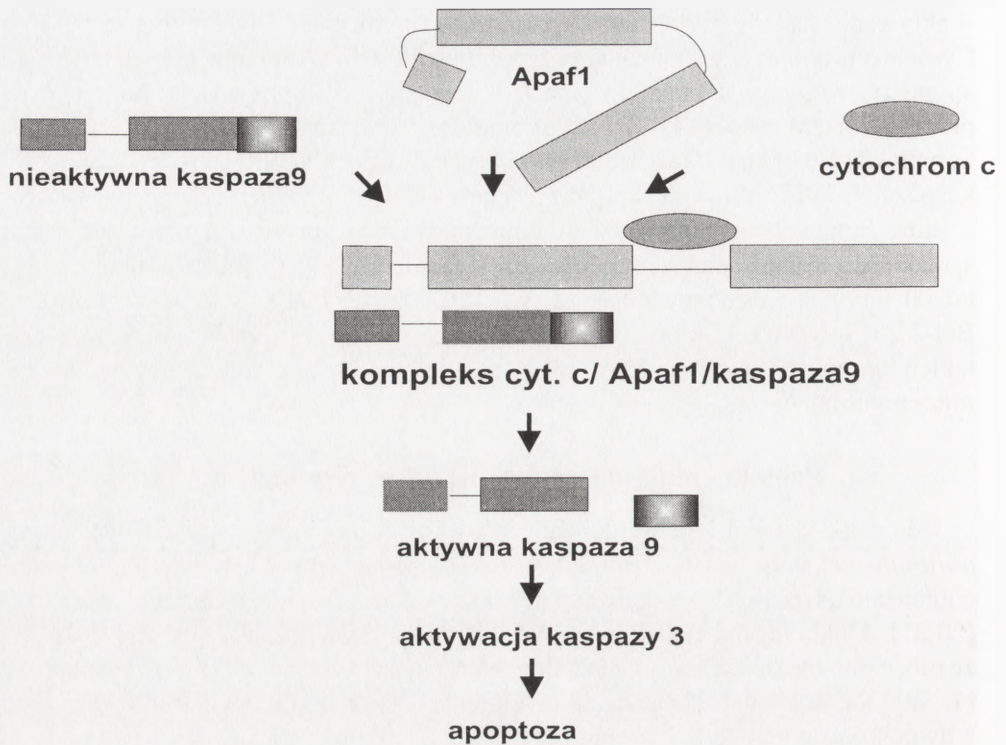
3.2. Protekcyjna rola białka Bcl-2 w regulacji apoptozy

Gen *bcl-2* został zidentyfikowany jako ssaczy homolog genu *ced-9* z *Caenorabditis elegans*. Białko Bcl-2 jest zakotwiczone w zewnętrznej błonie mitochondrialnej i dzięki swej lokalizacji ma możliwość wpływania na przebieg apoptozy [20,21]. Dokładny mechanizm jego działania nie jest poznany, przypuszcza się, że może ono blokować któryś z kanałów błonowych otwieranych w trakcie apoptozy [1, 39]. Nie dochodzi wówczas do uwolnienia z matryks mitochondrialnej żadnego z dwóch opisanych wyżej czynników mogących aktywować kaspazy i powodować śmierć komórki [20]. Podwyższona ekspresja genu *bcl-2* zmniejsza wrażliwość komórek na czynniki wywołujące apoptozę.

Nie udało się dotychczas odpowiedzieć na pytanie, czy mitochondria zaangażowane są w śmierć komórek we wszystkich modelach apoptozy. Pojawiły się doniesienia, że rola mitochondriów w apoptozie zależy często od czynnika wywołującego śmierć i typu komórek [24].

3.3. Rola proteaz w realizacji programu apoptozy

Czynniki indukujące apoptozę prowadzą do aktywacji białek z rodziny proteaz cysteinowych, zwanych kaspazami [2, 33]. Aktywne kaspazy uczestniczą w degradacji szeregu białek, takich jak: polimeraza poli[ADP-rybozy] (PARP), kinazy białkowe PAK, FAK, białko retinoblastoma-RB, laminy jądrowe [23,27,28,31], zależna od DNA kinaza białkowa i duża podjednostka replisomu [37], fodryna i aktyna. PARP jest enzymem naprawy DNA i degradacja PARP w czasie apoptozy może blokować próby naprawy uszkodzeń DNA. Kinazy białkowe PAK (ang. *p21/Ras activated kinase*) regulują między innymi aktywność kinaz z rodziny MAP oraz są ważnymi regulatorami cytoszkieletu. Kinazy FAK (ang. *focal adhesion kinase*) uczestniczą w regulacji białek znajdujących się w płytkach adhezji komórkowej



RYSUNEK 3. Mechanizm aktywacji kaspazy 3 przez uwalniany z mitochondriów cytochrom c

i pełnią ważną rolę w przekazywaniu sygnałów inicjowanych przez integryny i neuropeptydy [30]. Proteoliza kinaz białkowych PAK i FAK przez kaspazy prowadzi do powstania ich stale aktywnych form i zaburzonej fosforylacji białek komórkowych [23,31]. Wydaje się, że prowadzi to do procesów, takich jak: fałdowanie się błon komórkowych (ang. *membrane blebbing*), rozpad płytek adhezyjnych, cofanie się wypustek i rozpad połączeń międzykomórkowych, które należą do pierwszych objawów apoptozy [23,31]. Z kolei degradacja aktyny i lamin jądrowych przez kaspazy, występująca na wczesnym etapie apoptozy, może być odpowiedzialna za uwolnienie endonukleaz, które uczestniczą we fragmentacji jądrowego DNA. Proteoliza jednej z podjednostek endonukleazy DFF-45 prowadzi do jej aktywacji [35], co jest prawdopodobnie przyczyną cięcia DNA na fragmenty wielkości nukleosomu i jego wielokrotności.

Kaspazy występują w komórkach w formie nieaktywnych proenzymów, które ulegają aktywacji proteolitycznej przez proteazy z tej samej rodziny bądź w drodze autokatalitycznej proteolizy. Mogą też aktywować inne proteazy włączając kaskadę

TABELA 1. Podział proteaz cysteinowych z rodziny ICE i CED3, ich substraty i inhibitory, skróty: PARP – polimeraza poli[ADP-rybozy]; SREBP – białko wiążące się z sekwencjami wrzliwymi na sterydy; snRNP – małe jądrowe białka wiążące RNA; DNA-PKs – zależne od DNA kinazy białkowe

| Kaspazy | Nazwa | Substraty | Inhibitory | |
|---------------|--|---|---|--|
| Rodzina ICE | 6 4 1 | ICE rel-III, TY TX, ICH-2, ICErel-2 ICE | pro-kaspaza -5 pre-IL-1 β pre-IL-1 β , spektryna, czynnik indukujący IF γ | Z-Vad-FMK CrmA (μ M) p35 Ac-YVAD-CHO |
| Rodzina CED-3 | 7 3 6 8 10 2 9 | Mch3, ICE-LAP3, CMH-1 CPP32, Yama, Apopain Mch2 MACH, FLICE, Mch5 Mch4 ICH-1 ICE-LAMP6, Mch6 | pro-kaspaza-7 hnRNP SREBP SREBP, DNA-PKs, aktyna lamina A pro-kaspazy PARP, spektryna PARP | Z-Vad-FMK CrmA (μ M) p35 Ac-DEVD-CHO |

sekwencyjnie uruchamianych proteaz (rys. 3 i tab. 1). Rolę proteaz w apoptozie komórek nerwowych potwierdzają wyniki badań na komórkach, w których zwiększono poziom inhibitora proteaz, białka wirusowego p35. Inhibitor proteaz blokował śmierć tych komórek indukowaną usunięciem glukozy, jonoforem wapniowym i usunięciem surowicy. Podobnie białko crmA (wirusowe białko hamujące silnie proteazy z rodziny ICE) blokowało śmierć neuronów ze zwojów współczulnych kurczenia indukowaną usunięciem NGF. Wraz z pojawieniem się syntetycznych peptydów hamujących specyficzne proteazy możliwa stała się identyfikacja swoistych dla danego procesu proteaz. Proteazy z rodziny ICE uczestniczą w apoptozie motoneuronów w czasie rozwoju rdzenia kręgowego kurczenia [33]; z kolei proteaza CPP-32 odgrywa ważną rolę w śmierci komórek ziarnistych mózdzku indukowanej przez usunięcie z pożywki surowicy i jonów potasu [11], a obie grupy proteaz uczestniczą w uśmiercaniu oligodendrocytów przez TNF-czynnik nekrozy nowotworu [14]. Oprócz proteaz z rodziny ICE i CED-3, także inne proteazy, takie jak kalpains, mogą odgrywać istotną rolę w apoptozie komórek nerwowych. Kalpains są enzymami proteolitycznymi występującymi w cytoplazmie komórek w formie nieaktywnej i ulegają aktywacji po znacznym wzroście stężenia wapnia. Wśród substratów kalpain wymienia się szereg białek cytoszkieletalnych i błonowych oraz

białka regulatorowe, takie jak kinaza C, fosfolipaza C, receptor nianodynowy i NMDA. Znaczny wzrost aktywności kalpain towarzyszy zmianom neurodegeneracyjnym w ischemii. Podawanie inhibitorów kalpain hamuje śmierć neuronów i ogranicza uszkodzenia mózgu [6].

4. CZYNNIK TRANSKRYPCYJNY AP-1 JAKO WŁĄCZNIK PROGRAMU APOPTOZY

Programowana śmierć komórek zgodnie z przyjętymi kryteriami jest procesem wymagającym syntezy nowych białek i aktywacji genów. W większości przypadków obserwuje się opóźnienie lub znaczne zahamowanie samobójczej śmierci komórek przez inhibitory biosyntezy RNA lub białek. Nic więc dziwnego, że wśród zidentyfikowanych do tej pory białek pełniących funkcję regulacyjną w procesie programowanej śmierci są także czynniki transkrypcyjne [12, 13]. Indukowalne czynniki transkrypcyjne to białka pojawiające się w komórkach tylko w określonych sytuacjach, wiążące się w obszarach regulatorowych swoistych genów i uruchamiające syntezę konkretnego mRNA. Szereg danych wskazuje, że jednym z czynników regulujących proces apoptozy jest kompleks transkrypcyjny AP-1 (ang. *activator protein-1*). W skład kompleksu wchodzi białka należące do rodziny Fos i Jun. Rola kompleksu AP-1 polega na stymulacji programu genetycznego dostosowującego komórkę do określonej sytuacji fizjologicznej w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne. Prowadząc badania nad mechanizmem aktywacji genomu podczas pobudzenia komórek nerwowych przez kainian stwierdziliśmy, że w mózgu zwierząt dochodziło do pojawiania się kompleksu AP-1 w kilka godzin po wywołaniu drgawek i po przejściowym zaniku kompleksu, nagromadzał się on ponownie w kilka dni później [19]. W tym samym czasie wykazaliśmy równocześnie z zespołem dr. Ben Ariego, że drgawki indukowane przez kainian wywołują śmierć komórek nerwowych w drodze apoptozy [16]. Tak więc indukcję kompleksu AP-1 można było powiązać z zainicjowaniem apoptotycznej śmierci komórek nerwowych.

Wyniki naszych dalszych badań sugerują, że kompleks AP-1 pojawiający się w umierających komórkach jest inny od tego, który wykrywamy w komórkach nerwowych po stymulacji fizjologicznej [26]. Nagromadzanie się w komórkach umierających ufosforylowanych białek c-Jun i ATF2 sugeruje, że tworzony przez nie kompleks AP-1 może odegrać ważną rolę w regulacji apoptozy. Wyniki badań nad przebiegiem śmierci komórek nerwowych po usunięciu NGF, potwierdzają bezpośrednio rolę białek c-Jun i kompleksu AP-1 w apoptozie. Jeżeli metodami inżynierii genetycznej wyłączy się w tych komórkach czynnik AP-1 w trakcie procesu apoptozy (przez wprowadzenie dominującego negatywnego mutantu c-Jun), proces apoptozy jest zablokowany i nie dochodzi do uśmiercenia komórek nerwowych

[12, 13]. Aktywacja czynnika AP-1, a zwłaszcza akumulacja białka c-Jun w komórkach apoptotycznych nie jest zjawiskiem ograniczonym do wymienionych sytuacji modelowych, bowiem towarzyszy również śmierci komórek nerwowych po niedokrwieniu mózgu, w chorobie Alzheimera i Huntingtona [4, 9, 10, 18]. Choć rola czynnika AP-1 w regulacji apoptozy nie jest do końca poznana, wyniki ostatnio opublikowanych badań rzucają nowe światło na ten problem. Stwierdzono, że ekspresja białka c-Jun i jego ufosforylowanej formy w trakcie neurodegeneracji, koreluje z podwyższoną ekspresją białka zwanego Fas ligandem (FasL) [18]. Białko FasL należy do rodziny białek TNF (czynnik nekrozy nowotworów) i podobnie jak TNF jest czynnikiem indukującym apoptozę w wielu typach komórek mających na swojej powierzchni receptor, białko Fas (zwane też CD95, APO) [5]. Białko Fas w części cytoplazmatycznej ma domeny zwane *death domains*, które są odpowiedzialne za wiązanie białek adaptorowych uruchamiających proces śmierci. Wiązanie się FasL występującego jako trimer, indukuje trimeryzację błonowych białek Fas, co z kolei pobudza białka adaptorowe FADD (ang. *Fas Associated Death Domain*) i aktywuje kaspazę 8. Aktywacja tej kaspazy uruchamia kaskadę proteaz z rodziny ICE, które realizują program degradacji różnych substratów komórkowych, którego kulminacją jest degradacja jądrowego DNA [5].

5. PODSUMOWANIE

Poznanie molekularnego podłoża zjawisk neurodegeneracyjnych jest niezbędnym warunkiem podejmowania działań prewencyjnych bądź leczniczych. Fakt, że apoptoza, w przeciwieństwie do nekrozy, jest procesem czasochłonnym, wymagającym często syntezy nowych genów i białek stwarza szereg możliwości terapeutycznych. Choć nie we wszystkich schorzeniach neurodegeneracyjnych śmierć komórek ma charakter wyłącznie apoptyczny, większość badaczy zgadza się, że właśnie ten proces ma znaczenie dominujące w zjawiskach ekscytotoksyczności oraz chorobach Alzheimera, Parkinsona, stwardnieniu rozsianym bocznym, demencjach skojarzonych z AIDS i być może w starzeniu mózgu. Podejmuje się próby protekcji komórek nerwowych przed śmiercią w intensywnie badanym zjawisku ekscytotoksyczności przez stosowanie blokerów uwalniania GLU, blokerów receptorów NMDA i kanałów wapniowych. Doświadczalnie testuje się substancje blokujące powstawanie wolnych rodników tlenowych. Dzięki temu, że zidentyfikowano kilka białek wirusowych, które są naturalnymi inhibitorami proteaz apoptotycznych z grupy ICE, testuje się ich skuteczność w zapobieganiu apoptozie.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ADAMS JM, CORY S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; **281**: 1322–1325.
- [2] ALNEMRI ES. Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem* 1997; **64**: 33–42.
- [3] ANKARCRONA M, DYPBUKT JM, BONFOCO E, ZHIVOTOVSKY B, ORRENIUS S, LIPTON SA, NICOTERA P. Glutamate-induced neuronal cell death: A succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 1995; **15**: 961–973.
- [4] ANDERSON AJ, SU JH, COTMAN CW. DNA damage and apoptosis in Alzheimer's disease: colocalization with c-Jun immunoreactivity, relationship to brain area, and effect of postmortem delay. *J Neurosci* 1996; **16**: 1710–1719.
- [5] ASHKENAZIA, DIXIT VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; **281**: 1305–1308.
- [6] BARTUS RT, ELLIOTT PJ, HAYWARD NJ, DEAN RL, HARBESON S, STRAUB JA, LI Z, POWERS JC. Calpain as a novel target for treating acute neurodegenerative disorders. *Neurol Res* 1995; **17**: 249–258.
- [7] BONFOCO E, ANKARCRONA M, NICOTERA P, LIPTON SA. Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced respectively by mild and intense insults with NMDA or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 162–167.
- [8] CHARRIAUT-MARLANQUE C, AGGOUN-ZOUAOUI D, REPRESA A, BEN-ARI Y. Apoptotic features of selective neuronal death in ischemia, epilepsy and gp120 toxicity. *Trends Neurosci* 1996; **19**: 109–114.
- [9] DRAGUNOW M, YOUNG D, HUGHES D, MACGIBBON G, LAWLOR P, SINGLETON K, SIRIMANNE E, BEILHARZ E, GLUCAN P. Is c-Jun involved in nerve cell death following status epilepticus and hypoxic-ischemic brain injury? *Mol Brain Res* 1993; **18**: 347–352.
- [10] DRAGUNOW M, PRESTON K. The role of inducible transcription factors in apoptotic nerve cell death. *Brain Res Rev* 1995; **21**: 1–28.
- [11] ELDADAH BA, YAKOVLEV AG, FADEN AI. The role of CED-3-related cysteine proteases in apoptosis of cerebellar granule cells. *J Neurosci* 1997; **17**: 6105–6113.
- [12] ESTUS S, ZAKS WJ, FREEMAN RS, GRUDA M, BRAVO R, JOHNSON EM. Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. *J Biol Chem* 1994; **269**: 1717–1727.
- [13] HAM J, BABIJ C, WHITFIELD J, PFARR CM, LALLEMAND D, YANIV M, RUBIN LL. A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron* 1995; **14**: 927–939.
- [14] HISAHARA S, SHOJI S, OKANO H, MIURA M. ICE/CED-3 family executes oligodendrocyte apoptosis by Tumor Necrosis Factor. *J Neurochem* 1997; **69**: 10–20.
- [15] ELLERBY HM, MARTIN SJ, ELLERBY LM, NAIEM SS, RABIZADEH S, SALVESEN GS, CASIANO CA, CASHMAN NR, GREEN DR, BREDESEN DE. Establishment of a cell-free system of neuronal apoptosis: comparison of premitochondrial, mitochondrial, and postmitochondrial phases. *J Neurosci* 1997; **17**: 6165–6178.
- [16] FILIPKOWSKI RK, HETMAN M, KAMIŃSKA B, KACZMAREK L. DNA fragmentation in rat brain after intraperitoneal administration of kainate. *NeuroReport* 1994; **5**: 1538–1540.
- [17] GREEN DR, REED JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; **281**: 1309–1311.
- [18] HERDEGEN T, CLARET FX, KALLUNKI T, MARTIN-VILLALBA A, WINTER C, HUNTER T, KARIN M. Lasting N-terminal phosphorylation of c-Jun and activation of c-Jun N-terminal kinases after neuronal injury. *J Neurosci* 1998; **18**: 5124–5135.
- [19] KAMIŃSKA B, FILIPKOWSKI RK, ZURKOWSKA G, LASON W, PRZEWLOCKI R, KACZMAREK L. Dynamic changes in composition of AP-1 transcription factor DNA binding

- activity in rat brain following kainate induced seizures and cell death. *Eur J Neurosci* 1994; **6**: 1558–1566.
- [20] KLUCK RM, BOSSY-WETZEL E, GREEN DR, NEWMAYER DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; **275**: 1132–1136.
- [21] KROEMER G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 1997; **3**: 614–620.
- [22] LEIST M, NICOTERA P. Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp Cell Res* 1998; **239**: 183–201.
- [23] LEVKAU B, HERREN B, KOYAMA H., ROSS R, RAINES EW. Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125 FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 1998; **187**: 579–586.
- [24] LI P, NIJHAWAN D, BUDI HARDJO I, SRINIVASULA SM, AHMAD M, ALNEMRI ES, WANG X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; **91**: 479–489.
- [25] LIU X, KIM CN, YANG J, JEMMERSON R, WANG X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; **86**: 147–157.
- [26] MOSIENIAK G., FIGIEL I., KAMINSKA B. Cyclosporin A, an immunosuppressive drug, induces programmed cell death in rat C6 glioma cell by a mechanism that involves the AP-1 transcription factor. *J Neurochem* 1997; **68**: 1142–1149.
- [27] ORTH K, O'ROURKE K, SALVESEN GS, DIXIT VM. Molecular ordering of apoptotic mammalian CED-3/ICE-like proteases. *J Biol Chem* 1996; **271**: 20977–20980.
- [28] ORTH K, CHINNAIYAN AM, GARG M, FROELICH CJ, DIXIT VM. The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J Biol Chem* 1996; **271**: 16443–16446.
- [29] REED JC. Cytochrome c: can't live with it – can't live without it. *Cell* 1997; **91**(5): 559–562.
- [30] ROZENGURT E. Convergent signalling in the action of integrins, neuropeptides, growth factors and oncogenes. *Cancer Surv* 1995; **24**: 81–96.
- [31] RUDEL T, BOKOCH GM. Membrane and morphological changes in apoptogenic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 1997; **276**: 1571–1574.
- [32] SCARLETT JL, MURPHY MP. Release of apoptogenic proteins from the mitochondrial intermembrane space during the mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* 1997; **418**: 282–286.
- [33] SCHWARTZ LM, MILLIGAN CE. Cold thoughts of death: the role of ICE proteases in neuronal cell death. *TINS* 1996; **19**: 555–561.
- [34] STELLER H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; **267**: 1445–1462.
- [35] TANG D, KIDD VJ. Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis. *J Biol Chem* 1998; **273**: 28549–28552.
- [36] THOMPSON CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; **267**: 1456–1462.
- [37] UBEDA M, HABENER JF. The large subunit of the DNA replication complex C (DSEB/RF-C140) cleaved and activated by caspase-3 (CPP32/YAMA) during Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997; **272**: 19562–19568.
- [38] Van der HEIDEN MG, CHANDEL NS, WILLIAMSON EK, SCHUMACKER PT, THOMPSON CB. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 1997; **91**: 627–637.
- [39] YANG J, LIU X, BHALLA K, KIM CN, IBRADO AM, CAI J, PENG TI, JONES DP, WANG X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; **275**: 1129–1132.
- [40] ZORATTI M, SZABO I. The mitochondrial permeability transition. *Bioch Bioph Acta* 1995; **1241**: 139–176.

JONY WAPNIA I APOPTOZA

CALCIUM IONS AND APOPTOSIS

Jacek KUŹNICKI¹, Monika PUZIANOWSKA-KUŹNICKA²

¹Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Warszawa

²Instytut Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,
Zakład Endokrynologii, Warszawa

Streszczenie: W pracy opisano komórkowe enzymy i szlaki metaboliczne, które aktywowane są przez jony wapnia i których aktywacja może prowadzić do apoptozy. Przedstawiono również neurotoksyczne działanie jonów wapnia towarzyszące zjawiskom ekscytotoksyczności oraz toksyczności substancji, takich jak: metale ciężkie, białka HIV, priony i β -amyloid. Podano informacje o presenilinach, których mutacja może powodować wczesne pojawienie się choroby Alzheimera oraz o białkach wiążących wapń, które mogą przyspieszać lub opóźniać apoptozę neuronów.

Słowa kluczowe: apoptoza, neurotoksyczność, jony wapnia, białka wiążące wapń, preseniliny, choroba Alzheimera

Summary: Cellular enzymes and metabolic pathways that are activated by calcium ions, and activation of which may induce apoptosis, are described in this paper. Neurotoxic action of calcium ions associated with excitotoxicity, toxicity of different substances such as heavy metals, HIV proteins, prions, and β -amyloid are presented. Presenilins, the mutations of which may cause an early onset of Alzheimer's disease, as well as the involvement of Ca^{2+} -binding proteins in a process of induction and inhibition of apoptosis are described.

Key words: apoptosis, neurotoxicity, calcium ions, calcium binding proteins, presenilins, Alzheimer's disease

WSTĘP

Jony wapnia w organizmach eukariotycznych pełnią wiele istotnych funkcji, przy czym do szczególnie ważnych należy ich udział w przekazywaniu sygnałów

komórkowych [38, 43]. Jest to możliwe dzięki utrzymywaniu przez komórkę gradientu stężeń jonów wapnia między jej wnętrzem, gdzie stężenie wynosi około 100 nM, a środowiskiem zewnętrznym, gdzie wynosi ono 1,3–1,8 mM [62].

W zdrowych komórkach eukariotycznych poziom jonów wapnia jest precyzyjnie regulowany przestrzennie i czasowo, zależnie od ich stanu fizjologicznego. Pod wpływem odpowiednich czynników aktywujących, ich poziom wzrasta w określonych rejonach komórki i powoduje aktywację procesów od nich zależnych. W sytuacjach patologicznych często obserwuje się podwyższenie poziomu jonów wapnia. Prowadzi to do zaburzenia funkcjonowania komórek na skutek nadmiernej aktywacji niektórych procesów, a w sytuacjach ekstremalnych – do śmierci komórki przez nekrozę lub apoptozę [5, 46]. Indukowana przez jony wapnia toksyczność komórkowa występuje w różnych zjawiskach neuropatologicznych zarówno w przewlekłych chorobach neurodegeneracyjnych, jak i w stanach ostrych, np. przy udarach mózgu. Apoptoza komórek nerwowych, zachodząca w okresie normalnego rozwoju osobniczego, również charakteryzuje się zmienioną homeostazą wapniową i podwyższonym poziomem jonów wapnia.

To, jakie stężenie jonów wapnia jest dla komórki toksyczne, zależy od różnych czynników, m.in. od drogi, którą wapń dostał się do komórki, a także od jej stanu fizjologicznego wyznaczającego optymalny i toksyczny zakres stężeń jonów wapnia [37, 78]. Według hipotezy neuronalnego *set-point*, również i to, czy dane stężenie jonów wapnia włączy proces apoptozy, czy nekrozy, zależy od wyjściowego stanu fizjologicznego komórki, a w szczególności od poziomu ATP i zdolności do dalszego jego wytwarzania [2, 47]. Innymi słowy, o losie komórki poddanej działaniu patologicznego stresu decyduje nie tylko bezwzględny poziom jonów wapnia, ale i sprawność mitochondriów.

W pierwszej części artykułu opisane będą komórkowe enzymy i szlaki metaboliczne, które aktywowane są przez nadmiar jonów wapnia i których aktywacja może prowadzić do apoptozy (choć trzeba pamiętać, że w szczególnych sytuacjach niedobór jonów wapnia może również okazać się czynnikiem indukującym apoptozę) [33, 60]. Następnie opisany będzie udział jonów wapnia w różnych stanach neurotoksyczności, takich jak: ekscytotoksyczność, toksyczność metali ciężkich, białek HIV, prionów, a także toksyczność β -amyloidu w chorobie Alzheimera. Opisanie też będą wyniki najnowszych prac dotyczących presenilin, tj. białek występujących w retikulum endoplazmatycznym i biorących udział w utrzymywaniu homeostazy wapniowej, których mutacja „uczula” neurony na patologiczne zjawiska zachodzące w chorobie Alzheimera. W ostatniej części przedstawione będą białka wiążące wapń, które przejawiają aktywność proapoptotyczną, np. ALG-2 [83] oraz takie, które (przynajmniej *in vitro*) mogą hamować zmiany apoptyczne, np. kalbindyna D28k [24] i kalretynina [39, 41].

ENZYMY I UKŁADY EFEKTOROWE AKTYWOWANE PRZEZ JONY WAPNIA

Niefizjologicznie wysokie stężenie jonów sodu może uśmiercić komórkę bezpośrednio, tj. przez efekt osmotyczny, natomiast zbyt wysokie stężenie jonów wapnia uśmierca komórkę pośrednio, przez aktywację różnych enzymów i szlaków metabolicznych. Syntaza tlenu azotu, niektóre enzymy hydrolityczne, oksydaza ksantynowa, kinazy białkowe regulujące transkrypcję, transglutaminazy oraz enzymy mitochondriów i składniki cytoszkieletu są białkami, które wydają się odgrywać szczególną rolę w zależnych od jonów wapnia procesach destrukcyjnych zachodzących w komórce.

Niektóre izoformy syntazy tlenu azotu aktywowane są przez jony wapnia za pośrednictwem kalmoduliny. Tak właśnie, w wyniku zwiększonej produkcji tlenu azotu, wysoki poziom jonów wapnia działa toksycznie na komórki ziarniste mózdzku [45]. Nie wszystkie jednak neurony są jednakowo wrażliwe na podwyższony poziom NO będący skutkiem podwyższenia poziomu jonów wapnia. W niektórych neuronach kory mózgowej nawet znacznie podwyższony poziom tlenu azotu nie wywołuje zmian apoptotycznych [36].

Co najmniej trzy typy hydrolaz: proteazy, DNAzy i lipazy wydają się brać udział w toksyczności inicjowanej przez jony wapnia. Kalpains są proteazami zależnymi od jonów wapnia, które występują w jądrze i w cytoplazmie i które prawdopodobnie biorą udział w śmierci komórek wątroby i mózgu [8, 66]; nieznanym jest jednak mechanizm ich działania. Znane są dwie formy kalpain: jedna aktywowana jest przez niskie stężenia jonów wapnia, a druga – przez wysokie stężenia tego kationu. Za degradację DNA, obserwowaną w czasie apoptozy, odpowiedzialne są DNAzy wrażliwe na jony wapnia. Dotychczas nie udało się jednak wyizolować enzymu odpowiedzialnego za powstawanie charakterystycznej dla apoptozy „drabinki” produktów trawienia DNA [7]. Udział zależnej od jonów wapnia fosfolipazy A₂ w toksyczności komórkowej wiąże się z jej pośrednim udziałem w tworzeniu reaktywnych związków tlenu (tzw. ROS) oraz w tworzeniu związków wpływających na strukturę błon komórkowych. Ponadto, uwalniany pod wpływem fosfolipazy A₂ kwas arachidonowy hamuje pobieranie glutamianu przez neurony i komórki gleju, przez co wydłuża ekscytotoksyczne działanie tego transmitera [84]. W czasie długotrwałego wzrostu stężenia jonów wapnia dehydrogenaza ksantynowa może ulec przekształceniu w oksydazę ksantynową i w efekcie, zamiast przenosić elektrony na dwunukleotydy nikotynoadeninowe, przenosi je na cząsteczki tlenu. Prowadzi to do powstania dużej ilości ROS. Ten mechanizm jest odpowiedzialny za śmierć neuronów m.in. na skutek niedokrwienia [13, 17].

Udział mitochondriów w cytotoxyczności indukowanej jonami wapnia jest złożony. Zasadniczo mitochondria mogą kumulować pewną ilość jonów wapnia i obniżać ich stężenie w cytoplazmie, zapobiegając ich toksycznemu działaniu [69].

W pewnych warunkach jednak, zamiast akumulować jony wapnia, mitochondria je wydzielają. Z drugiej strony, zbyt duża akumulacja jonów wapnia przez mitochondria prowadzi do upośledzenia funkcji tych organelli i zmniejszenia syntezy ATP [6, 70].

Nie tylko długotrwały wzrost stężenia jonów wapnia może mieć dla komórki niekorzystne następstwa. Również krótkotrwały wzrost stężenia jonów wapnia może aktywować szlaki metaboliczne związane ze stopniem ufosforylowania czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za ekspresję różnych genów [21]. Można wyróżnić co najmniej 4 szlaki fosforylacji/defosforylacji, których aktywacja może wywoływać zmiany prowadzące do śmierci neuronów. Są to szlaki: kinaz białkowych II i IV zależnych od kalmoduliny; cyklaz adenylowych zależnych od jonów wapnia; kinaz białkowych C oraz kalcyneuryny (fosfatazy zależnej od jonów wapnia). Ekspresja genów, która zachodzi w zależności od jonów wapnia, dokonuje się za pośrednictwem różnych szlaków sygnałowych. Biorą w nich udział m.in. wyżej wymienione enzymy, które ostatecznie doprowadzają do aktywacji transkrypcji za pośrednictwem przynajmniej dwóch elementów regulatorowych znajdujących się w promotorach genów, tzw. CRE oraz SRE [27]. CRE jest „wrażliwym na zmiany stężenia Ca i cAMP” fragmentem DNA, z którym wiąże się czynnik transkrypcyjny CREB. Fosforylacja tego czynnika aktywuje promotory różnych genów (w tym genu *c-fos*) [3, 21, 22]. Fosforylacja CREB zachodzi przede wszystkim pod wpływem zwiększenia w jądrze komórkowym poziomu jonów wapnia. SRE jest elementem DNA „wrażliwym na surowicę”, a fosforylacja czynników transkrypcyjnych z nim się wiążących zachodzi przede wszystkim pod wpływem zwiększonego poziomu jonów wapnia w cytozolu.

Transglutaminazy tkankowe to enzymy zależne od jonów wapnia, które katalizują reakcję sieciowania białek w czasie apoptozy [18]. Ich działanie może ograniczać liczę neuronów w czasie niedokrwienia dzięki ograniczaniu uwalniania glutamianu.

Cytoskielet komórki ulega modyfikacjom pod wpływem jonów wapnia, które albo wiążą się bezpośrednio z niektórymi białkami, albo wpływają na poziom ich fosforylacji i polimeryzacji [60]. Podwyższony poziom jonów wapnia aktywuje proteazy, które hydrolizują białka cytoskieletu oraz białka łączące cytoskielet z błonami. Ponadto, zmiany w organizacji cytoskieletu zmieniają aktywność białek błonowych: kanałów jonowych i receptorów.

NEUROTOKSYCZNE DZIAŁANIE JONÓW WAPNIA

Ekscytotoksyczność

Ekscytotoksycznością nazywamy zjawisko zachodzące w neuronach lub w miocytach, które pojawia się na skutek stymulacji wykraczającej poza parametry fizjologiczne (stymulacja zbyt długa albo zbyt intensywna). Zjawisko ekscyto-

toksyczności obserwuje się m.in. w zatorach i uszkodzeniach mózgu oraz ostrych zatruciach np. tlenkiem węgla [10, 49]. W ośrodkowym układzie nerwowym głównym stymulatorem powodującym neurodegenerację jest glutaminian. Wzrost stężenia glutaminianu w przestrzeni synaptycznej stymulowanych elektrycznie neuronów hipokampa może powodować wzrost stężenia jonów wapnia w tych komórkach [79]. Zjawisko to może wyjaśniać śmierć neuronów w warunkach ekscytotoksyczności. Glutaminian powoduje zwiększenie stężenia jonów wapnia za pośrednictwem wielu różnych mechanizmów. Jednym z nich jest bezpośrednia stymulacja kanałów wapniowych połączonych z receptorem NMDA [73]. Inne mechanizmy to m.in.: aktywacja innych receptorów połączonych z kanałami wapniowymi; zwiększenie stresu oksydacyjnego przez hamowanie pobierania cysteiny [61, 67]; aktywacja kanałów wapniowych zależnych od potencjału.

Istnieją co najmniej trzy rodzaje dowodów wskazujących na to, że jony wapnia pełnią kluczową rolę w ekscytotoksyczności. Pierwszym jest fakt, że wzrost stężenia jonów wapnia obserwowany jest we wszystkich znanych modelach ekscytotoksyczności prowadzącej do śmierci komórek: niedokrwieniu mózgu [74], w skrawkach mózgu poddanych działaniu agonistów receptorów NMDA [34] lub niedotlenieniu [20]. Drugim jest możliwość zapobieżenia śmierci neuronów w różnych przypadkach neurotoksyczności przez uniemożliwienie wnikania jonów wapnia do komórek. Efekt ten osiągnąć można zmniejszając stężenie jonów wapnia w środowisku zewnątrzkomórkowym [28] lub farmakologicznie hamując kanały wapniowe połączone z receptorami dla glutaminianu [12, 76] lub kanały wapniowe wrażliwe na zmiany potencjału. Trzecią grupę dowodów stanowi fakt, że zahamowanie procesów biologicznych, aktywowanych przez nadmiar jonów wapnia, zapobiega neurotoksyczności. Przykładowo – wewnątrzkomórkowe chelatory jonów wapnia zapobiegają uszkodzeniom na skutek niedokrwienia *in vitro* [81], a zahamowanie aktywności kalmoduliny [52], kalcyneuryny [53] lub syntazy tlenu azotu chroni neurony przed toksycznym działaniem pobudzających aminokwasów [15].

Różne aspekty związku między ekscytotoksycznością a jonami wapnia nie są do końca wyjaśnione. Przykładowo – w niektórych modelach nie obserwuje się ilościowej korelacji między zwiększonym poziomem jonów wapnia a ekscytotoksycznością. Skomplikowana kinetyka wzrostu stężenia jonów wapnia, wpływ jonów wapnia na własną homeostazę oraz złożoność wzajemnych zależności między poziomem glutaminianu a jonami wapnia tworzą tak skomplikowany układ, że jest on trudny do pełnego zrozumienia i opisanie.

Toksyczność metali ciężkich

Niektóre metale, np. cyna i miedź, mogą wywoływać procesy neurodegeneracji pośrednio zaburzając homeostazę wapniową. Ich działanie polega m.in. na oddziaływaniu na białka biorące udział w transporcie jonów wapnia, na zastępowaniu

jonów wapnia połączonych z białkami oraz na modyfikacji aktywności szlaków prowadzących syntezę przekaźników drugiego rzędu, wpływających na procesy zależne od jonów wapnia [82]. Zaburzona homeostaza wapniowa w efekcie końcowym powoduje niewłaściwe uwalnianie neurotransmiterów i „uczulenie” na inne czynniki proapoptyczne [65, 82].

Toksyczność białek i peptydów

Białko wirusa HIV – gp120 wywołuje apoptozę neuronów *in vivo* i *in vitro* [4, 63], prowadząc do przeładowania komórek jonami wapnia. Zablockowanie kanałów wapniowych zapobiega neurotoksyczności indukowanej przez to białko [48, 50].

Z kolei priony wywołują apoptozę neuronów *in vivo* i *in vitro*, ale mechanizm ich działania nie jest wyjaśniony. W hodowlach neuronów, pod wpływem prionów, obserwuje się indukcję powstawania ROS oraz wnikanie jonów wapnia przez kanały wapniowe związane z receptorem NMDA [9, 64]. Spekuluje się nawet, że przekształcenie białka normalnego w formę infekcyjną, czyli prion, jest związane z chronicznym nadmiarem jonów wapnia.

Objawy kliniczne choroby Alzheimera są skutkiem neurodegeneracji, której przyczyna nie jest wyjaśniona. Istnieje kilka genów, których mutacja wydaje się wpływać na wczesne pojawienie się choroby Alzheimera. Czynnikiem, który prawdopodobnie indukuje zmiany patologiczne w tej chorobie, jest peptyd zwany β -amyloidem, powstający z białka APP [54]. Apoptozę neuronów można wywołać *in vitro* podając β -amyloid, który powoduje nadmierny napływ jonów wapnia do komórek [58]. Można też ją powstrzymać przez zablockowanie wpływu wapnia do wnętrza neuronów. Toksyczność β -amyloidu znacznie się zwiększa pod wpływem czynników powodujących uszkodzenie mózgu w czasie niedokrwienia, takich jak podwyższone stężenia pobudzających aminokwasów oraz obniżone stężenie glukozy. Spekuluje się, że choroba Alzheimera jest związana z chroniczną i wyjątkowo długotrwałą formą ekscytotoksyczności powodowanej przez β -amyloid [72, 54, 58]. Inne możliwe przyczyny tej choroby to:

- niewłaściwy metabolizm białka apoE4, biorącego udział w transporcie cholesterolu;
- mutacje białek presenilin będących składnikiem retikulum endoplazmatycznego oraz
- mutacje genu kodującego białko zwane α 2-makroglobuliną.

Podejrzuwa się, że co najmniej 30% chorych z wczesną formą choroby Alzheimera może mieć tę mutację.

PRESENILINY I CHOROBA ALZHEIMERA

Stosując model doświadczalny oparty na założeniu, że transfekcja komórek odpowiednim cDNA zapobiegnie apoptozie, wykryto dwa geny biorące udział w programowanej śmierci limfocytów T. Nazwano je *ALG-2* i *ALG-3* [14, 83]. Okazało się, że *ALG-2* koduje białko wiążące jony wapnia i działające jako induktor apoptozy, natomiast *ALG-3* może apoptozę blokować. *ALG-3* jest mysim homologiem ludzkiego białka PS-2, którego gen znajduje się na chromosomie 1 i jest znany jako gen rodzinnej formy choroby Alzheimerera. PS-1 i PS-2 są białkami zwanymi presenilinami i występują głównie w retikulum endoplazmatycznym neuronów [56, 57]. Występują one w mniejszej ilości w innych komórkach i być może znajdują się również na zewnętrznej stronie błony komórkowej. Preseniliny są białkami błonowymi zawierającymi osiem domen przechodzących przez błonę. Funkcja obu presenilin (są w 67% identyczne) nie jest wyjaśniona, ale na podstawie danych eksperymentalnych uważa się, iż biorą one udział w metabolizmie białka APP będącego prekursorem β -amyloidu oraz w regulacji homeostazy wapniowej retikulum endoplazmatycznego. Homologia do obecnego w *C. elegans* genu *sel-12*, który bierze udział w szlaku sygnałowym Notch, oraz fenotypowe podobieństwo myszy pozbawionych genu *PS-1* do myszy pozbawionych genu *Notch* sugerują, że preseniliny biorą udział w procesie rozwoju układu nerwowego. Mutacje presenilin zostały wykryte w przypadkach wczesnej rodzinnej choroby Alzheimerera. Choroba związana z mutacją preseniliny 1 pojawia się wcześniej, bo w wieku 30–50 lat, podczas gdy typowo choroba ta pojawia się w przedziale wieku 65–85 lat, a z mutacją preseniliny 2 – w wieku 50–65 lat. W różnych rodzinach mutacje dotyczą różnych aminokwasów, ale głównie zlokalizowane są w dwóch regionach: drugiej domenie przechodzącej przez błonę oraz w pobliżu hydrofilowej pętli. Ekspresja zmutowanych presenilin w hodowanych komórkach indukowała powstawanie neurotoksycznej formy β -amyloidu. Mutacje presenilin „uczulają” neurony na działanie czynników apoptycznych, takich jak niedobór czynników troficznych czy działanie β -amyloidu. Mechanizm proapoptycznych efektów mutacji presenilin polega na zaburzeniu uwalniania jonów wapnia z retikulum endoplazmatycznego i stresie oksydacyjnym. W komórkach PC-12, zawierających zmutowaną presenilinę 1, uwalnianie wapnia z retikulum endoplazmatycznego pod wpływem agonistów kanałów wapniowych lub tapsigarginy, inhibitora ATPazy wapniowej tego organellum, jest zwiększone. Natomiast dandrolen, inhibitor uwalniania jonów wapnia z retikulum endoplazmatycznego, chroni komórki PC12 zawierające zmutowaną presenilinę 1 przed apoptozą indukowaną β -amyloidem. Podobnie działa nifedipina, inhibitor zależnych od napięcia kanałów wapniowych.

Mutacja preseniliny 1 zaburzając homeostazę wapniową uwrażliwia komórki na apoptozę zależną od funkcji mitochondriów [26, 35]. Przykładowo – komórki PC12 zawierające zmutowaną formę preseniliny 1 wykazują zwiększoną wrażliwość

na czynniki apoptyczne hamujące dehydrogenazę bursztynianową. Natomiast takie czynniki, jak glutation czy cyklosporyna A, znoszą efekt mutacji presenilin wskazując, że śmierć tych komórek wywołują reaktywne związki tlenu oraz kaspazy, proteazy biorące udział w apoptozie. W tym świetle interesujący jest fakt, że preseniliny są substratami dla kaspaz. Zaburzenie uwalniania wapnia przez retikulum endoplazmatyczne zawierające zmutowaną presenilinę wpływać może hamująco na aktywność czynnika transkrypcyjnego NF κ B, prowadząc do apoptozy [25]. Aktywacja NF κ B przez czynnik działający ochronnie, zwany sAPP- α , chroni je przed apoptozą. W komórkach PC12 zawierających zmutowaną formę preseniliny 1 zaburzeniu ulegają procesy różnicowania pod wpływem NGF, czego efektem jest m.in. zmniejszona wielkość neurytów [23]. W komórkach tych wiązanie się czynnika transkrypcyjnego AP1 z DNA, zachodzące pod wpływem NGF, jest również znacząco zmniejszone [19]. Sugeruje to, że mutacja preseniliny 1 zmienia szlaki sygnałowe w komórkach różnicujących się pod wpływem NGF.

ROLA BIAŁEK WIĄZĄCYCH WAPŃ

ALG-2 jest białkiem wiążącym wapń potrzebnym do apoptozy w limfocytach T. Wykazano, że działanie ALG-2 nie jest związane z aktywnością proteazy ICE/Ced-3. Świadczy to o tym, że ALG-2 bierze udział w szlaku apoptozy po etapach, w których biorą udział proteazy zależne od jonów wapnia [44]. ALG-2 jest białkiem należącym do rodziny białek zawierających motywy *EF-hand* [11, 42]. Zawiera pięć takich motywów i tworzy osobną klasę białek wraz z sorcyną (białkiem indukowanym w nowotworach wykazujących oporność wielolekową), grankalcyną (biorącą udział w fuzji błon w neutrofilach) oraz podjednostką kalpajny (zależnej od jonów wapnia proteazy) [51]. Funkcja tych białek nie jest wciąż wyjaśniona.

Wśród białek wiążących wapń związanych z apoptozą w układzie nerwowym uwagę zwracają kalbindyna D28k i kalretynina, zawierające po sześć motywów *EF-hand*. Kalbindyna D28k występuje w niektórych neuronach mózgu i jest jej dużo w komórkach Purkiniego [1, 16, 29]. Kalretynina również występuje w dużej ilości w neuronach, najczęściej jednak w innych niż kalbindyna D28k, i nie ma jej w komórkach Purkiniego [68, 71, 85]. Funkcja tych białek nie jest znana, ale wiele danych wskazuje, że mogą one chronić neurony przed nadmiarem jonów wapnia. Według jednej z hipotez ich działanie ochronne związane jest z buforowaniem jonów wapnia wnikających do komórek w wyniku przedłużonej ich aktywacji [29, 32, 71]. Dane na ten temat są jednak niespójne. Według innej hipotezy kalretynina chroni neurony przed nadmiarem wapnia uczestnicząc w niezidentyfikowanym jeszcze szlaku metabolicznym, pełniąc podobnie jak kalmodulina funkcje

sensora wrażliwego na wapń, aktywującego określony enzym w tym szlaku [40]. Pokazano, że *in vitro* zarówno kalretynina, jak i kalbindyna D28k mogą działać jako czynniki zapobiegające apoptozie. Kalbindyna D28k blokowała apoptozę w komórkach PC12 zawierających zmutowaną formę preseniliny 1. W komórkach tych wzrost stężenia jonów wapnia, powstawanie wolnych rodników i zaburzenie funkcjonowania mitochondriów, indukowane przez β -amyloid, były znacząco zmniejszone w obecności zwiększonej ilości kalbindyny D28k [24]. Podobnie, pojawienie się zwiększonej ilości kalretyniny w komórkach PC12 hamowało apoptozę indukowaną brakiem czynników troficznych lub obecnością jonoforu wapnia A23178 [39, 41]. Obserwacje te potwierdzają, że zaburzenia poziomu jonów wapnia oraz białka wiążące wapń pełnią istotną rolę w procesach prowadzących do apoptozy.

INNE CZYNNIKI CHRONIĄCE PRZED APOPTOZĄ

Oprócz białek wiążących wapń, które mogą opóźniać lub wręcz hamować procesy apoptotyczne, opisano inne czynniki, które działają podobnie i mogą chronić neurony przed toksycznym działaniem wapnia. Jednym z takich czynników są związki chelatujące, które zapobiegają nadmiernemu wzrostowi stężenia jonów wapnia [80, 81]. Mogą to być również blokery kanałów wapniowych, np. flunaryzyna hamująca kanały zależne od potencjału [77]. Inną grupę związków stanowią czynniki troficzne, np. NGF [59]. Ochronne działanie tego czynnika może być związane np. z ustaleniem stanu równowagi wapniowej w komórce na wyższym poziomie, zwiększoną syntezą białek ochronnych, np. kalbindyny D28k, czy hamowanie syntezy tlenu azotu. Jeszcze inną grupę związków chroniących neurony przed apoptozą stanowią cząsteczki macierzy pozakomórkowej [30]. Niektóre z tych cząsteczek mogą wiązać jony wapnia na zewnątrz błony komórkowej, stanowiąc magazyn wapnia [31, 75]. Cząsteczki macierzy mogą również działać tak jak czynniki troficzne, wpływać na rozwój neurytów i indukować sygnały wewnątrzkomórkowe. Ich działanie ochronne może polegać na podnoszeniu poziomu jonów wapnia przez zmianę poziomu *set point* wymaganego do przeżycia komórek.

PODSUMOWANIE

Hipoteza *calmortalin* zakłada, że rozregulowanie homeostazy wapniowej jest kluczowym etapem w procesach prowadzących do śmierci komórki nerwowej w drodze apoptozy [5]. Istnieje wiele danych potwierdzających tę hipotezę. Złożoność działania jonów wapnia powoduje, że zrozumienie działania wszystkich mechanizmów i pro-

cesów zależnych od jonów wapnia oraz ich wzajemnych zależności nie jest jeszcze możliwe. Pewne wydaje się natomiast, że zapobieganie śmierci neuronów może być dokonywane przez działania utrzymujące poziom wapnia na właściwym poziomie. Kontrolowanie zatem poziomu jonów wapnia może być skutecznym sposobem na utrzymanie neuronów przy życiu w trakcie starzenia i w warunkach patologicznych [55].

LITERATURA

- [1] AMENTA F, CAVALOTTA D, DEL VALLE ME, MANCINI M, SABBATINI M, TORRES JM, VEGA JA. Calbindin D-28k immunoreactivity in the rat cerebellar cortex: age-related changes. *Neurosci Lett* 1994; **178**: 131–134.
- [2] ANKARCORONA N, DYPBUKT JM, BONFOCO E, ZHITVOTOVSKY B, ORRENIUS S, LIPTON SA, NICOTERA P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 1995; **15**: 961–973.
- [3] BADING H, GINTY DD, GREENBERG ME. Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science* 1993; **260**: 181–186.
- [4] BAGETTA G, CORASANITI T, BERLIOCCI L, NAVARRA M, FINAZZI-AGRO A, NISTICO G. HIV-1 gp120 produces DNA fragmentation in the cerebral cortex of rat. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; **211**: 130–136.
- [5] BENNETT MR, HUXLIN KR. Neuronal cell death in the mammalian nervous system: the calmodulin hypothesis. *Gen Pharmacol* 1996; **27**: 407–419.
- [6] BERNARDI P. The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin. A sensitive mitochondrial channel involved in cell death. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1275**: 5–9.
- [7] BORTNER CD, OLDENBURG NBE, CIDLOWSKI JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 1995; **5**: 21–26.
- [8] BRORSON JR, MANZOLILLO PA, MILLER RJ. Ca²⁺ entry via AMPA/kainate receptors and excitotoxicity in cultured cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 1994; **14**: 187–197.
- [9] BROWN DR, SCHMIDT B, KRETZSCHMAR HA. Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 1996; **380**: 345–347.
- [10] BULLOCK R. Strategies for neuroprotection with glutamate antagonists. Extrapolating from evidence taken from the first stroke and head injury studies. *Ann N Y Acad Sci* 1995; **765**: 272–278.
- [11] CELIO MR, PAULUS TL, SCHWALLER B [red.] Guidebook to the Calcium-binding Proteins. A Sambrook & Tooze Publication at Oxford University Press 1996.
- [12] CHOI DW. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* 1995; **18**: 58–60.
- [13] COYLE JT, PUTTFARCKEN P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 1993; **262**: 689–695.
- [14] D'ADAMIO L, LACANA E, VITO P. Functional cloning of genes involved in T-cell receptor-induced programmed cell death. *Sem Immunol* 1997; **9**: 17–23.
- [15] DAWSON VL, DAWSON TM, BARTLEY DA, UHL GR, SNYDER SH. Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci* 1993; **13**: 2651–2661.
- [16] DIOP AG, LESORT M, ESCLAIRE F, DUMAS M, HUGON J. Calbindin D28k-containing neurons, and not HSP70-expressing neurons, are more resistant to HIV-1 envelope (gp120) toxicity in cortical cell cultures. *J Neurosci Res* 1995; **42**: 252–258.

- [17] DYKENS JA, STERN A, TRENKNER E. Mechanism of kainate toxicity to cerebellar neurons *in vitro* is analogous to reperfusion tissue injury. *J Neurochem* 1987; **49**: 1222–1228.
- [18] FESUS L, THOMAZY V, FALUS A. Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett* 1987; **224**: 104–108.
- [19] FURUKAWA K, GUO Q, SCHELLENBERG GD, MATTSON MP. Presenilin-1 mutation alters NGF-induced neurite outgrowth, calcium homeostasis, and transcription factor (AP-1) activation in PC12 cells. *J Neurosci Res* 1998; **52**: 618–624.
- [20] GARTHWAITE G, GARTHWAITE J. Neurotoxicity of excitatory amino acid receptor agonists in rat cerebellar slices: dependence on calcium concentration. *Neurosci Lett* 1986; **66**: 193–198.
- [21] GHOSH A, GREENBERG ME. Calcium signalling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 1995; **268**: 239–247.
- [22] GINTY DD, KORNHAUSER JM, THOMPSON MA, BADING H, MAYO KE, TAKAHASI JS, GREENBERG ME. Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and circadian clock. *Science* 1993; **260**: 238–241.
- [23] GUO Q, FURUKAWA K, SOPHER BL, PHAM DG, XIE J, ROBINSON N, MARTIN GM, MATTSON MP. Alzheimers PS-1 mutation perturbs calcium homeostasis and sensitizes PC12 cells to death induced by amyloid β -peptide. *Neurochemistry* 1996; **8**: 379–383.
- [24] GUO Q, CHRISTAKOS S, ROBINSON N, MATTSON MP. Calbindin D28k blocks the proapoptotic actions of mutant presenilin 1: reduced oxidative stress and preserved mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 3227–3232.
- [25] GUO Q, ROBINSON N, MATTSON MP. Secreted β -amyloid precursor protein counteracts the proapoptotic action of mutant presenilin-1 by activation of NF- κ B and stabilization of calcium homeostasis. *J Biol Chem* 1998; **273**: 12341–12351.
- [26] GUO Q, SOPHER BL, FURUKAWA K, PHAM DG, ROBINSON N, MARTIN GM, MATTSON MP. Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid β -peptide: involvement of calcium and oxyradicals. *J Neurosci* 1997; **17**: 4212–4222.
- [27] HARDINGHAM GE, CHAWLA S, JOHNSON CM, BADING H. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 1997; **385**: 437–447.
- [28] HARTLEY DM, CHOI DW. Delayed rescue of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuronal injury in cortical culture. *J Pharmacol Exp Therap* 1989; **250**: 752–758.
- [29] HUNZIKER W. Calbindin D-28k. [w] Celio MR, Paulus TL, Schwaller B [red.] Guidebook to the Calcium-binding Proteins. A Sambrook & Tooze Publication at Oxford University Press 1996: 23–25.
- [30] HUXLIN KR, CARR R, SHULTZ M, SEFTON A, BENNETT MR. Trophic effect of collicular proteoglycan on neonatal rat retinal ganglion cells *in situ*. *Dev Brain Res* 1995; **84**: 77–88.
- [31] HUXLIN KR, DREHER B, SHULTZ M, SEFTON AJ, BENNETT MR. Effect of collicular proteoglycan on the survival of adult rat retinal ganglion cells following axotomy. *Eur J Neurosci* 1995; **7**: 96–107.
- [32] IACOPINO AM, QUINTERO EM, MILLER EK. Calbindin-D28k: a potential neuroprotective protein. *Neurodegeneration* 1994; **3**: 1–20.
- [33] JOHNSON EM, KOIKE T, FRANKLIN J. A calcium set-point hypothesis of neuronal dependence on neurotrophic factor. *Exp Neurol* 1992; **115**: 163–166.
- [34] KASS IS, LIPTON P. Calcium and long-term transmission damage following anoxia in dentate gyrus and CA1 regions of the rat hippocampal slice. *J Physiol* 1986; **378**: 313–334.
- [35] KELLER JN, GUO Q, HOLTSBERG FW, BRUCE-KELLER AJ, MATTSON MP. Increased sensitivity to mitochondrial toxin-induced apoptosis in neural cells expressing mutant presenilin-1 is linked to perturbed calcium homeostasis and enhanced oxyradical production. *J Neurosci* 1998; **18**: 4439–4450.

- [36] KOH J-Y, CHOI DW. Vulnerability of cultured cortical neurons to damage by excitotoxins: differential susceptibility of neurons containing NADPH-diaphorase. *J Neurosci* 1988; **8**: 2153–2163.
- [37] KOIKE T, MARTIN DP, JOHNSON EM Jr. Role of Ca^{2+} channels in the ability of membrane depolarization to prevent neuronal death induced trophic-factor deprivation: evidence that levels of internal Ca^{2+} determine nerve growth factor dependence of sympathetic ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 6421–6425.
- [38] KUŹNICKI J. Transport i funkcje jonów wapnia u eukariota. *Kosmos* 1988; **37**: 197–217.
- [39] KUŹNICKI J, STRAUSS K, ISAACS KR, JACOBOWITZ DM. Transfected PC-12 cells express calretinin: does altered Ca^{2+} -homeostasis affect PC-12 cell differentiation, survival and apoptosis? Proc. 25th. Meeting of Neuroscience, San Diego 1995.
- [40] KUŹNICKI J, ISAACS KR, JACOBOWITZ DM. The expression of calretinin in transfected PC12 cells provides no protection against Ca^{2+} -overload or trophic factor deprivation. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1313**: 194–200.
- [41] KUŹNICKI J, ISAACS KR, STRAUSS K, JACOBOWITZ DM. Expression of calretinin in transfected PC-12 cells inhibits their apoptosis. Fourth European Symposium on Calcium Binding Proteins in Normal and Transformed Cells. Perugia, Italy, 1996; P63.
- [42] KUŹNICKI J, FILIPEK A. Różnorodność i wielofunkcyjność białek wiążących wapń (CaBP). *Kosmos* 1997; **46**: 603–608.
- [43] KUŹNICKI J. Udział jonów wapnia w przekazywaniu sygnałów w jądrze komórkowym. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 311–316.
- [44] LACANA E, GANJEI JK, VITO P, DADAMIO L. Dissociation of apoptosis and activation of IL-1 β -converting enzyme/Ced-3 proteases by ALG-2 and the truncated Alzheimer's gene ALG-3. *J Immunol* 1997; **158**: 5129–5135.
- [45] LAFON-CAZAL M, CLUCASI M, GAVEN F, PIETRI S, BOCKAERT J. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: putative mediators of NMDA-induced cell death in cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 1993; **32**: 1259–1266.
- [46] LEIST M, NICOTERA P. Calcium and neuronal death. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1998; **132**: 79–125.
- [47] LEIST M, SINGLE B, CASTOLDI AF, KUHNLE S, NICOTERA P. Intracellular ATP concentration: a switch deciding between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 1997; **185**: 1481–1486.
- [48] LIPTON SA. Models of neuronal injury in AIDS: another role for the NMDA receptor? *Trends Neurosci* 1992; **15**: 75–79.
- [49] LIPTON SA, ROSENBERG PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New Eng J Med* 1994; **330**: 613–622.
- [50] LIPTON SA, SUCHER NJ, KAISER PK, DREYER EB. Synergistic effects of HIV coat protein and NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *Neuron* 1991; **7**: 111–118.
- [51] MAKI M, NARAYANA SVL, HITOMI K. A growing family of the Ca^{2+} -binding proteins with five EF-hand motifs. *Biochem J* 1997; **328**: 718–720.
- [52] MARCAIDA G, MINANA M-D, GRISOLIA S, FELIPO V. Lack of correlation between glutamate-induced depletion of ATP and neuronal death in primary cultures of cerebellum. *Brain Res* 1995; **695**: 146–150.
- [53] MARCAIDA G, KOSENKO E, MINANA M-D, GRISOLIA S, FELIPO V. Glutamate induces a calcineurin-mediated dephosphorylation of Na^+ , K^+ - ATPase that results in its activation in cerebellar neurons in culture. *J Neurochem* 1996; **66**: 99–104.
- [54] MATTSON MP, BARGER SW, CHENG B, LIEBERBURG I, SMITH-SWINTOSKY VL, RYDEL RE. β -amyloid protein metabolites and loss of neuronal Ca^{2+} homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 1993; **16**: 409–414.
- [55] MATTSON MP, FURUKAWA K. Programmed cell life: anti-apoptotic signaling and therapeutic strategies for neurodegenerative disorders. *Rest Neurol Neurosci* 1996; **9**: 191–205.

- [56] MATTSON MP, GUO Q. Cell and molecular neurobiology of presenilins: a role for the endoplasmic reticulum in the pathogenesis of Alzheimer's disease? *J Neurosci Res* 1997; **50**: 505–513.
- [57] MATTSON MP, GUO Q, FURUKAWA K, PEDERSEN WA. Presenilins, the endoplasmic reticulum, and neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1998; **70**: 1–14.
- [58] MATTSON MP, RYDEL RE, LIEBERBURG I, SMITH-SWINTOSKY VL. Altered calcium signaling and neuronal injury: stroke and Alzheimer's disease as examples. *Ann N Y Acad Sci* 1993; **679**: 1–21.
- [59] MATTSON MP, CHEN B, SMITH-SWINTOSKY VL. Neurotrophic factor mediated protection from excitotoxicity and disturbances in calcium and free radical metabolism. *Sem Neurosci* 1993; **5**: 295–307.
- [60] MATTSON MP, BARGER SW, BEGLEY JG, MARK RJ. Calcium, free radicals, and excitotoxic neuronal death in primary cell culture. *Meth Cell Biol* 1995; **46**: 187–216.
- [61] MEREDITH JE, FAZELI B, SCHWARTZ MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* 1993; **4**: 953–961.
- [62] MILLER RJ. The control of neuronal Ca^{2+} homeostasis. *Prog Neurobiol* 1991; **37**: 255–285.
- [63] MULLER WEG, SCHRODER HC, USHIJIMA H, DAPPER J, BORMANN J. gp120 of HIV-1 induces apoptosis in rat cortical cell cultures: prevention by memantine. *Eur J Pharmacol* 1992; **226**: 209–214.
- [64] MULLER WEG, USHIJIMA H, SCHRODER HC, FORREST JMS, SCHATTON WFH, RYTIK PG, HEFFNER-LAUC M. Cytoprotective effect of NMDA receptor antagonists on prion protein (PrionSc)-induced toxicity in rat cortical cell cultures. *Eur J Pharmacol* 1993; **246**: 261–267.
- [65] NICOTERA P, ROSSI A. Molecular mechanisms of metal neurotoxicity. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1993; **7**: 254–256.
- [66] ORRENIUS S, McCONKEY DJ, BELLOMO G, NICOTERA P. Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci* 1989; **10**: 281–285.
- [67] RATAN RR, MURPHY TH, BARABAN JM. Macromolecular synthesis inhibitors prevent oxidative stress-induced apoptosis in embryonic cortical neurons by shunting cysteine from protein synthesis to glutathione. *J Neurosci* 1994; **14**: 4385–4392.
- [68] ROGERS JH, RESIBOIS A. Calretinin and calbindin-D28k in rat brain: patterns of partial co-localization. *Neuroscience* 1992; **51**: 843–865.
- [69] RUTTER GA, THELER JM, MURGIA M, WOLLHEIM CB, POZZAN T, RIZZUTO R. Stimulated Ca^{2+} influx raises mitochondrial free Ca^{2+} to supramicromolar levels in a pancreatic β -cell line. Possible role in glucose and agonist-induced insulin secretion. *J Biol Chem* 1993; **268**: 22385–22390.
- [70] SCHINDER AF, OLSON EC, SPITZER NC, MONTAL M. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 1996; **16**: 6125–6133.
- [71] SCHWALLER B. Calretinin. [w] Celio MR, Paulus TL, Schwaller B [red.] Guidebook to the Calcium-binding Proteins. A Sambrook & Tooze Publication at Oxford University Press 1996: 26–28.
- [72] SCORZIELLO A, MEUCCI O, FLORIO T, FATTORE M, FORLONI G, SALMONA M, SCHETTINI G. β 25–35 alters calcium homeostasis and induces neurotoxicity in cerebellar granule cells. *J Neurochem* 1996; **66**: 1995–2003.
- [73] SEEBURG PH. The TINS/TiPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci* 1993; **16**: 359–365.
- [74] SIMON RP, SWAN JH, GRIFFITHS T, MELDRUM BS. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* 1984; **226**: 850–852.
- [75] SNOW DM, WATANABE M, LETOURNEAU PC, SILVER J. A chondroitinsulfate proteoglycan may influence the direction of retinal ganglion cell outgrowth. *Development* 1991; **113**: 1473–1485.

- [76] SUCHER NJ, AIZENMANE, LIPTON SA. N-methyl-D-aspartate antagonists prevent kainate neurotoxicity in rat retinal ganglion cells *in vitro*. *J Neurosci* 1991; **11**: 966–971.
- [77] TAKAHASHI K, KAMEDA H, KATAOKA M, UENO S, AKAIKE N. Effects of Ca^{2+} antagonist and antiepileptic on tetrodotoxin-sensitive Ca^{2+} -conducting channels in isolated rat hippocampal CA1 neurons. *Neurosci Lett* 1992; **148**: 60–62.
- [78] TANAKA S, KOIKE T. Up-regulation of L-type Ca^{2+} channel associated with the development of elevated $\text{K}^{(+)}$ -mediated survival of superior cervical ganglion cells *in vitro*. *Dev Biol* 1995; **168**: 166–178.
- [79] TONG L, PEREZ-POLO JR. Transcription factor DNA binding activity in PC12 cells undergoing apoptosis after glucose deprivation. *Neurosci Lett* 1995; **191**: 137–140.
- [80] TYMIANSKI M, WALLACE MC, SPIGELMAN I, UNO M, CARLEN PL, TATOR CH, CHARLTON MP. Cell-permeant Ca^{2+} chelators reduce early excitotoxic and ischemic neuronal injury *in vitro* and *in vivo*. *Neuron* 1993; **11**: 221–235.
- [81] TYMIANSKI M, CHARLTON MP, CARLEN PL, TATOR CH. Properties of neuroprotective cell-permeant Ca^{2+} chelators: effects on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and glutamate neurotoxicity *in vitro*. *J Neurophysiol* 1994; **72**: 1973–1992.
- [82] VIVIANI B, ROSSI AD, CHOW SC, NICOTERA P. Organotin compounds induce calcium overload and apoptosis in PC12 cells. *Neurotoxicology* 1995; **16**: 19–25.
- [83] VITOP, LACANA E, DADAMIO L. Interfering with apoptosis: Ca^{2+} -binding protein ALG-2 and Alzheimer's disease gene ALG-3. *Science* 1996; **271**: 521–525.
- [84] VOLTERRA A, TROTTI D, CASSUTTI P, TROMBA C, GALIMBERTI R, LECCHI P, RACAGNI G. A role for the arachidonic acid cascade in fast synaptic modulation: ion channels and transmitter uptake systems as target proteins. *Adv Exp Med Biol* 1992; **318**: 147–158.
- [85] WINSKY L, NAKATA H, MARTIN BM, JACOBOWITZ DM. Isolation, partial amino acid sequence, and immunohistochemical localization of a brain-specific calcium-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 10139–10143.

TOKSYNY MITOCHONDRIALNE – NEURODEGENERACJA I DRGAWKI

MITOCHONDRIAL TOXINS – NEURODEGENERATION AND SEIZURES

Ewa M. URBAŃSKA^{1,2}, Waldemar A. TURSKI^{1,2}

¹Katedra i Zakład Farmakologii i Toksykologii, Akademia Medyczna, Lublin,

²Zakład Toksykologii Klinicznej, Instytut Medycyny Wsi, Lublin

Streszczenie: W niniejszej pracy przeglądowej przedstawiono wybrane aspekty mechanizmów działania oraz następstw zastosowania tych spośród toksyn mitochondrialnych, które wywołują uszkodzenia neuronalne i drgawki, przy prawdopodobnym udziale układu aminokwasów pobudzających (układu glutaminergicznego). Należą do nich m.in. 1-metyl-4-fenylpyridinium (MPP+) będące aktywnym metabolitem 1-metyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridyny (MPTP), kwas aminooksyoctowy oraz kwas 3-nitropropionowy. Uważa się, iż zaburzenie wewnątrzkomórkowych procesów energetycznych może zwiększyć wrażliwość komórek nerwowych na toksyczne działanie aminokwasów pobudzających, a w konsekwencji prowadzić do wystąpienia selektywnej neurodegeneracji i drgawek.

Słowa kluczowe: drgawki, neurodegeneracja, kwas 3-nitropropionowy, MPTP, MPP+, kwas aminooksyoctowy, mitochondrialny łańcuch oddechowy

Summary: Mitochondrial toxins are substances impairing the mitochondrial synthesis of ATP what results in deranged cellular energy status. This review focuses mainly on neurodegenerative and convulsant properties of mitochondrial toxins such as 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+), being an active metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), aminooxyacetic acid and 3-nitropropionic acid. It was postulated that energy depletion might render neuronal cells more susceptible to the action of endogenous agonists of excitatory amino acid receptors. The involvement of enhanced glutamatergic transmission due to metabolic disturbances following the application of mitochondrial toxins is also discussed.

Keywords: convulsions, neurodegeneration, 3-nitropropionic acid, MPTP, MPP+, aminooxyacetic acid, mitochondrial respiratory chain

1. WPROWADZENIE

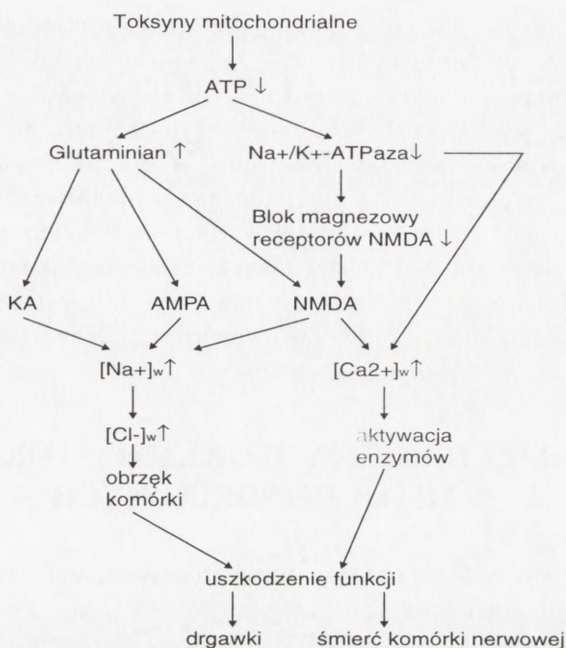
Dla celów niniejszej pracy przeglądowej pojęciem toksyny mitochondrialnej określono substancje, które zaburzając procesy energetyczne zachodzące w mitochondriach prowadzą do niedoborów energetycznych w komórkach ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Przedstawione zostaną wybrane aspekty mechanizmów działania oraz następstw zastosowania tych spośród toksyn mitochondrialnych, które wywołują uszkodzenia neuronalne i drgawki, przy prawdopodobnym udziale układu aminokwasów pobudzających (układu glutaminergicznego). Należą do nich m.in. 1-metyl-4-fenylpyridinium (MPP+) będące aktywnym metabolitem 1-metyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridyny (MPTP), kwas aminooksyooctowy (AOAA) oraz kwas 3-nitropropionowy (3-NPA).

2. ROLA MITOCHONDRIÓW W METABOLIZMIE ENERGETYCZNYM OUN

W 1952–1953 roku Georg Rolland i Fritjot Sjöstrand jako pierwsi opisali budowę ultrastrukturalną mitochondriów. Znaczący postęp technik badawczych ostatnich lat umożliwił skonstruowanie trójwymiarowych, szczegółowych modeli tej struktury, których opis przekracza ramy tego opracowania. W dużym uproszczeniu można opisać mitochondria jako owalne organelle zbudowane z błony zewnętrznej i błony wewnętrznej ograniczającej przestrzeń nazywaną macierzą. Błona zewnętrzna jest gładka, natomiast błona wewnętrzna jest pofałdowana i tworzy głębokie palczaste wypustki do macierzy nazywane grzebieniami [97].

W mitochondriach zachodzi intensywny proces tworzenia wysokoenergetycznych związków fosforanowych sprzężony z oddychaniem, czyli fosforylacja oksydacyjna. Zespół katalizatorów enzymatycznych wbudowany w błonę wewnętrzną nazywany jest łańcuchem oddechowym. Przenosi on równoważniki redukujące pochodzące z utleniania węglowodanów, kwasów tłuszczowych i aminokwasów na cząsteczkę tlenu przy jednoczesnej produkcji ATP (rys. 1).

Podstawowym substratem energetycznym komórki nerwowej jest glukoza, która po ufosforylowaniu w cytoplazmie przez enzym heksokinazę jest spalana w procesie glikolizy do pirogronianu z wytworzeniem 2 cząsteczek ATP i 2 NADH. Pirogronian łatwo dyfunduje przez błonę mitochondrialną do macierzy, gdzie ulega przekształceniu w acetylo-koenzym A. Ten z kolei po sprzęgnięciu ze szczawiooctanem ulega dalszemu spalaniu w obrębie cyklu kwasu cytrynowego (zwanego też cyklem Krebsa), w wyniku czego powstają wysokoenergetyczne związki fosforanowe (GTP), równoważniki redukujące oraz zregenerowana cząsteczka szczawiooctanu. Z jednej



Rysunek 1. Główny szlak przemian węglowodanów, lipidów i białek z uwzględnieniem cyklu kwasu cytrynowego i fosforylacji oksydacyjnej (łańcucha oddechowego)

cząsteczki glukozy powstają w macierzy mitochondrialnej 2 cząsteczki GTP, 2 cząsteczki FADH₂ oraz 6 cząsteczek NADH.

Równoważniki redukujące zawarte w NADH powstałym w obrębie cytoplazmy mogą przedostać się przez błonę mitochondrialną jedynie przy współdziałaniu odpowiednich mostków – nieodwracalnego, związanego z glicerolo-3-fosforanem i odwracalnego, jabłczano-asparaginianowego.

Synteza ATP podczas fosforylacji oksydacyjnej możliwa jest dzięki wyzwoleniu energii związanej z przepływem elektronów z NADH i FADH₂ na cząsteczkowy tlen. W jej pierwszym etapie biorą udział trzy pompy protonowe będące dużymi kompleksami białkowymi: reduktaza NADH-Q, reduktaza cytochromowa i oksydaza cytochromowa. Przepływ elektronów jest skojarzony z pompowaniem protonów do przestrzeni międzybłonowej i powoduje wytworzenie gradientu błonowego.

Elektrony z NADH wprowadzane są na łańcuch oddechowy na poziomie reduktazy NADH-koenzym Q (dehydrogenaza NADH, kompleks I), a następnie przekazywane na koenzym Q (ubichinon). Na ubichinon przenoszone są również elektrony z FADH₂ powstającego w cyklu kwasu cytrynowego podczas utleniania fumaranu przez dehydrogenazę bursztynianową. Enzym ten związany jest z wewnętrzną błoną mitochondrialną i stanowi część kompleksu reduktazy bursztynian-

koenzym Q (kompleks II). Drugą pompą protonową jest reduktaza cytochromowa (oksydoreduktaza ubichinon-cytochrom c, kompleks cytochromów bc₁, kompleks III). Trzecią pompę protonową stanowi oksydaza cytochromowa (kompleks IV), która umożliwiła przenoszenie elektronów z cytochromu c na tlen cząsteczkowy, w wyniku czego powstaje cząsteczka wody. W drugim etapie fosforylacji oksydacyjnej przepływ elektronów z powrotem przez błonę wewnętrzną do macierzy mitochondrialnej przez kanały w kompleksie syntetyzującym ATP uwalnia energię pozwalającą na tworzenie ATP. Metabolizm 1 cząsteczki glukozy przy użyciu mostka glicerolo-3-fosforanowego prowadzi do powstania 36 cząsteczek ATP, a mostka jabłczanowo-asparaginianowego – do wytworzenia 38 molekuł ATP [68,99].

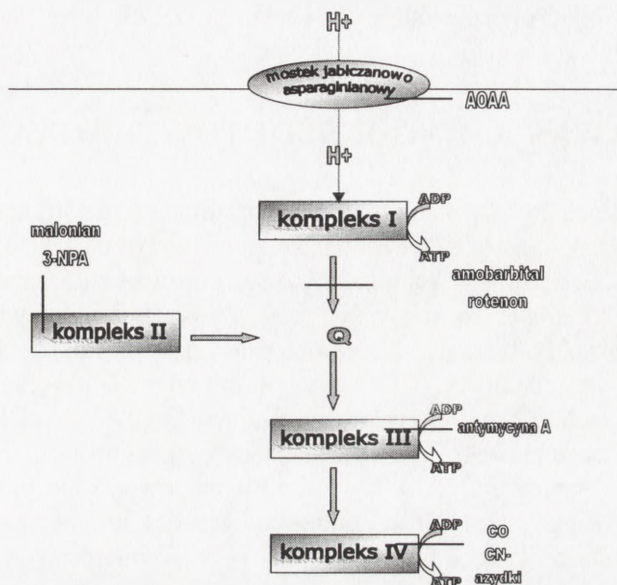
3. MECHANIZMY DZIAŁANIA TOKSYN MITOCHONDRIALNYCH

Toksyny mitochondrialne mogą zaburzać procesy energetyczne działając na różne etapy mitochondrialnej produkcji energii (rys. 2). Aktywność kompleksu I hamowana jest bezpośrednio przez MPP⁺, rotenon i amobarbital. Malonian jest odwracalnym, a 3-NPA nieodwracalnym inhibitorem dehydrogenazy bursztynianowej, a co za tym idzie mitochondrialnego kompleksu II. Kompleks III jest blokowany przez antymycynę A. Aktywność kompleksu IV jest hamowana przez cyjanki, azydki i tlenek węgla.

AOAA silnie hamuje aminotransferazę asparaginianową, będącą częścią mostka jabłczanowo-asparaginianowego, który stanowi drugą (oprócz mostka glicerolowo-fosforanowego) drogę przenoszenia równoważników redukcyjnych z cytoplazmy do mitochondriów [57].

4. MPP⁺

Podstawowe objawy kliniczne choroby Parkinsona, takie jak drżenie spoczynkowe, spowolnienie ruchowe i sztywność mięśniowa, opisane zostały przez Jamesa Parkinsona w 1817 roku. Pod koniec lat osiemdziesiątych naszego stulecia u młodych osób uzależnionych od narkotyków zaobserwowano nietypowo szybkie narastanie nieodwracalnych objawów choroby Parkinsona [27,59]. Stwierdzono, iż zaburzenia te są najprawdopodobniej spowodowane przez MPTP, powstające jako niewielka domieszka w trakcie nielegalnej produkcji meperydyno-podobnych substancji. Intensywne badania prowadzone na zwierzętach wkrótce potwierdziły histologiczne,



Rysunek 2. Miejsca hamowania łańcucha oddechowego przez MPP⁺, amobarbital i rotenon – kompleks I, malonian i kwas 3-nitropropionowy (3-NPA) – kompleks II, antymycynę A – kompleks III oraz tlenek węgla (CO), cyjanki (CN) i azydki – kompleks IV; kwas aminooksyoctowy (AOOA) hamuje wejście równoważników redukujących na kompleks I łańcucha oddechowego

biochemiczne i kliniczne podobieństwo następstw spożycia MPTP do zmian obserwowanych w przebiegu choroby Parkinsona u ludzi [22,58,65].

MPTP jest cząsteczką o dużej lipofilności, dzięki czemu łatwo przenika do OUN. Tam ulega szybkiemu przekształceniu do MPP⁺ w trakcie dwuetapowej reakcji zachodzącej przy udziale oksydazy monoaminowej (MAO-B) w komórkach glijowych. Uwolniony MPP⁺ jest następnie selektywnie wychwytywany w drodze aktywnego transportu przez neurony dopaminergiczne i w mniejszym stopniu noradrenergiczne, co decyduje o wybiórczości jego neurotoksycznego działania [54,55,56,65,74]. Wewnątrz komórki nerwowej MPP⁺ jest akumulowany w mitochondriach [86,88,89]. MPP⁺ hamuje aktywność dehydrogenazy NADH, która stanowi początkowe ogniwo mitochondrialnego łańcucha oddechowego (kompleks I) oraz reduktazę cytochromu c (kompleks IV)[74,85,87]. Zmniejszenie zawartości ATP potwierdzono zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*. Ponadto sugeruje się, że MPP⁺ zwiększa tworzenie cytotoksycznych wolnych rodników [10,98]. Okres półtrwania MPTP w mózgu wynosi około 24 godz., a MPP⁺ około 10 dni [65].

Eksperymentalne podania domózgowe MPP⁺ lub obwodowe MPTP prowadzą do wybiórczego niszczenia dopaminergicznych komórek nerwowych, których aksony

tworzą drogę czarno-prążkowiową [10,22,51]. Zmiany wywoływane przez MPTP/MPP+ stanowią obecnie nowy zwierzęcy model choroby Parkinsona.

5. KWAS AMINOOKSYOCTOWY (AOAA)

AOAA jest nieselektywnym inhibitorem transaminaz i dekarboksylaz. Zastosowany w małych dawkach AOAA hamuje aktywność enzymu rozkładającego kwas γ -aminomasłowy (GABA) – transaminazę GABA i prowadzi do wzrostu poziomu GABA w OUN. Skłoniło to do stosowania AOAA jako leku przeciwdrgawkowego w warunkach eksperymentalnych oraz przeprowadzenia wstępnych prób klinicznych. Okazało się jednak, iż AOAA wywołuje niekorzystne objawy uboczne, a w dużych dawkach blokuje enzym syntetyzujący GABA, co w konsekwencji może zmniejszyć stężenia tego neuroprzekaźnika w mózgu.

W roku 1989 stwierdzono, że AOAA silnie i nieodwracalnie blokuje syntezę endogennego antagonisty receptorów jonotropowych dla aminokwasów pobudzających, kwasu kynureninowego [104]. Wydało się więc interesujące szczegółowe określenie następstw lokalnego podania AOAA, przy założeniu, iż osłabienie endogennych mechanizmów hamujących może spowodować przewagę glutaminianergicznego układu pobudzającego. Wkrótce potem przedstawiliśmy pierwsze doniesienie o neurotoksycznym działaniu AOAA w prążkowie [106]. Po upływie dwóch lat trzy ośrodki naukowe rozpoczęły publikacje prac potwierdzających neurodegeneracyjne właściwości AOAA [7,71,107]. Wykazano, że AOAA podany miejscowo powoduje selektywne obumieranie komórek nerwowych w prążkowie, hipokampie i korze entorinalnej [7,20,23,31,69,71,107]. Działanie neurotoksyczne AOAA można zablokować stosując antagonistów glutaminianergicznych receptorów jonotropowych o typie kwasu N-metylo-D-asparaginowego (NMDA) lub niszcząc drogi neuronalne, na których zakończeniach uwalniane są aminokwasy pobudzające [7,71,107]. Badania elektrofizjologiczne nie ujawniły bezpośredniego pobudzenia receptorów glutaminianergicznych przez AOAA. Ilościowa ocena poziomu endogennego kwasu kynureninowego w prążkowie pobranym od zwierząt po lokalnym podaniu AOAA nie wykazała też obniżenia jego [7]. W poszukiwaniu innego mechanizmu działania zwrócono uwagę na możliwość blokowania przez AOAA mostka jabłczanowo-asparaginianowego, który jest drugą obok mostka glicerolo-fosforanowego drogą służącą przenoszeniu równoważników redukujących przez błonę mitochondrialną do macierzy mitochondrialnej. Istotnie, lokalne zastosowanie AOAA zmniejsza produkcję ATP w prążkowie [7].

6. KWAS 3-NITROPROPIONOWY (3-NPA)

W roku 1986 chińscy autorzy opisali 884 przypadki zatruc manifestujących się m.in. encefalopatią, wywołanych spożyciem trzciny cukrowej zanieczyszczonej 3-NPA. Substancja ta występuje dość powszechnie w świecie roślinnym a ponadto jest wytwarzana przez grzyby *Arthrimum* [41,50,52,61]. 3-NPA hamuje nieodwracalnie aktywność dehydrogenazy bursztynianowej, jednego z enzymów cyklu Krebsa wchodzącego równocześnie w skład mitochondrialnego kompleksu II [1,41,42]. 3-NPA wywiera działanie zarówno po podaniu doustnym, dootrzewnowym, jak i domózgowym. Obraz kliniczny zależy przede wszystkim od wielkości dawki, jak też od wrażliwości gatunkowej. Opisano objawy zatrucia ostrego i podostrego u ludzi, zwierząt domowych i hodowlanych oraz zwierząt laboratoryjnych [62]. Wielokrotnie udokumentowano występowanie uszkodzeń komórek nerwowych przede wszystkim w prążkowie, hipokampie i wzgórzu [16,39,41,47,48,72], ale nie w obrębie kory mózgowej, mózdzku czy podwzgórza [47,48,77]. Badania, w których porównywano następstwa eksperymentalnego podania 3-NPA różnymi drogami, domózgowo lub obwodowo, w różnych dawkach, jednorazowo lub wielokrotnie, wykazały wyraźną zależność nasilenia zmian patologicznych od warunków przeprowadzenia doświadczenia. Potwierdzono, że zastosowanie 3-NPA u zwierząt imituje przebieg choroby Huntingtona u ludzi. Odpowiedni dobór dawek i schemat stosowania 3-NPA pozwala nawet na wywołanie objawów charakterystycznych dla różnego stopnia nasilenia procesu chorobowego u ludzi [4,5,13,14,15,16,19,43,81]. Zwrócono też uwagę na podobieństwo zachowań zaobserwowanych u zwierząt do obrazu późnych dyskinez [2]. W latach 1995–1998 pojawiły się doniesienia o wpływie 3-NPA na przebieg procesów biochemicznych zachodzących nie tylko w komórkach nerwowych, ale też w komórkach glejowych i sformułowano hipotezy wiążące te zjawiska z procesami patologicznymi [29,33,49,75]. Wreszcie ostatnie lata zawoocowały doniesieniami o wywoływaniu przez 3-NPA nie tylko zmian o charakterze nekrozy, ale też i apoptozy [8,82,92].

7. INNE INHIBITORY

Malonian hamuje w sposób kompetycyjny dehydrogenazę bursztynianową oraz aktywność mitochondrialnego kompleksu II. Zmiany neurodegeneracyjne wywołane podaniem malonianu do prążkowie opisano po raz pierwszy w 1993 roku [6,46]. Stwierdzono też neurotoksyczne działanie malonianu w hipokampie, dotyczące szczególnie okolicy CA1, w mniejszym zakresie strefy CA3, przy znacznej oporności zakrętu zębatego [28,39]. Ponadto opisano zmniejszenie aktywności hydroksylazy tyrozynowej w prążkowie wskazujące na uszkodzenie drogi czarno-prążkowiej

po podaniu malonianu do istoty czarnej [25], jak też zmniejszenie aktywności transferazy acetylocholinowej w korze mózgowej i ciałach migdałowatych po podaniu tej toksyny do jądra podstawnego olbrzymiomórkowego (*n. basalis magnocellularis*) [26].

Rotenon, inhibitor kompleksu I, jest insektycydem pochodzenia roślinnego, którego toksyczne efekty znane były już w XVIII wieku w Ameryce Południowej i Malezji [90]. W latach trzydziestych i czterdziestych tego stulecia opisywano masywne zatrucia zwierząt rotenonem przebiegające z depresją oddechową, drżeniami mięśniowymi, drgawkami klonicznymi i tonicznymi oraz kończące się śmiercią [90].

Selektywne uszkodzenia prądkowia po lokalnym podaniu rotenonu u zwierząt doświadczalnych wykazano w 1985 roku, a w 1997 roku opisano analogiczne uszkodzenia po podaniu tej substancji dożylnie [35, 51,90]. Rotenon i MPP+ wykazują wiele cech wspólnych, m.in. działają najprawdopodobniej na identyczne miejsce wiążące w obrębie mitochondrialnego kompleksu I, są aktywnie transportowane i gromadzone przez neurony dopaminergiczne oraz wywołują zbliżony typ zmian neuropatologicznych [17, 35].

Procesy energetyczne w mitochondriach zaburzane są także przez amobarbital (hamuje kompleks I), antymycynę A (inhibitor kompleksu III), cyjanki i azydki (inhibitory kompleksu IV), związki rozprzegające łańcuch oddechowy, takie jak dwunitrofenol oraz inne.

8. UDZIAŁ AMINOKWASÓW POBUDZAJĄCYCH W PROCESACH NEURODEGENERACJI WYWOŁANYCH TOKSYNAMI MITOCHONDRIALNYMI

Intensywny rozwój badań nad rolą aminokwasów pobudzających w procesach neuropatologicznych nastąpił po opublikowaniu przez Johna Olneya pionierskich prac dotyczących uszkadzającego działania glutaminianu w strukturach OUN [79,80]. Początkowo uważano, że zmiany neurodegeneracyjne są wynikiem nadmiernego pobudzenia swoistych receptorów przez egzogennych lub endogennych agonistów. Z czasem uznano, że do obumierania komórek nerwowych może dochodzić nawet przy fizjologicznych stężeniach aminokwasów pobudzających, jeżeli współwystępują inne czynniki. Jednym z nich może być deficyt energetyczny komórki wywołany m.in. przez toksyny mitochondrialne.

Wyniki badań zgromadzone w ciągu ostatnich lat wskazują na doniosłą rolę układu aminokwasów pobudzających w procesach neurodegeneracji związanej z zaburzonym metabolizmem energetycznym mitochondriów. Początki prac eksperymentalnych datują się na koniec lat osiemdziesiątych. W badaniach *in vitro* stwier-

dzono wówczas, iż zaburzenie wewnątrzkomórkowych procesów energetycznych zwiększa wrażliwość komórek nerwowych na toksyczne działanie aminokwasów pobudzających [78,115,116]. Nie zaobserwowano wzrostu stężenia zewnątrzkomórkowego kwasu glutaminowego i asparaginowego, a mimo to antagoniści NMDA wywierali silne działanie ochronne w badanym modelu. Sformułowano więc hipotezę zakładającą, że wewnątrzkomórkowe niedobory energetyczne prowadzą do wzrostu wrażliwości receptorów glutaminianergicznych na działanie aminokwasów pobudzających [78,115,116]. Efekt ten wiązano przede wszystkim ze zniesieniem charakterystycznego dla receptora NMDA bloku kanału jonowego wywieranego w sposób zależny od potencjału błonowego przez jony Mg^{2+} [78,115].

Pierwsze doniesienie o neurodegeneracyjnym działaniu toksyny mitochondrialnej – AOAA w prądkowiu *in vivo* zostało przez nas opublikowane w 1989 roku [104]. Wykazano, że substancja ta podana do prądkowia u szczurów wywołuje zmiany neurodegeneracyjne przypominające następstwa lokalnego podania agonistów receptora typu NMDA. Świadczy o tym selektywny charakter uszkodzeń komórek nerwowych, brak uszkodzeń włókien przechodzących przez tą strukturę oraz blokowanie toksyczności przez 1) antagonistów NMDA oraz 2) uszkodzenie glutaminergicznej drogi korowo-prądkowiowej [7,104,106]. Badania nad działaniem AOAA podjęliśmy przyjmując założenie, iż zmniejszenie produkcji jedyne go endogennego antagonisty receptorów dla aminokwasów pobudzających, jakim jest kwas kynureninowy, może doprowadzić do względnej przewagi transmisji pobudzającej, a w konsekwencji do charakterystycznych zaburzeń czynności neuronalnej [104,106].

W roku 1991 opublikowano równocześnie wyniki naszych poszerzonych badań nad działaniem AOAA oraz wyniki Flinta Beala i współpracowników, a także Roberta Schwarcza i współpracowników, które potwierdziły i rozszerzyły nasze wcześniejsze obserwacje [7,71,107]. Wykazano m.in., że AOAA nie oddziałuje bezpośrednio z receptorami aminokwasów pobudzających, ale jego działanie neurotoksyczne jest blokowane przez antagonistów NMDA zarówno w prądkowiu, jak i w hipokampie [7,71,107]. Beal i współpracownicy przedstawili również dowody na to, że pod wpływem AOAA w prądkowiu nie ulegają uszkodzeniu komórki zawierające NADPH diaforazę, podobnie jak dzieje się po zastosowaniu aminokwasów pobudzających [7].

Również w 1991 roku pojawiły się publikacje wskazujące, że działanie neurotoksyczne innej toksyny mitochondrialnej – MPP+ może być osłabione lub opóźnione przez zastosowanie antagonisty NMDA [100]. Wykazano, że antagoniści NMDA zmniejszają neurotoksyczne działanie MPP+ w istocie czarnej i prądkowiu [91,100,117]. Mimo początkowych kontrowersji [36,73] późniejsze badania potwierdziły tę obserwację [18,114]. Wkrótce potem opisano i/lub scharakteryzowano wywoływane przez inne toksyny mitochondrialne: 3-NPA, malonian i rotenon zmiany neurodegeneracyjne, w których genetycznie potwierdzono udział aminokwasów pobu-

dzających (5,6,21,35). Wykazano również, że w obecności toksyn mitochondrialnych silniejsze jest działanie neurotoksyczne agonistów aminokwasów pobudzających [3,44,45,64,67,94].

Zgromadzone wyniki pozwoliły na skonstruowanie prawdopodobnego łańcucha wydarzeń związanych z zaburzeniem mitochondrialnych procesów energetycznych w komórkach nerwowych, które w efekcie końcowym mogą prowadzić do śmierci neuronów [53,105].

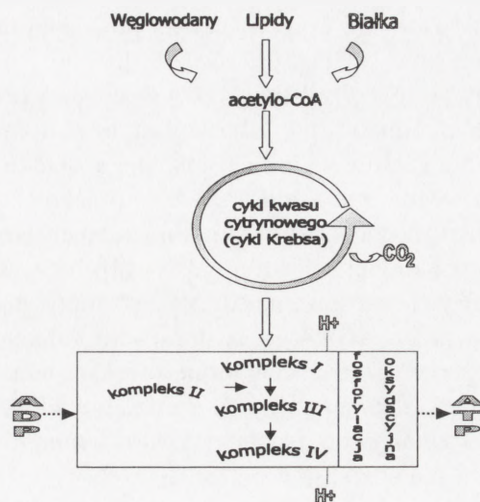
Zmniejszenie mitochondrialnej produkcji ATP prowadzi do wyczerpania zapasów ATP w komórce (rys. 3). Następstwem niedoboru energetycznego może być zmniejszenie aktywności Na^+/K^+ ATPazy zakłócające procesy repolaryzacji błony komórkowej. To z kolei może spowodować przedłużenie czasu otwarcia kanałów jonowych zależnych od potencjału błony komórkowej i napływ jonów wapnia do wnętrza komórki. Zmniejszenie blokowania kanału receptora NMDA przez Mg^{2+} , również zwiększa dokomórkowy przepływ jonów Na^+ i Ca^{2+} . Narastanie stężenia jonów Na^+ w tych warunkach przekracza możliwości wyrównawcze układu wymiennicza $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ i sprzyja dalszej kumulacji Ca^{2+} . Ca^{2+} jest też gromadzony w mitochondriach, co dodatkowo hamuje procesy energetyczne tam zachodzące, oraz aktywuje fosfolipazy, endonukleazy i proteazy powodując lizę błon strukturalnych, nieodwracalne zakłócenie większości procesów wewnątrzkomórkowych i na koniec śmierć komórki.

Na skutek niedoboru energii zakłóceniu ulega proces wychwytu neuroprze-kazników, w tym glutaminianu, a także jego metabolizm i magazynowanie. Rozpad komórek nerwowych dodatkowo zwiększa stężenie glutaminianu w przestrzeni pozakomórkowej, co wobec zwiększonej wrażliwości receptorów NMDA dodatkowo nasila procesy neurodegeneracji. Dlatego też zastosowanie antagonistów aminokwasów pobudzających może zmniejszyć neurotoksyczne działanie toksyn mitochondrialnych.

9. DRGAWKOTWÓRCZE DZIAŁANIE TOKSYN MITOCHONDRIALNYCH

Istnieją zaledwie pojedyncze informacje o drgawkotwórczym działaniu toksyn mitochondrialnych. We wczesnych latach siedemdziesiątych opisano drgawki wywołane cyjankiem potasu (KCN) i ouabainą czy semikarbazidem, który podobnie jak AOAA hamuje aktywność enzymów wymagających witaminy B₆ jako koenzymu [63,96,112,113]. Jednak mechanizm ich powstawania nie został jednoznacznie wyjaśniony.

W latach 1988–1991 opisywano występowanie drgawek charakteryzując zachowania wywołane podaniem MPTP u myszy [11,12,34,38,110]. Jedyna szczegółowa



Rysunek 3. Sugerowany mechanizm działania toksyn mitochondrialnych na metabolizm komórki nerwowej prowadzący do drgawek lub śmierci neuronów

praca dotycząca drgawkotwórczego działania toksyny mitochondrialnej MPP⁺ została opublikowana w 1992 roku. Wykazano, że podanie MPP⁺ do komory bocznej mózgu myszy powoduje wystąpienie drgawek klonicznych blokowanych przez antagonistów NMDA i midazolam. Leki przeciwpadaczkowe, takie jak: fenobarbital, trimetadion, etosuksymid i acetazolamid, okazały się nieskuteczne [101].

Właściwości drgawkotwórcze i prodrgawkowe AOAA znane były już od lat siedemdziesiątych [24,40,60,84,111]. Opisano je nawet u pacjentów, którym podawano AOAA [84]. Uważano, że efekty te są spowodowane hamowaniem przez AOAA aktywności dekarboksylazy kwasu glutaminowego (GAD) – enzymu syntetyzującego GABA. Dopiero szczegółowe badania przeprowadzone przez nas pod koniec lat osiemdziesiątych wykazały, że w chwili wystąpienia drgawek aktywność GAD jest niezmieniona, co sugerowało inny niż GABA-ergiczny mechanizm działania AOAA [103]. Stwierdziliśmy, że AOAA podany zarówno podskórnym, jak i domózgowo wywołuje u zwierząt drgawki kloniczne, którym towarzyszą charakterystyczne zmiany czynności elektrycznej mózgu. Pojedyncze epizody drgawkowe trwają kilka sekund, mogą powtarzać się, ale nie przechodzą w stan drgawkowy. Drgawki są hamowane przez diazepam, fenobarbital i sole kwasu walproinowego, podczas gdy inne leki przeciwpadaczkowe są nieefektywne [102,103]. Zastosowanie wybiórczych antagonistów NMDA lub kwasu kynureninowego może zapobiec drgawkom wywołanym domózgowym podaniem AOAA [103]. Obserwacje te zostały

potwierdzone przez inne zespoły badawcze, które wykazały, że lokalne iniekcje AOAA do hipokampa, prążkowie i kory węchowej powodują drgawki skutecznie blokowane przez antagonistów NMDA [32,69,71,93].

Mechanizm drgawkotwórczego działania AOAA łączyliśmy początkowo ze spadkiem produkcji kwasu kynureninowego obserwowanym pod wpływem AOAA w warunkach *in vitro*. Co prawda nie wykazano lokalnego spadku endogennego poziomu kwasu kynureninowego po podaniu AOAA do prążkowie [7], nie wyklucza to jednak, iż do takich zmian dochodzi w strukturach zaangażowanych w proces epileptogenezy, np. w hipokampie, ciałach migdałowych czy korze entorinalnej, po lokalnym lub obwodowym zastosowaniu AOAA. Alternatywna hipoteza zakłada, że zmiany wywołane przez AOAA są następstwem zahamowania mitochondrialnego metabolizmu energetycznego, co wtórnie zwiększa wrażliwość neuronalną na działanie agonistów glutaminianergicznych. Bardzo prawdopodobne jest współistnienie obu procesów – zmniejszonej syntezy kwasu kynureninowego oraz nadmiernej aktywacji układu aminokwasów pobudzających.

W świetle dostępnych danych założyliśmy, że upośledzenie mitochondrialnego metabolizmu energetycznego może być wystarczającym czynnikiem inicjującym procesy drgawkowe i podjęliśmy szczegółowe badania toksyn mitochondrialnych. Wykazaliśmy, że 3-NPA podane domózkowo lub obwodowo powoduje drgawki przypominające w pewnym stopniu drgawki występujące w wyniku zastosowania AOAA. Nawracającym drgawkom klonicznym nie towarzyszą drgawki toniczne czy stan drgawkowy. Drgawki po podaniu 3-NPA blokowane są przez diazepam, fenobarbital i sole kwasu walproinowego, ale nie fenytoinę, karbamazepinę, trimetadion i etosuksymid. W odróżnieniu od drgawek wywołanych przez AOAA, kompetycyjni i niekompetycyjni antagoniści NMDA nie hamują występowania drgawek spowodowanych przez 3-NPA. Natomiast antagoniści receptorów nie-NMDA, skutecznie chronią zarówno przed drgawkami, jak i toksycznością wywołaną przez 3-NPA. Potwierdzeniem znaczącej roli mechanizmów glutaminergicznych związanych z receptorami nie-NMDA w działaniu 3-NPA jest również nasilenie drgawkotwórczych efektów domózkowego podania kwasu kainowego i AMPA (kwas α -amino-3-hydroxy-5-metylizoxazole-4-propionowy), ale nie NMDA, u zwierząt otrzymujących podprogowe dawki 3-NPA [9,108].

Mimo zgromadzenia stosunkowo niewielkiej ilości danych o drgawkach wywołanych przez toksyny mitochondrialne wydaje się, że już teraz można określić pewne cechy odróżniające je od innych drgawek wywołanych chemicznie. Są to: indukcja wyłącznie drgawek klonicznych, znaczna oporność na działanie leków przeciwpadaczkowych i substancji przeciwdrgawkowych oraz brak pełnej korelacji między działaniem drgawkotwórczym a toksycznością rozumianą jako śmierć zwierząt laboratoryjnych. W klasycznych modelach drgawek kloniczno-tonicznych śmierć następuje najczęściej w trakcie lub bezpośrednio po wystąpieniu drgawek tonicznych.

Natomiast zgony zwierząt wywoływane toksynami mitochondrialnymi cechuje brak bezpośredniego związku z napadem drgawek.

Nasze dalsze prace badawcze skoncentrują się na ocenie ewentualnych drgawkotwórczych efektów zastosowania innych toksyn mitochondrialnych, takich jak: rotenon, malonian i antymycyna. Wystąpienie drgawek oraz potwierdzenie ewentualnego udziału układu aminokwasów pobudzających w ich patomechanizmie może pozwolić na uznanie drgawek mitochondrialnych za nowy model drgawek padaczkowych.

Wnikliwa analiza mechanizmów leżących u podłoża drgawek wywołanych przez toksyny mitochondrialne może przyczynić się do znaczącego postępu w leczeniu i zapobieganiu napadom padaczkowym u ludzi. Pamiętać bowiem należy, że mimo wprowadzania nowych leków przeciwpadaczkowych i stosowania politerapii, u około 30% pacjentów nie osiąga się skutecznej kontroli napadów drgawkowych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALSTON TA, MELA L, BRIGHT HJ. 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; **74**: 3767–3771.
- [2] ANDREASSEN OA, JORGENSEN HA. The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces vacuous chewing movements in rats. Implications for tardive dyskinesia? *Psychopharmacology (Berl)* 1995; **119**: 474–476.
- [3] BAZZETT TJ, FALIK RC, BECKER JB, ALBIN RL. Synergistic effects of chronic exposure to subthreshold concentrations of quinolinic acid and malonate in the rat striatum. *Brain Res* 1996; **718**: 228–232.
- [4] BEAL MF. Neurochemistry and toxin models in Huntington's disease. *Curr Opin Neurol* 1994; **7**: 542–547.
- [5] BEAL MF, BROUILLET E, JENKINS BG, FERRANTE RJ, KOWALL NW, MILLER JM, STOREY E, SRIVASTAVA R, ROSEN BR, HYMAN BT. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* 1993; **13**: 4181–4192.
- [6] BEAL MF, BROUILLET E, JENKINS B, HENSHAW R, ROSEN B, HYMAN BT. Age-dependent striatal excitotoxic lesions produced by the endogenous mitochondrial inhibitor malonate. *J Neurochem* 1993; **61**: 1147–1150.
- [7] BEAL MF, SWARTZ KJ, HYMAN BT, STOREY E, FINN SF, KOROSHETZ W. Aminooxyacetic acid results in excitotoxin lesions by a novel indirect mechanism. *J Neurochem* 1991; **57**: 1068–1073.
- [8] BEHRENS MI, KOH J, CANZONIERO LM, SENSI SL, CSERNANSKY CA, CHOI DW. 3-Nitropropionic acid induces apoptosis in cultured striatal and cortical neurons. *Neuroreport* 1995; **6**: 545–548.
- [9] BLASZCZAK P, SARAN T, TURSKI WA, URBANSKA EM. AMPA/Kainate receptors involvement in convulsant and proconvulsant properties of mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid in mice. *Soc Neurosci Abst* 1996; **22**: 607.5.
- [10] BLOEM BR, IRWIN I, BURUMA OJ, HAAN J, ROOS RA, TETRUD JW, LANGSTON JW. The MPTP model: versatile contributions to the treatment of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1990; **97**: 273–293.

- [11] BONUCCELLI U, FARIELLO RG Evidence for an epileptogenic action of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6,-tetrahydropyridine. *Neuropharmacology* 1989; **28**: 1419–1422.
- [12] BONUCCELLI U, GARANT D, FARIELLO R The acute convulsant effect of MPTP is dependent on intracerebral MPP+. *Neurosci Lett* 1991; **124**: 22–26.
- [13] BORLONGAN CV, KOUTOUZIS TK, FREEMAN TB, CAHILL DW, SANBERG PR Behavioral pathology induced by repeated systemic injections of 3-nitropropionic acid mimics the motoric symptoms of Huntington's disease. *Brain Res* 1995; **697**: 254–257.
- [14] BORLONGAN CV, KOUTOUZIS TK, SANBERG PR 3-Nitropropionic acid animal model and Huntington's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 1997; **21**: 289–293.
- [15] BORLONGAN CV, NISHINO H, SANBERG PR. Systemic, but not intraparenchymal, administration of 3-nitropropionic acid mimics the neuropathology of Huntington's disease: a speculative explanation. *Neurosci Res* 1997; **28**: 185–189.
- [16] BOSSI SR, SIMPSON JR, ISACSON O. Age dependence of striatal neuronal death caused by mitochondrial dysfunction. *Neuroreport* 1993; **4**: 73–76.
- [17] BOUGRIA M, VITORICA J, CANO J, MACHADO A. Implication of dopamine transporter system on 1-methyl-4-phenylpyridinium and rotenone effect in striatal synaptosomes. *Eur J Pharmacol* 1995; **291**: 407–415.
- [18] BROUILLET E, BEAL MF. NMDA antagonists partially protect against MPTP induced neurotoxicity in mice. *Neuroreport* 1993; **4**: 387–390.
- [19] BROUILLET E, HANTRAYE P, FERRANTE RJ, DOLAN R, LEROY-WILLIG A, KOWALL NW, BEAL MF. Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 7105–7109.
- [20] BROUILLET E, HENSHAW DR, SCHULZ JB, BEAL MF. Aminoxyacetic acid striatal lesions attenuated by 1,3-butanediol and coenzyme Q10. *Neurosci Lett* 1994; **177**: 58–62.
- [21] BROUILLET EP, SHINOBU L, MCGARVEY U, HOCHBERG F, BEAL MF. Manganese injection into the rat striatum produces excitotoxic lesions by impairing energy metabolism. *Exp Neurol* 1993; **120**: 89–94.
- [22] BURNS RS, CHIUH CC, MARKEY SP, EBERT MH, JACOBOWITZ DM, KOPIN IJ. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 4546–4550.
- [23] CHANG C, JANG T. Age-dependent neurotoxicity of striatal lesions produced by aminoxyacetic acid: quantitative *in vitro* 1H NMR spectroscopic studies. *J Neurochem* 1995; **65**: 1192–1198.
- [24] COLLINS RC, MEHTA S. Effect of amino-oxyacetic acid (AOAA) on focal penicillin seizures. *Brain Res* 1978; **157**: 311–320.
- [25] CONNOP BP, BOEGMAN RJ, BENINGER RJ, JHAMANDAS K. Attenuation of malonate-induced degeneration of the nigrostriatal pathway by inhibitors of nitric oxide synthase. *Neuropharmacology* 1996; **35**: 459–465.
- [26] CONNOP BP, BOEGMAN RJ, BENINGER RJ, JHAMANDAS K. Malonate-induced degeneration of basal forebrain cholinergic neurons: attenuation by lamotrigine, MK-801, and 7-nitroindazole. *J Neurochem* 1997; **68**: 1191–1199.
- [27] DAVIS GC, WILLIAMS AC, MARKEY SP, EBERT MH, CAINE ED, REICHERT CM, KOPIN IJ. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res* 1979; **1**: 249–254.
- [28] DAVOLIO C, GREENAMYRE JT. Selective vulnerability of the CA1 region of hippocampus to the indirect excitotoxic effects of malonic acid *Neurosci Lett* 1995; **192**: 29–32.
- [29] DESHPANDE SB, FUKUDA A, NISHINO H. 3-Nitropropionic acid increases the intracellular Ca^{2+} in cultured astrocytes by reverse operation of the Na^+-Ca^{2+} exchanger. *Exp Neurol* 1997; **145**: 38–45.

- [30] DU F, EID T, SCHWARCZ R. Neuronal damage after the injection of aminooxyacetic acid into the rat entorhinal cortex: a silver impregnation study. *Neuroscience* 1998; **82**: 1165–1178.
- [31] DU F, SCHWARCZ R. Aminooxyacetic acid causes selective neuronal loss in layer III of the rat medial entorhinal cortex. *Neurosci Lett* 1992; **147**: 185–188.
- [32] EID T, DU F, SCHWARCZ R. Differential neuronal vulnerability to amino-oxyacetate and quinolinate in the rat parahippocampal region. *Neuroscience* 1995; **68**: 645–656.
- [33] ESFANDIARI A, SOIFYOUDINE D, PATURNEAU-JOUAS M. Inhibition of fatty acid beta-oxidation in rat brain cultured astrocytes exposed to the neurotoxin 3-nitropropionic acid. *Dev Neurosci* 1997; **19**: 312–320.
- [34] FARIELLO RG, DEMATTEI M, CASTORINA M, FERRARO TN, GOLDEN GT. MPTP and convulsive responses in rodents. *Brain Res* 1987; **426**: 373–376.
- [35] FERRANTE RJ, SCHULZ JB, KOWALL NW, BEAL MF. Systemic administration of rotenone produces selective damage in the striatum and *globus pallidus*, but not in the *substantia nigra*. *Brain Res* 1997; **753**: 157–162.
- [36] FINIELS-MARLIER F, MARINI AM, WILLIAMS P, PAUL SM. The N-methyl-D-aspartate antagonist MK-801 fails to protect dopaminergic neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity *in vitro*. *J Neurochem* 1993; **60**: 1968–1971.
- [37] FU Y, HE F, ZHANG S, HUANG J, ZHANG J, JIAO X. 3-Nitropropionic acid produces indirect excitotoxic damage to rat striatum. *Neurotoxicol Teratol* 1995; **17**: 333–339.
- [38] FULLER RW, HEMRICK-LUECKE SK, PERRY KW. Deprenyl antagonizes acute lethality of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; **247**: 531–535.
- [39] GEDDES JW, PANG Z, WILEY DH. Hippocampal damage and cytoskeletal disruption resulting from impaired energy metabolism. Implications for Alzheimer disease. *Mol Chem Neuropathol* 1996; **28**: 65–74.
- [40] GOMES C, TROLIN G. GABA turnover in mouse brain: agreement between the rate of GABA accumulation after aminooxyacetic acid and the rate of disappearance after 3-mercaptopyropionic acid. *J Neural Transm* 1982; **54**: 265–274.
- [41] GOULD DH, GUSTINE DL. Basal ganglia degeneration, myelin alterations, and enzyme inhibition induced in mice by the plant toxin 3-nitropropanoic acid. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1982; **8**: 377–393.
- [42] GOULD DH, WILSON MP, HAMAR DW. Brain enzyme and clinical alterations induced in rats and mice by nitroaliphatic toxicants. *Toxicol Lett* 1985; **27**: 83–89.
- [43] GUYOT MC, HANTRAYE P, DOLAN R, PALFI S, MAZIERE M, BROUILLET E. Quantifiable bradykinesia, gait abnormalities and Huntington's disease-like striatal lesions in rats chronically treated with 3-nitropropionic acid. *Neuroscience* 1997; **79**: 45–56.
- [44] GREENE JG, GREENAMYRE JT. Exacerbation of NMDA, AMPA, and L-glutamate excitotoxicity by the succinate dehydrogenase inhibitor malonate. *J Neurochem* 1995; **64**: 2332–2338.
- [45] GREENE JG, GREENAMYRE JT. Manipulation of membrane potential modulates malonate-induced striatal excitotoxicity *in vivo*. *J Neurochem* 1996; **66**: 637–643.
- [46] GREENE JG, PORTER RH, ELLER RV, GREENAMYRE JT. Inhibition of succinate dehydrogenase by malonic acid produces an „excitotoxic” lesion in rat striatum. *J Neurochem* 1993; **61**: 1151–1154.
- [47] HAMILTON BF, GOULD DH. Correlation of morphologic brain lesions with physiologic alterations and blood-brain barrier impairment in 3-nitropropionic acid toxicity in rats. *Acta Neuropathol (Berl)* 1987; **74**: 67–74.
- [48] HAMILTON BF, GOULD DH. Nature and distribution of brain lesions in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid: a type of hypoxic (energy deficient) brain damage. *Acta Neuropathol (Berl)* 1987; **72**: 286–297.

- [49] HASSEL B, SONNEWALD U. Selective inhibition of the tricarboxylic acid cycle of GABAergic neurons with 3-nitropropionic acid *in vivo*. *J Neurochem* 1995; **65**: 1184–1191.
- [50] HE F, ZHANG S, ZHANG C. Mycotoxin –induced encephalopathy and dystonia in children. [w] Volan GN [red.] *Basic Science in Toxicology*, London: Taylor & Francis 1990: 596–604.
- [51] HEIKKILA RE, NICKLAS WJ, VYAS I, DUVOISIN RC. Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *Neurosci Lett* 1985; **62**: 389–394.
- [52] HU W. The isolation and structure identification of a toxic substance, 3-nitropropionic acid, produced by *Arthrinium* from mildewed sugar cane. *Chin J Prev Med* 1986; **20**: 321–323.
- [53] IKONOMIDOU C, TURSKI L. Neurodegenerative disorders: clues from glutamate and energy metabolism. *Crit Rev Neurobiol* 1996; **10**: 239–263.
- [54] IRWIN I, LANGSTON JW. Selective accumulation of MPP⁺ in the substantia nigra: a key to neurotoxicity? *Life Sci* 1985; **36**: 207–212.
- [55] JAVITCH JA, D'AMATO RJ, STRITTMATTER SM, SNYDER SH. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 2173–2177.
- [56] JOHANNESSEN JN. A model of chronic neurotoxicity: long-term retention of the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) within catecholaminergic neurons. *Neurotoxicology* 1991; **12**: 285–302.
- [57] KAUPPINEN RA, SIHRA TS, NICHOLLS DG. Aminooxyacetic acid inhibits the maleate-aspartate shuttle in isolated nerve terminals and prevents the mitochondria from utilizing glycolytic substrates. *Biochim Biophys Acta* 1987; **930**: 173–178.
- [58] KOPIN IJ, MARKEY SP. MPTP toxicity: implication for research in Parkinson's disease. *Ann Rev Neurosci* 1988; **11**: 81–96.
- [59] LANGSTON JW, BALLARD P, TETRUD JW, IRWIN I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983; **219**: 979–980.
- [60] LEGALLA SALLE G. Inhibition of kindling-induced generalized seizures by aminooxyacetic acid. *Can J Physiol Pharmacol* 1980; **58**: 7–11.
- [61] LIU X, LUO X, HU W. Studies on the epidemiology and etiology of moldy sugarcane poisoning in China. *Biomed Environ Sci* 1992; **5**: 161–177.
- [62] LUDOLPH AC, HE F, SPENCER PS, HAMMERSTAD J, SABRI M. 3-Nitropropionic acid – exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *Can J Neurol Sci* 1991; **18**: 492–498.
- [63] MANNING-SAYI J, LEONARD BE. Studies on the nootropic potential of some angiotensin converting enzyme inhibitors in the mouse. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1989; **13**: 953–962.
- [64] MARAGOS WF, SILVERSTEIN FS. The mitochondrial inhibitor malonate enhances NMDA toxicity in the neonatal rat striatum. *Brain Res Dev Brain Res* 1995; **88**: 117–121.
- [65] MARKEY SP, JOHANNESSEN JN, CHIUEH CC, BURNS RS, HERKENHAM MA. Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature* 1984; **311**: 464–467.
- [66] MAREY-SEMPER I, GELMAN M, LEVI-STRAUSS M. A selective toxicity toward cultured mesencephalic dopaminergic neurons is induced by the synergistic effects of energetic metabolism impairment and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 1995; **15**: 5912–5918.
- [67] MAYES PA. Fosforylacja oksydacyjna i mitochondrialne systemy transportujące. [w] Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW [red.] *Biochemia Harpera*, Warszawa, PZWL 1995: 147–160.
- [68] MCDONALD JW, SCHOEPP DD. Aminooxyacetic acid produces excitotoxic brain injury in neonatal rats. *Brain Res* 1993; **624**: 239–244.

- [70] MCMMASTER OG, BARAN H, WU HQ, DU F, FRENCH ED, SCHWARCZ R. gamma-Acetylenic GABA produces axon-sparing neurodegeneration after focal injection into the rat hippocampus. *Exp Neurol* 1993; **124**: 184–191.
- [71] MCMMASTER OG, DU F, FRENCH ED, SCHWARCZ R. Focal injection of aminooxyacetic acid produces seizures and lesions in rat hippocampus: evidence for mediation by NMDA receptors. *Exp Neurol* 1991; **113**: 378–385.
- [72] MILLER PJ, ZABORSZKY L. 3-Nitropropionic acid neurotoxicity: visualization by silver staining and implications for use as an animal model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 1997; **146**: 212–229.
- [73] MICHEL PP, AGID Y. The glutamate antagonist, MK-801, does not prevent dopaminergic cell death induced by the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) in rat dissociated mesencephalic cultures. *Brain Res* 1992; **597**: 233–240.
- [74] NICKLAS WJ, VYAS I, HEIKKILA RE. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by L-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, L-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci* 1985; **36**: 2503–2508.
- [75] NISHINO H, KUMAZAKI M, FUKUDA A, FUJIMOTO I, SHIMANO Y, HIDA H, SAKURAI T, DESHPANDE SB, SHIMIZU H, MORIKAWA S, INUBUSHI T. Acute 3-nitropropionic acid intoxication induces striatal astrocytic cell death and dysfunction of the blood-brain barrier: involvement of dopamine toxicity. *Neurosci Res* 1997; **27**: 343–355.
- [76] NISHINO H, SHIMANO Y, KUMAZAKI M, SAKURAI T. Chronically administered 3-nitropropionic acid induces striatal lesions attributed to dysfunction of the blood-brain barrier. *Neurosci Lett* 1995; **186**: 161–164.
- [77] NISHINO H, SHIMANO Y, KUMAZAKI M, SAKURAI T, HIDA H, FUJIMOTO I, FUKUDA A. Hypothalamic neurons are resistant to the intoxication with 3-nitropropionic acid that induces lesions in the striatum and hippocampus via the damage in the blood-brain barrier. *Neurobiology (Bp)* 1995; **3**: 257–267.
- [78] NOVELLI A, REILLY JA, LYSKO PG, HENNEBERRY RC. Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res* 1988; **451**: 205–212.
- [79] OLNEY JW. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 1969; **164**: 719–721.
- [80] OLNEY JW, SHARPE L. Brain lesions in infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science* 1969; **166**: 386–388.
- [81] PALFIS, FERRANTERJ, BROUILLETE, BEAL MF, DOLAN R, GUYOT MC, PESCHAN-SKI M, HANTRAYE P. Chronic 3-nitropropionic acid treatment in baboons replicates the cognitive and motor deficits of Huntington's disease. *J Neurosci* 1996; **16**: 3019–3025.
- [82] PANG Z, GEDDES JW. Mechanisms of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis. *J Neurosci* 1997; **17**: 3064–3073.
- [83] PEI G, EBENDAL T. Specific lesions in the extrapyramidal system of the rat brain induced by 3-nitropropionic acid (3-NPA). *Exp Neurol* 1995; **132**: 105–115.
- [84] PERRY TL, WRIGHT JM, HANSEN S, ALLAN BM, BAIRD PA, MACLEOD PM. Failure of aminooxyacetic acid therapy in Huntington disease. *Neurology* 1980; **30**: 772–775.
- [85] POIRIER J, BARBEAU A. 1-Methyl-4-phenyl-pyridinium-induced inhibition of nicotinamide adenosine dinucleotide cytochrome c reductase. *Neurosci Lett* 1985; **62**: 7–11.
- [86] RAMSAY RR, DADGAR J, TREVOR A, SINGER TP. Energy-driven uptake of N-methyl-4-phenylpyridine by brain mitochondria mediates the neurotoxicity of MPTP. *Life Sci* 1986; **39**: 581–588.
- [87] RAMSAY RR, SALACH JI, DADGAR J, SINGER TP. Inhibition of mitochondrial NADH dehydrogenase by pyridine derivatives and its possible relation to experimental and idiopathic parkinsonism. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; **135**: 269–275.

- [88] RAMSAY RR, SALACH JI, SINGER TP. Uptake of the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) by mitochondria and its relation to the inhibition of the mitochondrial oxidation of NAD+-linked substrates by MPP+. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; **134**: 743–748.
- [89] RAMSAY RR, SINGER TP. Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J Biol Chem* 1986; **261**: 7585–7587.
- [90] RAY DE. Pesticides derived from plants and other organisms. [w] Hayes WJ Jr, Laws ER Jr [red.] *Handbook of Pesticide Toxicology*. Academic Press 1991: 585–636.
- [91] SANTIAGO M, VENERO JL, MACHADO A, CANO J *In vivo* protection of striatum from MPP+ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Brain Res* 1992; **586**: 203–207.
- [92] SATO S, GOBBEL GT, HONKANIEMI J, LI Y, KONDO T, MURAKAMI K, SATO M, COPIN JC, CHAN PH. Apoptosis in the striatum of rats following intraperitoneal injection of 3-nitropropionic acid. *Brain Res* 1997; **745**: 343–347.
- [93] SCHARFMAN HE. Hyperexcitability of entorhinal cortex and hippocampus after application of aminooxyacetic acid (AOAA) to layer III of the rat medial entorhinal cortex *in vitro*. *J Neurophysiol* 1996; **76**: 2986–3001.
- [94] SIMPSON JR, ISACSON O Mitochondrial impairment reduces the threshold for *in vivo* NMDA-mediated neuronal death in the striatum. *Exp Neurol* 1993; **121**: 57–64.
- [95] SRIVASTAVA R, BROUILLET E, BEAL MF, STOREY E, HYMAN BT. Blockade of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) nigral toxicity in the rat by prior decortication or MK-801 treatment: a stereological estimate of neuronal loss. *Neurobiol Aging* 1993; **14**: 295–301.
- [96] STACH R, KACZ D. Effect of combined dopaminergic and GABA-ergic stimulation on ouabain-induced epileptiform activity. *Epilepsia* 1977; **18**: 417–423.
- [97] STODOLNIK-BARAŃSKA W. Cytoplazma i organelle komórkowe. [w] Ostrowski K [red.] *Histologia*, Warszawa: PZWL 1995: 88–110.
- [98] STOREY E, HYMAN BT, JENKINS B, BROUILLET E, MILLER JM, ROSEN BR, BEAL MF. 1-Methyl-4-phenylpyridinium produces excitotoxic lesions in rat striatum as a result of impairment of oxidative metabolism. *J Neurochem* 1992; **58**: 1975–1978.
- [99] STRYER L. Fosforylacja oksydacyjna. [w] Stryer L [red.] *Biochemia*, Warszawa: PWN 1997: 564–594.
- [100] TURSKI L, BRESSLER K, RETTIG KJ, LOSCHMANN PA, WACHTEL H. Protection of substantia nigra from MPP+ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature* 1991; **349**: 414–418.
- [101] TURSKI L, STEPHENS DN Excitatory amino acid antagonists protect mice against MPP+ seizures. *Synapse* 1992; **10**: 120–125.
- [102] TURSKI W, DZIKI M, PARADA J, KLEINROK Z, CAVALHEIRO EA. Age dependency of the susceptibility of rats to aminooxyacetic acid seizures. *Brain Res Dev Brain Res* 1992; **67**: 137–144.
- [103] TURSKI WA, DZIKI M, URBAŃSKA E, CALDERAZZO-FILHO LS, CAVALHEIRO EA. Seizures induced by aminooxyacetic acid in mice: pharmacological characteristics. *Synapse* 1991; **7**: 173–180.
- [104] TURSKI WA, GRAMSBERGEN JBP, TRAITLER H, SCHWARCZ R. Rat brain slices produce and liberate kynurenic acid upon exposure to L-kynurenine. *J Neurochem* 1989; **52**: 1629–1636.
- [105] TURSKI L, TURSKI WA. Towards an understanding of the role of glutamate in neurodegenerative disorders: energy metabolism and neuropathology. *Experientia* 1993; **49**: 1064–1072.
- [106] URBAŃSKA E, IKONOMIDOU C, SIEKLUCKA M., TURSKI WA. Amino-oxyacetic acid produces excitotoxic lesions in the rat striatum. *Soc Neurosci Abstr* 1989; **15**: 764.
- [107] URBAŃSKA E, IKONOMIDOU C, SIEKLUCKA M., TURSKI WA. Aminooxyacetic acid produces excitotoxic lesions in the rat striatum. *Synapse* 1991; **9**: 129–135.

- [108] URBANSKA EM, BLASZCZAK P, SARAN T, KLEINROK Z, TURSKI WA. Mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid evokes seizures in mice. *Eur J Pharmacol* 1998; w druku.
- [109] URBANSKA EM, TURSKI WA. Seizures induced by mitochondrial toxins – involvement of excitatory amino acids. Zjazd: „Excitatory Amino Acids 10 years later”. Brazylia, 1998 (streszczenie)
- [110] VAN NESS PC, OLSEN RW, VERITY MA. MPTP is proconvulsant acutely but has no long-term effect in rodent models of seizure and epilepsy. *Brain Res* 1989; **504**: 289–292.
- [111] WOOD JD, PEESKER SJ. The role of GABA metabolism in the convulsant and anticonvulsant actions of aminooxyacetic acid. *J Neurochem* 1973; **20**: 379–387.
- [112] YAMAMOTO H. Protection against cyanide-induced convulsions with alpha-ketoglutarate. *Toxicology* 1990; **61**: 221–228.
- [113] YAMASHITA J. Convulsive seizure induced by intracerebral injection of semicarbazide (an anti-vitamin B6) in the mouse. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1976; **22**: 1–6.
- [114] ZEEVALK GD, DERR-YELLIN E, NICKLAS WJ. Relative vulnerability of dopamine and GABA neurons in mesencephalic culture to inhibition of succinate dehydrogenase by malonate and 3-nitropropionic acid and protection by NMDA receptor blockade. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; **275**: 1124–1130.
- [115] ZEEVALK GD, NICKLAS WJ. Chemically induced hypoglycemia and anoxia: relationship to glutamate receptor-mediated toxicity in retina. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; **253**: 1285–1292.
- [116] ZEEVALK GD, NICKLAS WJ. Mechanisms underlying initiation of excitotoxicity associated with metabolic inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; **257**: 870–878.
- [117] ZUDDAS A, OBERTO G, VAGLINI F, FASCETTI F, FORNAI F, CORSINI GU MK-801 prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in primates. *J Neurochem* 1992; **59**: 733–739.

APOPTOZA NEURONÓW W HODOWLI *IN VITRO*

APOPTOSIS OF CULTURED NEURONS *IN VITRO*

Izabela FIGIEL

Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej,
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Streszczenie: Apoptoza komórek nerwowych występuje powszechnie w dojrzewającym układzie nerwowym. Opisywana jest również w patofizjologii tego układu. Charakteryzują ją podobne zmiany morfologiczne i biochemiczne jak te towarzyszące apoptozie innych typów komórek. Wielokrotnie potwierdzono, że do jej wystąpienia niezbędna jest ekspresja genów. Ponadto wykazano korelację między śmiercią neuronów wywołaną brakiem czynników wzrostowych bądź też nadmiernym pobudzeniem receptorów dla glutaminianu a ekspresją białka c-Jun wchodzącego w skład czynnika transkrypcyjnego AP-1. Podobne badania nad podłożem molekularnym apoptozy komórek nerwowych stały się możliwe dzięki wprowadzeniu modeli hodowli komórkowych. Artykuł ten poświęcony jest opisaniu niektórych z nich.

Słowa kluczowe: apoptoza, hodowle komórkowe, ekscytotoksyczność, c-Jun.

Summary: Apoptosis of neuronal cells commonly occurs in the developing nervous system. It is also known to be involved in pathophysiological events. This form of cell death is characterized by similar morphological and biochemical changes like those typical for apoptosis in other cells. It has been repeatedly shown that apoptosis depends on gene expression. Furthermore, a correlation between neuronal death induced by growth factor deprivation, or by an extensive activation of glutamate receptors on the one hand, and expression of c-Jun protein, a component of AP-1 transcription factor, on the other, has been shown. Studies on molecular bases of neuronal apoptosis became possible due to establishment of cell culture models. In this article they are described with discussion of their virtues and caveats.

Key words: apoptosis, cell culture, excitotoxicity, c-Jun.

Hodowle komórkowe są z powodzeniem wykorzystywane do badań mechanizmów funkcjonowania złożonych organizmów. Podstawową zaletą takich układów modelowych jest możliwość obserwacji wpływu określonych czynników na przeżywanie i różnicowanie komórek. Między innymi opisano sposoby izolacji i utrzymywania w warunkach *in vitro* niemal wszystkich populacji neuronalnych. Od kilku lat

hodowle komórek nerwowych są również wykorzystywane do badań apoptozy. Poważnym problemem, z którym borykają się badacze jest heterogenność pierwotnych (wyprowadzanych bezpośrednio z materiału zwierzęcego) hodowli komórkowych. Zazwyczaj bowiem uzyskuje się hodowle wzbogacone w neurony i zawierające komórki glejowe. Często też frakcja neuronalna nie jest jednorodna. W efekcie, czynnik wywołujący neurodegenerację powoduje różną odpowiedź poszczególnych komórek. Dodatkowo, komórki umierające w drodze apoptozy nie ulegają fagocytozie, jak to ma miejsce *in vivo* i często w późniejszym etapie przechodzą nekrozę. Opracowano odpowiednie metody umożliwiające wykrywanie zmian morfologicznych i biochemicznych towarzyszących apoptozie komórek w hodowli. Powszechnie stosowane są barwienia z wykorzystaniem fluorochromów, takich jak oranż akrydyny i bisbenzimid. Substancje te mają zdolność wiązania z chromatyną, a wzbudzone światłem o odpowiedniej długości fali, emitują promieniowanie fluorescencyjne. Do wykrywania fragmentacji DNA *in situ* na poziomie pojedynczej komórki stosuje się również metodę TUNEL. Jest ona oparta na działaniu enzymu, terminalnej transferazy, która do końców 3' w pękniętej nici DNA dobudowuje wyznakowany digoksygeniną lub biotyną nukleotyd. Przeprowadzana z kolei reakcja immunocytochemiczna pozwala na uwidocznienie komórek z pofragmentowanym DNA. Ponadto, w miarę wzbogacania wiedzy na temat molekularnego podłoża apoptozy, wzrasta liczba dostępnych przeciwciał rozpoznających białka istotne dla wystąpienia tego procesu.

MODELE APOPTOZY W NEUROGENEZIE

Powstawaniu układu nerwowego towarzyszy śmierć przez apoptozę ponad 50% neuroblastów [29]. Śmierć ta jest regulowana przez czynniki wzrostowe, neurotrofiny, które decydują o przeżyciu określonych populacji neuronów [4, 32]. Modele *in vitro*, które naśladowałyby naturalnie występującą programowaną śmierć komórek nerwowych, okazały się niezbędne do badania molekularnych mechanizmów tego zjawiska. Najczęściej wykorzystywanymi modelami są hodowle współczulnych neuronów zwoju szyjnego oraz hodowle neuronów ziarnistych mózdzku.

Hodowla neuronów współczulnych

Często wykorzystywanym modelem programowanej śmierci neuronów jest hodowla komórek zwoju szyjnego szczura w pożywce pozbawionej czynnika wzrostu nerwów (NGF). Model ten oparty jest na fizjologicznej roli NGF, który wspomaga wzrost neuronów współczulnych w trakcie rozwoju zwierzęcia. W ciągu 3–7 dni po urodzeniu, ponad 35% neuronów tej populacji umiera wskutek niedoboru NGF

TABELA 1. Zalety i wady modeli apoptozy w neurodegeneracji

| | + | - |
|--------------------------------|---|--|
| Hodowle neuronów współczulnych | znany wymagany czynnik troficzny zmiana jednego parametru wywołuje śmierć duże perikariony, możliwa mikroinjekcja | uzyskiwana mała liczba komórek wyprowadzana z 21-dniowych płodów |
| Hodowle neuronów ziarnistych | uzyskiwana duża liczba komórek wyprowadzane z 8-dniowych oseków | nie znane wymagane czynniki wzrostowe małe perikariony, trudna mikroinjekcja zmiana dwóch parametrów wywołuje śmierć |

[36]. System hodowli tych komórek ma wiele zalet (tab. 1). Zwykle tkanka jest uzyskiwana z 21-dniowych płodów szczura, chociaż niektórzy badacze z powodzeniem stosują pobieranie materiału ze zwierząt nowonarodzonych. Komórki hodowane w pożywce zawierającej surowicę i NGF są zdolne do różnicowania i znakomicie przeżywiają do kilku tygodni *in vitro* [6]. Poważnym czynnikiem ograniczającym badania w tym modelu jest niewielka liczba komórek uzyskiwana z jednego zwierzęcia (ok. 20 tys.). Pozbawienie troficznego działania neurotrofiny, np. przez podanie do pożywki przeciwciała rozpoznającego NGF, wywołuje w ciągu 24–72 godzin śmierć komórek, która zachodzi drogą apoptozy [13, 26]. Badania ultrastrukturalne pokazały, że pierwsze zmiany morfologii polegające na fragmentacji wypustek neuronalnych i obkurczaniu perikarionów zachodzą już 12–18 godzin po deprivacji troficzej [26]. Z kolei następuje fragmentacja DNA na odcinki oligonukleosomowe [9, 12]. Zastosowanie inhibitorów syntezy RNA i białka potwierdziło, że do wystąpienia tych charakterystycznych zmian morfologii komórkowej niezbędne jest powstawanie nowych makrocząsteczek [26]. Kilka zespołów badawczych poszukuje tych białek „zabójców”. Obecnie wiadomo, że w hodowli neuronów współczulnych już po 4 godzinach od odplukania NGF wzrasta poziom aktywnej, ufosforylowanej formy białka c-Jun, jednego ze składników czynnika transkrypcyjnego AP-1 [14, 21]. Co więcej, ekspresja innych białek rodzin Fos i Jun nie ulega zmianie. Nieznaczny wzrost poziomu białka c-Fos notowano zaledwie w ok. 1% neuronów, co nie wskazuje na jego udział w procesie apoptozy [21]. Potwierdzono natomiast funkcjonalne znaczenie białka c-Jun dla tego procesu.

Podanie do hodowli neuronów współczulnych, prowadzonej w pożywce nie zawierającej NGF, przeciwciała rozpoznającego białko c-Jun, jak również mikroiniekcja dominującego negatywnego mutantu c-Jun w znacznym stopniu ochrania te komórki przed apoptozą [14, 21]. Ponadto, sam wzrost ekspresji białka c-Jun wywołuje śmierć neuronów współczulnych *in vitro*, mimo obecności NGF w pożywce [21].

Opisany model apoptozy neuronów współczulnych zwoju szyjnego szczura pozbawionych troficznego działania NGF umożliwił badaczom udowodnienie funkcjonalnej roli białka c-Jun w tym procesie. Obecnie poszukuje się kolejnych wykonawców wyroku śmierci komórek nerwowych. Prawdopodobnie są wśród nich białka, których ekspresja jest regulowana przy udziale c-Jun.

Hodowla neuronów ziarnistych mózdzku

Hodowla neuronów ziarnistych mózdzku wyprowadzana jest z 8-dniowych osesków szczura. W przypadku tego modelu można dysponować ogromną liczbą komórek (z jednego zwierzęcia uzyskuje się ok. 20 mln). Neurony ziarniste mózdzku przeżywają w warunkach *in vitro* jedynie w obecności surowicy i podwyższonego do 25 mM stężenia K^+ [18] bądź też niewielkiego stężenia NMDA [3]. Zarówno warunki depolaryzacji, jak i stymulacja receptorów NMDA, prawdopodobnie naśladują fizjologiczną aktywność neuronów *in vivo* [5]. Dzięki takim warunkom neurony mózdzku zdolne są do wysyłania wypustek, tworzenia połączeń synaptycznych i produkcji glutaminianu. Przeniesienie hodowli do pożywki pozbawionej surowicy i zawierającej jedynie 5 mM K^+ wywołuje śmierć neuronów, która ma morfologiczne i biochemiczne cechy apoptozy [10]. Przypomina to naturalnie występującą śmierć 20–30% neuronów ziarnistych między 3 a 5 tygodniem życia zwierzęcia [34, 35]. Taka eliminacja komórek ziarnistych doprowadza do powstania odpowiedniego stosunku między ich liczbą i liczbą komórek Purkinjego w dojrzałym mózdzku.

Badania prowadzone na tym modelu apoptozy wskazują także na funkcjonalną rolę białka c-Jun. Wykazano, że śmierci neuronów ziarnistych towarzyszy zwiększona ekspresja genu *c-jun* [28]. Wyniki ostatnich badań, w których wykorzystano przeciwciała rozpoznające ufosforylowane formy białka c-Jun, wskazują, że deprywacja troficzna prowadzi do wzrostu fosforylacji białka c-Jun na serynie 63 [33]. Ponadto, transfekcja komórek ziarnistych mózdzku w hodowli ekspresyjnymi mutantami c-Jun, w których zmieniono miejsca fosforylacji, potwierdziła ostatecznie, że do wystąpienia apoptozy niezbędna jest obecność ufosforylowanej formy białka c-Jun [33].

Opisany model apoptozy neuronów ziarnistych mózdzku jest modelem złożonym. Należy pamiętać, że do wywołania masywnej odpowiedzi komórek wymagane jest działanie dwóch czynników: deprywacja troficzna oraz obniżenie stężenia K^+ . Jednak już samo przeniesienie komórek do pożywki nie zawierającej surowicy wywołuje początkowo zaburzenia w funkcjonowaniu mitochondriów (6–8 godzin po odplukaniu

surowicy), a następnie zmiany morfologiczne charakterystyczne dla apoptozy (24–48 godzin po deprivacji troficznej) [2]. Zastosowanie antyoksydantów pozwoliło na stwierdzenie, że hodowla neuronów ziarnistych mózdzku pozbawionych jedynie troficznego działania surowicy może stanowić model do badania apoptozy wywołanej stresem oksydacyjnym [2]. Ostatnio udokumentowano również występowanie apoptozy w hodowli neuronów ziarnistych mózdzku w wyniku deprivacji tlenu i glukozy [23].

MODELE APOPTOZY W STANACH PATOFIZJOLOGICZNYCH

Wyniki ostatnich badań wskazują, że apoptotyczna śmierć neuronów może występować w tak rozpowszechnionych stanach chorobowych, jak: niedokrwienie, choroba Alzheimera, Huntingtona, epilepsja. Badanie molekularnego podłoża wspomnianych chorób stało się możliwe dzięki opracowaniu modeli hodowli komórkowych. Najbardziej znane są hodowle szczurzych lub mysich neuronów korowych oraz hodowle komórek hipokampa.

Hodowla neuronów korowych

Przygotowanie tej hodowli wiąże się z koniecznością pobierania materiału z 16-dniowych płodów. Hodowla wyróżnia się stosunkowo niewielkim zanieczyszczeniem komórkami glejowymi. W wielu laboratoriach wykorzystuje się ten model do badania mechanizmów śmierci neuronów towarzyszących udarom mózgu.

Kilkudniowe hodowle mogą być poddawane hipoksji i hipoglikemii. Warunki niedotlenienia najczęściej uzyskuje się przez zmianę atmosfery w inkubatorach, która przez ściśle określony czas zawiera 95% azotu. Odplukanie glukozy łączy się ze zmianą pożywki, w której prowadzona jest hodowla, na zbuforowany roztwór soli [19, 20]. W takich warunkach obserwowana jest ostra neurodegeneracja, która nosi znamiona nekrozy. Komórki pęcznieją i odrywają się od podłoża. Towarzyszy temu nadmierne uwalnianie glutaminianu ze zdepolaryzowanych komórek nerwowych oraz wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} [7]. Wiadomo jednak, że zablokowanie receptorów dla glutaminianu prowadzi do opóźnionej neurodegeneracji, która charakteryzuje się morfologicznymi i biochemicznymi cechami apoptozy [20, 24].

Klasyczne modele neurodegeneracji uzyskuje się przez podanie do pożywki komórek *in vitro* glutaminianu [8]. Udowodniono, że wywołana w ten sposób śmierć komórek może zachodzić drogą nekrozy lub apoptozy, w zależności od zastosowanego stężenia aminokwasu pobudzającego [11]. W modelu tym potwierdzono, że

śmierć neuronów związana z pobudzeniem receptorów dla glutaminianu może zależeć od ekspresji nowych białek. Są wśród nich czynniki transkrypcyjne łączące się z miejscem TRE, aktywowanym przez estry forbolu [17].

Hodowla komórek hipokampa

Opracowano kilka modeli hodowli komórek hipokampa. Zasadniczą cechą odróżniającą te modele jest wiek zwierząt, z których pobierana jest tkanka, co z kolei decyduje o przeżywaniu określonych populacji neuronów. Na przykład w celu uzyskania hodowli wzbogaconej w neurony piramidowe rogu Ammona, wykorzystuje się zwierzęta w 18 dniu rozwoju embrionalnego. Powszechnie stosuje się również hodowle hipokampa wyprowadzone z noworodków szczura. Należy jednak pamiętać, że hodowle te charakteryzują się wysoką proliferacją komórek glejowych. Natomiast hodowle komórek zakrętu zębatego, wzbogacone w neurony ziarniste uzyskuje się z 5-dniowych osesków szczura. Model ten jest rzadko stosowany ze względu na czasochłonną preparatykę oraz niewielką liczbę uzyskiwanych komórek. Porównanie hodowli stosowanych do badań patofizjologii ośrodkowego układu nerwowego przedstawia tabela 2.

W przebiegu znanych chorób ośrodkowego układu nerwowego szereg zmian neurodegeneracyjnych notuje się w hipokampie. Najczęściej dotyczą one komórek rogu Ammona, w którym wyróżnia się cztery części zwane polami CA. Poszczególne pola różnią się nie tylko budową, ale również wrażliwością na czynniki chorobowe. Wiadomo, że w procesach niedokrwiennych i padaczce dochodzi do niemal cał-

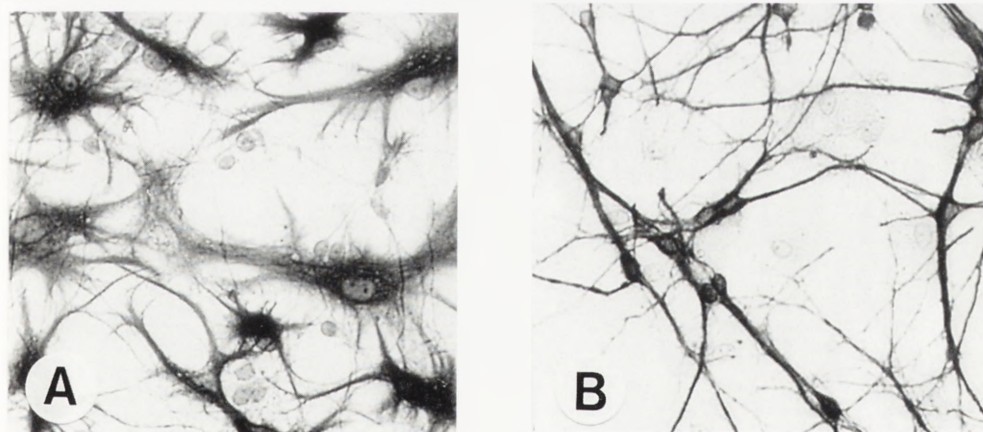
TABELA 2. Zalety i wady hodowli stosowanych do badań patofizjologii ośrodkowego układu nerwowego

| | + | - |
|---|---|--|
| Hodowle neuronów korowych | uzyskiwana duża liczba komórek zawiera 95% neuronów niska proliferacja komórek glejowych | wyprowadzana z 16-dniowych płodów |
| Hodowle neuronów hipokampa | uzyskiwana duża liczba komórek niska proliferacja komórek glejowych | wyprowadzana z 18-dniowych płodów zawiera różne populacje neuronów |
| Hodowle zakrętu zębatego hipokampa | uzyskiwana z 5-dniowych osesków zawiera głównie neurony ziarniste | uzyskiwana mała liczba komórek wysoka proliferacja komórek glejowych |

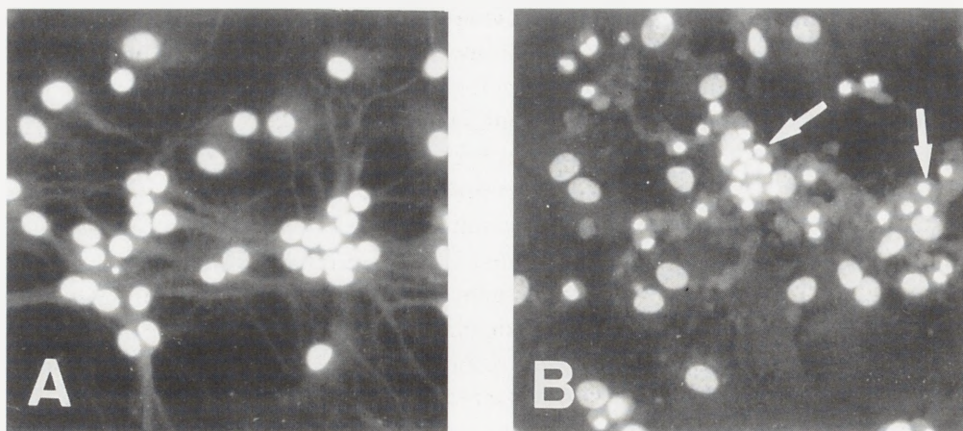
kowitego wyginięcia komórek nerwowych pola CA1 [30, 31]. Udokumentowano także znaczny ubytek neuronów piramidowych zarówno w chorobie Alzheimera, jak i po iniekcji glutaminianu bezpośrednio do hipokampa [25]. Natomiast komórki zakrętu zębatego charakteryzują się wyjątkową odpornością na czynniki wywołujące neurodegenerację.

W badaniach nad mechanizmem powstawania wspomnianych zmian neurodegeneracyjnych coraz częściej wykorzystuje się hodowle komórek hipokampa, które poddawane są działaniu glutaminianu. Wiadomo, że wrażliwość komórek na glutaminian zmienia się wraz z rozwojem hodowli i jest związana z pojawianiem się jego receptorów na powierzchni komórek [27].

Interesującym przykładem modelu apoptozy są hodowle komórek zakrętu zębatego. Z badań przeprowadzonych w naszym laboratorium wynika, że te komórki, *in vivo* niewrażliwe na czynniki neurodegeneracyjne, w warunkach *in vitro* przechodzą klasyczną apoptozę. Opracowana przez nas metoda izolacji i hodowli komórek zakrętu zębatego hipokampa szczura pozwala na utrzymanie tych komórek *in vitro* przez ok. 10 dni [15]. Uzyskuje się hodowlę heterogenną, wzbogaconą w neurony ziarniste, ale zawierającą także komórki astrogleju. Do identyfikacji typów komórek obecnych w hodowli zastosowano metodę immunocytochemiczną, wykorzystując przeciwciała rozpoznające białka cytoszkieletu charakterystyczne dla astrocytów – GFAP (ang. *glial fibrillary acidic protein*; kwaśne włóknikowe białko glejowe) i neuronów – MAP2 (ang. *microtubule-associated protein 2*; białko związane z mikrotubulami) (rys. 1). Podanie glutaminianu do 6-dniowej hodowli prowadzi do powstania zmian w morfologii, typowych dla neurodegeneracji [16]. Zmiany te nasilały się wraz ze wzrostem stężenia glutaminianu i czasem jego działania. W

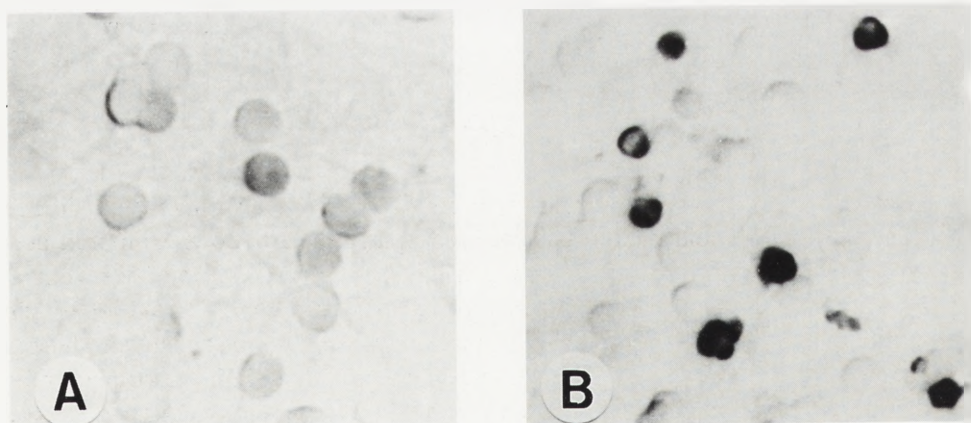


RYSUNEK 1. Immunocytochemiczna identyfikacja komórek w hodowli zakrętu zębatego szczura: A – morfologia astrocytów wykrywana przeciwciałem anti-GFAP, B – morfologia neuronów wykrywana przeciwciałem anti-MAP2



RYSUNEK 2. Barwienie oranżem akrydyny: A – hodowla komórek zakrętu zębatego hipokampa szczura (kontrola), B – hodowla traktowana glutaminianem (strzałki wskazują komórki wykazujące silną kondensację chromatyny)

hodowlach traktowanych przez 24 godziny glutaminianem w stężeniu 0,5 mM ok. 50% neuronów charakteryzowało się obkurczonym ciałem i pofragmentowanymi wypustkami. Pięciokrotnie niższe stężenie glutaminianu wywoływało podobny efekt w przypadku mniejszej liczby neuronów, stanowiącej ok. 30% całej populacji neuronalnej obecnej w hodowli. Do obserwacji morfologii jąder komórkowych zastosowano metody barwienia oranżem akrydyny i bisbenzimidem. W ten sposób pokazano, że działaniu glutaminianu towarzyszy kondensacja chromatyny z jed-



RYSUNEK 3. Wykrywanie fragmentacji DNA metodą TUNEL: A – hodowla komórek zakrętu zębatego hipokampa (kontrola), B – hodowla traktowana glutaminianem (ciemne zabarwienie świadczy o uszkodzeniu DNA)

noczesnym jej przemieszczeniem pod błonę jądrową oraz często fragmentacja jądra (rys. 2). Wykorzystując metodę TUNEL uzyskano dodatnie barwienie, świadczące o wystąpieniu tej fragmentacji w znacznej liczbie neuronów (ok. 80% populacji) traktowanych przez 24 godziny glutaminianem w stężeniu 0,5 mM (rys. 3).

Próbując wnikać w molekularne podłoże obserwowanej neurodegeneracji, zbadano ekspresję białek c-Fos i c-Jun w hodowlach poddanych działaniu glutaminianu. W tym celu zastosowano technikę immunocytochemiczną z wykorzystaniem odpowiednich przeciwciał. Pokazano wzrost ekspresji obu białek już po 2 godzinach od podania glutaminianu. W przypadku białka c-Fos wzrost ten dotyczył niemal wszystkich komórek nerwowych obecnych w hodowli i nie zależał od stężenia aminokwasu (w zakresie 0,1–0,5 mM). Natomiast wzmożoną ekspresję białka c-Jun obserwowano jedynie w komórkach o zmienionej morfologii, świadczącej o neurodegeneracji [16]. Mimo że do udowodnienia funkcjonalnej roli białka c-Jun w procesie apoptozy komórek zakrętu zębatego hipokampa niezbędne są dalsze badania, to uzyskane wyniki świadczą o istnieniu korelacji ekspresji tego białka z pojawianiem się charakterystycznych zmian neurodegeneracyjnych.

Innym ciekawym modelem wykorzystywanym w badaniach nad przebiegiem choroby Alzheimera są hodowle komórek hipokampa poddane działaniu β -amyloidu. Wykazano, że śmierć komórek nerwowych, która zachodzi w ciągu 3–5 dni po podaniu peptydu, towarzyszy obkurczanie perikarionów, kondensacja i fragmentacja chromatyny [1]. Potwierdzono również wzrost ekspresji białka c-Jun w komórkach wykazujących charakterystyczne zmiany morfologii jądra [1]. Ponadto sugeruje się funkcjonalną rolę kalpajny, proteazy zależnej od jonów Ca^{2+} w tym procesie. Wiadomo bowiem, że zastosowanie selektywnego inhibitora tej proteazy, skutecznie zapobiega śmierci neuronów hipokampa *in vitro* wywołanej β -amyloidem [22].

UWAGI KOŃCOWE

Od czasu, kiedy udowodniono, że neurony *in vitro* mogą umierać w drodze apoptozy, powstało wiele modeli badawczych opartych na hodowli komórek nerwowych. Zastosowanie takich uproszczonych układów modelowych może przybliżyć uczonych do poznania mechanizmów leżących u podstaw apoptozy. Ma to ogromne znaczenie ze względu na występowanie tego zjawiska w powszechnych stanach patofizjologicznych ośrodkowego układu nerwowego. Techniki hodowli neuronów *in vitro* mogą zatem stanowić punkt wyjścia do opracowania skutecznych metod terapii.

PIŚMIENICTWO

- [1] ANDERSON AJ, PIKE CJ, COTMAN CW. Differential induction of immediate early gene proteins in cultured neurons by β -amyloid (A β): association of c-Jun with A β -induced apoptosis. *J Neurochem* 1995; **65**: 1487–1498.
- [2] ATABAY C, CAGNOLI CM, KHARLAMOV E, IKONONOVIC MD, MANEV H. Removal of serum from primary cultures of cerebellar granule neurons induces oxidative stress and DNA fragmentation: Protection with antioxidants and glutamate receptor antagonists. *J Neurosci Res* 1996; **43**: 465–475.
- [3] BALAZS R, HACK N, JORGENSEN OS. Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor has a trophic effect on differentiating cerebellar granule cells. *Neurosci Lett* 1988; **87**: 80–86.
- [4] BARDE YA. Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* 1989; **2**: 1525–1534.
- [5] BURGOYNERD, GRAHAM ME, CAMBRAY DM. Neurotrophic effects of NMDA receptor activation on developing cerebellar granule cells. *J Neurocytol* 1993; **22**: 689–695.
- [6] CHANG JY, KOROLEV VV. Cyclic AMP and sympathetic neuronal programmed cell death. *Neurochem Int* 1997; **31**: 161–167.
- [7] CHOI DW. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* 1995; **18**: 58–60.
- [8] CHOI DW, ROTHMAN SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 1990; **13**: 171–182.
- [9] DECKWERTH TL, JOHNSON EM. Temporal analysis of events associated with programmed cell death (apoptosis) of sympathetic neurons deprived of nerve growth factor. *J Cell Biol* 1993; **123**: 1207–1222.
- [10] DMELLO SR, GALLI C, CIOTTI T, CALISSANO P. Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: Inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 10989–10993.
- [11] DREYER EB, ZHANG D, LIPTON SA. Transcriptional or translational inhibition blocks low dose NMDA-mediated cell death. *NeuroReport* 1995; **6**: 942–944.
- [12] EDWARDS SN, BUCKMASTER AE, TOLKOVSKY AM. The death programme in cultured sympathetic neurons can be suppressed at the post-translational level by nerve growth factor, cyclic AMP, and depolarization. *J Neurochem* 1991; **57**: 2140–2143.
- [13] EDWARDS SN, TOLKOVSKY AM. Characterization of apoptosis in cultured sympathetic neurons after nerve growth factor withdrawal. *J Cell Biol* 1994; **124**: 537–546.
- [14] ESTUS S, ZAKS WJ, FREEMAN RS, GRUDA M, BRAVO R, JOHNSTON EM. Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of *c-jun* as necessary for neuronal apoptosis. *J Cell Biol* 1994; **127**: 1717–1727.
- [15] FIGIEL I, PONIŃSKI P, ŁUKASIUK K, KACZMAREK L. Studies on effects of culture conditions and age of donor on hippocampal neurons *in vitro*. *Folia Histochem Cytobiol* 1993; **31**: 169–173.
- [16] FIGIEL I, KACZMAREK L. Cellular and molecular correlates of glutamate-evoked neuronal programmed cell death in the *in vitro* cultures of rat hippocampal dentate gyrus. *Neurochem Int* 1997; **31**: 229–240.
- [17] FINIELS F, ROBERT JJ, SAMOLYK ML, PRIVAT A, MALLETT J, REVAH F. Induction of neuronal apoptosis by excitotoxins associated with long-lasting increase of 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate-responsive element-binding activity. *J Neurochem* 1995; **65**: 1027–1034.
- [18] GALLO V, KINGSBURY A, BALAZS R, JORGENSEN OS. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci* 1987; **7**: 2203–2213.

- [19] GOLDBERG MP, CHOI DW. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci* 1993; **13**: 3510–3524.
- [20] GWAG BJ, LOBNER D, KOH JY, WIE MB, CHOI DW. Blokade of glutamate receptors unmasks neuronal apoptosis after oxygen-glucose deprivation *in vitro*. *Neuroscience* 1995; **68**: 615–619.
- [21] HAM J, BABIJC, WHITFIELD J, PFARR CM, LALLEMAND D, YANIV M, RUBIN LL. A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron* 1995; **14**: 927–939.
- [22] JORDAN J, GALINDO MF, MILLER RJ. Role of calpain and interleukin-1 converting enzyme-like proteases in the β -amyloid-induced death of rat hippocampal neurons in culture. *J Neurochem* 1997; **68**: 1612–1621.
- [23] KALDA A, ERISTE E, VASSILJEV V, ZHARKOVSKY A. Medium transitory oxygen-glucose deprivation induced both apoptosis and necrosis in cerebellar granule cells. *Neurosci Lett* 1998; **240**: 21–24.
- [24] LOBNER D, CHOI DW. Preincubation with protein synthesis inhibitors protects cortical neurons against oxygen-glucose deprivation-induced death. *Neuroscience* 1996; **72**: 335–341.
- [25] MARAGOS WF, GREENAMYRE JT, PENNEY JT, YOUNG AB. Glutamate dysfunction in Alzheimer disease: an hypothesis. *Trends Neurosci* 1987; **10**: 65–68.
- [26] MARTIN DP, SCHMIDT RE, DISTEFANO PS, LOWRY OH, CARTER JG, JOHNSON EM. Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. *J Cell Biol* 1988; **106**: 829–844.
- [27] MATTSON MP, KATER SB. Development and selective neurodegeneration in cell cultures from different hippocampal regions. *Brain Res* 1989; **490**: 110–125.
- [28] MILLER TM, JOHNSON EM. Metabolic and genetic analyses of apoptosis in potassium/serum-deprived rat cerebellar granule cells. *J Neurosci* 1996; **16**: 7487–7495.
- [29] OPPENHEIM RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1991; **14**: 453–501.
- [30] ROTHMAN SM, OLNEY JW. Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trends Neurosci* 1987; **10**: 229–302.
- [31] SLOVITER RS. Epileptic brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. *Brain Res Bull* 1983; **10**: 675–697.
- [32] SNIDER WD. Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* 1994; **77**: 627–638.
- [33] WATSON A, EILERS A, LALLEMAND D, KYRIAKIS J, RUBIN LL, HAM J. Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 1998; **18**: 751–762.
- [34] WETTS R, HERRUP K. Direct correlation between Purkinje and granule cell number in the cerebella of lurcher chimeras and wild-type mice. *Dev Brain Res* 1983; **10**: 41–47.
- [35] WILLIAMS RW, HERRUP K. The control of neuron number. *Annu Rev Neurosci* 1988; **11**: 423–453.
- [36] WRIGHT LL, CUNNINGHAM TJ, SMOLEN AJ. Developmental neuron death in the rat superior cervical sympathetic ganglion: cell counts and ultrastructure. *J Neurocytol* 1983; **12**: 727–738.

KOMUNIKATY

VII OGÓLNOPOLSKA KONFERENCJA BIOLOGII KOMÓRKI THE VIIITH POLISH CONFERENCE ON CELL BIOLOGY

Uprzejmie informujemy, że VII Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki zostanie zorganizowana w 1999 roku, w dniach 9 (środa) do 12 (sobota) września, w Krakowie.

Za organizację Konferencji z upoważnienia Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki odpowiedzialni będą profesorowie: Tadeusz Cichocki, Włodzimierz Korohoda i Stanisław Przystalski.

Zainteresowanych prosimy o śledzenie dalszych komunikatów.

First Announcement. The VIIth Polish Conference on Cell Biology will be organized in Cracow, on 9 (Wednesday) to 12 (Saturday) September 1999.

For the organization of Conference the professors: Tadeusz Cichocki, Włodzimierz Korohoda and Stanisław Przystalski have been chosen by the Polish Cell Biology Society.

Please keep attention to the forthcoming communicates.

Wskazówki przygotowania rysunków do publikacji w PBK

Dostarczane na dyskietkach teksty powinny być napisane w Wordzie, wersja 6,0 lub wcześniejsza. Jeśli w tekst zostały wstawione rysunki, powinny one zostać umieszczone osobno na dyskietce. Powinny to być albo mapy bitowe (.TIF, .PCX), albo pliki z Corela, wersja 5,0 lub wcześniejsza. Każda wersja Worda lub Corela pozwala na zachowanie pracy w formacie wersji wcześniejszej.

Cennik odbitek prac dla Autorów w 1997 r.

| | | | | |
|----------------|-------|-------|-------|--------|
| Liczba odbitek | 50 | 100 | 200 | 400 |
| Cena zł | 40,00 | 60,00 | 80,00 | 100,00 |

Zamówienie na odbitki **musi** być złożone wraz z przesłaną korektą pracy.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach. Prosimy Autorów o nadsyłanie prac bezpośrednio do Redaktorów odpowiedniej specjalności (adresy na 2 str. okładki), a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 20 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych w zasadzie z ostatnich 5 lat (do 10% pozycji bibliograficznych starszych);

2) doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji);

3) listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s. 75) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy: w pracy i domowy wraz z telefonem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawiać alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNILICA LS, McLURE ME, SPELTZBERG TC. Histone biosynthesis and the cell cycle. [w] Philips MP, Schwartz E [red.] Histone and Nucleohistones. London, New York: Philips, Plenum Press 1977: 60–64.

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarum polycephalum*. *Exptl Cell Res* 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rysunków powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Wymiary poszczególnych rysunków, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmienionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji. Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu doby. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz mogą zamówić odbitki odpłatnie odsyłając korektę, cennik w PBK.

Redakcja prosi o propozycję do 5 osób (nazwisko, imię, adres, fax), które byłyby odpowiednimi recenzentami maszynopisu, nie powinny jednak być pracownikami instytucji, w której pracuje autor, ani jego współpracownikami. Redakcja prosi także głównego Autora o dołączenie do maszynopisu podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu, tabel i rycin. **tak** **nie** Treść pracy nie była uprzednio publikowana i nie została wysłana do innej redakcji. **tak** **nie**

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę. **tak** **nie** Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM **tak** **nie**

Jest zgoda osób, których informacje niepublikowane są zamieszczone w tekście artykułu **tak** **nie** Odpowiadam za całość pracy opisanej w zał. maszyn. **tak** **nie**

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postęпах Biologii Komórki" przechodzi na własność redakcji i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji. **podpis**

TREŚĆ

| | |
|--|----|
| Od Redakcji | 1 |
| KACZMAREK L.: Przedmowa | 2 |
| BARCIKOWSKA M.: Choroba Alzheimera jako przykład schorzenia neurodegeneracyjnego | 5 |
| KAMIŃSKA B., STAŃCZYK M.: Molekularne mechanizmy neurodegeneracji | 15 |
| KUŹNICKI J., PUZIANOWSKA-KUŹNICKA M.: Jony wapnia i apoptoza | 29 |
| URBAŃSKA E. M., TURSKI W. A.: Toksyny mitochondrialne – neurodegeneracja i drgawki | 43 |
| I. FIGIEL: Apoptoza neuronów w hodowli <i>in vitro</i> | 63 |
| Komunikaty | 74 |
| Wskazówki przygotowania rysunków do publikacji w PBK | 75 |

Warunki prenumeraty kwartalnika POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Prenumerata na rok 1999

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1999 na konto:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99,
01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,
IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001.

Cena prenumeraty rocznika na rok 1999:

- dla instytucji (bibliotek) wynosi 60 zł,
- a dla odbiorców indywidualnych 20 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 1999 should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, account No:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,
IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001.

Price per year 20 dollars USA.

Indeks 369705