

Marta Słomka

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Badanie właściwości neurotoksycznych
i neuroprotekcyjnych amidu
kwasu 1-metylnikotynowego
w wybranych modelach doświadczalnych**

PROMOTOR:

PROF. DR HAB. MED. J.W. ŁAZAREWICZ

Zakład Neurochemii, Pracownia Farmakoneurochemii

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

im. Mirosława Mossakowskiego

Warszawa 2009

Wyniki opisane w niniejszej rozprawie zostały częściowo wykorzystane w następujących publikacjach:

1. Słomka M, Ziemińska E, Lazarewicz J. (2008) Nicotinamide and 1-methylnicotinamide reduce homocysteine neurotoxicity in primary cultures of rat cerebellar granule cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 68(1):1-9.
2. Słomka M, Ziemińska E, Salinska E, Lazarewicz JW. (2008) Neuroprotective effects of nicotinamide and 1-methylnicotinamide in acute excitotoxicity in vitro. *Folia Neuropathol.*;46(1):69-80.
3. Dragun P, Makarewicz D, Wójcik L, Ziemka-Nałecz M, Słomka M, Zalewska T. (2008) Matrix metalloproteinases activity during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. The effect of 1-methylnicotinamide (MNA). *J Physiol Pharmacol*. 59(3):441-55.

Badania przedstawione w tej pracy zostały sfinansowane przez grant zamawiany Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr: PBZ-KBN-101/T09/2003/11 oraz grant promotorski nr: N N401 004 735

I. WSTĘP	6
1.1. Ekscytotoksyczność, jako czynnik wspólny dla wielu procesów neurodegeneracyjnych	6
1.1.1. Mechanizmy ekscytotoksyczności	8
1.1.1.1. Receptory jonotropowe (iGluR) AMPA i NMDA	8
1.1.1.2. Receptory metabotropowe dla glutaminianu (mGluR)	9
1.1.2. Patogeneza uszkodzenia neuronów wywołana nadmiernym pobudzeniem receptorów dla glutaminianu	10
1.1.2.1. Zaburzenia homeostazy wapnia w neuronach	10
1.1.2.2. Stres oksydacyjny-indukcja reakcji wolnorodnikowych	12
1.1.2.3. Rola tlenu azotu	13
1.2. Neuroprotekcja w procesach ekscytotoksyczności i jej perspektywy	14
1.3. Nikotynamid – związek protekcyjny o złożonych mechanizmach działania	16
1.3.1 Nikotynamid jako związek protekcyjny w obrębie OUN	19
1.4. Amid kwasu 1-metylnikotynowego – endogenna pochodna nikotynamidu	20
1.4.1. Występowania i biosynteza 1-metylnikotynamidu oraz jego fizjologiczne znaczenie w komórkach	20
1.4.2. Znaczenie kliniczne 1-metylnikotynamidu	23
1.4.2.1. Działanie 1-metylnikotynamidu na obwodzie	23
1.4.2.2. 1-Metylnikotynamid w obrębie OUN: toksyna czy związek protekcyjny?	27
II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	32
III. MATERIAŁY I METODY	34
3.1. Badania in vivo	34
3.1.1. Materiał doświadczalny	34
3.1.2. Modele doświadczalne	34
3.1.2.2. Modelowa asfiksja (hipoksja/ischemia) 7- dniowych osesków szczurzych	35
3.1.2.3. Mikroiniekcje NMDA do prądkowia 7-dniowych szczurów	35
3.1.2.4. Mikroiniekcje MNA, NAM i MPP+ do prądkowia 7 –dniowych szczurów	36
3.1.3. Przygotowanie materiału do analiz immunochemicznych oraz opis wykonanych doświadczeń	36
3.1.3.1. Western blot	36
3.1.3.2. Badanie aktywności metaloproteinaz metodą zymograficzną	37
3.1.3.3. Oznaczanie zawartości prostanoidów: PGE ₂ , TXB ₂ , 6-ketoPGF _{1α} w korze 7-dniowych szczurów	38
3.1.3.3.1. Wykorzystane narzędzia farmakologiczne oraz zastosowany schemat doświadczeń	39
3.1.4. Badania ex vivo	40
3.1.4.1. Barwienie immunocytochemiczne	40

3.1.4.2. Oznaczenie aktywności metaloproteinaz metodą histochemiczną	41
3.1.4.3. Oznaczanie zawartości 1-metylnikotnamidu po podaniu obwodowym w mózgu	41
3.1.5. Doświadczenia behawioralne	43
1.1.5.1. Ocena podawania MNA do SNpc – test z podaniem apomorfiny	43
3.2. Badania in vitro	43
3.2.1. Hodowla pierwotnych neuronów mózdzku szczura	43
3.2.2. Hodowla komórek śródbłonna naczyń mózgu szczura	44
3.2.3. Modele neurotoksyczności i ocena przeżywalności komórek	44
3.2.4. Metody z wykorzystaniem znaczników fluorescencyjnych	44
3.2.4.1. Pomiar zmian stężenia Ca wewnątrz komórek za pomocą sondy Calcium OrangeTM	44
3.2.4.2. Oznaczenie produkcji rodników tlenowych przy użyciu 2,7-dichlorofluoresceiny	45
3.2.4.3. Oznaczanie zmian potencjału błony mitochondrialnej z użyciem rodaminy 123 (Rh 123)	45
3.2.5. Metody radiochemiczne	45
3.2.5.1. Pobieranie znakowanego ¹⁴C 1-metylnikotynamidu i nikotynamidu przez neurony ziarniste mózdzku i komórki śródbłonna linii RBE4	45
3.2.5.2. Nagromadzenie ⁴⁵Ca w neuronach	46
3.2.5.3. Wiązanie znakowanego [³H]MK-801 do frakcji błon kory mózgu szczura	46
3.2.5.4. Wiązanie znakowanego [³H]diazepamu do frakcji błon kory mózgu szczura	46
3.2.6. Analiza ekspresji genu N-metyltransferazy nikotynamidowej	47
3.2.6.1. Izolacja RNA	47
3.2.6.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji	47
3.2.6.3. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)	48
3.3. Inne procedury	49
3.3.1. Oznaczanie stężenia białka metodą Lowry	49
3.3.2. Analiza statystyczna	49
IV. WYNIKI	51
4.1. Badanie biodostępności 1-metylnikotynamidu: zmiany poziomu w surowicy i mózgu po podaniu dootrzewnowym	51
4.2. Ocena transportu 1-metylnikotynamidu do komórek śródbłonna linii RBE4 oraz neuronów ziarnistych mózdzku	52
4.3. Ocena poziomu mRNA dla 1- metyltransferazy nikotynamidowej (NNMT)	54
4.4. Badanie toksyczności 1-metylnikotynamidu	55
4.4.1. Ocena toksycznego oddziaływania MNA na neurony dopaminergiczne w rejonie istoty czarnej zbitej u dorosłych szczurów – porównanie z toksycznością MPP+	55
4.4.2. Wpływ podania MNA do części zbitej istoty czarnej na aktywność ruchową szczurów dorosłych	59

4.4.3. Ocena toksyczności domózgowego podania MNA u 7-dniowych osesków szczurzych	61
4.4.4. Wpływ 1-metylnikotynamidu na przeżywalność neuronów ziarnistych mózdzku <i>in vitro</i>	62
4.5. Analiza neuroprotekcynnego potencjału 1- metyl nikotynamidu	63
4.5.1. Testowanie właściwości neuroprotekcynnych MNA w modelu asfiksji okołoporodowej 7 -dniowych osesków szczurzych	63
4.5.2. Ocena wpływu NAM i MNA na aktywację kaspazy 3 w modelowej asfiksji okołoporodowej	66
4.5.3. Wpływ MNA na wielkość uszkodzeń mózgu wywołanych domózgowym podaniem NMDA u 7-dniowych szczurów	67
4.5.4. Badanie wpływu 1-metylnikotynamidu na ekscytotoksyczność <i>in vitro</i>	67
4.5.4.1. Wpływ NAM i MNA na przeżywalność neuronów ziarnistych mózdzku po podaniu glutaminianu i NMDA	68
4.5.4.2. Wpływ MNA i NAM na pobieranie zewnątrzkomórkowego wapnia przez neurony inkubowane w obecności glutaminianu i NMDA	68
4.5.4.3. Wpływ MNA i NAM na stężenie wewnątrzkomórkowego wapnia w neuronach po podaniu glutaminianu	72
4.5.4.4. Ocena wpływu MNA na aktywność receptora NMDA	74
4.5.5. Wpływ 1-metylnikotynamidu na wiązanie [³ H]-diazepam - interakcja z receptorem GABA _A	75
4.5.6. Ocena wpływu NAM i MNA na poziom produkcji wolnych rodników tlenowych oraz potencjał mitochondrialny w neuronach poddanych działaniu bodźca ekscytotoksycznego	76
4.5.7. Wpływ 1-metylnikotynamidu na aktywność metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowe w mózgu 7- dniowych szczurów poddanych hipoksji/ischemii	79
4.5.8. Wpływ MNA na ekspresję cyklooksygenazy 2 (COX-2) w korze mózgu 7-dniowych szczurów poddanych hipoksji/ischemii	82
4.5.9. Badanie wpływu MNA na poziom syntezy prostanoidów w korze mózgu 7 -dniowych osesków szczurzych poddanych hipoksji/ischemii	84
4.5.10. Ocena wpływu inhibitora receptora prostacyklinowego IP-RO324479 na działanie neuroprotekcynne MNA u 7-dniowych szczurów poddanych hipoksji/ischemii	87
V. Dyskusja	
5.1. Wprowadzenie	88
5.2. Neurotoksyczność 1-metylnikotynamidu w świetle danych literaturowych oraz badań własnych	88

5.3. Potencjał neuroprotekcyny 1-metylnikotynamidu in vivo w modelu hipoksji/ischemii 7-dniowych szczurów	93
5.4. Wpływ 1-metylnikotynamidu na zjawisko ekscytotoksyczności związane z aktywacją receptorów NMDA in vivo i in vitro	96
5.5. Aktywacja metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej a protekcja MNA w modelowej hipoksji/ischemii u 7-dniowych szczurów	102
5.6. Wpływ podawania 1-metylnikotynamidu na poziom aktywności COX-2 oraz syntezę prostanoidów w modelu asfiksji okołoporodowej szczurów - możliwy mechanizm neuroprotekcynnego działania MNA	104
VI. PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ I WNIOSKI	111
VII. LITERATURA	116
VIII. STRESZCZENIE	132

Wykaz najważniejszych skrótów użytych w rozprawie

[Ca²⁺]_i	stężenie wapnia wewnątrzkomórkowego
15-Deoxy-TIC	(ang. <i>15-Deoxy-16-(m-tolyl)-17,18,19,20-tetranorisocarbacyclin</i>), ligand specyficzny dla receptora prostacyklinowego IP ₂
2-PYR	1-metyl-1-pirydono 5- karboksamid
4-PYR	1-metyl-4-pirydono-5-karboksamid
6-keto-PGF_{1α}	(ang. <i>6-oxo-9α,11,α15S-trihydroksy-prost-13-en-1-oic acid</i>), stabilna pochodna prostacykliny I ₂
AD	choroba Alzheimera
AMPA	(ang. <i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid</i>), kwas alfa-amino-3- hydroksy-5-metyl-4-isoksazolepropionowy
ATP	adenozynotrójfosforan
BBB	(ang. <i>blood-brain barrier</i>), bariera krew-mózg
CAL	(ang. <i>coronary artery ligation</i>), model zawału serca u szczurów wywołanego zamknięciem tętnicy wieńcowej
cAMP	cykliczny 3', 5' adenzynomonofosforan
cDNA	(ang. <i>complementary DNA</i>), komplementarny DNA
CGRP	(ang. <i>calcitonin gene related peptide</i>), peptyd związany z genem kalcytoniny
COX-1	cyklooksygenaza 1
COX-2	cyklooksygenaza 2
CP101,606	(ang. <i>(1S,2S)-1-(4-hydroxyphenyl)-2-(4-hydroxy-4-phenylpiperidino)-1-propan- ol</i>), analog ifenprodilu, antagonist podjednostki NR2B receptora NMDA
DAG	1,2diacyloglicerol

DCF	2,7-dichlorofluoresceina
DCFH-DA	dwuoctan 2,7-dichlorofluoresceiny
EDTA	kwask etylenodiaminotetraoctowy
EGTA	kwask etylenoglikolotetraoctowy
ELISA	(ang. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>), test immunoenzymatyczny
eNOS	(ang. <i>endothelial nitric oxide synthase</i>), endotelialna syntaza tlenku azotu
FK-506	Tacrolimus, lek immunosupresyjny, inhibitor kalcyneuryny
GABA_A	receptor gabaergiczny typu A
GABA	(ang. <i>gamma-aminobutyric acid</i>), kwask gamma-aminomasłowy
GAPDH	(ang. <i>glyceraldehyde 3-phospho dehydrogenase</i>), dehydrogenaza fosforanu aldehydu glicerynowego
GFAP	(ang. <i>glial fibrillary acidic protein</i>), kwaśne białko włókienkowe gleju
Glu	kwask glutaminowy
Gly	glicyna
GLY_B	miejsca glicynowe na receptorze NMDA
HPLC	(ang. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>), wysokosprawna chromatografia cieczowa
iGluR	receptory jonotropowe dla glutaminianu
IP	receptor prostacyklinowy
i.p.	(ang. <i>intraperitoneal</i>), dootrzewnowo
ICAM-1	(ang. <i>intracellular-adhesion molecule 1</i>), międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna 1
iNOS	(ang. <i>inducible nitric oxide synthase</i>), indukowalna syntaza tlenku azotu
IP₃	1,4,5-trisfosforan inozytolu

L-DOPA	lewodopa, 3,4-dihydroksyfenyloalanina
L-NAME	(ang. <i>L-N^G-Nitroarginine methyl ester</i>), inhibitor syntazy NO
LTD	(ang. <i>long-term depression</i>), długotrwałe osłabienie transmisji synaptycznej
LTP	(ang. <i>long-term potentiation</i>), długotrwałe wzmocnienie synaptyczne
MAO-B	oksydaza monoaminowa B
MCAO	(ang. <i>middle cerebral artery occlusion</i>), odwracalny model ischemii przejściowej mózgu
mGluRs	receptory metabotropowe dla glutaminianu
MK-801	dizocyplina, maleinian 5-metylo-10,11-dihydro-5H-dibenzocyklohepteno-5,10- iminy, bezkompetycyjny antagonist receptoru NMDA
MPPs	(ang. <i>matrix metalloproteinases</i>), metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej
MMP-2	metaloproteinaza 2
MMP-9	metaloproteinaza 9
MNA	amid kwasu 1-metylnikotynamidowego; 1-metylnikotynamid
MPP+	1-metyl-4-fenylpirydyna
MPTP	(ang. <i>mitochondrial permeability transition</i>), uszkodzenie mitochondriów polegające na otwarciu kanałów w błonie wewnętrznej mitochondriów
MPTP	1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyna
NAD	nukleotyd nikotynoamidoadeninowy
NADH	zredukowany dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
NADP	fosforan nikotynoamidoadeninowy
NADPH	zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NAM	nikotynamid, witamina PP

NeuN	białko jądrowe dojrzałych neuronów
NMDA	kwask N-metylo-D-asparaginowy
NNMT	N-metyltransferaza nikotynamidowa
nNOS	(ang. <i>neuronal nitric oxide synthase</i>), neuronalna syntaza tlenku azotu
NOS	(ang. <i>nitric oxide synthase</i>), syntaza tlenku azotu
NS398	(ang. <i>N-(2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl)methanesulphonamide</i>), selektywny inhibitor COX-2
O₂[·]	rodnik nadtlenkowy
OCT	(ang. <i>organic cation transporter</i>), transporter kationów organicznych
OH[·]	peroksyrodnik
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PARP	polimeraza poli-ADP-rybozy
PD	choroba Parkinsona
PGE₂	prostaglandyna E ₂
PGH₂	prostaglandyna H ₂
PGI₂	prostacyklina I ₂
PI	jodek propidyny
RBE4	(ang. <i>rat brain endothelial cell line</i>), linia komórek śródbłonna naczyń mózgowych szczura
Rh123	rodamina 123
RO 324479	(ang. <i>R-3-(4-Fluoro-phenyl)-2-[5-(4-fluoro-phenyl)-benzofuran-2-ylmethoxy carbonylamino]-propionic acid</i>), inhibitor receptorów prostacyklinowych IP
ROS	(ang. <i>reactive oxygen species</i>), reaktywne formy tlenu
rt	(ang. <i>reverse transcription</i>), reakcja odwrotnej transkrypcji

SAM	S-adenozylometionina
SERCA	(<i>ang. sarcoendoplasmic reticulum calcium ATP-ase</i>), pompa wapniowa zależna od ATP, zlokalizowana w siateczce sarkoplazmatycznej
SNpc	(<i>łac. Substantia Nigra pars compacta</i>), część zbita istoty czarnej
SOD	dysmutaza ponadtlenkowa
TAE	tetraetyloamina
TH	(<i>ang. tyrosine hydroxylase</i>), hydroksylaza tyrozynowa
TRPV1	(<i>ang. transient receptor potential vanilloid type 1</i>), receptor waniloidowy 1
TTC	(<i>ang. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride</i>), chlorek 2,3,5-trifenylotetrazoliny
TXA₂	tromboksan A ₂
TXB₂	tromboksan B ₂ , stabilna pochodna tromboksanu A ₂
VCAM-1	(<i>ang. vascular cell adhesion molecule-1</i>), cząstka adhezyjna śródbłonna naczyńniowego
WRS	(<i>ang. water immersion and water restraint stress</i>), model indukcji stresu u szczurów polegający na zanurzaniu zwierząt w wodzie

***Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi,
Panu Prof. dr hab. med. Jerzemu W. Łazarewiczowi, za poświęcony czas, nieustanny patronat
naukowy, liczne inspirujące wskazówki i uwagi, które ułatwiły mi napisanie tej rozprawy.***

Marta Słomka

*Dziękuję Pani mgr Aleksandrze Stafiej za rzeczowe sugestie i wsparcie, za dodawanie mi otuchy
oraz krytykę, gdy było trzeba.*

*Składam także serdeczne podziękowania Pani Apolonii Ziembowicz za okazaną mi pomoc przy
wykonywaniu doświadczeń in vivo.*

Dziękuję serdecznie wszystkim koleżankom i kolegom z Zakładu Neurochemii za okazaną wszechstronną pomoc i życzliwość oraz stworzenie niepowtarzalnej atmosfery do pracy naukowej.

I. Wstęp

1.1. Ekscytotoksyczność, jako czynnik wspólny dla wielu procesów neurodegeneracyjnych

Neurodegeneracja, postępujący proces uszkodzenia i zwyrodnienia komórek nerwowych leży u podstaw wielu chorób układu nerwowego prowadzących do obumierania neuronów. Dotychczasowe obserwacje przebiegu procesów neurodegeneracyjnych i towarzyszących im zmian w morfologii komórek nerwowych wskazują, że patomechanizmy wielu jednostek chorobowych obejmują, jako wspólny wtórny element, nadmierne lub długotrwałe pobudzenie receptorów dla kwasu glutaminowego, zwane ekscytotoksycznością (Salińska i wsp., 2005). Wystąpienie ekscytotoksyczności może wywoływać:

1. zmiany ostre - uszkodzenia powstałe w wyniku udarów niedokrwiennych oraz urazów mózgu, hipoglikemii oraz stanów padaczkowych;
2. zmiany przewlekłe - obserwowane w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych ośrodkowego układu nerwowego (OUN) m.in.: choroby Parkinsona, Alzheimerera, Huntingtona, w stwardnieniu rozsianym.

Kwas glutaminowy (Glu) jest głównym pobudzającym neuroprzebieżnikiem w mózgu ssaków, biorącym udział w szybkiej transmisji sygnału czynnościowego oraz plastyczności synaptycznej związanej z procesami uczenia się i pamięci. Pobudzający system glutaminianergiczny pozostaje w dynamicznej równowadze z hamującym układem GABA-ergicznym, co ma kluczowe znaczenie dla fizjologicznej równowagi w OUN.

Termin ekscytotoksyczność (toksyczność pobudzeniowa) wprowadzony przez Olneya (1971) w ujęciu klasycznym zakłada, że podwyższony poziom glutaminianu w przestrzeni międzykomórkowej skutkujący przedłużoną depolaryzacją i zaburzeniami homeostazy jonowej, prowadzi do uruchomienia ciągu reakcji mogących prowadzić do śmierci komórki (Danysz i wsp., 1995; Łazarewicz i wsp., 2003). Warunkiem wstępnym

pojawienia się ekscytotoksyczności jest nadmierne lub długotrwałe pobudzenie receptorów glutaminianergicznych jonotropowych (iGluR) - AMPA, NMDA oraz metabotropowych - (mGluR) grupy I (mGluRI), mGluR1 i mGluR5, co może nastąpić w wyniku wzrostu zewnątrzkomórkowego stężenia agonisty receptorów kwasu glutaminowego.

Efekt ten może być następstwem:

- silnej stymulacji transsynaptycznej i uwolnieniem glutaminianu z puli neuroprzebieżnikowej,
- wycieku glutaminianu z puli metabolicznej na skutek uszkodzenia mechanicznego (uraz mózgu) lub udaru niedokrwinnego,
- zahamowania transportu zwrotnego lub odwrócenia aktywności transporterów wychwyty zwrotnego glutaminianu tak jak to ma miejsce w ischemii.

Ekscytotoksyczność może także wystąpić w wyniku działania endogennych lub egzogennych analogów glutaminianu, będących agonistami receptorów dla pobudzających aminokwasów. Badania wykonane w latach dziewięćdziesiątych, uzupełniające klasyczny model ekscytotoksyczności, wskazują na istotną rolę zaburzeń energetycznych. Według koncepcji powolnej ekscytotoksyczności, neurony stają się bardziej wrażliwe na znajdujący się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej glutaminian z powodu zaburzeń energetycznych zachodzących w komórkach. Kluczową rolę w tych procesach odgrywają mitochondria. Uszkodzenie mitochondriów czynnikami stresującymi (hipoksja, niedobór glukozy), związkami blokującymi łańcuch oddechowy (jony cyjankowe, rotenon) lub/i powodującymi stres oksydacyjny prowadzi do spadku produkcji ATP w neuronach i promuje szlaki prowadzące do neurodegeneracji (Urbańska i wsp., 1991; Turski i wsp., 1991). Przy niedoborze ATP ulega zwolnieniu praca pompy sodowo - potasowej (Na⁺/K⁺-ATP-azy błonowej) odpowiedzialnej za utrzymywanie potencjału błonowego. Zwiększa to prawdopodobieństwo aktywacji zależnych od potencjału kanałów sodowych i wapniowych oraz wytwarzania przez nie potencjałów czynnościowych w odpowiedzi na nawet nieznaczny stymulację, uwrażliwiając neurony na glutaminian. Następuje zwolnienie zależnego od potencjału bloku magnezowego na receptorach NMDA.

W ostatnich latach rośnie liczba prac wskazujących na rolę astrocytów w przebiegu ekscytotoksyczności. Astrocyty, podobnie jak neurony wydzielają neuroprzekaźniki, w tym glutaminian, na drodze egzocytozy w sposób zależny od jonów Ca^{2+} . Wymieniony proces uwalniania glutaminianu odbywa się w fizjologicznych zakresach stężeń Ca^{2+} wewnątrzkomórkowego w astrocycie. Te obserwacje wskazują na modulację procesów plastyczności przez astrocyty (Montana i wsp., 2004; Bergersen i Gundersen, 2009). Z drugiej strony na powierzchni astrocytów występują liczne transportery dla glutaminianu, które mogą sprawnie usuwać nadmiar pobudzającego przekaźnika (Ferrarese i Beal, 2004).

1.1.1. Mechanizmy ekscytotoksyczności

1.1.1.1. Receptory jonotropowe (iGluR) AMPA i NMDA

Pierwszym etapem w kaskadzie ekscytotoksyczności jest aktywacja receptorów AMPA, co prowadzi do depolaryzacji i umożliwia pobudzenie innych napięciowo zależnych receptorów i kanałów. Większość receptorów AMPA wykazuje dużą przepuszczalność dla jonów sodu i potasu a niską dla wapnia. Przepływ jonów wapnia przez kanał AMPA zależy od ekspresji podjednostki GluR2 posiadającej resztę argininy w miejsce glutaminy w regionie międzybłonowym - TM2. Zmiany w budowie receptorów AMPA, polegające na obniżeniu względnej zawartości podjednostek GluR2, mogące prowadzić od zwiększenia przepuszczalności kanałów AMPA dla jonów wapnia, opisywano w mózgu w początkowym okresie rozwoju osobniczego, w interneuronach hipokampa oraz w różnych stanach patologicznych (Dingledine i wsp., 1999; Laezza i Dingledine, 2004).

Pobudzenie receptora AMPA jest niezbędne do zaktywowania receptora NMDA przez glutaminian. Dzięki tej właściwości receptory NMDA uważane są za detektory koincydencji oraz ogniwo pośrednie w procesach plastyczności neuronalnej (Danysz, 1995). W wyniku aktywacji receptorów przez glutaminian dochodzi do depolaryzacji błony. Receptory AMPA ulegają szybszej aktywacji niż receptory NMDA, ale powinowactwo glutaminianu do nich jest niższe. Inną charakterystyczną cechą tych receptorów jest bardzo szybko (w czasie milisekund) pojawiająca się desensytyzacja w odpowiedzi na obecność agonisty. Dodatkowo depolaryzacja błony wzmagana jest przez wtórną aktywację napięciowo – zależnych kanałów sodowych, co wspólnie indukuje zniesienie bloku magnezowego i otwarcie dla jonów wapnia kanału w receptorach NMDA.

Dowodzono, iż nadmierna aktywacja receptorów NMDA odgrywa kluczową rolę w procesach ekscytotoksyczności. Jest to związane z wysokim przewodnictwem tych receptorów dla jonów wapnia i sodu napływających do neuronów, oraz ruchem jonów potasu wychodzących z komórki. W obecności jonów magnezu przy potencjale spoczynkowym błony przewodnictwo tego receptora jest bliskie zeru (Nowak i wsp., 1984). Przy pełnej depolaryzacji błony może dojść również do aktywacji receptora NMDA przy niepodwyższonym, spoczynkowym stężeniu glutaminianu w przestrzeni synaptycznej, co może łatwo indukować kaskadę ekscytotoksyczności (Doble i wsp., 1999). Warunkiem pełnej aktywacji receptora NMDA jest nie tylko usunięcie jonu magnezowego blokującego kanał i związanie głównego agonisty - glutaminianu, ale także związanie koagonisty tj. glicyny lub D-seryny do miejsca glicynowego GLY_B. Bez obecności koagonisty receptor NMDA nie może ulec aktywacji, nawet przy wysokim stężeniu agonisty. Dodatkowo aktywność receptora NMDA podlega regulacji poprzez wiązanie pozytywnych lub negatywnych modulatorów takich jak: poliamidy, histamina, Zn²⁺, pregnenolon oraz poprzez zmiany potencjału redoks i pH (Danysz i wsp., 1998).

W warunkach prawidłowych w neuronach i komórkach astrogleju zachodzi zrównoważony przepływ jonów poprzez błonę komórkową, a dzięki działaniu pomp jonowych ulega zachowaniu gradient elektrochemiczny. Natomiast przedłużająca się depolaryzacja powoduje zaburzenie równowagi osmotycznej wywołanej wnikaniem jonów sodu, który indukuje bierny napływ chlorków oraz wody do neuronów. Prowadzi to do pęcznienia komórek, uszkodzeń organelli, a nawet lizy (Kiedrowski i wsp., 1994; Rothman i wsp., 1985). Cechą charakterystyczną ekscytotoksycznego uszkodzenia neuronów jest obrzmienie dendrytów i ciał komórek nerwowych przy zachowaniu niezmiennych aksonów i zakończeń presynaptycznych. Po początkowym wzroście stężenia Ca²⁺ wewnątrzkomórkowego wywołanego aktywacją receptorów NMDA dochodzi do spadku stężenia tych jonów do wartości fizjologicznej, na skutek wychwytu do naturalnych magazynów komórkowych. Jednak po kilku godzinach następuje wtórny przyrost stężenia jonów wapnia, który nie jest hamowany przez antagonistów receptora NMDA, a może ulegać nasileniu przez zablokowanie błonowej pompy Na⁺/Ca²⁺ lub odwrócenia kierunku jej pracy. Taka obserwacja sugeruje, że dochodzi do trwałego zaburzenia równowagi jonowej (*ang. pump/leak-equilibrium*).

1.1.1.2. Receptory metabotropowe dla glutaminianu (mGluR)

Istotnym elementem mechanizmów ekscytotoksycznego uszkodzenia neuronów może być nadmierne pobudzenie receptorów metabotropowych (mGluRs) należących do grupy I (Martin i wsp., 1992). Jak dotąd poznano i sklonowano 8 typów receptorów metabotropowych (Pałucha, 2000). Podzielono je na trzy grupy mGluR: I, II i III, zgodnie z homologią sekwencji aminokwasowej, profilem farmakologicznym oraz typem szlaku przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego (Conn i wsp., 1997). Dobrze udokumentowane badania immunocytochemiczne wykazały obecność receptorów metabotropowych we wszystkich strukturach mózgu. Receptory mGluR grupy I (mGluR1 i mGluR5) zlokalizowane są głównie postsynaptycznie a ich aktywacja odbywa się w sytuacji, kiedy występuje nadmiar glutaminianu w przestrzeni synaptycznej. Receptory metabotropowe grupy II (mGluR2 i 3) oraz III (mGluR4, 6, 7 i 8) położone są w większości presynaptycznie centralnie lub nieco poza synapsą (Danysz, 2001; Pałucha, 2000). Stymulacja receptorów grupy II i III prowadzi do zahamowania cykazy adenylowej i spadku poziomu cAMP w komórce (Schoepp i wsp., 1999). Natomiast receptory mGluR grupy I są sprzężone za pośrednictwem białka G_q z fosfolipazą C, której aktywacja, w wyniku pobudzenia tych receptorów wywołuje syntezę i uwalnianie wtórnych przekaźników: 1,4,5-trisfosforanu inozytolu (IP3) oraz diacyloglicerolu, (DAG) na skutek rozszczepienia cząsteczki fosfatydylo-inozytolo(4,5)bifosforanu. IP3 uwalniany do cytoplazmy wiąże się ze swoim receptorem na powierzchni siateczki śródplazmatycznej, wywołując uwolnienie jonów wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych. DAG z kolei w obrębie cytoplazmy powoduje aktywację i translokację do błony kinazy białkowej C, która fosforyluje m.in. receptory NMDA, ograniczając w istotnym stopniu ich desensytyzację. Ponadto, aktywacja receptorów mGluR grupy I prowadzi do hamowania przewodnictwa kanałów potasowych, co prowadzi do zwiększenia pobudliwości neuronów. Wiadomo, że antagoniści receptorów metabotropowych należących do grupy I, jak również agoniści grupy II i III mGluR wykazują neuroprotekcję w kilku modelach ischemicznego uszkodzenia mózgu (Bond i wsp., 1998, 2000; Makarewicz i wsp., 2006), chociaż w niektórych eksperymentach obserwowano przejawy neuroprotekcji indukowanej przez agonistów mGluR grupy I (Montoliu i wsp., 1997; Cai i wsp., 1999; Cambonie i wsp., 2000).

1.1.2. Patogeneza uszkodzenia neuronów wywołana nadmiernym pobudzeniem receptorów dla glutaminianu

1.1.2.1. Zaburzenia homeostazy wapnia w neuronach

Powszechnie akceptowana hipoteza zakłada, że podstawowym elementem mechanizmu uszkodzenia neuronów w ekscytotoksyczności jest przeładowanie neuronów wapniem, pochodzącym z przestrzeni zewnątrzkomórkowej, zachodzące głównie za pośrednictwem receptorów NMDA. W warunkach fizjologicznych jony wapnia są wtórnymi przekaźnikami regulującymi wiele szlaków metabolicznych poprzez wiązanie się z enzymami lub specyficznymi białkami regulatorowymi, oddziałując na procesy fosforylacji i defosforylacji białek efektorowych (Sattler i Tymianski, 2000) Wzrost wewnętrznego stężenia Ca^{2+} jest wykorzystywany do przekazywania informacji w komórkach, stąd niezwykle ważne wydaje się być sprawne działanie systemu regulatorowego.

W prawidłowej, niepobudzonej komórce nerwowej występuje gradient stężenia jonów wapnia między cytozolem, gdzie wynosi on 10^{-7} M, a środowiskiem zewnętrznym komórki (10^{-3} M) (Wieloch i wsp., 1982). W czasie pobudzenia komórki, jony Ca^{2+} napływają przez przepuszczalne dla nich kanały jonowe: kontrolowane przez napięcie błonowe tzw. kanały napięciowo-zależne, oraz/lub regulowane przez neurotransmitery kanały receptorów jonotropowych, głównie NMDA. Nadmiar jonów wapnia jest usuwany z cytosolu do wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych, zwłaszcza do kanałów siateczki śródplazmatycznej przy udziale specyficznej ATP-azy wapniowej, SERCA (*ang. sarcoplasmatic – endoplasmatic reticulum calcium ATPase*) (Kostyuk i wsp., 1995). Jony wapnia uwalniane są z tych zasobów m.in. za pośrednictwem wewnątrzkomórkowych receptorów wrażliwych na IP3 (Rosa i wsp., 1997). Receptory IP3 stanowią element szlaku transdukcji sygnałów wewnątrz komórki, wiodącego od różnego typu receptorów metabotropowych sprzężonych poprzez białka G z fosfolipazą C do mobilizacji wapnia wewnątrzkomórkowego. W warunkach fizjologicznych nadmiar jonów wapniowych we wnętrzu komórki może być dodatkowo buforowany przez białka wiążące wapń obecne w neuronach np. kalbindynę D28, kalretyninę, kalmodulinę, czy białko S-100 (Groves i wsp., 1998). Nadmiar jonów wapnia usuwany jest z komórki aktywnie, przy udziale błonowej ATPazy wapniowej (*ang. Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase*, PMCA), mającej wysokie powinowactwo do Ca^{2+} , lub/i przez charakteryzujący się dużą wydajnością system

wymiennika $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Jony Ca^{2+} mogą też być pobierane przez mitochondria, chociaż jest to bufor o stosunkowo niskim powinowactwie, który ulega aktywacji dopiero, gdy stężenie Ca^{2+} osiąga około $0,5 \mu\text{M}$. Ocenia się, że tylko 1-5% wapnia zmagazynowanego w mitochondriach ulega uwalnianiu do cytosolu (Kristian i wsp., 1996). W warunkach fizjologicznych wapń dostaje się do mitochondriów w zaleźnym od energii procesie ułatwionej elektroforetycznej dyfuzji zgodnie z gradientem elektrochemicznym i wiąże się z jonami fosforanowymi oraz grupami polarnymi na wewnętrznej ich powierzchni (Mayer i wsp., 1987). Podczas ekscytotoksycznego, niekontrolowanego napływu jonów Ca^{2+} do neuronów, w którym uczestniczy nadmierne pobudzenie receptorów NMDA, dochodzi do indukowanego przez Ca^{2+} wyrzutu wapnia, określanego jako CICR (ang. *calcium - induced calcium release*), z magazynów siateczki śródplazmatycznej przez kanały rianodynowe i IP3. Jednocześnie następuje wzrost pobierania wapnia przez mitochondria. Nagromadzenie przez mitochondria więcej niż 30-50 nmoli Ca^{2+} na mg białka powoduje dysfunkcję tych organelli. Potencjał błonowy zostaje zniesiony i mitochondria uwalniają nagromadzony wapń, a także jony potasu, magnezu lub inne składniki macierzy np. glutation, natomiast do wnętrza mitochondriów wnika woda powodując pęcznienie mitochondriów. Dochodzi do tzw. uprzepuszczalnienia błon mitochondrialnych, MPT (ang. *mitochondrial permeability transition*).

Przedmiotem dyskusji pozostaje kwestia czy toksyczność wapnia zależy od jego podwyższonego stężenia w cytosolu, czy od całkowitego obciążenia komórki wapniem. Istnieją dane wskazujące, że przeładowanie Ca^{2+} jest odpowiedzialne za zmiany apoptotyczne i nekrotyczne. Wiadomo, iż długotrwały i znaczny wzrost stężenia Ca^{2+} indukuje procesy prowadzące do śmierci neuronów. Wykazano bezpośrednią korelację między pobieraniem Ca^{2+} a wywołaną przez glutaminian śmiercią neuronów (Hartley i wsp., 1993). Z kolei napływ Ca^{2+} przez kanały typu L nie indukuje uszkodzeń, a podobne stężenia Ca^{2+} wywołane przez aktywacje receptorów NMDA są toksyczne (Hartley i wsp., 1993; Sattler i Tymianski, 2000). Wskazuje to na fakt, że nie tylko napływ jonów Ca^{2+} , ale i sposób ich wejścia do komórki odgrywa rolę w neurotoksyczności.

1.1.2.2. Stres oksydacyjny-indukcja reakcji wolnorodnikowych

Szczególnie wysokie ryzyko pojawienia się uszkodzeń o charakterze wolnorodnikowym występuje w mózgu podczas ekscytotoksyczności (Coyle i wsp., 1993).

Wynika to z najwyższego w całym organizmie zapotrzebowania na tlen, którego znacząca ilość przekształca się w ROS (*ang. reactive oxygen species*, reaktywne formy tlenu), a także z wysokiej zawartości metali przejściowych w tkankach mózgu. Nadmierne pobudzenie receptorów NMDA prowadzi do wzmożonej produkcji ROS na drodze aktywacji cytoplazmatycznej oksydazy NADPH. Jak opisali Girourd i wsp. (2009) aktywacja receptorów NMDA prowadzi do wzmożonej produkcji NO przez nNOS, zasocjowaną z tym receptorem poprzez białka zagęszczeń postsynaptycznych, PSD95. Powstały NO (scharakteryzowany poniżej), z kolei aktywuje rozpuszczalne cyklazy guanylowe (*ang. soluble guanylate cyclase, sGC*) do produkcji cGMP. Wzrost poziomu cGMP prowadzi do aktywacji kinazy PKG, która aktywuje katalityczną podjednostkę oksydazy NADPH – NOX2, co w rezultacie skutkuje znaczącym wzrostem ROS. Oprócz opisanego wyżej szlaku ważnym źródłem ROS generowanym w neuronach na drodze ekscytotoksyczności *via* receptory NMDA są mitochondria (Dugan i wsp., 1995).

Szkodliwość ROS polega na ich wysokiej reaktywności, co powoduje, że mogą wchodzić w reakcje z lipidami, białkami czy kwasami nukleinowymi (Chan i wsp., 1998). W warunkach fizjologicznych powstawanie i poziom ROS jest kontrolowany przez system zmiataczy wolnych rodników oraz antyutleniaczy, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza, peroksydaza glutationowa, kwas askorbinowy i inne (Pias i wsp., 2002). Podczas toksyczności pobudzeniowej dochodzi do załamania równowagi między produkcją ROS a ich inaktywacją, co skutkuje m.in. peroksydacją lipidów błonowych w obrębie siateczki śródplazmatycznej, mitochondriów i błony plazmatycznej neuronów, prowadząc do śmierci komórki (Olanow i wsp., 1993). Z kolei modyfikacja wolnorodnikowa białek może prowadzić bezpośrednio do ich denaturacji lub do zmiany aktywności. Powstające w nadmiarze ROS działają także na procesy metaboliczne w obrębie mitochondriów, mechanizmy naprawy uszkodzeń DNA oraz na indukcję szlaku apoptotycznego zależnego i niezależnego od kaspaz.

1.1.2.3. Rola tlenu azotu

W fizjologii, jak i podczas ekscytotoksyczności tlenek azotu (NO) jest uwalniany w neuronach poddanych pobudzeniu glutaminianergicznemu, w czym pośredniczą receptory NMDA (Garthwaite i wsp., 1991). NO syntetyzowany jest z L-argininy i tlenu cząsteczkowego przy udziale syntazy tlenu azotu, NOS (*ang. nitric oxide syntase*). W

mózgu występują trzy izoformy NOS. Izoformami konstytutywnymi NOS, aktywowanymi przez kompleks Ca^{2+} /kalmodulina są neuronalna - nNOS oraz endotelialna - eNOS. NO powstający w neuronach za pośrednictwem nNOS bierze udział w transsynaptycznej regulacji neurotransmisji chemicznej. Funkcją NO wytwarzanego w śródbłonku naczyń mózgowych przez eNOS jest regulacja krążenia mózgowego. Indukowana izoforma NOS (iNOS) występująca w mikrogleju i astrocytach, w komórkach endotelium oraz mięśniówki naczyń, a także w neuronach, odgrywa rolę w procesach zapalnych. Nie jest ona zależna od wapnia, ale od indukcji cytokin. Kluczowa rola w mechanizmach zwyrodnienia neuronów jest przypisywana NO powstającemu w wyniku aktywności nNOS i iNOS (Strosznajder, 1994; Chalimoniuk i Strosznajder, 1998; Szutowicz i wsp., 2001). NO utworzony w wyniku nadmiernej stymulacji nNOS wydaje się być głównym elementem w ostrej ekscytotoksyczności. Natomiast iNOS, praktycznie niewykrywalna w zdrowych tkankach mózgu, w warunkach patologicznych ulega opóźnionej aktywacji i może brać udział w zwyrodnieniu neuronów. Mechanizmy neurotoksycznego działania NO są złożone. Mechanizm neurotoksyczności NO, wykorzystujący jego funkcje fizjologiczne, może polegać na pobudzeniu uwalniania glutaminianu z zakończeń synaptycznych i tym samym wzmacnianiu ekscytotoksycznych mechanizmów uszkodzenia i śmierci neuronów.

NO jest bardzo reaktywnym rodnikiem. Za szczególnie niekorzystną dla neuronów uważa się reakcję rodnika tlenu azotu z anionorodnikiem ponadtlenkowym z wytworzeniem anionu nadtlendioazotawego, który z kolei może oddziaływać z zawartą w białkach tyrozyną, utleniając tione. Skutkiem tego może być inaktywacja transportera glutaminianu, prowadząca do zaostrzenia ekscytotoksyczności. Dodatkowo nadtlendioazotan jest uważany w wielu rodzajach komórkach za induktora apoptozy (Dawson i wsp., 1993). NO uszkodza łańcuch DNA, co indukuje procesy naprawcze z udziałem polimerazy poli-ADP-rybozy (PARP). Proces ADP-rybozylacji jest bardzo energochłonny i jego nadmierna aktywacja prowadzi do wyczerpania zapasów NAD^+ i ATP, a w konsekwencji do deenergizacji i śmierci komórek (Zhang, 1994; Bolanos, 1995). Innym ważnym celem uszkadzającego działania NO mogą być także mitochondria.

1.2. Neuroprotekcja w procesach ekscytotoksyczności i jej perspektywy

Zapobieganie uszkodzeniom neuronów stanowi niezwykle ważny i nadal nierozwiązany problem współczesnej medycyny. Niepowodzenia na tym polu można

tłumaczyć wciąż jeszcze niedostatecznym poznaniem procesów obumierania komórek nerwowych oraz mechanizmów aktywacji endogennych czynników neuroprotektoryjnych. Ekscytotoksyczność jest komponentą niemal wszystkich procesów neurodegeneracyjnych, a jednocześnie może wykazywać niekorzystny efekt synergistyczny z innymi patologicznymi procesami w obrębie tkanki nerwowej. Dlatego też wydaje się celowym poszukiwanie substancji farmakologicznych i strategii terapeutycznych hamujących ten proces lub/i modulujących w kierunku fizjologicznego poziomu transmisji glutaminianergicznej.

Logicznym wydaje się wykorzystanie inhibitorów receptorów NMDA w hamowaniu ekscytotoksyczności. Pomimo początkowo wielu obiecujących wyników w różnych modelach zwierzęcych, tylko niewielka grupa tych związków przeszła pomyślnie pierwszą fazę prób klinicznych. Silni antagoniści receptora NMDA, MK-801 czy fencyklidyna powodowały efekty uboczne: halucynacje, w wyższych dawkach katatonię, uszkodzenia neuronów oraz nasilenie apoptozy w niedojrzałym mózgu, obserwowane w modelu asfiksji okołoporodowej u szczurów (Ikonomidou i wsp. 2000). Do inhibitorów, które pomyślnie przeszły badania kliniczne zalicza się memantynę i amantadynę, kompetycyjnych, słabych antagonistów kanału receptora NMDA, stosowanych w terapii choroby Alzheimera i Parkinsona (Wilcock i wsp., 2003; Gardoni i wsp., 2006; Danysz i Parsons, 2003). Memantyna jest jedynym, jak do tej pory związkiem dopuszczonym w leczeniu choroby Alzheimera z grupy hamującej receptory glutaminianergiczne. Jest ona dość dobrze tolerowana przez pacjentów oraz daje funkcjonalną poprawę procesów pamięciowych i opóźnienie rozwoju demencji (Koutsilieri i wsp., 2007). Amantadyna skutecznie hamuje występujące u parkinsoników dyskinezy, jak też wydłuża przeżycie. Obiecujące wyniki badań dotyczyły zastosowania dekstrometorfanu, jednak związek ten wywoływał niekorzystne efekty uboczne w postaci senności. Nowym preparatem w leczeniu choroby Parkinsona jest związek z grupy selektywnych inhibitorów podjednostki NR2B receptora NMDA (antagonista miejsca poliamidowego), CP101,606, zarejestrowany jako Traxoprodil. Zainteresowanie tymi antagonistami wynika z faktu, że stwierdzono pozytywną korelację między ekspresją podjednostki NR2B a występowaniem objawów chorobowych oraz dyskinez po leczeniu L-Dopa. Próby zastosowania antagonistów podjednostki NR2A niestety nie przyniosły pozytywnych rezultatów (Koutsilieri i wsp.,

2007). Obecnie trwają również badania przedkliniczne nad zastosowaniem ligandów receptorów metabotropowych (Danysz, 2005; Pilc, 2003).

Jednym z najpoważniejszych problemów klinicznych związanych z wystąpieniem ekscytotoksyczności są udary niedokrwienne mózgu. Badania nowych leków w udarze niedokrwinnym prowadzone są w dwóch kierunkach. Pierwszy polega na przywróceniu krążenia w miejscu niedokrwienia (reperfuzja), drugi dotyczy zapobiegania niekorzystnym zmianom biochemicznym związanym z niedokrwieniem (neuroprotekcja). Niestety na tym polu nie odnotowano poważniejszych sukcesów. Mimo zachęcających wyników wielu badań przedklinicznych, jak dotąd żadna substancja potencjalnie neuroprotekcynna nie przeszła pozytywnie prób klinicznych. Wynika to z różnorodnych przyczyn. Jedną z nich stanowi duża rozpiętość między dawkami używanymi w modelach eksperymentalnych a bezpiecznymi, znacznie niższymi dawkami stosowanymi w badaniach klinicznych. Wskazuje się też na skomplikowaną naturę udarów, której modele zwierzęce nie są w stanie w pełni oddać, oraz zbyt krótki i nie dający się wykorzystać w praktyce czas na zastosowanie skutecznej terapii czyli tzw. okno terapeutyczne (De Keyser i wsp., 1999). Przykładem niepowodzeń w terapii może być wspomniany już Traxoprodil. Stosowanie tego leku w udarach i urazach mózgu zakończyło się niepowodzeniem. Podobnie próby kliniczne III fazy z lekami będącymi kompetywnymi (selfotel) i bezkompetywnymi (cerestat, eliprodil) antagonistami miejsca wiążącego poliamidy, a także z antagonistą miejsca glicynowego (GVI50526) nie przyniosły pozytywnych rezultatów. Istotnym ograniczeniem wyników badań doświadczalnych w ischemii mózgu na gryzoniach i naczelnych jest także fakt, że ocena wyników badań doświadczalnych oparta jest głównie na zmniejszeniu ogniska niedokrwienia, podczas gdy w badaniach klinicznych najistotniejszym punktem jest stan neurologiczny i funkcjonalny chorych, zwykle dodatkowo obciążonych innymi schorzeniami (Wahlgren i wsp., 2007).

Szansą na skuteczną neuroprotekcję może być zastosowanie jednocześnie kilku związków, angażujących różne szlaki prowadzące do przeżycia komórek nerwowych, bądź związków o szerokim spektrum działania. Jednocześnie istnieje konieczność ciągłej weryfikacji działania tych związków na poziomie klinicznym oraz molekularnym, także poszukiwanie nowych substancji neuroprotekcynnych. Ciekawym podejściem wydają się próby stosowania związków obecnych już w leczeniu innych jednostek chorobowych nie obejmujących układu nerwowego. Takie podejście wydaje się uzasadnione z kilku

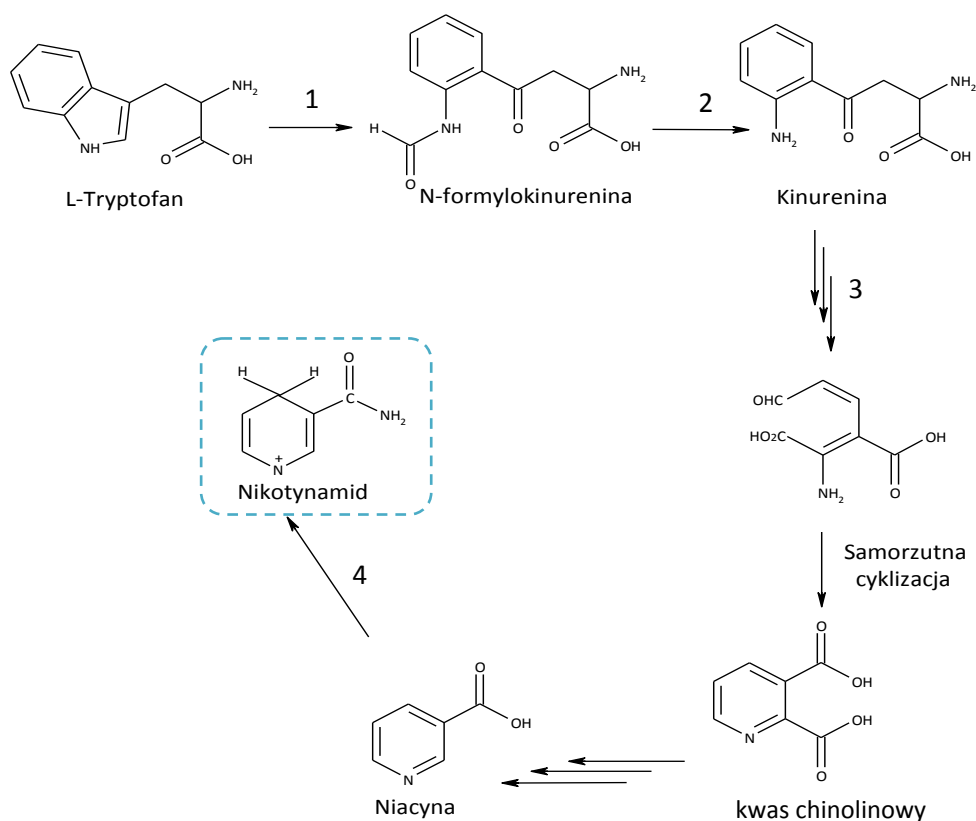
przyczyn. Znane są dobrze bezpieczne, dopuszczalne dawki, oraz ewentualne skutki uboczne występujące po podaniu takich substancji.

1.3. Nikotynamid – związek protekcyjny o złożonych mechanizmach działania

W nurt zastosowania w neuroprotekcji związków znanych ze swoich pozytywnych właściwości wpisują się badania nad działaniem witamin. Związki te, jak wynika z ich definicji, są niezbędne dla utrzymania procesów życiowych organizmu, są składnikami koenzymów lub same regulują przemiany metaboliczne.

Nikotynamid (NAM), amid kwasu nikotynowego – to łatwo rozpuszczalny w wodzie i alkoholu związek, znany również jako witamina B₃ lub PP. Jest to jedna z nielicznych witamin nieulegających zmianom mimo procesów przetwarzania i przechowywania żywności.

Dzienne zapotrzebowanie na NAM u osób dorosłych wynosi ok. 15 mg i wzrasta u kobiet w ciąży do 20 mg, u dzieci wynosi około 12 mg. Całkowite zapotrzebowanie na NAM jest zwykle zaspakajane poprzez jego syntezę z tryptofanu w wątrobie, skąd jest dystrybowany do innych tkanek. Przyjmuje się, że 1 mg nikotynamidu powstaje z 60 mg tryptofanu. Poszczególne etapy w syntezie NAM (Rysunek 1) obejmują:



Rysunek 1. Synteza niacyny i nikotynamidu (opis w tekście).

1. Przemianę tryptofanu do N-formylokinureniny przez enzym 2,3-dioksygenazę indoloaminową
2. N-formylokinurenina w wyniku działania formamidazy przechodzi w kinureninę
3. Kinurenina podlega szeregu reakcji min. samorzutnej cyklizacji do chinolinianu, który ulega przemianie w niacynę
4. Niacyna w wyniku przyłączenia grupy aminowej z udziałem aminotransferazy niacynowej przekształcana jest w nikotynamid.

Egzogenne podawanie tego związku zwiększa wydalanie metabolitów NAM z organizmu (podrozdział 1.4.1), ale nie wpływa na poziom jego syntezy *de novo* (Fukowatari i Shibata, 2007). NAM wydaje się być kluczowym związkiem dla podtrzymania fizjologicznych procesów w organizmach ssaków. Służy, bowiem jako prekursor syntezy nukleotydów: nikotynoamidoadeninowego (NAD) oraz fosforanu nikotynoamidoadeninowego (NADP), biorących udział w ponad dwustu różnych biochemicznych reakcjach zachodzących w komórce (Maisie i wsp., 2004). Związek ten uczestniczy w regulacji poziomu cukru we krwi oraz cholesterolu, w procesach utleniania i redukcji, uczestniczy w regulacji przepływu krwi w naczyniach, współdziała w syntezie hormonów płciowych.

O kluczowym znaczeniu tego związku dla prawidłowego funkcjonowania organizmu może świadczyć zespół chorobowy związany z niedoborem NAM, określaną jako pelagra. Nazwa pelagra została użyta po raz pierwszy przez Frappoliego w 1771 roku i pochodzi od słów *pell*a i *agra*, które są źle użytymi włoskimi słowami *pellis* i *aegra*, oznaczającymi "chora skóra". Pierwsze badania nad pelagrą przeprowadził hiszpański lekarz Casal, który w 1735 roku po raz pierwszy opisał tę chorobę. Pelagra była uznana za jednostkę chorobową najpierw w Hiszpanii, Portugalii i Włoszech, a potem w kolejnych krajach europejskich, lecz ustalenie zależności między występowaniem pelagry a niedoborem NAM nastąpiło dopiero w 20 wieku. W okresie międzywojennym pelagra była schorzeniem rozpowszechnionym zarówno w Europie, jak i Ameryce Południowej. Objawiała się zmianami skórnymi na języku, szyi, twarzy, rękach (szorstkość i zaczerwienienie skóry), a także zaburzeniami układu trawienia (biegunki, wymioty, spadek masy ciała) oraz zaburzeniami układu nerwowego (ból i zawroty głowy,

zaburzenia pamięci) prowadzącymi do depresji lub/i demencji, co może świadczyć o przewodniej roli NAM w utrzymaniu prawidłowej funkcji kory mózgowej. Nieleczona pelagra w skrajnych przypadkach może prowadzić do śmierci. Suplementacja nikotynamidem cofa całkowicie objawy chorobowe.

Witaminę PP stosuje się zarówno w postaci amidu jak i kwasu nikotynowego - niacyny, doustnie oraz w postaci zastrzyków. Badania działania witaminy PP obniżającego poziom cholesterolu we krwi rozpoczęto już w latach 50-tych ubiegłego wieku. Wykazały one, że duże dawki kwasu nikotynowego (ale nie nikotynamidu), tzn. 1,2 do 2 gramów dziennie, wyraźnie zmniejszają stężenie cholesterolu (o ponad 20%) oraz triglicerydów (o ponad 50%) we krwi. A zatem niacyna zmniejsza we krwi stężenie tych lipidów, które odgrywają istotną rolę w powstawaniu zmian miażdżycowych w naczyniach krwionośnych. W dalszych badaniach stwierdzono, że podawanie kwasu nikotynowego zmniejsza o około 30% częstość występowania zawałów mięśnia sercowego u osób zagrożonych miażdżycą

(Ganji i wsp., 2003; Birjmohun i wsp., 2005). Nikotynamid można stosować z innymi lekami hipolipemizującymi, pamiętając jednak o tym, że terapeutyczne dawki tego leku związane są z licznymi działaniami niepożądanymi. Główne działania niepożądane to: zaczerwienienie i suchość skóry, świąd, rumień, uderzenia gorąca do głowy, hipotensja, zaburzenia rytmu serca, zaostrzenie przebiegu choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy, zwiększenie stężenia kwasu moczowego, glukozy i aminotransferaz w surowicy. Do przeciwwskazań w stosowaniu nikotynamidu zalicza się: świeży zawał mięśnia sercowego, niewydolność krążenia, chorobę wrzodową żołądka i dwunastnicy, jaskrę, niewydolność wątroby, cukrzycę, dnę moczanową.

Wiele danych dotyczy prób zastosowania NAM w leczeniu cukrzycy typu 1. Mimo pozytywnych wyników uzyskanych w badaniach prowadzonych na zwierzętach z eksperymentalnie indukowaną cukrzycą, w dużym badaniu klinicznym nie potwierdzono opóźnienia wystąpienia cukrzycy po zastosowaniu nikotynamidu. Wykazano jednak ochronne działanie NAM na komórki typu B trzustki przed agresją ze strony układu odpornościowego (O'Braien i wsp., 2000; Gale i wsp., 2004; Olmos i wsp., 2006).

1.3.1. Nikotynamid jako związek protekcyjny w obrębie OUN

Zainteresowanie związkami o wielokierunkowym, potencjalnie neuroprotektynym mechanizmie działania skłoniły do przetestowania wpływu NAM na procesy patologiczne występujące w komórkach nerwowych. Już w latach 80-tych stwierdzono, że NAM może mieć pewne pozytywne działanie w obrębie układu nerwowego, jako endogenne ligandy miejsc benzodiazepinowych na receptory GABA_A (Fujimoto i wsp., 1982; Bold i wsp., 1985). W światowej literaturze podnoszona jest możliwość wykorzystania NAM w neuroprotekcji, wykryto bowiem jego działanie ochronne i lecznicze nie tylko na komórki śródbłonna naczyń ale i na neurony *in vitro* oraz *in vivo* w ischemii mózgu (Maiese i Chong, 2003). Istnieją dane o protekcyjnej aktywności NAM w odwracalnym modelu ischemii przejściowej mózgu - MCAO (ang. *middle cerebral artery occlusion*), w modelu ogniskowego niedokrwienia oraz w asfiksji okołoporodowej u szczurów (Yao i wsp., 2004; Yang i wsp., 2002; Feng i wsp., 2006). Mechanizm cytoprotekcyjnego działania nikotynamidu jest złożony, obejmuje wiele szlaków sygnałowych w komórce i wciąż jest nie do końca poznany. Wskazuje się m.in. na:

1. modulację aktywności PARP,
2. polaryzację błony mitochondrialnej, co wpływa na zachowanie metabolizmu energetycznego komórek (NAM pobierany jest aktywnie przez mitochondria przez specyficzny transporter),
3. inhibicję apoptozy przez hamowanie uwalniania cytochromu c, hamowanie kaspaz efektorowych (kaspaza 1, 3 i 8) oraz aktywację szlaku kinazy Akt,
4. podtrzymywanie asymetrycznej budowy błony poprzez hamowanie eksternalizacji reszt fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy błony komórkowej, a co za tym idzie hamowanie aktywacji komórek mikrogleju i produkcji cytokin prozapalnych (Chong i wsp., 2002; Maiese i Chong, 2003).

Ponieważ wszystkie te elementy patogenezy uszkodzenia neuronów hamowane przez NAM są składowymi mechanizmami neurotoksyczności pobudzeniowej (ekscytotoksyczności), wydaje się, że nikotynamid ma cechy substancji mogącej hamować wywołane przez ekscytotoksyczność szlaki wiodące ku śmierci neuronów.

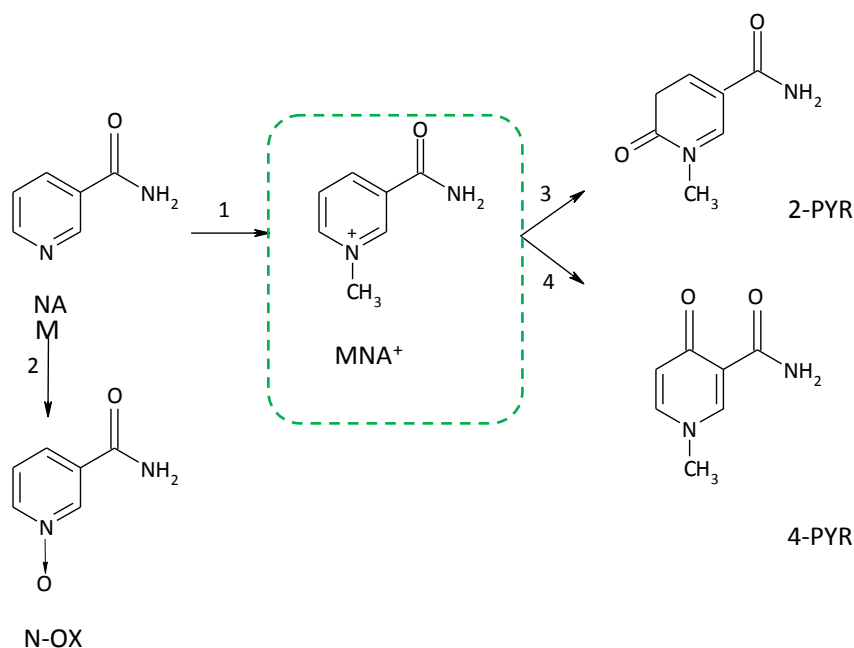
1.5. Amid kwasu 1-metylnikotynowego – endogenna pochodna nikotynamidu

1.5.1. Występowania i biosynteza 1-metylnikotynamidu oraz jego fizjologiczne znaczenie w komórkach

Kluczowym metabolitem przemian nikotynamidu jest amid kwasu 1-metylnikotynowego zwyczajowo określany, jako 1-metylnikotynamid¹ (MNA). Nadmiar NAM metabolizowany jest głównie w komórkach wątroby do MNA na drodze metylacji przez enzym cytoplazmatyczny, N-metyltransferazę nikotynamidową (NNMT; EC.2.1.1.1), przy udziale S- adenozylometioniny (SAM), jako donora grup metylowych. MNA może ulegać utlenieniu do 1-metyl-1-pirydono 5- karboksamidu lub/i 1-metyl-4-pirydono-5- karboksamidu przy udziale oksydazy aldehydowej. W niewielkim stopniu NAM może być utleniany przez cytochrom P450 do tlenku N-nikotynamidu (Rysunek 2).

Należy nadmienić, iż w obrębie gatunków oraz osobników występuje genetyczna zmienność w syntezie N-metyltransferazy nikotynamidowej. Aktywność tego enzymu jest indukowana przez obecność substratów oraz czynniki zewnętrzne np. stres. Przyjmuje się, że u 52% populacji ludzkiej występuje wysoka ekspresja NNMT (Williams i Ramsden_{a,b,c,d} 2005). NNMT występuje w znaczących ilościach w wątrobie, a także w płucach, sercu, nerkach i mięśniach szkieletowych. Przez długi czas występowanie NNMT w mózgu było dyskusyjne, jednakże zostało ono potwierdzone przez obecność specyficznego mRNA oraz pomiar aktywności enzymatycznej w izolowanych frakcjach mózgu (Williams i Ramsden_{a,b,c,d} 2005; Fukuschima i wsp., 2002). Preferowanym substratem dla tego enzymu jest NAM, jednak NNMT charakteryzuje się niską specyficznością substratową i może metylować ksenobiotyczne związki zawierające w swojej cząsteczce pierścień pirydynowy.

¹ W dalszej części pracy autor posługuje się nazwą obiegową: 1-metylnikotynamid lub skrótem MNA.



Rysunek 2. Szlak syntezy i katabolizmu 1-metylnikotynamidu w komórce. **1** – N-metyltransferaza nikotynamidowa; **2** – cytochrom P450 ; **3, 4** – oksydaza aldehydowa; **NAM**– nikotynamid; **MNA⁺**- amid kwasu 1-metylnikotynamidowego; **N-OX** - tlenek N-nikotynamidu; **2-PYR** - 1-metyl-1-pirydono 5-karboxsyamid; **4-PYR** – 1-metyl-4-pirydono-5-karboxsyamid.

Dzięki tej właściwości NNMT zaliczana jest do systemu detoksyfikacyjnego w organizmie (dodatkowe informacje w podrozdziale 1.4.2.2). Substratem dla NNMT może być także kwas nikotynowy, co wynika z jego homologicznej budowy z cząsteczką NAM (Carlson i wsp., 2005).

MNA oraz jego metabolity wydalone są głównie przez nerki z moczem. Za wychwyt z krwiobiegu oraz wydalanie MNA odpowiedzialne są transportery dla kationów organicznych OCT (*ang. organic cation transporter*). OCT 1 (niezależny od pH i jonów Na⁺) oraz OCT2 i 3 (zależne od ATP i jonów Na⁺) obecne są w błonie podstawnej kanalików proksymalnych. OCT pośredniczą także w metabolizmie innych kationów organicznych, takich jak tetraetyloamina (TAE), 1-metyl-4-fenylpirydyna (MPP⁺) oraz endogennych: choliny, dopaminy, adrenaliny, noradrenaliny, 5-hydroksytryptaminy (Maiza i wsp., 1992; Sun i wsp., 2006). Wspomniane związki różnią się powinowactwem oraz szybkością transportu za pośrednictwem OCT. Przykładowo MNA hamuje transport MPP⁺ przez kanały OCT1 i 2, aczkolwiek hamowanie transportu przez OCT1 jest nieco silniejsza niż w przypadku OCT2 (Kakehi i wsp., 2002). Transportery OCT oprócz występowania na kanalikach nerki obecne są na powierzchni komórek wątroby, jelit oraz mózgu.

MNA wykorzystywany jest, jako biomarker procesów fizjologicznych. Poziom MNA badany jest przy określaniu niedoborów nikotynamidu (Vivian i wsp., 1958), przy ocenie przepływu osocza przez nerki jako parametr RPF (*ang. renal plasma flow*), a także łącznie z 2PYR i 4PYR może służyć do określenia wydzielania kanalikowego w nerkach, co wynika z jego śladowej resorpcji zwrotnej (Maiza i wsp., 1992; Musfeld i wsp., 2001). Wykryto pozytywną korelację, między wzrostem stężenia wydalanego MNA a zwiększeniem tempa proliferacji peroksosomów w wątrobie. Nasuwa to możliwość zastosowania MNA do tego typu oznaczeń rutynowo, zamiast stosowania drogiego, czasochłonnego i trudnego do interpretacji badania z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego (Delaney i wsp., 2005).

Poziom MNA w moczu zależy ściśle od fizjologicznego stanu organizmu (ważną rolę odgrywa wiek, przebyte choroby w tym schorzenia wątroby i nerek) i występuje w surowicy ludzkiej w stężeniach 1-117 ng ml⁻¹, w moczu zawartość waha się w granicach 0,5–25 µg ml⁻¹ (Musfeld i wsp., 2001). Produkcja oraz stężenie wydalanego MNA znacząco wzrasta w przypadkach marskości wątroby (Pumpo i wsp., 2001). Zmiany chorobowe upośledzają wykorzystanie NAM do produkcji nukleotydów NAD i NADP niezbędnych do syntezy ATP, co w konsekwencji skutkuje kryzysem energetycznym. NAM jest katabolizowany w szybkim tempie do MNA oraz jego metabolitów 2PYR i 4PYR. Należy jednak zaznaczyć, iż podwyższony poziom MNA obserwuje się zawsze po podaniu dużych dawek NAM u ludzi zdrowych, co zabezpiecza przed szkodliwym działaniem nadmiaru tej witaminy.

1.4.2. Znaczenie kliniczne 1-metylnikotynamidu

1.4.2.1. Działanie 1-metylnikotynamidu na obwodzie

MNA, podobnie jak jego prekursor NAM, jest związkiem stabilnym chemicznie. Przez lata metabolity nikotynamidu, w tym MNA służyły, jako biomarkery procesów fizjologicznych (podrozdział 1.4.1.) We wszystkich tych badaniach MNA uważany był za nieaktywny biologicznie związek. Pojawiające się próby stosowania MNA w klinice, jako środka o charakterze przeciwzapalnym (Gębicki i wsp., 2003) oraz przypisywanie temu związkowi pozytywnych efektów w badaniach klinicznych u pacjentów z cukrzycą (Gosteli i wsp., 2004), zmieniły spojrzenie na tę metylowaną pochodną nikotynamidu.

W ostatnich latach wykazano przeciwzakrzepowe i trombolityczne właściwości MNA, zależne od aktywacji ścieżki sygnałowej cyklooksygenaza-2 / prostacyklina I₂ (COX-2/ PGI₂), w modelu pomiaru trombolizy podczas pozaustrojowej indukcji zakrzepicy naczyń tętniczych przy normalnym ciśnieniu krwi wg. Gryglewskiego. Analogiczne badania przeprowadzono w modelu zakrzepicy tętniczej z indukowanym nadciśnieniem nerkowym u szczurów (Chłopicki i wsp., 2007; Mogielnicki i wsp., 2007). To ostatnie odkrycie nabiera znaczenia z uwagi na fakt, że nadciśnienie tętnicze jest jednym z najważniejszych czynników ryzyka powstania zakrzepów w dużych naczyniach, prowadzącym w konsekwencji do choroby wieńcowej i udarów mózgu. W doświadczeniach z trombolizą dowiedziono, że MNA posiada zależną od dawki, utrzymującą się w czasie, fibrynolityczną aktywność pojawiającą się około drugiej minuty a osiągającą najwyższą wartość między 20 – 25 minutą po podaniu. Podobnie, w modelu zakrzepicy naczyń tętniczych z indukowanym nadciśnieniem naczyń nerkowych, MNA wykazywał właściwości trombolityczne zależne od dawki. W obu przypadkach aktywność fibrynolityczna była znoszona po zastosowaniu odpowiednich narzędzi farmakologicznych, nieselektywnego inhibitora COX – indometacyny i selektywnego inhibitora COX-2 – rofecoxibu. Zastosowaniu tych związków towarzyszył spadek stężenia 6-keto-PGF_{1α}, metabolitu PGI₂. Co więcej MNA nie wykazywał żadnego wpływu na poziom innych prostanoidów, takich jak tromboksan A₂ (TXA₂) i prostaglandyna E₂ (PGE₂). Należy podkreślić, iż zastosowanie MNA nie wpłynęło na zmianę ciśnienia tętniczego w czasie trwania eksperymentów.

Interesujący wydaje się brak podobnej aktywności MNA w modelu zakrzepicy żyłnej. Prawdopodobnie ma to związek z mniejszym znaczeniem płytek krwi, w przeciwieństwie do modelu zakrzepicy tętniczej, gdzie stymulacja komórek śródbłonna np. przez inhibitory konwertazy angiotensyny czy kwas acetylosalicylowy (ASA) prowadzi do uwolnienia PGI₂ i lizy zakrzepu. Wydaje się, że dla aktywności przeciwzakrzepowej w krążeniu żylnym większe znaczenie ma uwalnianie NO niż PGI₂. Brak efektu można powiązać z faktem, iż podanie MNA nie stymuluje aktywności NOS a co za tym idzie nie powoduje zwiększenia puli NO (Chłopicki i wsp., 2007). Zwrócenie uwagi na biologiczne znaczenie szlaku COX-2/PGI₂ powiązane jest z rozpoznaniem ostatnio zwiększonym ryzykiem udarów i zawałów serca u pacjentów stosujących leki będące inhibitorami COX-2, co znacząco hamuje syntezę PGI₂ (Grosser i wsp., 2006). MNA wydaje się więc być dobrym kandydatem na substancję zwiększającą pulę endogennej PGI₂, tym bardziej, że

podjęto próby zastosowania PGI₂ lub jej stabilnych analogów w klinice w leczeniu nadciśnienia, chorób naczyń obwodowych czy uszkodzeń wątroby.

Właściwości przeciwzapalne związane z syntezą PGI₂ zależną od indukcji COX-2 przez komórki endotelium (Chlopicki i wsp., 2007), oraz wykazanie skuteczności miejscowego stosowania MNA (Gębicki i wsp., 2003; Woznicka i wsp., 2005) nasunęły możliwość testowania tego związku w procesach zapalnych powiązanych z syntezą prostanoidów np. w uszkodzeniu błony śluzowej żołądka przez czynniki stresowe lub toksyczne. Brzozowski i wsp. (2008) wykazał protekcyjne działanie egzogennie podawanego MNA na śluzówkę żołądka w szczurzym modelu indukcji stresu, polegającym na zanurzaniu zwierząt w wodzie (*ang. water immersion and water restraint stress; WRS*), oraz w uszkodzeniu błony śluzowej żołądka przez dożyłdkowe podawanie 75% etanolu. Mechanizm zależnego od dawki, gastroprotekcyjnego działania MNA, polegał na poprawie mikrokrążenia krwi w błonie śluzowej żołądka, wywołanej aktywacją ścieżki COX-2/PGI₂, a także indukcji uwalniania wasodylatacyjnego neuropeptydu - CGRP z zakończeń aferentnych nerwów czuciowych przez bezpośrednią (a także pośrednią przez zwiększenie puli PGI₂) stymulację receptorów TRPV1. Ponadto MNA wzmacniał ekspresję mRNA dla peptydu CGRP oraz jego uwalnianie do krwiobiegu. MNA działał też podobnie jak związki o charakterze antyrodnikowym, podwyższając pulę dostępnej SOD oraz hamując utlenienie lipidów błony komórkowej (Brzozowski i wsp. 2008). Dodatkowo, w modelu WRS, MNA w wyższych dawkach hamował wydzielanie kwasu solnego oraz pepsyny, co sugeruje jego aktywność przeciwwydzielniczą, którą ma także jego prekursor, NAM (Stratford i wsp., 1996). Porównując ochronne działanie MNA ze znanymi i sprawdzonymi preparatami chroniącymi przed uszkodzeniami śluzówkę żołądka, takimi jak omeprazol (inhibitor pompy protonowej) czy ranitydyna (inhibitor receptorów histaminowych H₂), Brzozowski i wsp. (2008) podają, iż skuteczność MNA jest porównywalna ze stosowaniem ranitydyny, a oba związki mają słabsze działanie w stosunku do omeprazolu. Zważywszy na fakt, że choroba wrzodowa a także uszkodzenia błony śluzowej żołądka pod wpływem długotrwałych warunków stresowych lub działania związków o charakterze drażniąco-uszkodzającym (np. alkohol) stały się poważnym problemem klinicznym, prowadzenie badań nad nowymi związkami protekcyjnymi wydaje się być działaniem celowym.

Znanych jest wiele procesów chorobowych, w których przebiegu dochodzi do zaburzeń aktywności śródbłonna. Czynnikiem ryzyka wystąpienia dysfunkcji śródbłonna naczyń jest hipertriglicydemia oraz/i cukrzyca. MNA obniżał znacząco poziom triglicerydów w przebiegu hipertriglicydemii oraz poprawiał parametry aktywności naczyń w cukrzycy (Bartuś i wsp., 2008). Jak wynika z informacji zamieszczonych na stronie www.clinicaltrials.gov:

(<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00519714?recr=open&cond=%22Hypertriglyceridemia%22&rank=11>), we wrześniu 2007 roku rozpoczęto badania kliniczne II i III fazy nad wpływem MNA na hipertriglicydemie. Były one nadzorowane przez Montrealski Instytut Serca i zostały zakończone w styczniu 2009 roku. W chwili pisania tej rozprawy wyniki testów klinicznych nie były podane do wiadomości publicznej.

Gębicki i wsp. (2003) oraz Woznicka i wsp. (2005) wykazali właściwości przeciwzapalne MNA w schorzeniach dermatologicznych, w tym w trądziku różowatym. Jednakże szlaki hamowania oraz mediatory odpowiedzi immunologicznej zaangażowane w ten proces pozostawały nieznane. Bryniarski i wsp. (2008) potwierdzili hamowanie odpowiedzi zapalnej przez MNA w modelu kontaktowej nadwrażliwości na oxazolon u myszy, jednocześnie tłumacząc mechanizm tego działania. MNA hamował odczyn zapalny poprzez mechanizm związany z uwalnianiem endotelialnej PGI₂, wykazując brak bezpośredniego efektu na aktywację limfocytów. PGI₂ uważana jest za jednego z najsilniejszych endogennych inhibitorów aktywacji płytek krwi, a co za tym idzie MNA zwiększający pulę dostępnej PGI₂, a w następstwie hamując uwalnianie prozapalnego TXA₂ promował wygaszanie reakcji immunologicznej. PGI₂ uwalniana pod wpływem MNA dodatkowo mogła hamować ekspresję molekuł adhezyjnych takich jak ICAM-1, a sama cząsteczka MNA może bezpośrednio stabilizować barierę mikronaczyniową, zapobiegając infiltracji komórek zapalnych.

Pozytywne działanie MNA wydaje się być związane także z budową jego cząsteczki, dużego kationu organicznego. MNA w przeciwieństwie do swego prekursora, NAM, wykazuje zdolność przyłączania się do ujemnie naładowanych struktur. Gębicki i wsp. (2003) wykazali zdolność wiązania MNA do glikozoaminoglikanów, np. heparyny. Niewykluczone jest więc, że po podaniu obwodowym związek ten może wchodzić w interakcje z glikozoaminoglikanami na powierzchni endotelium, bez bezpośredniego wnikania do komórek. Takie zachowanie może po części tłumaczyć przeciwzapalną

aktywność MNA, który przez samą swoją obecność może hamować przyleganie i interakcje komórek oraz molekuł prozapalnych z komórkami śródbłonka naczyń. Ponadto MNA wydaje się być dobrym kandydatem do oddziaływań z macierzą zewnątrzkomórkową (Dragun i wsp, 2008; Borkowski i wsp., 2008), chroniąc jednocześnie jej składniki przed niekorzystnym przemodelowaniem w procesach patologicznych, np. w zawałach.

Borkowski i wsp. (2008) wykazali skuteczność MNA w modelu zawału serca u szczurów wywołanego zaciśnięciem tętnicy wieńcowej (*ang. coronary artery ligation; CAL*). Analiza biochemiczna wykazała zmniejszony stosunek pirydynolina/hydroksypolina² w sercach zwierząt traktowanych MNA (5.9 ± 0.2 nmol/mmol) w porównaniu do grupy kontrolnej – zawałowej (7.6 ± 0.6). Podczas gdy zawartość hydroksypoliny pozostała niezmienną. Podawanie MNA szczurom w czasie pozawałowej przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej w sercu skutkowało zmniejszeniem ilości mostków kolagenowych i elastynowych³. Podobny proces został zaobserwowany dla desmozyny. Efekt ten przekłada się na zmniejszenie upośledzenia funkcji rozkurczowej lewej komory serca (-dP/dt - wartość przyrostu ciśnienia w czasie, mierzonego w trakcie skurczu izowolumetrycznego lewej komory) i poprawę czynności rozkurczowej w grupie leczonej MNA, w porównaniu do nieleczonej.

Reasumując, przedstawione dane wskazują na to, że MNA wydaje się być związkiem o działaniu plejotropowym o złożonym i nadal nie do końca poznany mechanizmie działania.

1.4.2.3. 1-Metylnikotynamid w obrębie OUN: toksyna czy związek protekcyjny?

Mało wiadomo o roli MNA w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (OUN). MNA *in vivo* wykazuje pewne korzystne właściwości; jest inhibitorem wychwytu zwrotnego choline z przestrzeni międzykomórkowej i jej usuwania do krwi, prawdopodobnie na zasadzie przestrzennego blokowania specyficznego transportera (Vargas i wsp., 1996). Mechanizm takiego działania MNA nie jest do końca wyjaśniony a

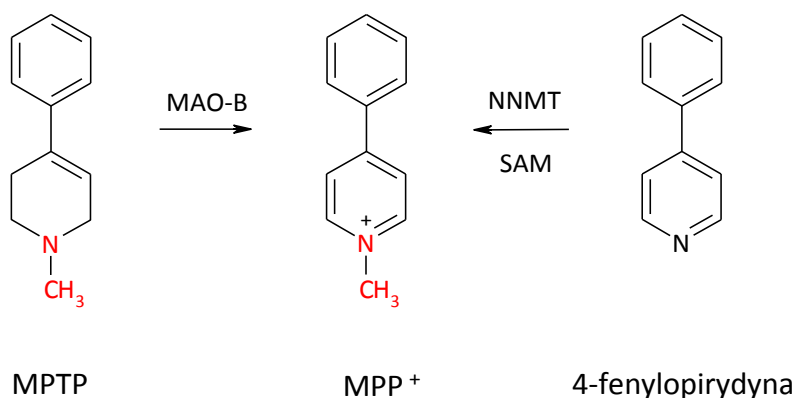
² Hydroksypolina jest aminokwasem charakterystycznym dla kolagenu, toteż zawartość kolagenu całkowitego w tkance może być oznaczona na podstawie określenia ilości tego aminokwasu. Pirydynolina jest związkiem tworzącym międzycząsteczkowe wiązania w dojrzałych włóknach kolagenu.

³ Istnieje zależność między zaawansowaniem niewydolności serca a zawartością kolagenu w mięśni lewej komory serca. Okołonaczyniowe gromadzenie włókien kolagenu (*arteriosclerosis*) pogarsza rozszerzalność naczyń pod wpływem czynników endo- i egzogennych, co w konsekwencji prowadzi do obniżenia się rezerwy naczyniowej.

może wynikać z faktu, że jest on dużym, kationem organicznym nieprzechodzącym przez barierę krew-mózg. Wysoki poziom cholinylacji hamuje wady rozwojowe układu nerwowego, powoduje poprawę procesów pamięciowych nawet u osobników w starszym wieku (Blusztajn, 1998). Obecność MNA promuje więc produkcję acetylocholiny, neurotransmitera powiązanego szczególnie z procesami pamięciowymi. Dlatego uważa się, że MNA może pośrednio brać udział w regulacji cech osobowości i możliwości poznawczych u ssaków (Williams i Ramsden_{a,b,c,d}, 2005). Stwierdzono fizjologicznie wysoki poziom metyltransferazy nikotynamidowej w obrębie rdzenia przedłużonego i w niektórych rejonach kory (płat skroniowy, kora przedczołowa), co może sugerować, iż w tych strukturach występuje niewielkie zapotrzebowanie na NAM, a podwyższone na MNA, w przeciwieństwie do niskiego poziomu tego enzymu w rejonie jąder podstawy oraz części zbitiej istoty czarnej (*Substantia nigra pars compacta*) (Parsons i wsp., 2002, 2003; Ramsden, 2001; Williams i Ramsden_{a,c,d}, 2005). Wykazanie obecności NNMT w neuronach świadczy o katabolizmie NAM i obecności endogennie powstającego MNA (Vargas i wsp., 1996; Williams i Ramsden_{a, b, c, d} 2005).

Z drugiej strony w literaturze obecne są dane o szkodliwym działaniu MNA na komórki nerwowe min. linii neuroblastoma (Willets i wsp., 1993). Jednak toksyczność MNA wiązana jest przede wszystkim w eksperymentach z neuronami o fenotypie dopaminergicznym. Według danych Fukushima i wsp. (2002, 2005), MNA podany do części zbitiej istoty czarnej znacząco obniżał poziom dopaminy w obrębie prążkownia u szczurów. Dodatkowo, cząsteczka MNA zbliżona jest w swojej strukturze do modelowej toksyny dla neuronów dopaminergicznych, MPP⁺, posiadającej grupę metylową przy atomie N w pierścieniu fenolowym.

A



B TETRAIZOCHINOLINY/ β -KARBOLINY \xrightarrow{NNMT} METYLOWANA POCHODNA

Rysunek 3. Rola niespecyficznej metylacji z udziałem NNMT w chorobie Parkinsona. (a) Alternatywna droga syntezy MPP+ z związków pirydynowych przez NNMT. (b) metylacja β -karbolin i tetraizochinolin do bardziej toksycznych metylowanych pochodnych. **NNMT**- N-metyltransferaza nikotynamidowa; **MPTP**-1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyna; **MPP+**-1-metylo-4-fenylpirydyna; **MAO-B** - oksydaza monoaminowa B; **SAM**- S-adenozylometionina. Potencjalnie toksyczna grupa metylowa zaznaczona jest na kolor czerwony.

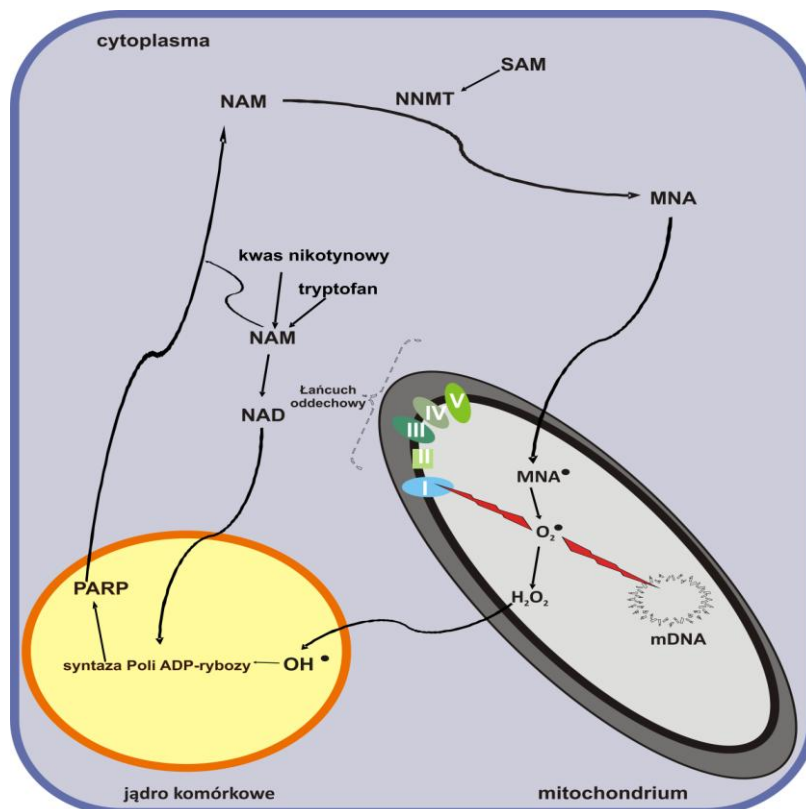
Bradbury i wsp. (1985) i Athwall i wsp. (1996) stwierdzili, że grupa N-metylowa ściśle koreluje z neurotoksycznością związków. MPP+, podobnie jak MNA może być syntetyzowany w wyniku aktywności metyltransferazy nikotynamidowej (Rysunek 3A), która charakteryzuje się niską specyficznością substratową. Substratami dla NNMT są także inne związki pirydynowe takie jak β -karboliny i tetraizochinoliny (Rysunek 3B), które jak się sugeruje mogą zaostrzać objawy choroby Parkinsona a nawet ją wywoływać (Matsubara i wsp., 2002; Williams i Ramsden_{a,b,c,d}, 2005). Dane o szkodliwości MNA dla komórek dopaminergicznych nie dotyczą jego związku prekursorowego. Wykazano, że NAM zmniejszał toksyczność L-Dopa a także działał protekcyjnie względem toksycznego działania MPP+. Podanie analogu NAM, 6-aminonikotynamidu powodowało hamowanie syntezy dwunukleotydów NAD i NADP, a wtórnie spadek poziomu dopaminy oraz utratę neuronów dopaminergicznych w rejonie części zbitej istoty czarnej (Beal i wsp., 2003; Cartwright i wsp., 2004;).

Williams i wsp. (2005), Fukushima i wsp. (2002) postulują zaburzenia homeostazy na szlaku nikotynamid-NNMT-1-metylnikotynamid w genezie choroby Parkinsona. Niski poziom NAM (którego cytoprotekcyjne właściwości opisano w paragrafie 1.3.) w komórkach OUN, może prowadzić do neurodegeneracji, podczas gdy wysoki kieruje procesy komórkowe w kierunku nowotworzenia (Harvias i wsp., 2000; Chong i wsp., 2002), lub w młodszym wieku do zaburzeń rozwojowych poprzez zakłócenia w syntezie PARP (Hageman i wsp., 2001). Zwiększona podaż NAM (np. przez sztuczną suplementację) nasila procesy kataboliczne w kierunku syntezy potencjalnie toksycznego MNA, a jednocześnie redukuje dostępną pulę SAM dla innych reakcji metylacji. Wiadomo, że w przebiegu choroby Parkinsona obserwuje się spadek poziomu SAM, który pogłębia się w trakcie leczenia. Długotrwałe, chroniczne przyjmowanie wysokich dawek NAM (z naturalnym pokarmem lub też, jako suplement diety) może prowadzić do akumulacji MNA. Willets i wsp. (1993) oraz Fukushima i wsp. (2002) postulują, że toksyczne działanie MNA waha się między 1/5 a 1/50 toksyczności szkodliwej dawki MPP+, angażując przy

tym te same szlaki komórkowe. Wiadomo, że zarówno MNA jak i inne podobne w budowie cząsteczki mogą wnikać do komórek za pośrednictwem transporterów dużych kationów organicznych (OCT1, 2, 3). Zakładając wieloletnie „przedawkowania” NAM i możliwość akumulacji MNA, niewykluczone jest osiągnięcie progu toksyczności dla tego związku. Na uwagę zasługuje fakt, iż MNA „dzieli” drogę wejścia do neuronów przez transporter OCT2 z antyparkinsonowskimi lekami, takimi jak memantyna i amantadyna, które zwiększają poziom neurotransmiterów monoaminowych (głównie dopaminy) w przestrzeni synaptycznej (Busch i wsp., 1998).

W świetle tych badań, MNA wydaje się być endogenną toksyną w obrębie OUN powiązaną z występowaniem choroby Parkinsona (Aoyama i wsp., 2000; Williams i Ramsden ^{a,b,c,d}, 2005). Williams i wsp. (1993) stwierdzili, że u pacjentów z chorobą Parkinsona wzrasta ilość MNA wydalanego z moczem a poziom metylacji NAM jest z wielokrotnioną (Parsons i wsp., 2002). Nie wiadomo jednak, co jest tego przyczyną: nadmierna podaż NAM czy mutacje/polimorfizm w genie metyltransferazy nikotynamidowej, wywołujące nadmierną metylację związków pirydynowych.

Jak dowodzi Fukuschima i wsp. (1995, 2002) endogenne MNA syntetyzowane w komórkach może powodować peroksydację lipidów błony komórkowej oraz uszkadzać białka łańcucha oddechowego na drodze wolnorodnikowej, a efekt ten hamowany jest przez SOD.



Rysunek 4. Schemat prawdopodobnego toksycznego działania MNA – indukcja reakcji wolnorodnikowych (objaśnienie w tekście). Rysunek adaptowany z pracy Williams i Ramsden_{a,b} (2005) z modyfikacjami.

Cząsteczka MNA może uszkadzać wiele białek wchodzących w skład łańcucha oddechowego, ale wydaje się być najbardziej toksyczna dla podjednostki 30 kDa kompleksu I (oksydoreduktaza NADH/ ubichinon), która jest transbłonowym żelazo-siarkowym białkiem wrażliwym na oksydację lipidów wewnętrznej błony komórkowej mitochondrium (Fukushima i wsp., 2005). Rodnik nadtlenkowy (O_2^{\bullet}) powstający w reakcji utleniania-redukcji NADH:MNA (MNA jako akceptor elektronu z NADH staje się rodnikiem) przy udziale kompleksu I może uszkadzać bezpośrednio kompleks I lub/i pośrednio mitochondrialne DNA (mDNA) (Fukushima i wsp., 2005). Uszkodzenia wolnorodnikowe są ważną składową wielu procesów neurodegeneracyjnych, w tym także choroby Parkinsona. Z drugiej jednak strony Gębicki i wsp. (2003) wskazują na słaby, ale wykrywalny, potencjał antyrodnikowy NAM i MNA; chociaż oba związki nie mogą być rozpatrywane w kategoriach efektywnych zmiataaczy wolnych rodników. Ponadto nadmiar NAM uwalnianego z NAD w wyniku poli-ADP-rybozylacji przez PARP (polimeraza ADP-rybozy) wywołanej rodnikami hydroksylowymi (OH^{\bullet}) ulega w obrębie cytoplazmy

metylacji do MNA, który inicjuje powstawanie rodników O[•] w łańcuchu oddechowym (Fukushima i wsp., 2002, 2005; Williams i Ramsden^{a, b, c, d,} 2005).

Podsumowując, działanie MNA w ośrodkowym układzie nerwowym nie jest jasne, a zbadanie czy ten związek odgrywa rolę neuroprotekcijną czy neurotoksyczną wydaje się być ważne i celowe. Autorzy kluczowych prac dotyczących szkodliwości MNA, Williams i Ramsden nie wykluczają, iż za tym efektem stoi jedynie nadekspresja aktywności NNMT oraz coraz powszechniejsza ekspozycja na występujące w środowisku ksenobiotyki, będące substratami dla tego enzymu.

II. Założenia i cel pracy

Jak opisano we Wstępie, ostatnio niezależne grupy badawcze podjęły studia nad cytoprotekcyjnym i terapeutycznym potencjałem 1-metylnikotynamidu (MNA), pochodnej metylowej nikotynamidu (NAM). W literaturze dostępne są dobrze udokumentowane dane, w których porównywano obwodowe działanie NAM i MNA. W badaniach tych MNA wykazywał działanie plejotropowe, które było podobne, a często nawet silniejsze, niż efekty cytoprotekcyjne, przeciwzapalne oraz przeciwzakrzepowe jego prekursora. Szereg badań dotyczyło wpływu MNA na układ krążenia i potwierdziło, że może on być lekiem

stosowanym w terapii zaburzeń sercowo-naczyniowych przebiegających z dysfunkcją śródbłonna i zaburzeniami zakrzepowo-zatorowymi. Pozytywne wyniki prac eksperymentalnych doprowadziły do badań klinicznych koordynowanych przez Montrealski Instytut Chorób Serca.

O ile obraz pozytywnego działania MNA na obwodzie nie pozostawia wątpliwości, w światowej literaturze obecne są dane o toksyczności tego związku w obrębie układu nerwowego. Niespójność tych danych skłoniły mnie do podjęcia własnych badań dotyczących neurotoksyczności MNA. Z drugiej strony, chociaż są zachęcające doniesienia o cytoprotekcyjnym działaniu MNA na obwodzie, brak w literaturze informacji na temat działania MNA na mózg w przebiegu niedokrwienia/niedotlenienia. W szczególności nie ma danych na temat neuroprotekcyjnego działania tego związku na procesy związane z ekscytotoksycznością. Postanowiono więc zbadać te zagadnienia.

Celem niniejszej pracy było:

1. Zbadanie ostrej toksyczności MNA po domózgowym podaniu u szczurów dorosłych oraz osesków, a także wobec neuronów w hodowli *in vitro*.
2. Zbadanie biodostępności MNA i jego wnikania do mózgu siedmiodniowych osesków szczurzych po podaniu dootrzewnowym oraz pobierania przez neurony *in vitro*.
3. Określenie neuroprotekcyjnego potencjału MNA w modelu asfiksji okołoporodowej u siedmiodniowych szczurów.
4. Ocena wpływu MNA na ekscytotoksyczność *in vivo* i *in vitro*.
5. Próba wyjaśnienia mechanizmów spodziewanego neuroprotekcyjnego działania MNA w modelu hipoksji – ischemii mózgu osesków szczurzych.

W niniejszej pracy połączono badania przeprowadzone na modelu zwierzęcym z zastosowaniem modeli alternatywnych *in vitro* (hodowli neuronów ziarnistych mózdzku szczura lub badania frakcji błonowych izolowanych z kory mózgu szczura), które wykorzystano do wyjaśnienia mechanizmów neuroprotekcyjnego działania MNA.

III. Materiały i metody

Doświadczenia z wykorzystaniem zwierząt były prowadzone zgodnie z obowiązującymi w Polsce przepisami oraz z Konwencją Europejską. Zezwolenie na wykonanie doświadczeń wydała IV Lokalna Komisja Etyczna do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie.

3.1. Badania in vivo

3.1.1. Materiał doświadczalny

W badaniach *in vivo* materiał doświadczalny stanowiły:

- a) Dorosłe szczury, samce szczepu *Wistar* o masie ciała 230 – 250 g, z hodowli

prowadzonej w IMDiK PAN, utrzymywanej w warunkach stabilnej temperatury, wilgotności oraz diety.

- b) Siedmiodniowe oseski szczurze *Wistar* tego samego pochodzenia. Po rozpoczęciu eksperymentów mioty były przetrzymywane w warunkach jak wyżej przez okres podany w opisie doświadczeń.

3.1.2. Modele doświadczalne

3.1.2.1. Iniekcje związków farmakologicznych do części zbitej istoty czarnej (*Substantia nigra pars compacta*) szczurów dorosłych

W celu zbadania bezpośredniego wpływu MNA na neurony dopaminergiczne podawano jednostronnie do istoty czarnej zbitej badany związek w dawkach: 20, 40 i 80 µg w objętości 1 µl. Jako kontrolę pozytywną, według której oceniano toksyczność MNA, użyto zwierząt, którym podawano MPP+ w dawce 20 µg. Kontrolę negatywną (sham) stanowiły zwierzęta, którym podawano rozpuszczalnik - sól fizjologiczna. Dawki podawanych związków wyznaczono na podstawie literatury (Liou i wsp., 1996; Sindhu i wsp., 2006) oraz obserwacji własnych. Procedurę rozpoczynano od podania narkozy wziewnej halotanowej, a następnie unieruchamiano zwierzęta w ramie stereotaktycznej (Stoeling Co.). Miejsce podania ustalano według parametrów: AP 5,3; L 2,0; V 7,8 mm od bregmy. W czaszce wywiercano otwór trepanacyjny o średnicy ok. 2 mm, do którego wprowadzano mikroigłę ze stali szlachetnej o średnicy 0,46 mm (Hamilton). 1 µl roztworu MNA lub MPP+ w soli fizjologicznej lub samej soli fizjologicznej, w przypadku zwierząt kontrolnych, podawano przez 2 minuty za pomocą pompy infuzyjnej; ustalając wydajność pompy na 0,25 µl na minutę. Po zabiegu skórę zszywano i zwierzęta wracały do swoich klatek na okres 5 dni, po których poddawano ocenie uszkodzenia. W tym celu stosowano metody immunohistochemiczne oraz testy behawioralne.

3.1.2.2. Modelowa asfiksja (hipoksja/ischemia) 7 dniowych osesków szczurzych

Hipoksję-ischemię u 7-dniowych osesków szczurzych szczepu *Wistar* indukowano jak opisano przez Rice'a i wsp. 1981 i Andine i wsp. 1990. Noworodki szczurze poddawano znieczuleniu wziewnemu halotanem z podtlenkiem azotu i jednostronnemu zamknięciu tętnicy szyjnej wspólnej. Wypreparowaną tętnicę szyjną wspólną podwiązywano w dwu miejscach chirurgicznymi nićmi jedwabnymi (7.0), a następnie przecinano między podwiązkami, lub tylko wypreparowano (sham). Ranę zaszywano, a zwierzęta

odstawiano do klatki z matką na okres jednej godziny. Po tym okresie zwierzęta ponownie oddzielano od matki i eksponowano na warunki hipoksyjne przez 65 min mieszanką gazową zawierającą 7.7% O₂ w N₂ w termostатовanej komorze (35-36 °C). Potencjalnie farmakologicznie czynne substancje: NAM i MNA w testowanych dawkach podawano 30 min. po hipoksji/ischemii. Dla oceny uszkodzenia, dwa tygodnie po hipoksji mózgi poddano ocenie makroskopowej oraz zbadano ubytek masy półkul metodą wagową.

3.1.2.3. Mikroiniekcje NMDA do prążkowania 7-dniowych szczurów

Mikroiniekcje do prążkowania wykonywane były w narkozie halotanowej indukowanej jak wyżej opisano z użyciem aparatu stereotaktycznego dla małych szczurów wg koordynatów: AP 2; L 0,5; V 5 mm (Sherwood i Timiras, 1970). Koordynaty ustalono na podstawie lokalizacji bregmy. Dla oceny lezji wywołanej podaniem 1 µl 15 nM roztworu NMDA oraz wpływu dootrzewnowego podania MNA na wielkość uszkodzenia wykonano preparaty seryjnych skrawków mózgu dla morfometrycznej (wolumetrycznej) oceny obszaru lezji metodą TTC. Skrawki inkubowano przez 30 min w temp. 37 °C w PBS zawierającym 0,5% roztwór TTC (chlorek 2,3,5-trifernylotetrazoliny). Następnie usuwano TTC i w celu utrwalenia skrawków zalewano je 10% roztworem formaliny na 24 godz. Seryjne skrawki fotografowano na tle skali aparatem cyfrowym. Wielkość lezji określano przy użyciu programu *ImageJ* (National Institute of Health, USA) z uwzględnieniem grubości skrawków.

3.1.2.4. Mikroiniekcje MNA, NAM i MPP+ do prążkowania 7-dniowych szczurów

Mikroiniekcje wykonano jw. Badane związki podawano do prążkowania w dawkach: 40, 80 i 100 µg. Lezje oceniano morfometrycznie w skrawkach wybarwionych metodą TTC w 7 dniu po podaniu testowanych związków, jak podano w 3.1.2.3.

3.1.3. Przygotowanie materiału do analiz immunochemicznych oraz opis wykonanych doświadczeń

3.1.3.1. Western blot. Wyjściowym materiałem do badań była kora mózgu 7-dniowych osesków szczurzych. Zwierzęta były dekapitowane, w temperaturze 4 °C wydobywano mózg i izolowano korę, usuwano naczynia krwionośne i istotę białą. Tkanę

homogenizowano w 25 mM buforze Tris-HCl, pH 7,4 z dodatkiem mieszaniny inhibitorów proteaz Complete (Roche Diagnostics GmbH). Tak przygotowany materiał przechowywano w temp. -70 °C i używano do oznaczeń immunochemicznych. Zawartość białka w preparacie oznaczano metodą Lowry'ego przy użyciu fenolowego odczynnika Folina (Lowry i wsp., 1951). Próbkę przygotowano inkubując je w buforze o składzie: 0,125 M TRIS, 10% glicerol, 0,22% błękit bromofenolowy, 2% SDS, 0,1% 2-merkaptoetanol, przez 5 min w temp. 100° C. Do elektroforezy pobrano po 50 µg białka/studzienkę i poddano rozdzielaniu przez 120 min. na 10% żelu poliakrylamidowym wg metody Laemmli (1970) przy napięciu 100V. Następnie dokonano transferu rozdzielonych białek metodą elektroblotingu na błonę nitrocelulozową (0,2 µm, Hybond-ECL, Amersham) przez 1,5 godz. przy natężeniu prądu 350 mA. Po 3 krotnym (przez 5 min.) przepłukaniu błony nitrocelulozowej w buforze TBST (50 mM TRIS, 153 mM NaCl, Tween 0,05%, pH 7,5) blokowano niespecyficzne wiązania przez inkubację w 5% odtłuszczonego mleku w TBST przez 1 godz. Po kolejnym trzykrotnym płukaniu w TBST błonę nitrocelulozową poddano inkubacji ze specyficznymi przeciwciałami poliklonalnymi, anty COX-2 (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) lub anty β-aktyna (Sigma) w rozcieńczeniu 1:1000 w 5% mleku w TBST i pozostawiono na noc w 4° C. Następnego dnia po standardowym przepłukaniu w TBST błonę inkubowano 30 min. w temp. pokojowej z wtórnymi, poliklonalnym przeciwciałem typu IgG połączonym z peroksydazą chrzanową, rozcieńczonym w stosunku 1:1000 w 5% mleku w TBST. Do detekcji białka użyto metody chemiluminescencyjnej ECL wykorzystując zestaw firmy PIERCE.

3.1.3.2. Badanie aktywności metaloproteinaz metodą zymograficzną

Całe pólki lub ich fragmenty homogenizowano w 10-krotnej objętości (v/v) buforu (50mM TRIS-HCl, pH 7.6), zawierającego 150 mM NaCl, 5mM CaCl₂, 0.05% Brij 35, 0.02% NaN₃ i 1% Triton X-100. Homogenaty wirowano przy 11300 rpm przez 5 minut w temperaturze 4°C. W uzyskanym nadsącu oznaczano stężenie białka metodą Lowry. Nadsącz w objętości 300 µl, zawierający 1000 µg białka inkubowano z 50 µl sepharozy B związanej z żelatyną (gelatin-Sepharose 4B, Pharmacia Biotech) przez okres 90 minut w 4°C a następnie wirowano przy 4000 x g przez 5 minut w temperaturze 4°C. Osad,

zawierający związane ze złożem metaloproteinazy, płukano 2-krotnie w 500 µl buforu do homogenizacji nie zawierającym Tritonu X-100. Po każdym płukaniu zawiesinę wirowano (4000 rpm przez 5 minut w 4°C). Po ostatnim wirowaniu osad zawieszano w 50 µl buforu do płukania z dodatkiem 10 % DMSO i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 4°C, ciągle mieszając. Po zakończonej inkubacji zawiesinę wirowano ponownie w podanych wyżej warunkach. W pobranym nadsądczu określano aktywność MMP-2 i MMP-9.

Tak przygotowane ekstrakty z półkul mózgu poddanych niedokrwieniu mieszano z nie redukującym buforem obciążającym (SB), 5-krotnie stężonym, zawierającym: 62,5 mM Tris-HCl o pH 6.8, 10% glicerol, 2% SDS, 0.05% błękit bromofenolowy. Próby o równej zawartości białka nakładano na przygotowany 7,5% żel poliakrylamidowy, spolimeryzowany z 0,1% żelatyną. Elektroforezę prowadzono w buforze zawierającym 25mM TRIS pH 8.3, 192mM glicynę, 0,5% SDS, przy stałym napięciu prądu wynoszącym 100V, w temperaturze 4°C, przez około 3 godziny. Po zakończeniu elektroforezy z żeli usuwano SDS przez dwukrotne płukanie trwające 20 minut w 2,5 % wodnym roztworze Tritonu X-100, a następnie żele inkubowano w buforze aktywującym o składzie: 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ i 0.02% NaN₃. Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C przez 48 godzin. Po upływie tego czasu żele barwiono 0.1% błękitem Coomassie (Coomassie Blue R250) w roztworze wodnym zawierającym 40% metanolu i 10% kwasu octowego. Nadmiar barwnika usuwano roztworem 10% metanolu i 7% kwasu octowego. Jasne prążki widoczne na tle ciemno wybarwionego żelu są wyznacznikiem aktywności badanych enzymów. Pozycję poszczególnych MMPs na żelu określano w obecności standardów MMP-2 i MMP-9 (Oncogene). Poziom aktywności proteolitycznej MMP-2 i MMP-9 oznaczano densytometrycznie stosując program komputerowy Gel Expert Program (Nucleotech Corp.), określając aktywność metaloproteinaz jako procent aktywności półkuli kontrolnej (kontralateralnej).

3.1.3.3. Oznaczanie zawartości prostanoidów: PGE₂, TXB₂, 6-ketoPGF_{1α} w korze i hipokampie 7-dniowych szczurów

Mózgi zwierząt poddanych hipoksji/ischemii dekapitowano i natychmiast preparowano hipokamp oraz korę; ważono i zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -70°C do czasu izolacji prostanoidów na kolumnach Sep Pack C₁₈ Cartridge.

Przygotowanie próbek:

1. Próbki mózgu homogenizowano w temp. 4 °C w 0,1 M PBS z 1 mM EDTA z dodatkiem 15 % metanolu o pH 7,4, przy zachowaniu proporcji: 100 mg tkanki na 1 ml buforu.
2. Homogenat wirowano przy 10.000 x g przez 10 min.
3. Supernatant doprowadzono do pH ok. 4, stosując 1M bufor octanowy.
4. Przygotowanie Sep Pack C₁₈ Cartridge:
 - przepłukiwanie 10 ml H₂O w celu usunięcia polarnych związków
 - przepłukiwanie 10 ml metanolu.
5. Badane próby nakładano na Sep Pack C₁₈ Cartridge, przy czym szybkość przepływu ustalano na 0,5 ml/ minutę, aby osiągnąć odpowiednią wydajność elucji.
6. Przemycano kolumnę 2 ml eteru naftowego, a następnie 2 ml 15% metanolu
7. Prostanoidy eluowano 4 ml 1% metanolu w octanie etylu.
8. Próbki zatężano pod N₂ (do sucha) i rozpuszczano w 200 ul buforu do oznaczeń zawartym w zestawie.

Oznaczenia przeprowadzono natychmiast lub próby przechowywano w -70 °C w atmosferze N₂. Do oznaczeń wykorzystano następujące komercyjnie dostępne zestawy firmy Cayman Chemical (Ann Arbor, USA):

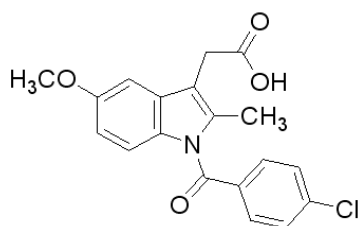
- 6-ketoPGF_{1α} EIA Kit numer katalogowy: 515211
- Prostaglandin E₂ EIA Kit numer katalogowy: 514010
- Thromboxane B₂ EIA Kit numer katalogowy: 519031

Oznaczenia wykonano zgodnie z instrukcją producenta wykreślając krzywą wzorcową. Stężenie prostanoidów przeliczano na masę mokrej tkanki. Prostanoidy oznaczano w trzech punktach czasowych: 30, 60 i 120 minut licząc od podania MNA.

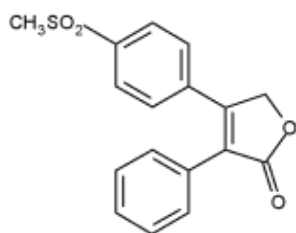
3.1.3.3.1. Wykorzystane narzędzia farmakologiczne oraz zastosowany schemat doświadczeń

W celu zbadania przypuszczalnego mechanizmu działania MNA poprzez modyfikacje odpowiedzi na szlaku COX- 1 / COX-2 → synteza PGI₂ → aktywacja receptora IP zastosowano następujące narzędzia farmakologiczne:

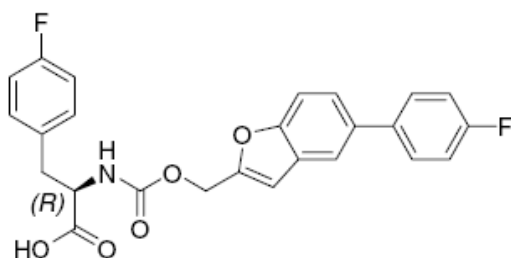
2. **indometacyna**, (Sigma) (nieselektywny inhibitor COX) dawka
5 mg/kg



3. **rofecoxib**, (Merck) (specyficzny antagonist COX-2) 10 mg/kg



4. **RO 324479**, (Roche) (inhibitor receptora IP) 10 mg/kg



3.1.4. *Badania ex vivo*

3.1.4.1. *Barwienie immunocytochemiczne*

Hydroksylaza tyrozynowa (TH). W celu oceny stopnia uszkodzenia neuronów dopaminergicznych w mózгах dorosłych szczurów w rejonie części zbitej istoty czarnej po podaniu MNA lub MPP+, po 5 dniach zwierzęta głęboko uśpiono letalną dawką *i.p.* Vetbutalu a następnie przeprowadzono perfuzję przez lewą komorę serca 4% PFA w PBS o temperaturze 4°C. Mózgi izolowano i umieszczono w 4% PFA na 24 godziny. Po tym czasie tkankę umieszczono w roztworze 20 % sacharozy w celu krioprotekcji. Następnie mózgi zamrażano i cięto w płaszczyźnie czołowej z użyciem kriostatu (Microm HM550) na

skrawki o grubości 20 μm . Uzyskane preparaty wybarwiano na obecność hydroksylazy tyrozynowej mysim monoklonalnym przeciwciałem anty TH (Sigma), markerem neuronów dopaminergicznych. Przeciwciała I-rzędowe nakładano w rozcieńczeniu 1:1000 na 24 godziny w temperaturze pokojowej. W celu zablokowania wiązań nieswoistych skrawki inkubowano przez godzinę w mieszaninie 0,1% albuminy bydlęcej (BSA) i 1% surowicy koziej (Sigma, Gibco) w PBS. Jako wtórnego przeciwciała użyto fluorescencyjnego antymysiego poliklonalnego IgG w rozcieńczeniu 1:500 w PBS (Alexa fluor 546, Invitrogen, Molecular Probes Inc). Preparaty następnie zamykano z użyciem Fluoromont G (Dako). Liczbę TH-pozytywnych neuronów w badanym obszarze zliczano w mikroskopie konfokalnym ZEISS LSM 510. Dla każdego zwierzęcia badano przynajmniej 4 skrawki określając stopień uszkodzenia w porównaniu do półkuli kontrlateralnej (kontrolnej).

Mikroglej. Preparaty z mózgów dorosłych szczurów poddanych iniekcji do *SNpc* barwiono na obecność komórek mikrogleju, stosując lektynę- BS-I (Sigma) z *Bandeirea simplicifolia* wyznakowaną fluorescencyjnie FITC. Lektynę w rozcieńczeniu 1:1000 w PBS nakładano na preparaty na okres 1 godziny. Po tym czasie odpłukiwano lektynę trzykrotnie PBS, preparaty suszono i zamykano stosując Fluoromont G. Obecność komórek mikrogleju oceniano pod mikroskopem konfokalnym ZEISS LSM 510.

Barwienie neuronów i astrocytów. Dla określenia fenotypu komórek w skrawkach mózgu 7-dniowych szczurów wykonano reakcję z przeciwciałami znakującymi białka typowe dla neuronów oraz astrocytów odpowiednio: NeuN (białko jądrowe dojrzałych neuronów) (Chemicon) oraz GFAP (kwaśne białko włókienkowe gleju) (Dako). Dla rozwinięcia reakcji barwnych zastosowano odpowiednie II rzędowe przeciwciała wyznakowane Alexa Fluor 546 (Invitrogen). Uzyskane obrazy analizowano w mikroskopie fluorescencyjnym (Zeiss).

3.1.4.2. Oznaczenie aktywności metaloproteinaz metodą histochemiczną

Wypreparowane mózgi 7 dniowych osesków szczurzych poddanych H/I oraz zwierząt kontrolnych i traktowanych jednorazową *i.p.* iniekcją MNA w dawce 62,5 mg/kg (dawka protekcyjna) mrożono natychmiast w suchym lodzie i przechowywano w temperaturze -70°C do czasu analizy. Ponieważ wcześniej wykonana zymografia pokazała, że MNA wykazywał największy wpływ na poziom metaloproteinaz po 48 godzinach, zdecydowano się na analizę skrawków jedynie w tym punkcie czasowym. Mózgi

umieszczano w komorze kriostatu na okres 1 godziny (dla zrównoważenia temperatury) i cięto na skrawki o grubości 20 μm . Skrawki nakładano na szkiełka podstawowe i przechowywano w temperaturze $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bezpośrednio przed wykonaniem oznaczeń skrawki suszono przez 10-15 minut w temperaturze pokojowej a następnie inkubowano w roztworze żelatyny (100 mg/ml) związanej z fluoresceiną (DQTM gelatin from pig skin, fluorescein conjugate, Invitrogen, Molecular Probes). Inkubację prowadzono w pozbawionej dostępu światła wilgotnej komorze przez 3 godziny w temperaturze 37°C . W celu wykluczenia niespecyficznego fluorescencji niektóre skrawki inkubowano w roztworze żelatyny, do którego dodawano inhibitor metaloproteinaz - fenantrolinę (Sigma). Stężenie końcowe inhibitora w mieszaninie reakcyjnej wynosiło 10 mM.

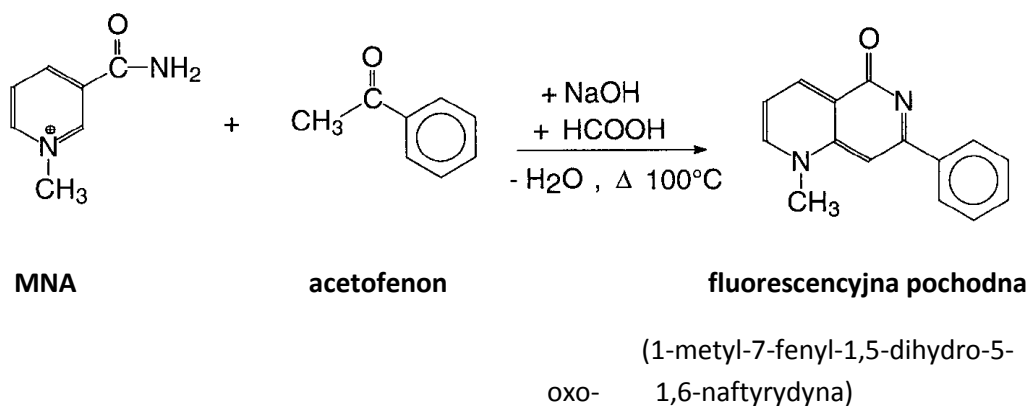
Po zakończonej inkubacji skrawki utrwalano zimnym roztworem 4% paraformaldehydu w PBS. Po utrwaleniu skrawki płukano 3 x 10 minut w PBS. Po końcowym płukaniu preparaty zatapiano w medium zapobiegającym zanikowi fluorescencji (Fluoromount, Dako)) i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Preparaty oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym firmy Zeiss przy długości fali światła 450-490 nm.

3.1.4.3. Oznaczanie zawartości 1-metylnikotnamidu po podaniu obwodowym w mózgu

Oznaczenie zawartości MNA w mózgu 7-dniowych szczurów po dootrzewnowym podaniu (*i.p.*) wykonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z odwróconym układem faz przy użyciu detektora fluorescencyjnego wg. metody Somogyi i wsp. (1990) z modyfikacjami. Materiał do analiz stanowiły odbiałczone za pomocą 0,6 M HClO_4 homogenaty mózgowi wirowane przy 14000 x g a następnie neutralizowane 2M KOH.

Do rozdzielania używano systemu złożonego z pompy P580 (Dionex, Sunnyvale, USA), autosemplera Gina 50 (Dionex, Sunnyvale, USA), kolumny ze złożem Hypersil gold (Thermo Electron Co, Waltham, USA), oraz detektora fluorymetrycznego RF 2000 (Dionex, Sunnyvale, USA). Aby otrzymać fluorescencyjną pochodną MNA (wg. reakcji Rysunek 5), przed każdym rozdzieleniem, do 100 μl próbki dodawano 100 μl 100 mM acetofenonu w alkoholu (cz.d.a); po krótkim mieszaniu inkubowano w temp 4°C . Następnie dodawano 200 μl 6M NaOH; mieszano i po 10 min inkubacji w 4°C traktowano 100 μl kwasu mrówkowego przez 15 min. Po tym czasie próbki podgrzewano do $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 3 min.

Schłodzone próby nanoszono na kolumnę przy pomocy autosemplera. Podczas rozdziału fazę ruchomą stanowiła mieszanina o składzie: 0,01 M kwas heptanosulfonowy, 0,5% trietyloamina, 22% acetonitryl, woda. Całość fazy była doprowadzana do pH 3,2 za pomocą kwasu fosforowego. Elucję, przy prędkości 1,2 ml/min prowadzono izokratycznie do 8 min. Pomiarów ilości fluorescencyjnego produktu dokonywano przy długościach fal detektora $\lambda_{\text{ex}} = 366 \text{ nm}$, oraz emisji $\lambda_{\text{em}} = 418 \text{ nm}$. Pik MNA przypadał na około 3 minutę rozdziału.



Rysunek 5. Przebieg upochadniania MNA oraz wzór strukturalny fluorescencyjnej pochodnej powstałej w reakcji z acetofenonem.

Każdą serię pomiarów zawartości MNA poprzedzało wyznaczenie krzywej standardowej dla wzorców w zakresie stężeń od 0,05 do 5 $\mu\text{g/ml}$. Standardy poddawano dokładnie tym samym procedurom co próbki biologiczne. Na podstawie otrzymanej krzywej wyznaczano stężenie MNA w badanych próbach.

3.1.5. Doświadczenia behawioralne

4.1.5.1. Ocena podawania MNA do SNpc – test z podaniem apomorfiny

Dorośle szczury, samce 5 dni po iniekcji do SNpc MNA i MPP+ w stężeniach jak w paragrafie 3.1.2.1. poddano testowi z podaniem Apomorfiny (Sigma), niespecyficznego agonisty receptorów D2. Zwierzęta otrzymywały w iniekcji *i.p.* apomorfinę w dawce 1 mg/kg. Następnie zwierzęta umieszczano w ciemnej arenie. Po około 5 minutach

obserwowano pierwsze spontaniczne obroty (*ang. circling*). Obserwacje prowadzono przez 1 godzinę, po której rotacje samoczynnie zanikały. Aktywność zwierząt nagrywano i analizowano przy wykorzystaniu programu EthoVision (Noldus). Zliczano pełne (360°) obroty wykonane przez zwierzęta ipsilateralnie i kontrlateralnie do miejsca podania badanych związków.

3.2. Badania *in vitro*

3.2.1. Hodowla pierwotnych neuronów mózdzku szczura

Model doświadczeń *in vitro* stanowiły hodowle komórek ziarnistych mózdzku szczura (CGC) preparowane z 7-dniowych szczurów szczepu *Wistar* obu płci, o masie 12-18 g, wg. metody pisanej przez Schousboe i wsp. (1985). Zdezynfekowane alkoholem zwierzęta (16 sztuk) dekapitowano, a następnie izolowano z nich mózdzki, które rozdrabniano na siekaczu (McIlwain) na skrawki o wymiarach 400 x 400 μm . Tak rozdrobnioną tkankę umieszczano w buforze HIB (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM HEPES, 9,1 mM glukoza) z dodatkiem 0,025% trypsyny (Sigma) i 0,05% DNAzy (Roche) i wytrząsano w łaźni wodnej, w temperaturze 37°C przez 15 min. Następnie po dodaniu roztworu zawierającego inhibitor trypsyny, zawiesinę komórek wirowano, a osad zawieszano w ciepłym medium wzrostowym BME (Basal Medium Eagle, Invitrogen) z dodatkiem soli Earla (Sigma) uzupełnionym 10% cielecą surowicą płodową (Sigma), 25 mM KCl i 0,5 % (v/v) roztworem penicyliny/streptomycyny (Sigma) i rozdrabniano za pomocą strzykawki z grubą igłą. Całość powtórnie wirowano i rozdrabniano aż do uzyskania zawiesiny pojedynczych komórek. Przed wysianiem na płytki komórki zabarwione 2% roztworem błękitu trypanu liczone w komorze Bürkera. Gęstość wysiewanych komórek wynosiła 4-5 mln (w zależności od eksperymentu) na dołek 6-dołkowej płytki lub 1 mln na dołek 24 dołkowej płytki. Trzydzieści sześć godz. po założeniu hodowli, dodawano do komórek 7,5 μM Ara C (arabinozyd cytozyny) aby zapobiec mnożeniu się komórek glejowych i fibroblastów. Hodowlę prowadzono w inkubatorze w standardowych warunkach przy 37° C i 5% zawartości CO₂ w powietrzu o 95% wilgotności.

3.2.2. Hodowla komórek śródbłonna naczyń mózgu szczura

Komórki linii RBE-4 wysiewano na płytki 6-dołkowe i hodowano w pożywce α MEM/Ham's F10 z Glutamaxem (Invitrogen, Gibco), zawierającej 10% inaktywowanej

surowicy bydlęcej, zasadowy czynnik wzrostu fibroblastow, bFGF (Sigma) (ang. *basic fibroblast growth factor*) i genetycyne. Hodowle między pasażem 13 - 25 były używano do dalszych badań.

3.2.3. Modele neurotoksyczności i ocena przeżywalności komórek

W modelu ostrej ekcytotoksyczności indukowanej glutaminianem lub NMDA, neurotoksyny w stężeniu 0,5 mM dodawano do buforu LOCKE 25 zawierającego: 134 mM NaCl, 25 mM KCl, 4 mM NaHCO₃, 5 mM HEPES, 2,3 mM CaCl₂, 5 mM D-glukozę i 5 μM glicynę, w którym inkubowano neurony po usunięciu środowiska wzrostowego. Komórki poddawano działaniu ekcytotoksyn przez 30 min. w standardowych warunkach, po czym przywracano medium wzrostowe. Po 24 godz. komórki utrwalano 80% zimnym metanolem i barwiono jodkiem propidyny (5 μg/ml). Przeżywalność hodowli określano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego ZEISS AXIOVERT 25, licząc żywe w momencie utrwalania neurony. Wyniki wyrażano jako % żywych neuronów w stosunku do całkowitej liczby neuronów w polu widzenia.

3.2.4. Metody z wykorzystaniem znaczników fluorescencyjnych

3.2.4.1. Pomiar zmian stężenia Ca wewnątrz komórek za pomocą sondy Calcium OrangeTM

Siódmego dnia hodowli neurony ziarniste inkubowano przez 30 min. w warunkach standardowych z barwnikiem fluorescencyjnym Calcium OrangeTM (Invitrogen, Molecular Probes Inc.) o stężeniu 10 μM w medium zawierającym: 154 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 2,3 mM CaCl₂, 5,6 mM glukozę oraz 8,6 mM bufor HEPES, pH 7,4. Następnie nadmiar barwnika usuwano przez trzykrotnie płukanie powyższym medium i hodowle pozostawiono w nim do dalszych pomiarów. Zmiany fluorescencji Calcium Orange, odpowiadające zmianom w stężeniu wewnątrzkomórkowego wapnia [Ca²⁺]_i rejestrowano za pomocą mikroskopu konfokalnego ZEISS LSM 510 przy długościach fal wzbudzenia i emisji odpowiednio 485 i 538 nm. Po trwającej 90 sekund wyjściowej obserwacji intensywności fluorescencji, zmiany rejestrowano przez 30 min. co 30 sek. Komórki pobudzano przez podanie 0,5 mM glutaminianu. Dane zbierano z 10 losowo wybranych pól pomiarowych, a wynik przedstawiono w postaci procentowych zmian intensywności fluorescencji Calcium OrangeTM, odpowiadających wzrostowi stężenia

wewnątrzkomórkowego wapnia w neuronach po podaniu badanych związków, w porównaniu do fluorescencji sondy w tych samych komórkach przed zadziałaniem bodźca.

3.2.4.2. Oznaczenie produkcji rodników tlenowych przy użyciu 2,7-dichlorofluoresceiny

Komórki w ilości 1 mln na dołek 24 dołkowej płytki po 7 dniach hodowli in vitro inkubowano w warunkach standardowych w obecności 100 μ M DCFH-DA (6-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate, Invitrogen, Molecular Probes Inc., USA), (Wang i wsp.1999). Po 30 min. nadmiar barwnika fluorescencyjnego odplukano dwukrotnie buforem LOCKE 25 i komórki pozostawiono w nim do dalszego eksperymentu. Następnie do hodowli podawano MNA, NAM i 0,5 mM glutaminian i po 30 min. Mierzono poziom fluorescencji komórek co 1 min. przez 2 godz. przy użyciu czytnika fluorescencyjnego Fluorocan Ascent FL (Thermo Labsystems, Finlandia). Do pomiaru zastosowano filtry: dla światła wzbudzającego λ_{ex} - 485 nm i dla światła emitowanego λ_{em} - 538 nm.

3.2.4.3. Oznaczanie zmian potencjału błony mitochondrialnej z użyciem rodamin 123 (Rh 123)

Komórki ziarniste mózdzku (1 milion na dołek) 7 dnia hodowli inkubowano w buforze o składzie jw. w obecności 10 μ M Rh123 (Invitrogen, Molecular Probes Inc.) w temp. 37 °C przez 30 minut. Po tym czasie sondę odplukiwano a do hodowli podawano określone stężenia MNA oraz NAM. Następnie badano poziom fluorescencji w czasie (co 1 min.) za pomocą czytnika Fluorocan Ascent FL (Thermo Labsystems, Finlandia) z użyciem filtrów dla światła wzbudzającego λ_{ex} 490 nm i emitowanego λ_{em} 538 nm.

3.2.5. Metody radiochemiczne

3.2.5.1. Pobieranie znakowanego ^{14}C 1-metylnikotynamidu i nikotynamidu przez neurony ziarniste mózdzku i komórki linii RBE4

Dla oznaczenia pobierania MNA (Uniwersytet Medyczny, Łódź) oraz NAM (Perkin Elmer) użyto izotopów ^{14}C obu związków o aktywności 1 μ Ci na dołek zawierający określoną liczbę komórek. Inkubacje prowadzono w buforze Krebsa o składzie (mM): NaCl 112,0, KCl 5,0, CaCl₂ 2,5, KH₂PO₄ 1,0, MgSO₄ 1,2, NaHCO₃ 12,0 i glukoza 11,1. inkubację prowadzono przez 15, 30 i 60 minut, po czym usuwano medium zawierające izotop, a reakcje zatrzymywano za pomocą buforu PBS poprzez trzykrotne płukanie. Następnie komórki rozpuszczano przy użyciu 300 μ l 0,1 % Tritonu X-100 w 5 mM TRIS-HCl, pH 7,4.

Lizat komórkowy mieszano z płynem Bray'a, a radioaktywność mierzono za pomocą licznika scyntylicyjnego Wallac 1409.

3.2.5.2. Nagromadzenie ^{45}Ca w neuronach

Pobieranie wapnia radioaktywnego przez komórki ziarniste mózdzku oznaczano w hodowlach prowadzonych przez siedem dni. Po usunięciu środowiska wzrostowego neurony (5 mln/dotek 6-ciodotkowej płytki) preinkubowano przez 10 min. w 37°C w środowisku zawierającym: 154 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 3,6 mM NaHCO_3 , 1,3 mM CaCl_2 , 5,6 mM glukozę, 10 mM HEPES pH 7,35. Następnie dodawano 5 μM glicynę i inhibitory, a po kolejnych 5 min. preinkubacji, $^{45}\text{CaCl}_2$ (1 μCi /dotek) razem z ekscytotoksynami i inkubowano komórki przez 10 min. Radioaktywne środowisko usuwano, a komórki trzykrotnie przemywano zimnym medium bez glukozy i CaCl_2 , zawierającym 2 mM EGTA. Następnie dodawano zimny 0,5 M NaOH do każdego dołka i pozostawiono w temperaturze 4°C przez 30 min. Ekstrakt komórkowy łączono z mieszaniną scyntylicyjną Bray'a, a radioaktywność mierzono za pomocą licznika scyntylicyjnego Wallac 1409.

3.2.5.3. Wiązanie znakowanego [^3H]MK-801 do frakcji błon kory mózgu szczura

Błony preparowano wg procedury Wang i wsp. (1999) a następnie inkubowano z [^3H]MK-801 oraz z różnymi stężeniami NAM i MNA w buforze o składzie: 5 mM HEPES z 5 mM TRISem pH 7,4. Inkubacje kończono przez filtrację z użyciem filtrów Whatman GF/B filters / Brandel MPR-24. Poziom radioaktywności zebranych frakcji mierzono w liczniku scyntylicyjnym. Niespecyficzne wiązania [^3H]MK-801 ocenione w obecności 10 μM nieznakowanego MK-801.

3.2.5.4. Wiązanie znakowanego [^3H]diazepamu do frakcji błon kory mózgu szczura

Doświadczenie przeprowadzono na błonach uzyskanych wg preparatyki jw. wg procedury Fujimoto i wsp. (1982) z modyfikacjami. Błony inkubowano z 5 nM [^3H]diazepamem (Amersham) oraz z różnymi stężeniami MNA w temperaturze 37°C przez 1 godzinę. Inkubacje kończono przez filtrację z użyciem filtrów Whatman GF/B filters / Brandel MPR-24. Następnie mierzono poziom radioaktywności zebranych frakcji w liczniku scyntylicyjnym. Niespecyficzne wiązania [^3H]diazepamu oceniono w obecności nieznakowanego (zimnego) diazepam w stężeniu 3 μM .

3.3.6. Analiza ekspresji genu N- metyltransferazy nikotynamidowej

3.3.6.1. Izolacja RNA

Całkowite RNA izolowano z mózgow oraz wątroby dorosłych szczurów szczepu *Wistar* oraz 7 dniowych osesków szczurzych w warunkach sterylnych, zmodyfikowaną metodą Chomczyńskiego i Sacchi (1987), używając odczynnika TRI-reagent[®] Kit (Ambion). Pobrane struktury mózgowe tj.: korę, hipokamp, mózdzek oraz wątrobę płukano dwukrotnie buforem PBS, a następnie homogenizowano w 1 ml odczynnika TRI-reagent. Fragmenty tkanki, które nie uległy lizie odwirowywano przy obrotach 12000 x g przez 10 min w 4 °C. Następnie, do 1 ml homogenatu dodawano 100 µl chloroformu, energicznie mieszano przez 15 sek., pozostawiano na 15 min w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano przy 12000 x g przez 15 min w 4 °C. Górną fazę wodną zawierającą RNA przenoszono do nowej probówki, dodawano 0,5 ml zimnego izopropanolu, delikatnie mieszano, pozostawiano na 5 min w temperaturze pokojowej i wirowano przez 10 min przy obrotach 12000 x g w 4 °C. Po 5 min wirowano przy obrotach 12000 x g przez 15 min w 4 °C. Osad przemywano 1 ml 75% etanolem. Po kilkuminutowym odparowaniu etanolu z próbek, osad RNA zawieszano w 20 µl wody wolnej od RNAz (Promega Corporation). Stężenie oraz czystość RNA mierzono w spektrofotometrze Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech) i oznaczano na podstawie gęstości optycznej (OD) przy długości fali 260 nm, wg zasady: OD 1 = 40 µg/ml RNA. Czystość RNA szacowano na podstawie stosunku wartości odczytów OD 260/280 nm. Do badań używano RNA o stosunku OD 260/280 nm wyższym od 1,6.

3.3.6.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Całkowite wyizolowane RNA (2 µg) użyto jako matrycę dla reakcji odwrotnej transkrypcji, w której otrzymano DNA komplementarne do mRNA (cDNA). Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano przy użyciu zestawu odczynników firmy Applied Biosystem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, w końcowej objętości 20 µl. Reakcja przebiegała trójetapowo:

1. W temperaturze 25 °C - 10 min
2. W temperaturze 37 °C - 120 min

3. Podgrzanie do temperatury 85 °C w celu inaktywacji odwrotnej transkryptazy przez 5 sekund a następnie schładzano do 4°C.

3.3.6.3. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Uzyskane cDNA powielano metodą PCR używając starterów wykonanych w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, według sekwencji uzyskanej przy użyciu programu z platformy NCBI - Primer3. Jednocześnie, jako wewnętrzną kontrolę zastosowano określenie poziomu ekspresji genu kodującego konstytutywne białko, GAPDH. Do powielenia specyficznego cDNA badanych dla sekwencji badanych genów użyto następujących starterów:

- NNMT (N-metyltransferaza nikotynamidowa)

5' TCCTCAGACATCTGCTGAAA3'

3' CACACACTAGAACTTCCGTT5'

- GAPDH

5' ACCACAGTCCATGCCATCAC3'

3' ATGTCGTTGTCCCACCACCT5'

Reakcję łańcuchową polimerazy przeprowadzano przy użyciu zestawu odczynników firmy Qiagen wg zaleceń producenta. Próbkę były inkubowane w aparacie GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) w warunkach podanych w Tabeli 1.

Produkty PCR (10 µl) poddawano elektroforezie w 2% żelu agarozowym z bromkiem etydyny w buforze TAE (45 mM Tris-octan, 0,1 mM EDTA) przy napięciu 70 V. Żel fotografowano w świetle UV, obraz analizowano densytometrycznie przy użyciu programu TotalLab v1.11 (Non Linear Dynamics), ilość produktu przeliczano na ilość genu kodującego GAPDH. Specyficzność reakcji weryfikowano na podstawie wielkości otrzymanego produktu. Dla NNMT i GAPDH wielkość produktu wynosiła odpowiednio 250 bp i 452 bp.

Etapy	NNMT	GAPDH
Wstępna denaturacja	94 °C 20 sekund	94 °C 20 sekund

Ilość cykli		30	30
Przebieg jednego cyklu	denaturacja	95 °C 20 sekund	95 °C 20 sekund
	przyłączanie starterów	55 °C 30 sekund	55 °C 30 sekund
	Wydłużanie	72 °C 60 sekund	72 °C 60 sekund
Końcowe wydłużanie		72 °C 10 sekund	72 °C 10 sekund
schładzanie		4°C	4°C

Tab. 1. Warunki reakcji PCR dla poszczególnych starterów.

3.4. Inne procedury

3.3.1. Oznaczanie stężenia białka metodą Lowry

Oznaczenie polega na pomiarze absorbancji barwnego kompleksu przy długości fali 750 nm. Mieszanina reakcyjna w końcowej objętości 460 µl zawierała: 2 µl białka, 8 µl wody, 50 µl odczynnika A (BIO-RAD, nr kat. 500-0113) i 400 µl odczynnika B (BIO-RAD, nr kat. 500-0114). Wartość absorbancji mierzono po 15 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej wobec próby ślepej (nie zawierającej białka). Standardem był roztwór albuminy bydlecej o stężeniu 10 µg/µl lub 15 µg/ml. Stężenie białka obliczano według następującego wzoru:

Białko całkowite (µg/µl) = absorbancja próbki x stężenie standardu /absorbancję standardu / 2 (objętość białka w próbce)

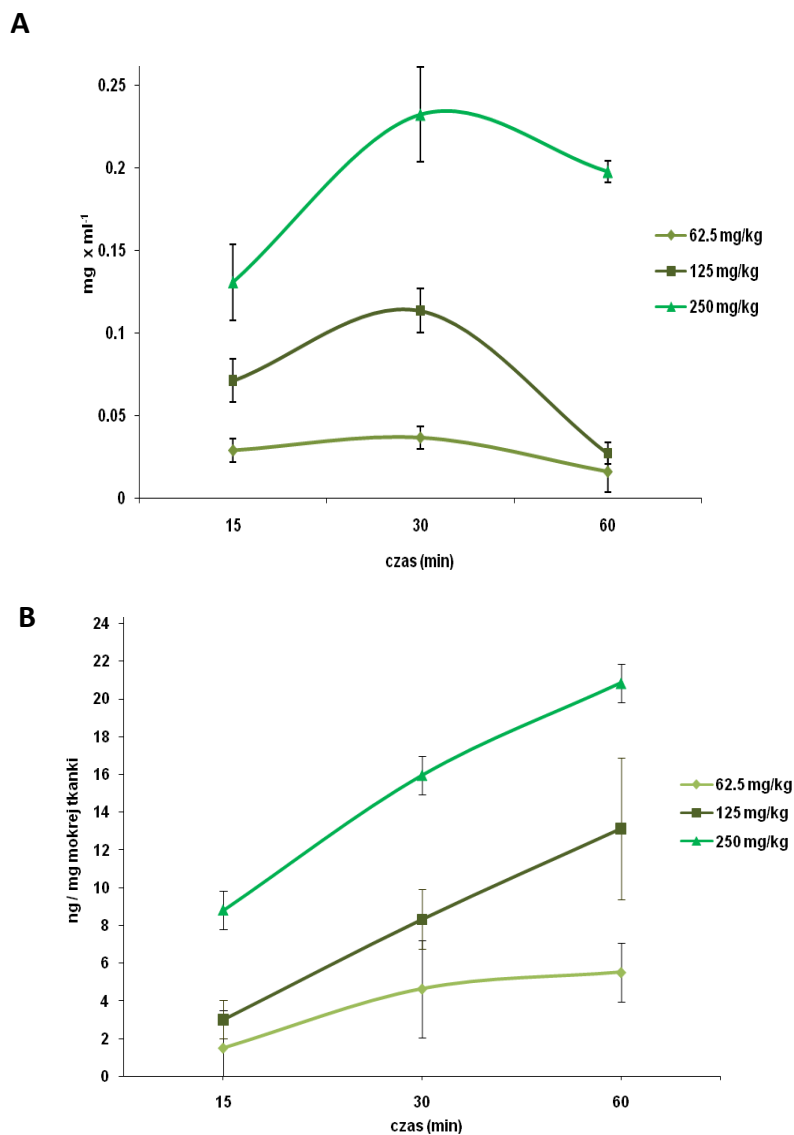
3.3.2. Analiza statystyczna

Otrzymane wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej z poszczególnych danych eksperymentalnych, ± odchylenie standardowe (SD). Ilość powtórzeń zaznaczono w opisie rycin. Różnice między średnimi obliczono za pomocą analizy wariancji ANOVA (post hoc test Dunnetta, Tuckey'a lub Bonferroniego). Do wszystkich obliczeń stosowano program GraphPad Prism 2.01.

IV. Wyniki

4.1. Badanie biodostępności 1-metylnikotynamidu: zmiany poziomu w surowicy i mózgu po podaniu dootrzewnowym

Zbadano przenikanie 1-metylnikotynamidu (MNA), podanego w różnych dawkach dootrzewnowo (*i.p.*), do surowicy krwi oraz mózgu 7-dniowych osesków szczurzych, stanowiących w niniejszej pracy model doświadczalny *in vivo*.



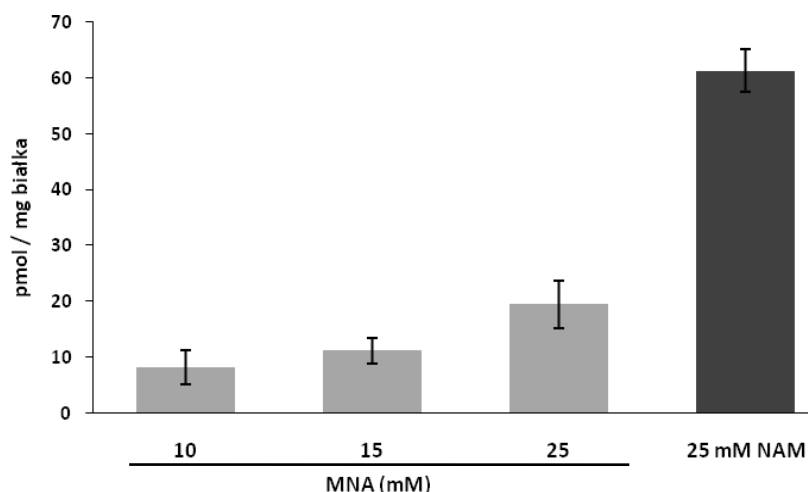
Ryc.1. Poziom MNA w surowicy (A) i mózgu (B) 7-dniowych osesków szczurzych po *i.p.* podaniu związku, w zależności od czasu i dawki, oznaczony metodą HPLC. Wykres przedstawia wartości średnie \pm SD (n=6) z trzech niezależnych doświadczeń.

Zgodnie z wynikami zamieszczonymi na Ryc. 1A w surowicy krwi wykazano oznaczalne stężenia MNA, osiągające najwyższy poziom w 30 minucie po podaniu. Stężenie MNA w surowicy było zależne od zastosowanej dawki i osiągało najwyższą wartość (0,225 mg x

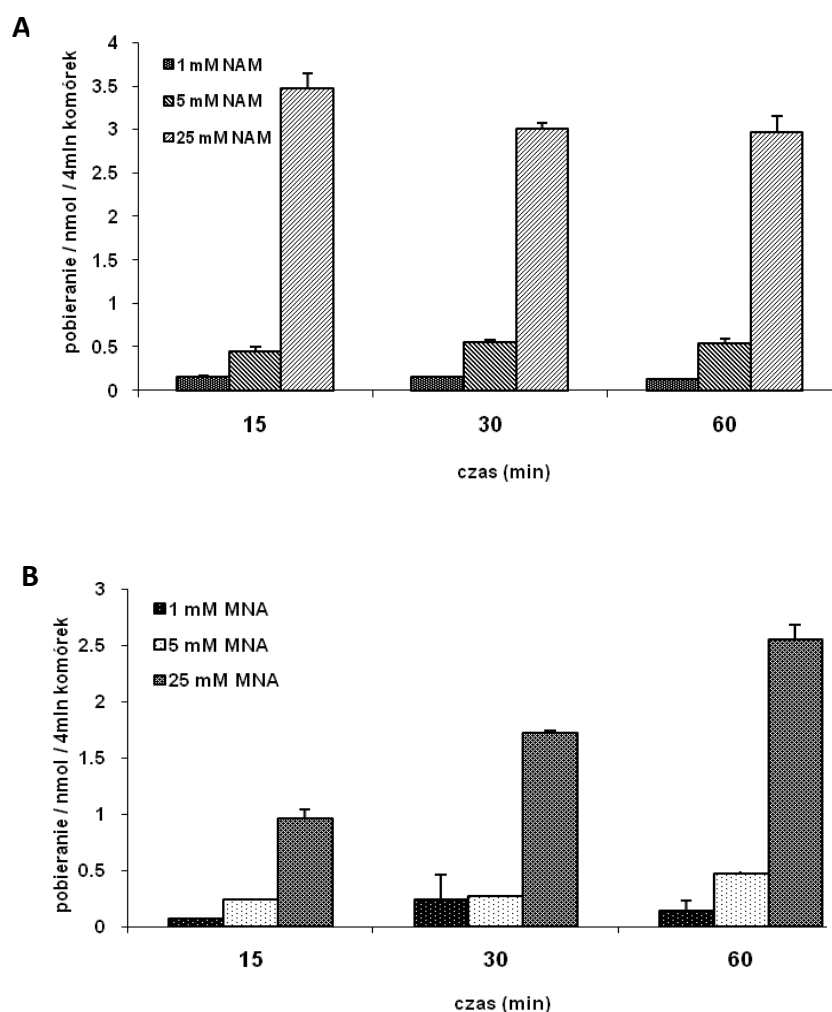
ml⁻¹) przy dawce 250 mg/kg. Późniejszy spadek poziomu MNA można przypisać przemieszczania tego związku do tkanek. W mózgu po 30 minutach zaobserwowano postępujący wzrost poziomu MNA w czasie i zależnie od dawki, przy jednoczesnym spadku poziomu tego związku w surowicy (Ryc. 1B).

4.2. Ocena transportu 1-metylnikotynamidu do komórek śródbłonna linii RBE4 oraz neuronów ziarnistych mózdku

Jak przedstawiono na Ryc. 1A i B MNA podany obwodowo przenika do mózgu, a jego poziom zależy od czasu i dawki. Następnym etapem badań była ocena efektywności transportu MNA do dwóch typów komórek mózgu tj.: śródbłonna i neuronów. Ponieważ nie znaleziono w literaturze informacji dotyczących pobierania związku prekursorowego MNA - nikotynamidu (NAM), postanowiono przeprowadzić oznaczenie jego pobierania równoległe z MNA. W tym celu zbadano pobieranie znakowanych ¹⁴C NAM i MNA, w czasie. Przedmiotem badań były komórki linii RBE4 wyprowadzonej z endotelium mózgu szczura, oraz neurony ziarniste mózdku. Ponieważ nie stwierdzono znaczącego pobierania MNA przez komórki śródbłonna w 15 i 30 minucie od podania na Ryc. 2 przedstawiono wartości z punktu czasowego 60 min.



Ryc. 2. Pobieranie [¹⁴C]NAM oraz [¹⁴C]MNA przez komórki śródbłonna linii RBE4 w czasie 60 minutowej inkubacji. Wykres przedstawia wartości średnie ± SD (n=6) z dwóch niezależnych doświadczeń.

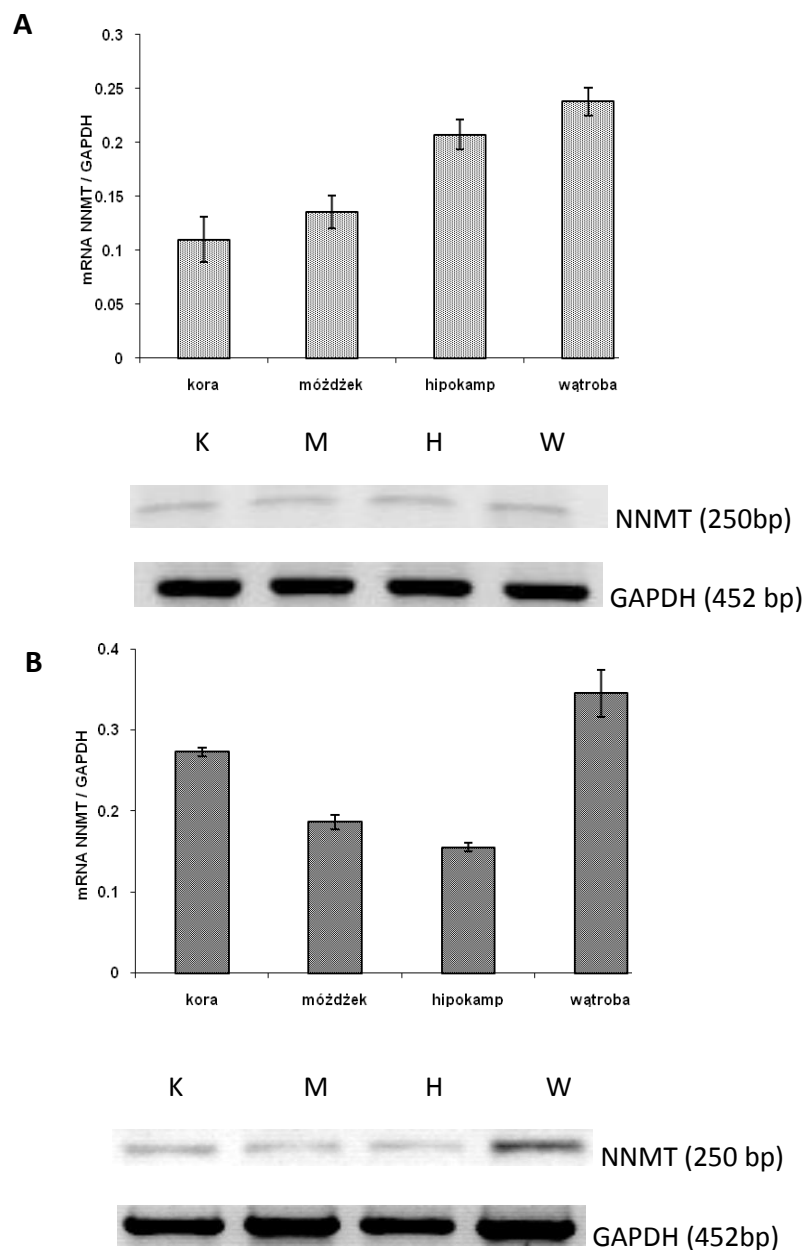


Ryc. 3. Pobieranie [^{14}C] NAM (A) oraz [^{14}C] MNA (B) przez neurony ziarniste mózdzku w zależności od dawki i czasu inkubacji. Wykres przedstawia wartości średnie \pm SD ($n=6$) z trzech niezależnych doświadczeń.

Zgodnie z Ryc. 2 i 3, zarówno komórki neuronów ziarnistych mózdzku jak i komórki linii RBE4 pobierały znakowany NAM i MNA. NAM wykazywał szybsze tempo przenikania do neuronów, osiągając plateau już po 15 minutach inkubacji (Ryc. 3A). W przypadku MNA nagromadzenie związku było zależne (podobnie jak badaniach *in vivo*) od czasu i dawki, i osiągało najwyższe wartości przy 25 mM stężeniu w 60 minucie doświadczenia. Komórki linii RBE4 pobierały MNA znacznie słabiej, osiągając statystycznie znamienne wartości w granicach 1-20 pmol/mg białka w 60 minucie inkubacji (Ryc. 2).

4.3. Ocena poziomu mRNA dla 1- metyltransferazy nikotynamidowej (NNMT)

Nikotynamid jest związkiem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania mózgu. Ponieważ w tej pracy wykazano pobieranie NAM, prekursora MNA, w hodowli neuronów ziarnistych mózdzku, postanowiono sprawdzić możliwość powstawania MNA *de novo* w mózgu.



Ryc. 4. Poziom ekspresji mRNA dla genu 1-metyltransferazy nikotynamidowej (NNMT) w strukturach mózgu 7-dniowego oseska (A) i szczura dorosłego (3 miesięcznego) (B). Wykresy przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej normalizowane względem GAPDH i stanowią średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń \pm SD. Poniżej wykresów zamieszczono typowy obraz rozdziału elektroforetycznego produktów PCR homologicznego do mRNA NNMT z kory mózgowej (K), mózdzku (M), hipokampa (H) i wątroby (W) oseska i dorosłego szczura.

W tym celu zbadano obecność mRNA dla 1- metyltransferazy nikotynamidowej (enzymu odpowiedzialnego za metylacje NAM do MNA) w strukturach mózgu szczura, z uwzględnieniem zmian w czasie rozwoju zwierząt. Jako kontrolę ekspresji dla NNMT przyjęto mRNA wyizolowane z wątroby (w organizmie szczura występuje jedna izoforma NNMT), co wynikało z danych literaturowych opisujących wysoki konstytutywny poziom NNMT w tym narządzie. Analiza z wykorzystaniem metody rtPCR wykazała zróżnicowany poziom ekspresji genu NNMT w mózgach szczurów dorosłych oraz 7 dniowych osesków szczurzych. Jak można zauważyć na Ryc. 3A i 3B poziom mRNA dla NNMT różni się między poszczególnymi strukturami mózgu tj. korą, mózdzkiem, hipokampem. Występują również różnice w ekspresji tego genu między zwierzętami dorosłymi a oseskami. Te wyniki potwierdzają możliwość syntezy MNA w różnych rejonach mózgu u zwierząt dorosłych, jak i w rozwoju.

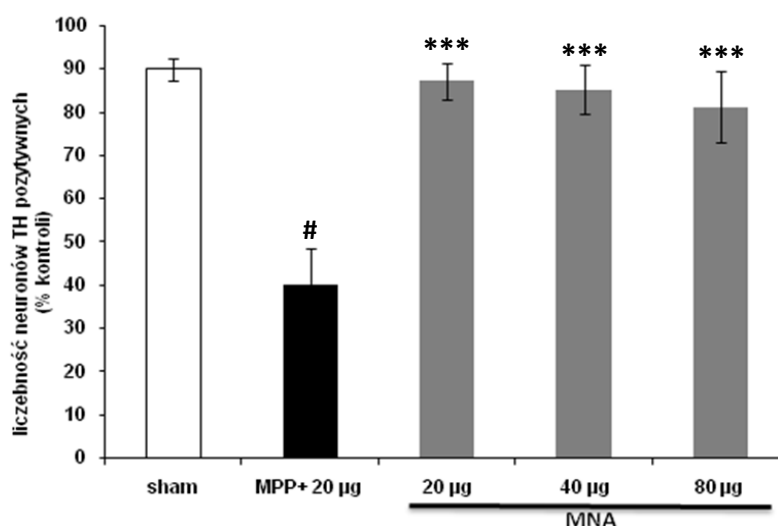
4.4. Badanie toksyczności 1-metylnikotynamidu

4.4.1. Ocena toksycznego oddziaływania MNA na neurony dopaminergiczne w rejonie części zbitej istoty czarnej u dorosłych szczurów – porównanie z toksycznością MPP+

Dane literaturowe, przypisujące MNA toksyczne działanie na neurony dopaminergiczne skłoniły mnie do podjęcia tej kwestii w niniejszej rozprawie. W tym celu dorosłym szczurom podawano jednostronnie, bezpośrednio do części zbitej istoty czarnej (SNpc) wzrastające dawki MNA. Dla określenia uszkodzeń oceniano ubytek neuronów TH-pozytywnych w badanym rejonie w porównaniu do kontroli, którą stanowiła kontrlateralna istota czarna, w grupach: sham (zwierzęta po iniekcji rozpuszczalnika - soli fizjologicznej) oraz u zwierząt poddanych iniekcji MNA lub MPP+. Związek MPP+ wybrano, jako kontrolę pozytywną, ponieważ stanowi modelową toksynę dla neuronów dopaminergicznych szeroko stosowaną w badaniach *in vivo* i *in vitro* do indukcji objawów modelujących chorobę Parkinsona. Wiadomo z literatury, że bezpośrednia aplikacja MPP+ do istoty czarnej lub prądkowia prowadzi do uszkodzenia neuronów dopaminergicznych (Sayre i wsp., 1986; Sirinathsinghji i wsp., 1988; Sindhu i wsp., 2006). Ponadto, proponowany w literaturze, potencjalny mechanizm uszkadzającego działania MNA angażuje analogiczne szlaki jak MPP+. Zgodnie z danymi literaturowymi oraz doświadczeniami własnymi, do eksperymentów wybrano MPP+ w dawce 20 µg na iniekcję. Zastosowane stężenia MNA wybrano arbitralnie, podając wielokrotnione dawki MPP+.

Stopień uszkodzenia wyrażono jako % spadku liczebności neuronów TH-pozytywnych względem kontrolnej, kontrlateralnej istoty czarnej. W tak zaprojektowanym doświadczeniu spodziewano się uchwycić przejawy toksyczności MNA.

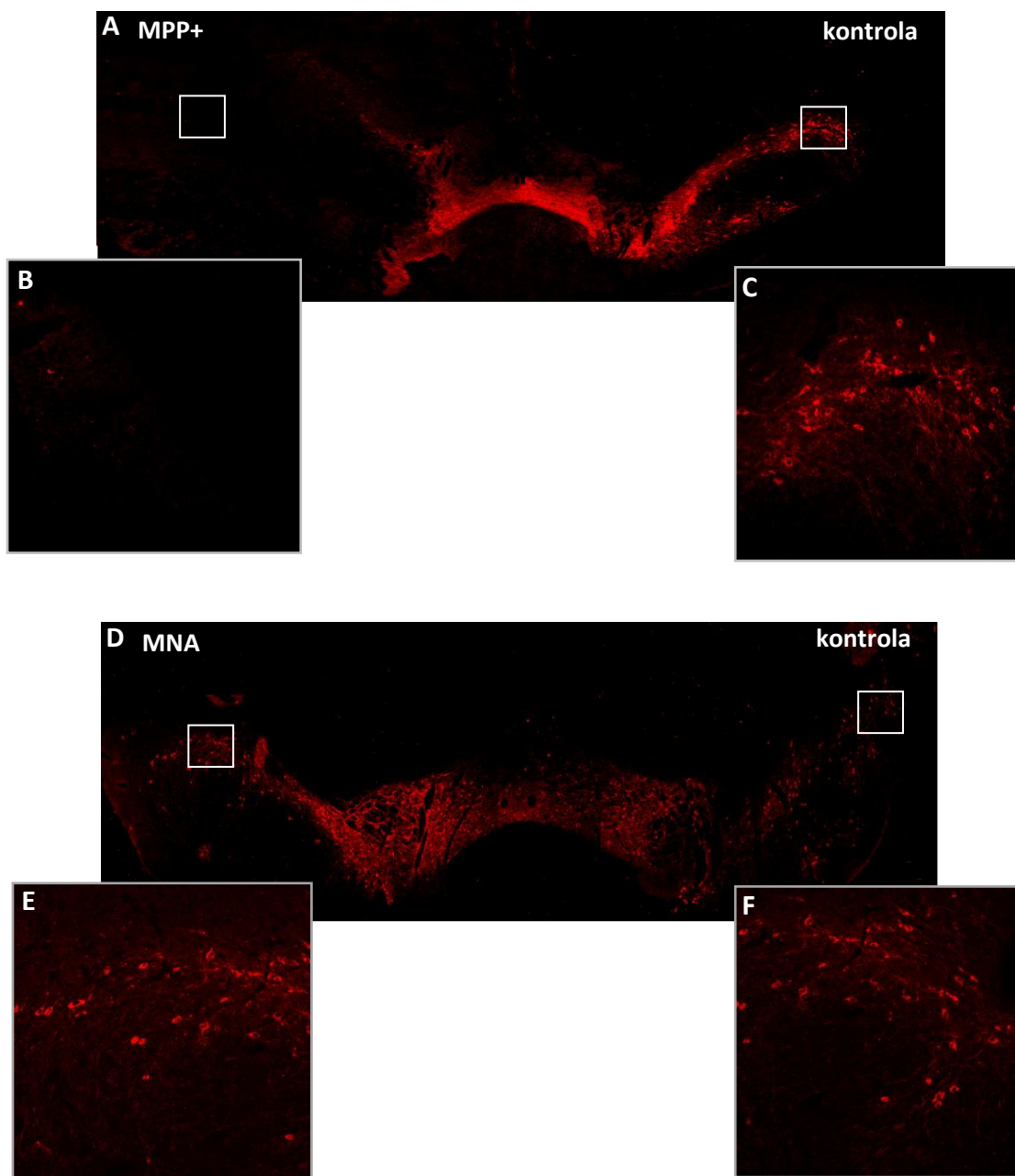
Na podstawie poziomu immunoreaktywności hydroksylazy tyrozynowej (TH) - kluczowego enzymu w syntezie dopaminy w ciele neuronu oraz w zakończeniach nerwowych wykazano, zgodny z literaturą, ubytek neuronów dopaminergicznych wywołany przez MPP+ (Ryc. 5A). W przeprowadzonych doświadczeniach podanie MPP+ bezpośrednio do SNpc powodowało spadek liczby neuronów dopaminergicznych w tym rejonie o ponad 50 % w stosunku do strony kontrlateralnej (Ryc. 5). Nie stwierdzono podobnego toksycznego efektu w przypadku



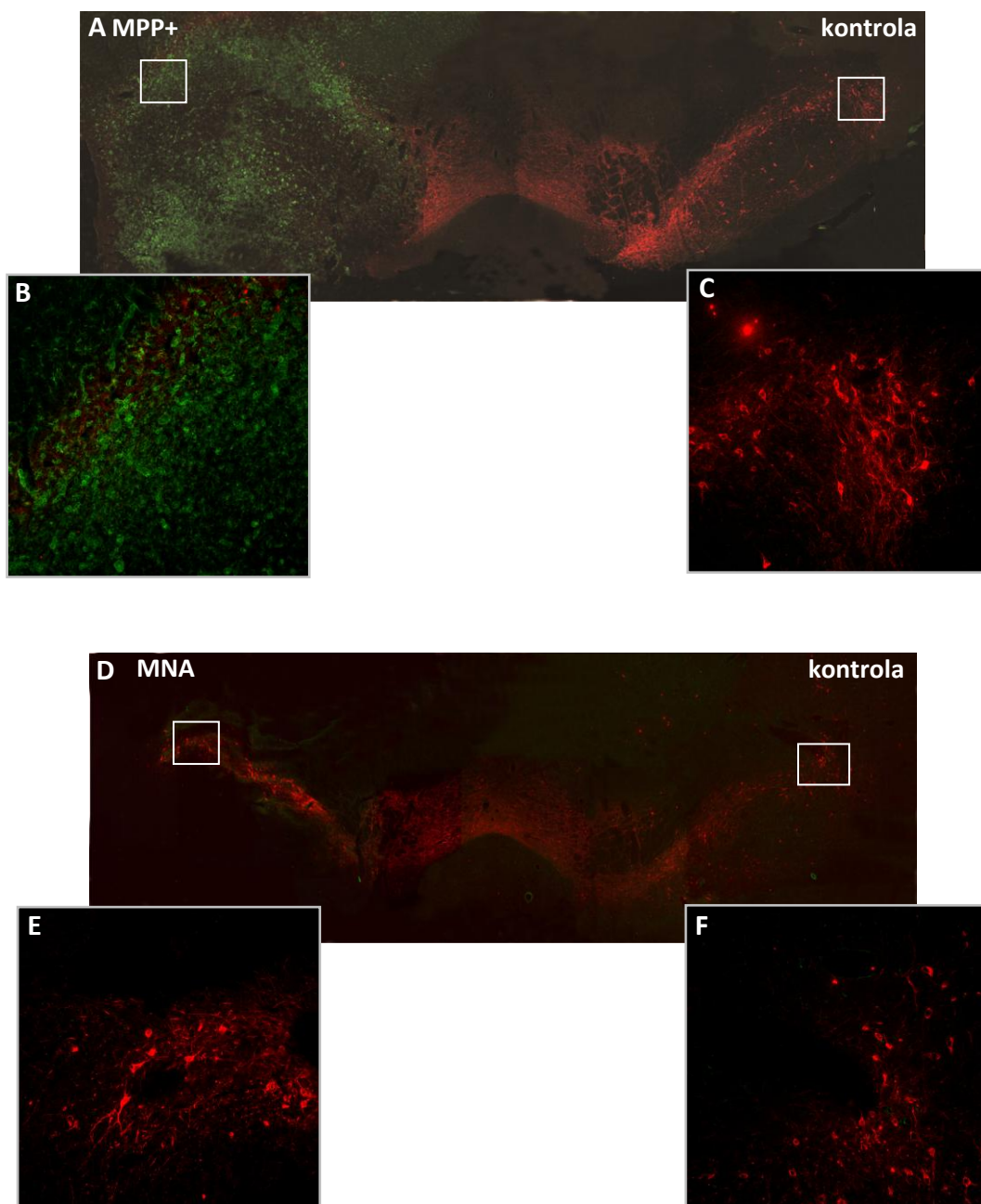
Ryc. 5. Ocena uszkodzenia neuronów rejonu istoty czarnej w 5 dniu po jednostronnym podaniu 20 µg MPP+ lub 20, 40 i 80 µg MNA. Wykres przedstawia wartości średnie \pm SD *** $p < 0,001$ znacząco różne w porównaniu do wartości grupy MPP+, # $p < 0,001$ znaczące różne w porównaniu do wartości grupy sham. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-hoc Bonferroniego.

MNA, który nie powodował znamiennego statystycznie obniżenia liczebności neuronów. Po podaniu MNA w dawce 80 µg obserwowano tendencje do ubytku liczby neuronów. Ponadto nieznaczne obniżenie liczby komórek TH-pozytywnych w porównaniu do zwierząt naiwnych wywołane było samą iniekcją, o czym świadczy procent utraty neuronów po podaniu MNA na poziomie półkuli ipsilateralnej grupy sham. Na Ryc. 6 przedstawiono typowy obraz barwienia istoty czarnej na obecność hydroksylazy tyrozynowej po podaniu MPP+ oraz MNA.

Spadkowi liczebności neuronów dopaminergicznych wywołanym przez MPP+ towarzyszył napływ oraz aktywacja komórek mikrogleju po stronie ipsilateralnej. Stan zapalny związany z aktywacją mikrogleju jest uważany za jeden z najważniejszych czynników neurodegeneracji układu dopaminergicznego, zarówno w warunkach doświadczalnych, jak i u pacjentów z chorobą Parkinsona (Teismann i wsp., 2003). Dlatego następnym krokiem było zbadanie, z wykorzystaniem barwienia komórek zapalnych specyficzną lektyną, wpływu na aktywację mikrogleju jednostronnego wstrzyknięcia MNA do części zbitej istoty czarnej mózgu szczura, w porównaniu do MPP+. Zgodnie z założeniem MPP+ wywołał masowy napływ komórek mikrogleju po stronie ipsilateralnej istoty czarnej (Ryc. 7A, B, C). Natomiast iniekcje MNA w dawce 20, 40 i 80 µg nie miały wpływu na poziom immunoreaktywności lektyny specyficznej dla mikrogleju (Ryc. 7D, E, F). Same podanie rozpuszczalnika również nie powodowało napływu komórek zapalnych (dane nie pokazane).



Ryc. 6. Wpływ iniekcji MPP+ (A) oraz MNA (D) na poziom immunoreaktywności hydroksylazy tyrozynowej (TH) w neuronach w rejonie istoty czarnej mózgu szczura 5 dni po podaniu. W grupie MPP+ obserwowano dramatyczny zanik neuronów dopaminergicznych w obrębie części zbitej istoty czarnej. Ponieważ MNA nie powodował utraty komórek TH-pozytywnych w żadnej ze stosowanych dawek (20, 40 i 80 μ g) na Ryc. przedstawiono tylko obraz po podaniu największej dawki (80 μ g). Zdjęcia A i D przedstawiają obraz istoty czarnej powiększony 100 razy. Zdjęcia B i C, E i F przedstawiają powiększone, zaznaczone fragmenty istoty czarnej.

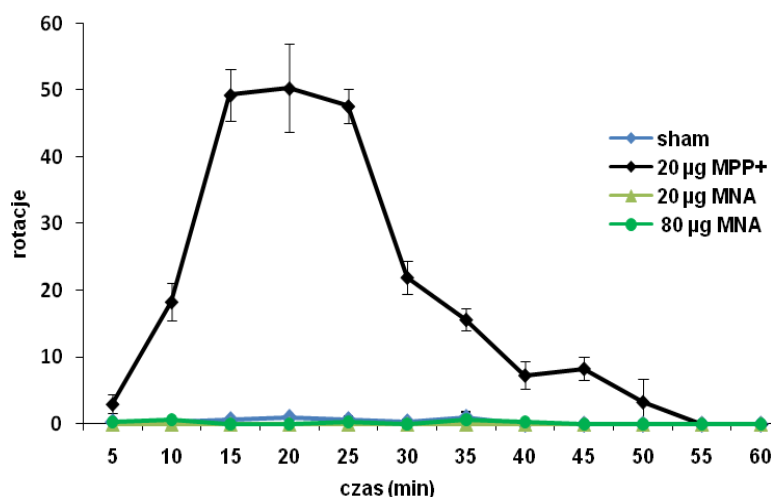


Ryc. 7. Wpływ iniekcji MPP+ (A) oraz MNA (D) na poziom immunoreaktywności hydroksylazy tyrozynowej (TH) w neuronach oraz aktywację mikrogleju w rejonie istoty czarnej mózgu szczura 5 dni po podaniu. W grupie MPP+ obserwowano masowy naciek mikrogleju (zielony kolor) w obrębie części zbitnej i siatkowatej istoty czarnej. Ponieważ MNA nie indukował aktywacji komórek mikrogleju w żadnej ze stosowanych dawek (20, 40 i 80 μ g) na Ryc. przedstawiono tylko obraz po podaniu największej dawki (80 μ g). Zdjęcia A i D przedstawiają obraz istoty czarnej powiększony 100 razy. Zdjęcia B, C, E i F przedstawiają powiększone, zaznaczone fragmenty istoty czarnej.

4.4.2. Wpływ podania MNA do części zbitnej istoty czarnej na aktywność ruchową szczurów dorosłych

Poza opisanymi powyżej badaniami immunochemicznymi, w teście z apomorfina – niespecyficznym agonistą receptorów dopaminowych D2, oceniono wpływ

jednostronnego podania MNA do SNpc na zmiany aktywności ruchowej. Podanie agonisty wymusza u zwierząt z ubytkiem neuronów dopaminergicznych rotacje kontrlateralne w kierunku miejsca potencjalnego uszkodzenia wywołanego podaniem testowanych związków. Przyjmuje się, że spadek poziomu dopaminy większy niż 90% wywołuje pozytywne wyniki w teście z apomorfina (Hudson i wsp., 1993).



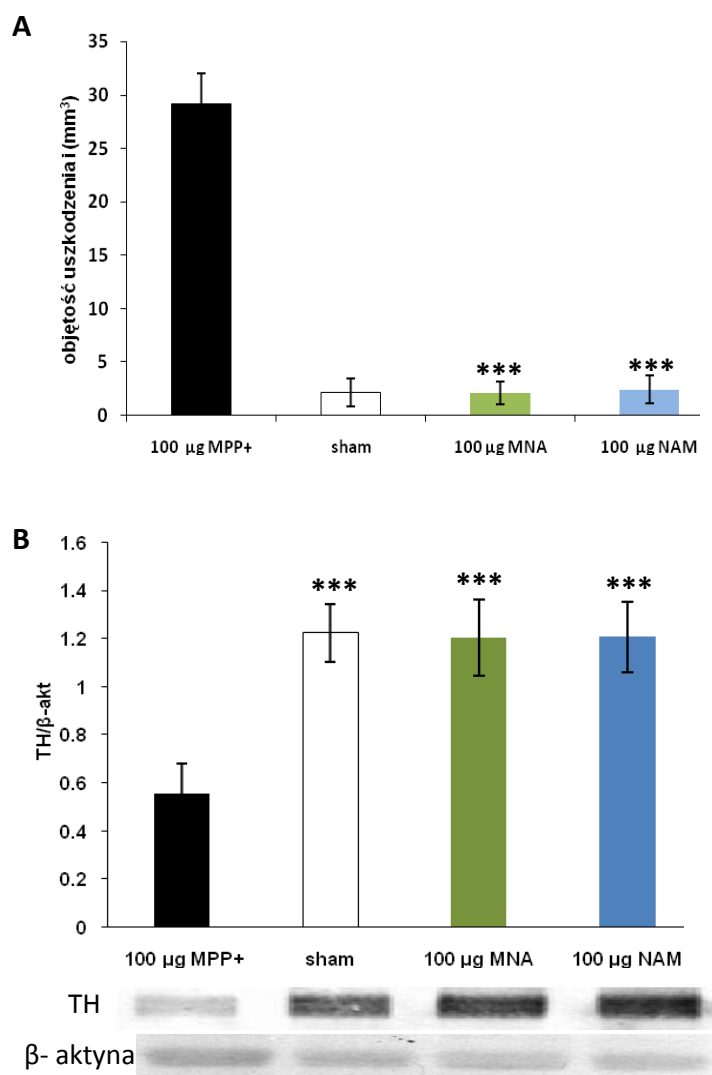
Ryc. 8. Wpływ MNA na aktywność lokomotoryczną szczurów po podaniu apomorfiny – zestawienie z działaniem MPP+. Test przeprowadzono 5 dnia po domózgowej iniekcji w rejon istoty czarnej zbitej badanych związków - MPP+ i MNA. Sham oznacza grupę, której podano sól fizjologiczną dla sprawdzenia efektu samej iniekcji. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń \pm SD (n=16). Ponieważ, MNA w badanym zakresie stężeń: 20, 40, 60 i 80 μ g nie powodował wystąpienia rotacji, dla lepszej czytelności na wykresie uwzględniono jedynie najmniejsze i największe badane stężenie.

Zgodnie z wynikami zamieszczonymi na Ryc. 8, MNA w żadnym z badanych stężeń nie powodował wystąpienia rotacji po podaniu apomorfiny. Jak wiadomo z literatury, podanie MPP+ do SNpc indukuje u szczurów wystąpienie kontrlateralnych rotacji od 3 dnia do 12 tygodni po podaniu (Liou i wsp., 1996). W wykonanych doświadczeniach u zwierząt po podaniu MPP+, dootrzewnowe podanie apomorfiny od około 5 minuty powodowało wystąpienie kontrlateralnych rotacji. Maksimum rotacji przypadało między 15 a 25 minutą (50 ± 2 obroty/5 min); następnie powoli spadało do wartości zerowej w 55 minucie pomiaru. Dodatkowo u zwierząt traktowanych MPP+ obserwowano dystonie (przykurcze końcówki ogona, skręcanie ciała i wyginanie grzbietu) oraz hipokinezę przedniej kończyny po stronie ipsilateralnej. Pojawiały się także spontanicznie obroty w kierunku operowanej półkuli (jeden, dwa obroty/minutę) zanikające w czasie. Opisywane objawy nie występowały u zwierząt, którym wstrzyknięto sól fizjologiczną (sham) oraz MNA.

4.4.3. Ocena toksyczności domózgowego podania MNA u 7-dniowych oseków szczurzych

Zgodnie z przedstawionymi wyżej wynikami, MNA nie wykazywał toksycznych właściwości w stosunku do neuronów dopaminergicznych dorosłych szczurów. Ponieważ modelem badawczym *in vivo* wykorzystanym w dalszej części tej rozprawy jest model asfiksji okołoporodowej 7-dniowych szczurów postanowiono sprawdzić, czy domózgowe podanie MNA do prądkowia oseków może indukować uszkodzenie lub zmiany w poziomie hydroksylazy tyrozynowej. Dodatkowo sprawdzono czy związek prekursorowy MNA – NAM może powodować uszkodzenie. Wynika to z faktu, że NAM jest metabolizowany do MNA przy udziale enzymu NNMT.

Jak przedstawiono na Ryc. 9A, wolumetryczna ocena wielkości uszkodzenia skrawków mózgu wybarwionych metodą TTC, poddanych analizie przy użyciu programu ImageJ, wykazała istotne statystycznie różnice w objętości ubytku tkanki mózgowej u szczurów, którym podano MPP+, w porównaniu do zwierząt kontrolnych (sham), którym wstrzyknięto roztwór soli fizjologicznej. Zarówno NAM jak i MNA nie wywołały znaczących uszkodzeń mózgu. Nie zaobserwowano również spadku poziomu immunoreaktywności TH w półkuli poddanej iniekcji MNA, NAM oraz sham (Ryc. 9B). W przypadku MPP+ uzyskano spodziewany spadek immunoreaktywności TH o około 50 % 5 dnia po podaniu.

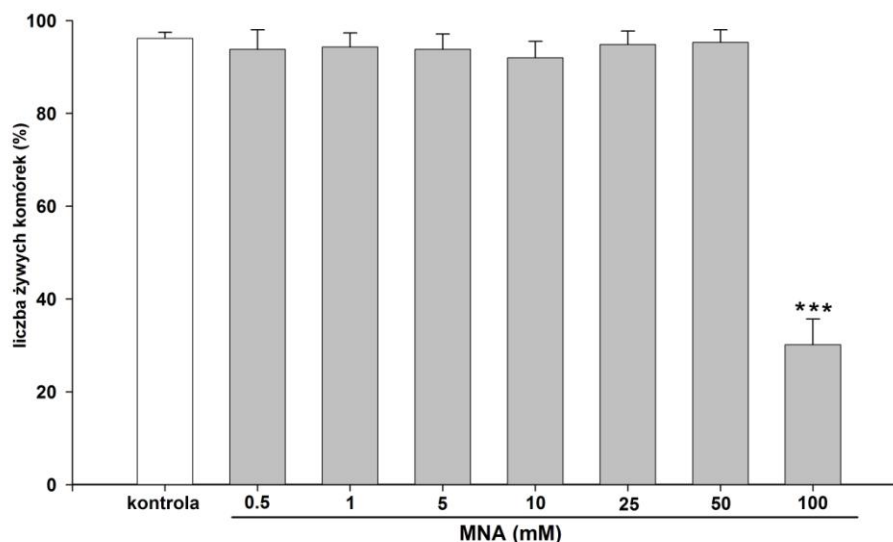


Ryc. 9. Ocena wielkości obszaru uszkodzenia po podaniu 100 µg MPP+, MNA i NAM do prążkowiec 7 dniowych osesków szczurzych (A) oraz immunoreaktywności hydroksylazy tyrozynowej (TH) (B). Ocena wielkości lezji oraz poziomu TH przeprowadzono 5 dnia po domózgowym podaniu testowanych związków. Wykres A przedstawia wielkości średnie \pm SD (n=6), ; ***<0,001 znacząco różne w porównaniu do MPP+. Wykres B ilustruje poziom TH wyrażony w wartościach względnych uzyskanych za pomocą analizy densytometrycznej Western blotów, względem β -aktyny. Poniżej zamieszczono przykładowy obraz Western blot. Uzyskane wartości są średnią arytmetyczną \pm SD, (n=6) z trzech niezależnych doświadczeń; ***p<0,001 znacząco różne w stosunku do grupy MPP+. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-test Bonferroniego.

4.4.4. Wpływ 1-metylnikotynamidu na przeżywalność neuronów ziarnistych mózdzku *in vitro*

Ponieważ w niniejszych badaniach model doświadczalny *in vitro* stanowiły hodowle pierwotne komórek ziarnistych mózdzku szczura, zbadano wpływ trwającej 24 godziny inkubacji z MNA na przeżywalność neuronów w hodowli. Jak przedstawiono na Ryc. 10, trwająca 24 godziny inkubacja z MNA podanym w stężeniu do 50 mM włącznie

pozostawała bez wpływu na przeżywalność komórek w hodowli. Ten wynik wskazuje na brak uchwytynych właściwości toksycznych MNA.



Ryc. 10. Wpływ trwającej 24 godziny inkubacji z wzrastającymi stężeniami MNA na przeżywalność neuronów ziarnistych mózdzku. Wykres przedstawia wartości średnie \pm SD (n=6); znacząco różne ***p<0,001 w porównaniu do wartości grupy kontrolnej. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-hoc Bonferroniego.

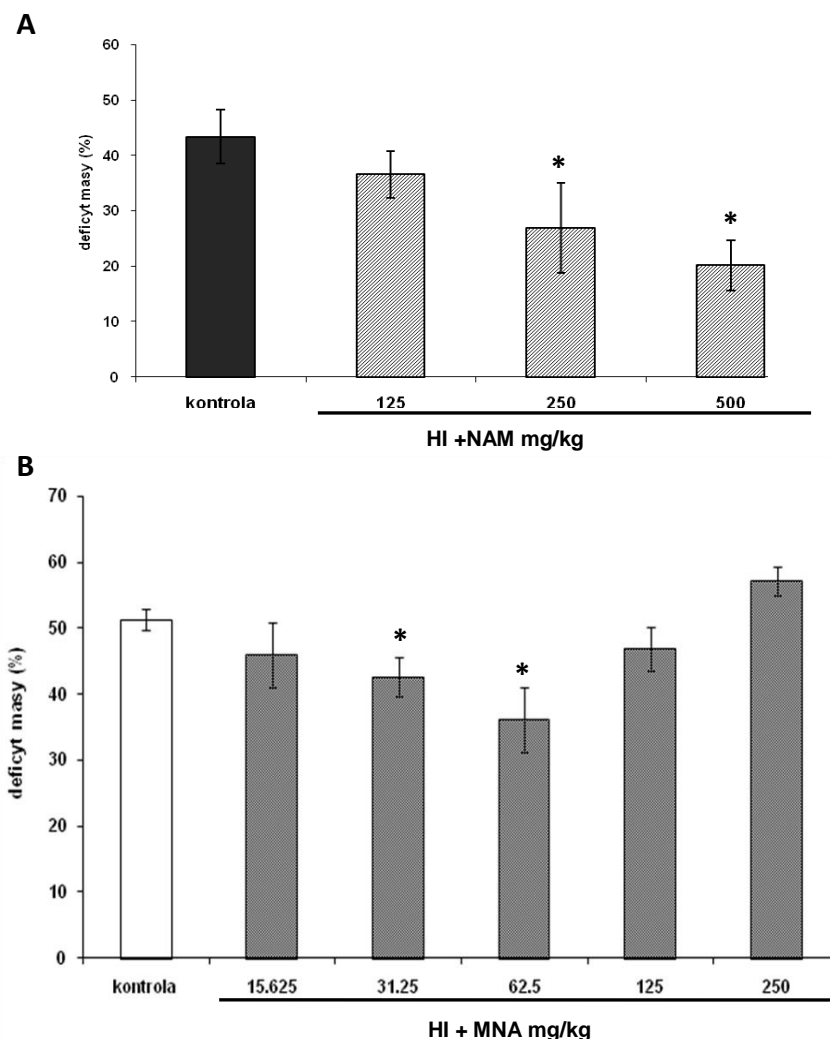
4.5. Analiza neuroprotekcijnego potencjału 1- metylnikotynamidu

4.5.1. Testowanie właściwości neuroprotekcyjnych MNA w modelu asfiksji okołoporodowej 7-dniowych osesków szczurzych

Ekspozycja noworodków szczurzych na warunki hipoksyjno-ischemiczne powoduje w mózgowiu badanych zwierząt uszkodzenie obejmujące głównie rejon unaczyniony przez końcowe odgałęzienia tętnicy szyjnej wspólnej. Zgodnie z danymi autorów: Rice i wsp. (1981), Bona i wsp. (1997) w tym modelu samo jednostronne zamknięcie tętnicy szyjnej wspólnej lub sama hipoksja nie wywołuje uszkodzenia mózgu.

W zastosowanych warunkach doświadczalnych otrzymywano powtarzalnie deficyt masy półkuli ipsilateralnej u zwierząt poddanych hipoksji/ischemii, który wynosił średnio 50 % (Ryc. 11). W badaniu neuroprotekcijnego potencjału MNA zastosowano NAM, jako związek referencyjny. Takie posunięcie wynikało z faktu, że NAM posiada plejotropowe, opisane w literaturze właściwości neuroprotekcyjne w wielu modelach ischemii u szczurów, w tym w modelu asfiksji okołoporodowej 7-dniowych szczurów (Feng i wsp.,

2006). W niniejszych doświadczeniach NAM podano w dawkach, stosowanych przez innych autorów.



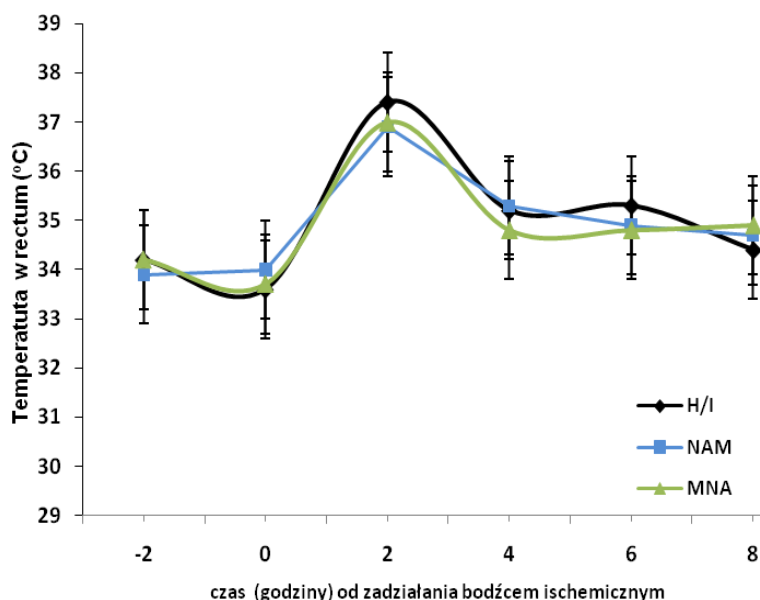
Ryc. 11. Wpływ dootrzewnowego podania NAM (A) oraz MNA (B) na uszkodzenie mózgu wywołane przez hipoksję/ischemię. Wykres przedstawia wartości średnie \pm SD (n=10) uszkodzenia półkuli ipsilateralnej w stosunku do kontralateralnej, wyrażone w %; *p<0,05 znacząco różne w porównaniu do półkuli uszkodzonej (kontrola).

Jak przedstawiono na Ryc. 11A ochronny wpływ NAM zależał ściśle od dawki. Znamiennej statystycznie ochronę mózgu przez NAM uzyskano w dawkach 250 i 500 mg/kg.

Porównanie świeżej masy półkul, przeprowadzone dwa tygodnie po wywołaniu hipoksji-ischemii u 7 dniowych szczurów kontrolnych i leczonych MNA wykazało, że dootrzewnowe podanie MNA 30 minut po hipoksji/ischemii zmniejszyło znamienne uszkodzenie mózgowia, mierzone ubytkiem masy półkuli ipsilateralnej. MNA podawany w dawce 31,25 i 62,5 mg/kg zmniejszał stopień uszkodzenia mózgu w porównaniu z kontrolą (hipoksja nieleczona) średnio o około 15%. Nie wykazano statystycznie znamiennych

różnic pomiędzy kontrolą a zwierzętami otrzymującymi MNA w dawkach 15,625, 125 oraz 250 mg/kg (Ryc. 11B). Na podstawie przeprowadzonych badań, można stwierdzić, że w modelu asfiksji okołoporodowej u siedmiodniowych szczurów, MNA podany obwodowo posiada potencjał neuroprotektyny, który lokuje się wąskim przedziale dawek rzędu 30-60 mg/kg.

Dodatkowo przeprowadzono pomiar temperatury ciała osesków w *rectum* dla sprawdzenia czy MNA może wywoływać hipotermię u małych zwierząt. Temperatura ciała a przede wszystkim mózgu ma ogromny wpływ na skutki niedokrwienia mózgu. Hipotermia ma działanie neuroprotektynowe, a mechanizm działania wielu leków, np.: NAM – prekursora MNA, można przynajmniej częściowo tłumaczyć obniżeniem temperatury. Stąd, dla wykluczenia możliwości, że neuroprotektynowe działanie MNA wynika z wpływu na temperaturę ciała osesków szczurzych, wynikła konieczność kontroli temperatury ciała zwierząt w opisanych wyżej eksperymentach. Pomiary temperatury ciała w *rectum* wykazały, że u szczurów poddanych hipoksji-ischemii i otrzymujących MNA (62,5 mg/kg) lub NAM (500 mg/kg) nie zaobserwowano hipotermii w porównaniu z temperaturą ciała zwierząt kontrolnych (hipoksja – ischemia nie leczona).

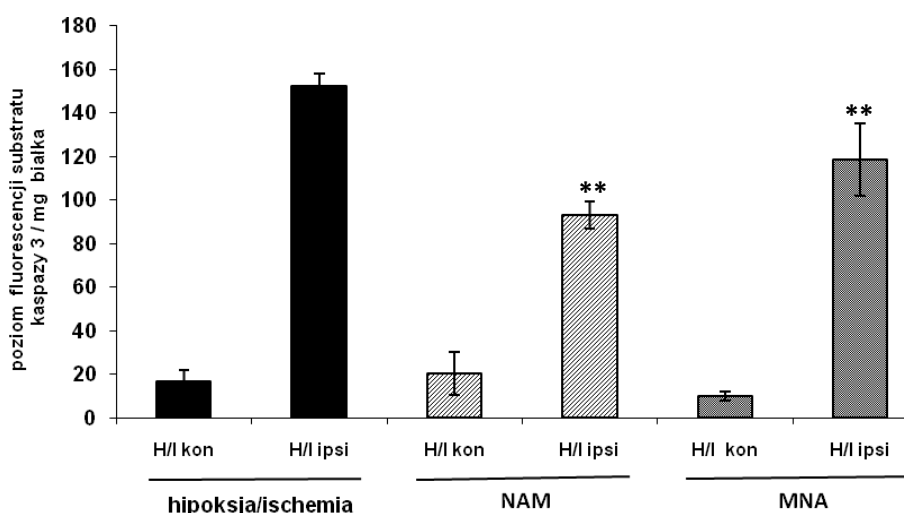


Ryc. 12. wpływ NAM i MNA na temperaturę ciała 7-dniowych osesków poddanych modelowej asfiksji okołoporodowej mierzoną w *rectum*. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SD (n=10). Nie stwierdzono różnic między grupami.

4.5.2. Ocena wpływu NAM i MNA na aktywację kaspazy 3 w modelowej asfiksji okołoporodowej

Zgodnie z literaturą oraz badaniami własnymi NAM podany jednorazowo 30 minut po ischemii dootrzewnowo w bardzo wysokich dawkach 250 i 500 mg/kg lub MNA w znacznie niższych dawkach 31,25 – 62,5 mg/kg indukowały neuroprotekcję. Jednym z istotnych mechanizmów ochronnego wpływu NAM w modelach ischemii u zwierząt jest zapobieganie degeneracji neuronów poprzez zahamowanie aktywności kaspaz, w tym kaspazy 3 – egzekutorowej (Chong i wsp., 2004).

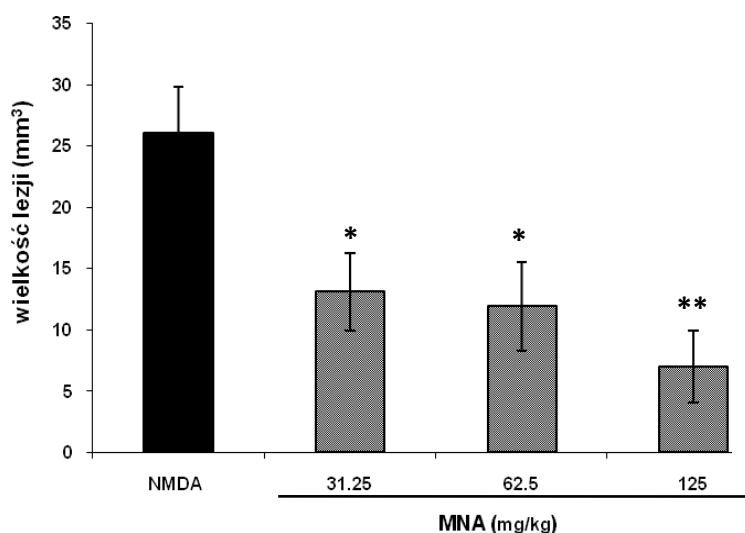
Zbadano wpływ NAM i MNA na poziom aktywnej kaspazy 3 w korze mózgu osesków szczyrzych poddanych modelowej asfiksji okołoporodowej. Badania przeprowadzono po 24 godzinach od wystąpienia asfiksji. Badanie poziomu aktywności tylko w jednym punkcie czasowym było podyktowane danymi literaturowymi, z których wynikało, że w zastosowanym modelu statystycznie istotne różnice w poziomie kaspazy 3 obserwowano 24 godziny po wystąpieniu bodźca uszkodzającego (Feng i wsp., 2006). Jak przedstawiono na Ryc. 13 hipoksja/ischemia powodowała gwałtowny wzrost poziomu kaspazy 3 w półkuli ipsilateralnej, w porównaniu do półkuli kontrlateralnej po 24 godzinach. NAM w dawce 500 mg/kg, zgodnie z oczekiwaniami zmniejszał poziom aktywnej kaspazy 3. MNA w dawce 62,5 mg/kg, choć słabiej także hamował aktywność kaspazy 3 24 godziny po epizodzie hipoksyjno – ischemicznym.



Ryc. 13. Ocena wpływu NAM i MNA na poziom aktywnej kaspazy 3 w półkuli niedokrwionej (H/lipsi) i w porównaniu do półkuli kontrlateralnej, kontrolnej (H/I kon) w korze mózgu osesków poddanych hipoksji/ ischemii, mierzona po 24 godzinach. Wykres przedstawia wielkości średnie \pm SD (n=6); **p<0,01 znaczące różnice w porównaniu do grupy H/lipsi nieleczonej. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz test Dunnetta.

4.5.3. Wpływ MNA na wielkość uszkodzeń mózgu wywołanych domózgowym podaniem NMDA u 7-dniowych szczurów

Mózg 7-dniowego oseska szczurzego jest bardzo podatny na uszkodzenia związane z nadmierną aktywacją receptorów NMDA występujące podczas epizodów ischemicznych (Venucci i Hagberg, 2004). Postanowiono sprawdzić wpływ MNA na ekscytotoksyczną komponentę śmierci neuronów. Jak przedstawiono na Ryc. 14 MNA podany dootrzewnowo 30 minut po wykonaniu iniekcji 15 nM NMDA w objętości 1 μ l bezpośrednio do prążkowie 7-dniowych szczurów powodował zależną od dawki statystycznie zmienną neuroprotekcję.



Ryc. 14. Wpływ MNA na wielkość uszkodzenia wywołanego podaniem NMDA do prążkowie 7 dniowych osesków szczurzych. MNA podawano dootrzewnowo 30 minut po iniekcji NMDA. Ocenę wielkości lezji przeprowadzono 5 dnia po podaniu testowanych związków. Wykres przedstawia wielkości średnie \pm SD (n=6); *p<0,05, **p<0,01 znaczące różnice w porównaniu do grupy NMDA. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz test Dunnetta.

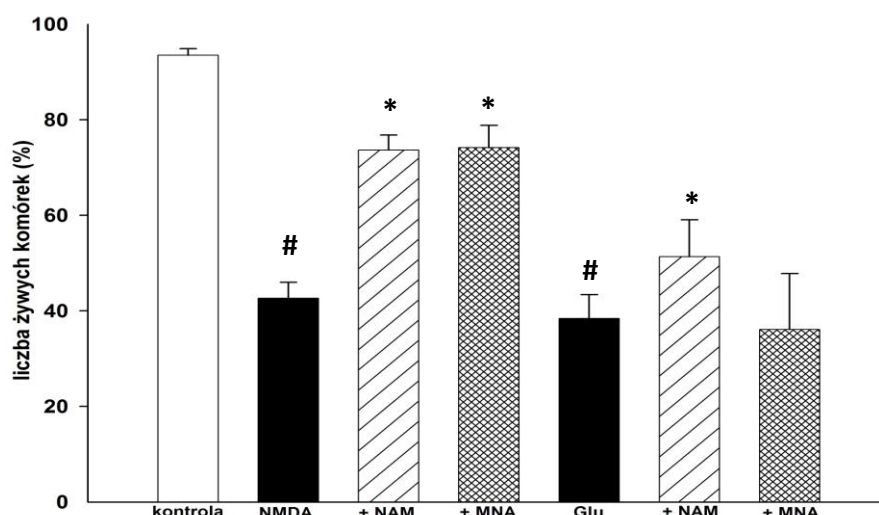
Dlatego też wysunięto hipotezę, że MNA wpływa hamująco na proces ekscytotoksyczności wywoływanej przez receptory NMDA.

4.5.4. Badanie wpływu 1-metylnikotynamidu na ekscytotoksyczność *in vitro*

W eksperymentach zamieszczonych w tej części rozprawy przeprowadzono ocenę wpływu MNA na ekscytotoksyczność. Wszystkie doświadczenia przeprowadzono zestawiając efekt działania MNA, z jego związkiem prekursorowym - NAM.

4.5.4.1. Wpływ NAM i MNA na przeżywalność neuronów ziarnistych mózdku po podaniu glutaminianu i NMDA

Jak zaprezentowano na Ryc. 15, neurotoksyczność wywołana przez 30 minutową inkubację neuronów ziarnistych z 0,5 mM glutaminianem lub NMDA w obecności 5 μ M glicyny wyrażała się znaczącym spadkiem liczby żywych neuronów ocenianym po 24 godzinach. Jednoczesne podanie 25 mM NAM lub MNA łącznie z NMDA zwiększało przeżywalność neuronów o ponad 40 %. W przypadku ekscytotoksyczności wywołanej przez glutaminian, statystycznie istotną neuroprotekcję uzyskano jedynie w przypadku NAM. Badane związki w niższych zakresach stężeń od 1 do 15 mM nie indukowały poprawy przeżywalności neuronów, na Ryc. 15 przedstawiono wyłącznie efekty podania najwyższych działających protekcyjnie stężeń.

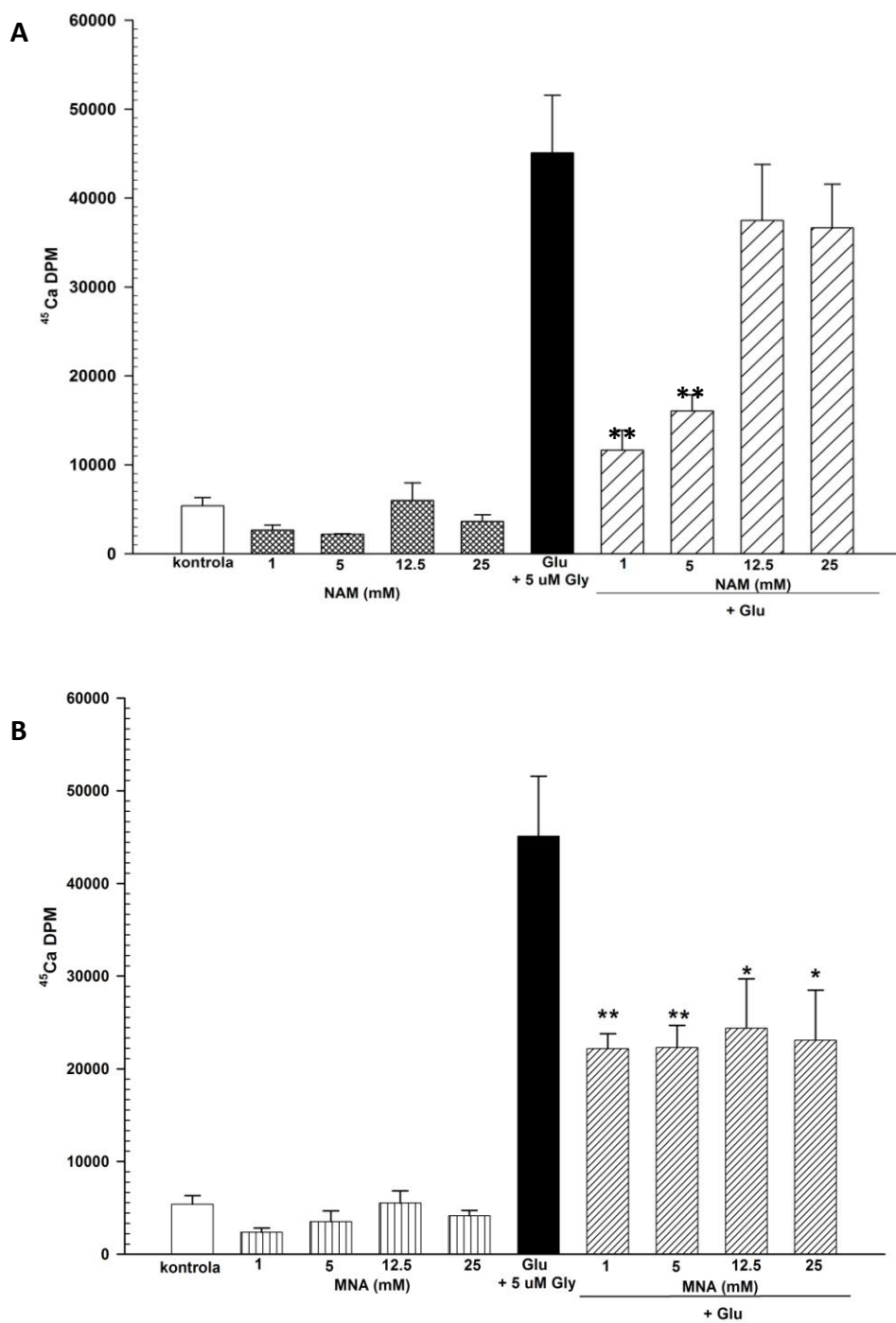


Ryc. 15. Wpływ 25 mM NAM i MNA na przeżywalność neuronów ziarnistych mózdku eksponowanych na działanie 0,5 mM glutaminianu lub NMDA. Wykres przedstawia wielkości średnie \pm SD (n=6); *p<0,05 znacząco różne w porównaniu do grupy inkubowanej z NMDA lub glutaminianem; # p<0,001 znaczące różnice w porównaniu do grupy kontrolnej. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz test Dunnetta.

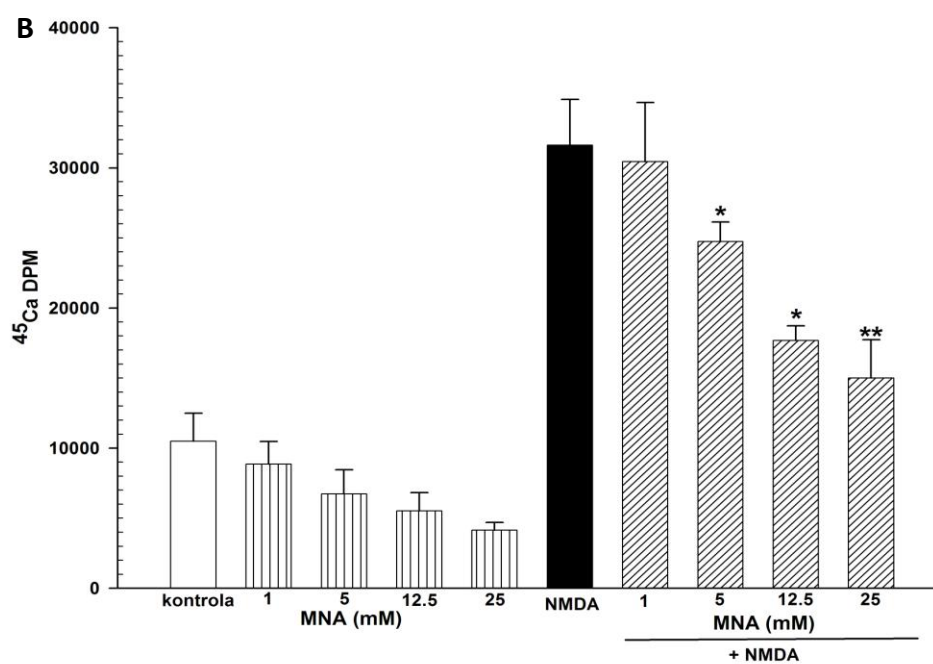
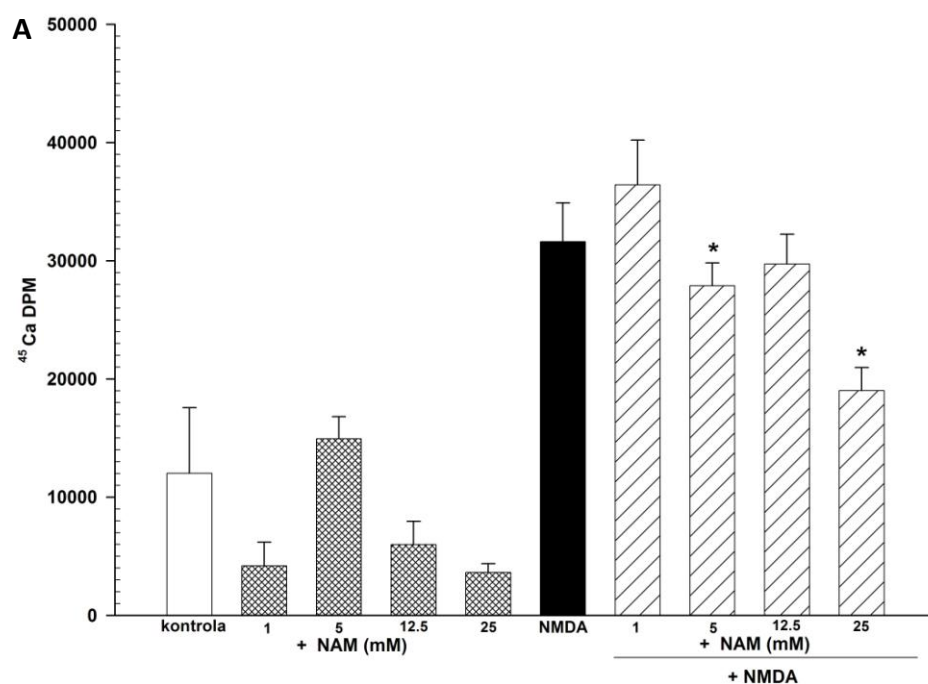
4.5.4.2. Wpływ MNA i NAM na pobieranie zewnątrzkomórkowego wapnia przez neurony inkubowane w obecności glutaminianu i NMDA

Znana jest ścisła zależność między neurotoksycznością powodowaną przez glutaminian i NMDA, a napływem zewnątrzkomórkowego wapnia. Dlatego też przeprowadzone doświadczenia miały na celu zbadanie, czy MNA oraz NAM wywiera wpływ na wywołane przez glutaminian i NMDA pobieranie wapnia.

Wskaźnikiem napływu wapnia zewnątrzkomórkowego w wyniku uogólnionego pobudzenia receptorów dla glutaminianu było pobieranie ^{45}Ca przez neurony. Po podaniu naturalnego agonisty (Ryc. 16A, B) hamujący, statystycznie znamieny wpływ na pobierania ^{45}Ca obserwowano we wszystkich testowanych stężeniach MNA tj.: 1, 5, 12,5 i 25 mM, przy czym działanie MNA było niezależne od dawki (Rys. 16B). NAM hamował napływ zewnątrzkomórkowego wapnia wyłącznie w najniższych badanych stężeniach: 1 i 5 mM (Ryc. 16 A). Stwierdzono, że trwająca 10 minut inkubacja komórek ziarnistych mózdzku z 0,5 mM NMDA indukowała pobieranie wapnia radioaktywnego przez neurony, co może wiązać się z bardzo selektywną aktywacją receptora NMDA. Wykazano, że MNA hamował indukowane przez NMDA pobieranie radioaktywnego wapnia w sposób zależny od dawki. Otrzymano statystycznie znamienne obniżenie nagromadzenia ^{45}Ca przy zastosowaniu stężeń 5 i 12,5 mM MNA. Zarówno NAM jak i MNA w stężeniu 25 mM hamowały napływ ^{45}Ca do komórek (Rys. 17A i B). Te dane wskazują na hamowanie przez MNA oraz NAM związanego z aktywacją receptora NMDA napływu wapnia do neuronów ziarnistych mózdzku. Działanie obu związków różniło się między sobą relacją dawka – efekt.



Ryc. 16. Wpływ NAM (A) i MNA (B) na pobieranie ⁴⁵Ca przez neurony ziarniste mózdzku w czasie inkubacji z 0,5 mM glutaminianem (Glu). Wykres przedstawia wartości średnie ± SD (n=6) z trzech niezależnych doświadczeń; *p<0,05, **p < 0,01 znacząco różne w porównaniu do działania glutaminianu (Glu). Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz test Dunnetta.

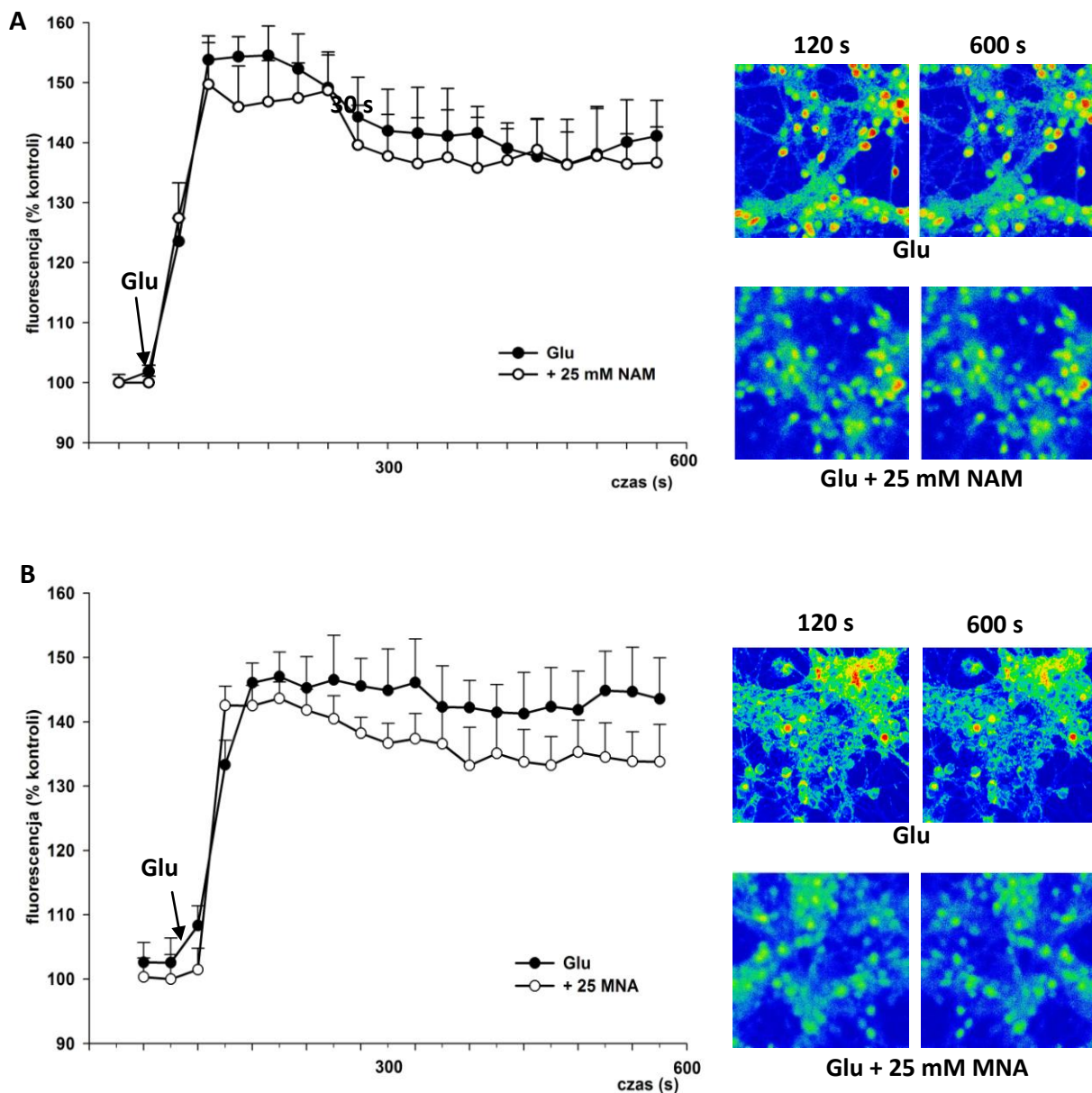


Ryc. 17. Wpływ NAM (A) i MNA na pobieranie ^{45}Ca przez neurony ziarniste mózdzku w czasie inkubacji z 0,5 mM NMDA. Wykres przedstawia wartości średnie \pm SD (n=6) z trzech niezależnych doświadczeń ; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ znacząco różne w porównaniu do grupy NMDA. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz test Dunnetta.

4.5.4.3. Wpływ MNA i NAM na stężenie wewnątrzkomórkowego wapnia w neuronach po podaniu glutaminianu

Ostra neurotoksyczność glutaminianu jest wiązana zarówno z aktywacją receptorów NMDA i napływem przez nie wapnia zewnątrzkomórkowego, jak i dodatkowo z mobilizacją wapnia wewnątrzkomórkowego, co wyraża się wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia.

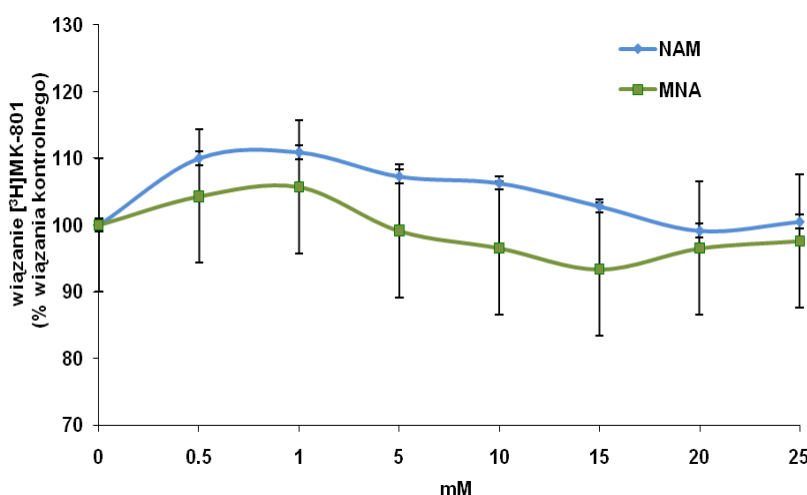
Dla zbadania, czy MNA i NAM wpływa na poziom wapnia wewnątrzkomórkowego w pierwotnej hodowli neuronów ziarnistych mózdzku zastosowano wrażliwą na wapń sondę fluorescencyjną Calcium OrangeTM. Analizę przeprowadzono za pomocą obrazowania w mikroskopie konfokalnym. Jak pokazano na Ryc. 16 podanie glutaminianu powodowało wzrost fluorescencji Calcium OrangeTM, co wskazuje na wzrost stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego średnio o 50%. Dodanie do środowiska inkubacyjnego wzrastających stężeń (1, 5, 12,5 mM) MNA lub NAM nie hamowało przyrostu fluorescencji (dane nie pokazane). W przypadku obu związków jedynie przy zastosowaniu 25 mM stężenia obserwowano zaledwie tendencję do obniżenia poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia.



Ryc. 18. Wpływ NAM (A) i MNA (B) na wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia w neuronach ziarnistych mózdzku wywołany przez 0,5 mM glutaminian (Glu). Zmiany stężenia wapnia mierzone przyrostem intensywności fluorescencji sondy wapniowej Calcium OrangeTM. Wykres przedstawia wartości średnie \pm SD (n=6) z trzech niezależnych doświadczeń. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między grupami. Przy wykresach umieszczono przykładowe obrazy pokazujące poziom wapnia wewnątrzkomórkowego, wyrażony w umownej skali kolorów (barwa niebieska odpowiada najniższej intensywności fluorescencji, pomarańczowa najwyższej) w 120 sekundzie (maksymalny poziom po podaniu Glu) i pod koniec pomiaru- w 600 sekundzie. Ponieważ wartości fluorescencji dla 1, 5, 12,5 mM MNA pokrywały się z linią 0,5 mM Glu, dla lepszej czytelności pominięto je na rycinie.

4.5.4.4. Ocena wpływu MNA na aktywność receptora NMDA

Wyniki doświadczeń zamieszczonych w podpunkcie 4.5.3., 4.5.4. wskazują, że MNA istotnie statystycznie ograniczał wielkość lezji wywołanej domózgowym podaniem NMDA *in vivo*, a także hamował w wyższych zastosowanych stężeniach napływ wapnia zewnątrzkomórkowego wywołany aktywacją receptora NMDA. Ponieważ nie znaleziono w literaturze informacji na temat wpływu MNA na aktywność receptora NMDA, podjęto próbę zbadania tego zagadnienia, jednocześnie porównując działanie MNA z jego związkiem prekursorowym, NAM.

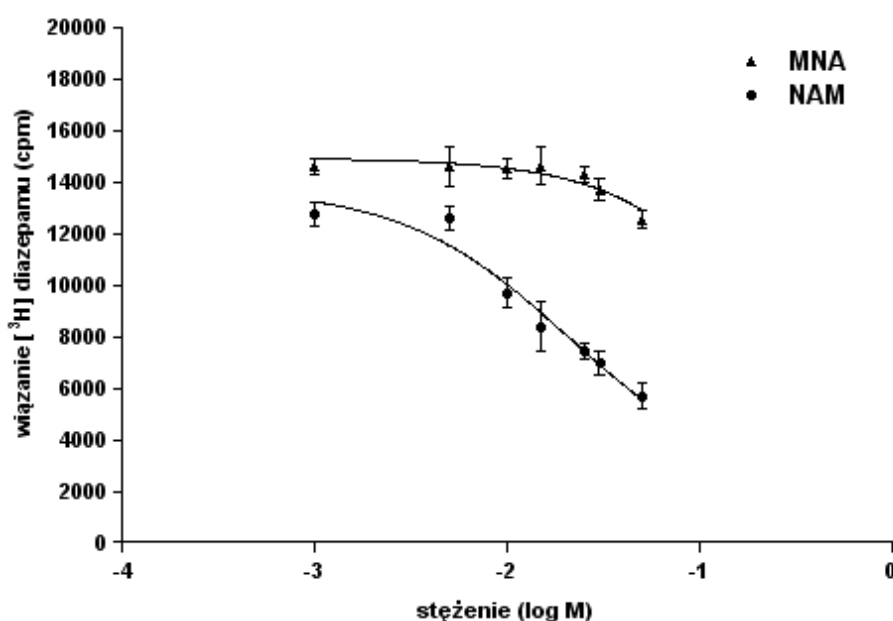


Ryc. 19. Wpływ wzrastających stężeń NAM i MNA na wiązanie [³H]MK-801 do frakcji błon synaptosomalnych w obecności 100 μM NMDA i 10 μM glicyny. Wykres przedstawia wartości średnie ± SD (n=4) z trzech niezależnych doświadczeń. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między grupami.

Dla aktywacji receptorów NMDA zastosowano selektywnego agonistę tych receptorów, podanego w warunkach optymalnych dla otwarcia kanału, to jest w obecności 10 μM glicyny i braku magnezu w medium. Wpływ NAM i MNA na aktywność receptora NMDA badano w szerokim zakresie stężeń (Ryc. 19). Interakcje z receptorem określano na podstawie hamowania wiązania znakowanego MK-801. NAM i MNA w przebadanych stężeniach nie zmieniały w sposób istotny statystycznie wiązania [³H]MK-801, co przeczy możliwości hamowania przez oba związki aktywności receptora NMDA.

4.5.5. Wpływ 1-metylnikotynamidu na wiązanie [³H]-diazepamu - interakcja z receptorem GABA_A

Już w latach 80-tych wykazano, że NAM - związek prekursorowy MNA, jest pozytywnym, endogennym modulatorem miejsca benzodiazepinowego receptora GABA_A. Znalaziono szereg endogennych związków wiążących się do miejsca benzodiazepinowego, powodujących nasilenie prądów chlorkowych płynących przez receptor GABA_A m.in. NAM, hipoksantynę czy inozynę (Lapin i wsp., 1981; Fujimoto i wsp., 1981). Po otrzymaniu wyników potwierdzających brak bezpośredniej interakcji MNA z receptorem NMDA postawiono hipotezę roboczą, że potencjalny mechanizm neuroprotekcynowego działania MNA może być związany z aktywacją receptora GABA_A, co mogłoby obniżyć prawdopodobieństwo aktywacji receptorów NMDA w żywych komórkach poprzez stabilizację potencjału błonowego neuronów. Dlatego też, dla wykluczenia, bądź potwierdzenia oddziaływania MNA z miejscem benzodiazepinowym wykonano doświadczenie polegające na badaniu wypierania przez NAM i MNA znakowanego trytem diazepamu związanego z frakcją błonową kory mózgu szczura.



Ryc. 20. Wpływ MNA i NAM na wiązanie [³H]-diazepamu do frakcji błon kory mózgu szczura. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z czterech niezależnych eksperymentów ± SD (n=4).

W zastosowanym układzie eksperymentalnym, zgodnie z danymi literaturowymi, NAM wykazywał hamowanie wiązania diazepamu w przedziale stężeń 10⁻² – 10⁻¹ M (Ryc. 20). Natomiast MNA w tym samym zakresie stężeń nie hamował wiązania znakowanego

diazepamu. Wyniki przeprowadzonego doświadczenia wskazujące na brak wpływu MNA na miejsce benzodiazepinowe receptora GABA_A przemawia przeciwko oddziaływaniu wykluczającemu oddziaływanie MNA z receptorem benzodiazepinowym jako potencjalnemu mechanizmowi protekcyjnego działania tego związku.

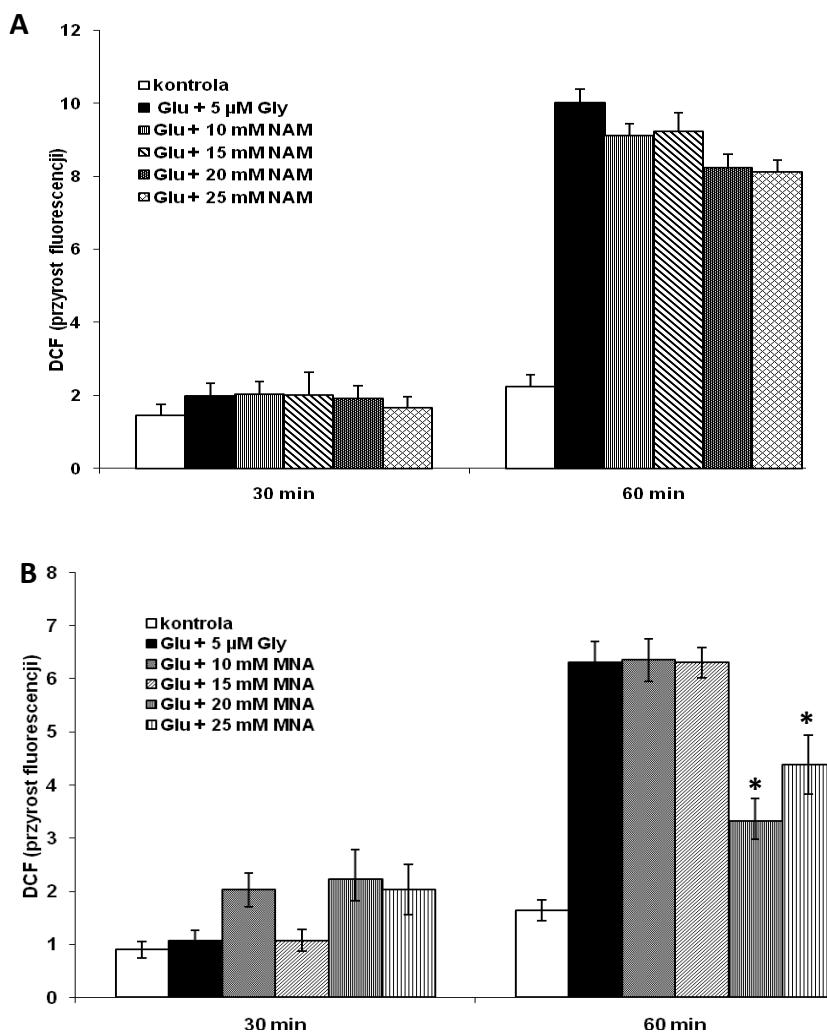
4.5.6. Ocena wpływu NAM i MNA na poziom produkcji wolnych rodników tlenowych oraz potencjał mitochondrialny w neuronach poddanych działaniu bodźca ekscytotoksycznego

W literaturze podawane są sprzeczne dane, dotyczące wpływu MNA na syntezę wolnych rodników przez mitochondria. Fukushima i wsp. (1995, 2002) opisywali generowanie rodników tlenowych w izolowanej frakcji mitochondrialnej mózgu pod wpływem MNA. Z drugiej strony Gębicki i wsp. (2003) wykazali słaby, ale dający się odnotować potencjał antyrodnikowy NAM i MNA, aczkolwiek oba związki nie mogą być rozpatrywane w kategorii wydajnych zmiataczy wolnych rodników. Ponieważ MNA w wykonanych doświadczeniach *in vivo* oraz *in vitro* wykazywał właściwości neuroprotekcyjne, zbadano wpływ MNA w szerokim zakresie stężeń na poziom wolnych rodników oraz potencjał mitochondriów w hodowli neuronów ziarnistych mózdzku po zadziałaniu ekscytotoksyną. Do oceny wpływu MNA na stres oksydacyjny i dysfunkcję mitochondriów indukowaną przez podanie glutaminianu zastosowano dwa podejścia doświadczalne: oszacowanie produkcji wolnych rodników tlenowych za pomocą 2,7-dichlorofluoresceiny (DCF) oraz zmiany potencjału błony mitochondrialnej z użyciem sondy rodamininy 123 (Rh123).

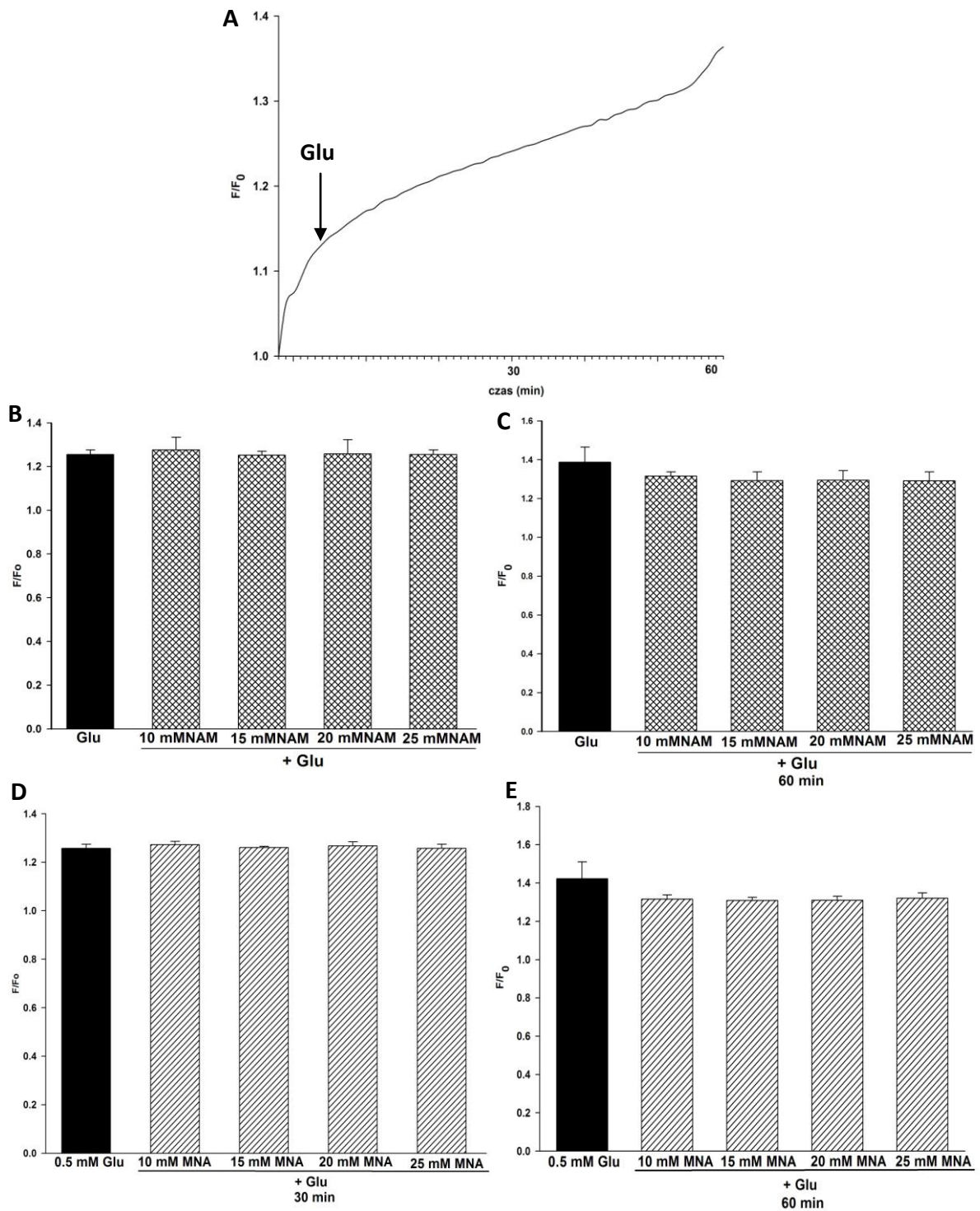
Zgodnie z wynikami zamieszczonymi na Ryc. 21, podaniu glutaminianu do hodowli neuronów ziarnistych mózdzku towarzyszył stres oksydacyjny objawiający się gwałtownym wzrostem produkcji wolnych rodników i wzrostem fluorescencji DCF, którego nie hamowało podanie NAM (Ryc. 21A). Zastosowanie MNA w stężeniach: 20 i 25 mM (Ryc. 21B) w 60 minucie pomiaru istotnie statystycznie hamowało produkcję rodników tlenowych i redukowało poziom sygnału DCF, co może świadczyć o antyrodnikowych właściwościach tego związku.

Zastosowanie Rh123 pozwoliło uwidocznić spadek potencjału błony mitochondrialnej w wyniku działania ekscytotoksycznego bodźca - glutaminianu. Zgodnie z wykresem zamieszczonym na Ryc. 22A, glutaminian wywołał znaczący, narastający wzrost

fluorescencji Rh123, co świadczy o spadku potencjału mitochondrialnego. Jednak podanie, zarówno NAM jak i MNA w zakresie stężeń od 10 do 25 mM w sposób istotny statystycznie nie hamowało wzrostu fluorescencji w badanych punktach czasowych (Ryc. 22B i C). Podsumowując, MNA hamował generowanie wolnych rodników wywołaną glutaminianem, niemniej jednak nie zapobiegał spadkowi potencjału mitochondrialnego w pierwotnej hodowli neuronów.



Ryc. 21. Zmiany w poziomie fluorescencji DCF w komórkach ziarnistych mózdzka szczura pod wpływem glutaminianu (Glu): wpływ NAM (A) i MNA (B). Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń \pm SD (n=6). * $p < 0,05$ - różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek inkubowanych z glutaminianem. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-test Bonferroniego.



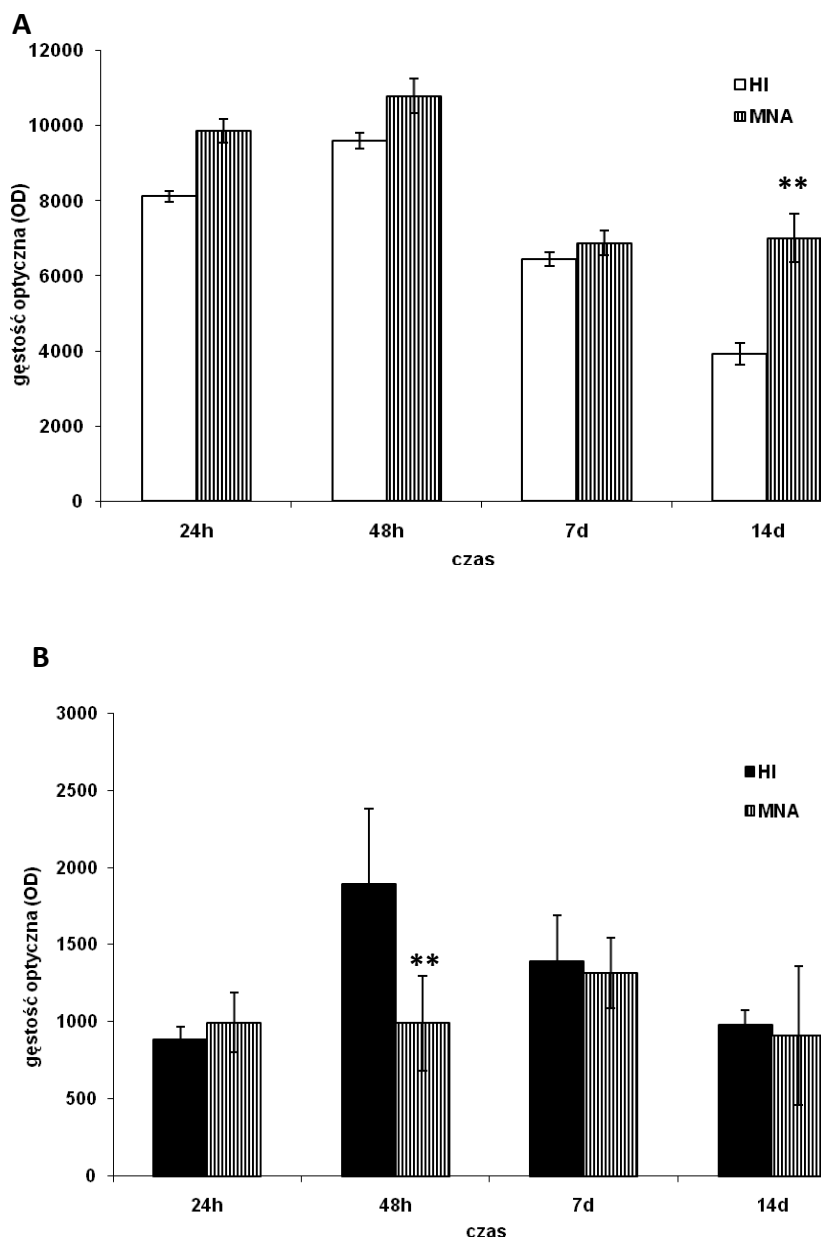
Ryc. 22. Zmiany w poziomie fluorescencji Rh123 pod wpływem glutaminianu (A). Wpływ MNA na zmiany potencjału mitochondrialnego w hodowli neuronów ziarnistych mózdzku wywołane 0,5 mM glutaminianem (Glu) w 30 (B) i 60 (C) minucie po podaniu ekscytotoksyny. Zmiany zostały przedstawione w postaci stosunku fluorescencji wyjściowej F_0 do przyrostu fluorescencji F w czasie. Wykres przedstawia wartości średnie \pm SD ($n=6$). Nie stwierdzono istotnie statystycznych różnic między grupami.

4.5.7. Wpływ 1-metylnikotynamidu na aktywność metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej w mózгах 7- dniowych szczurów poddanych hipoksji/ischemii

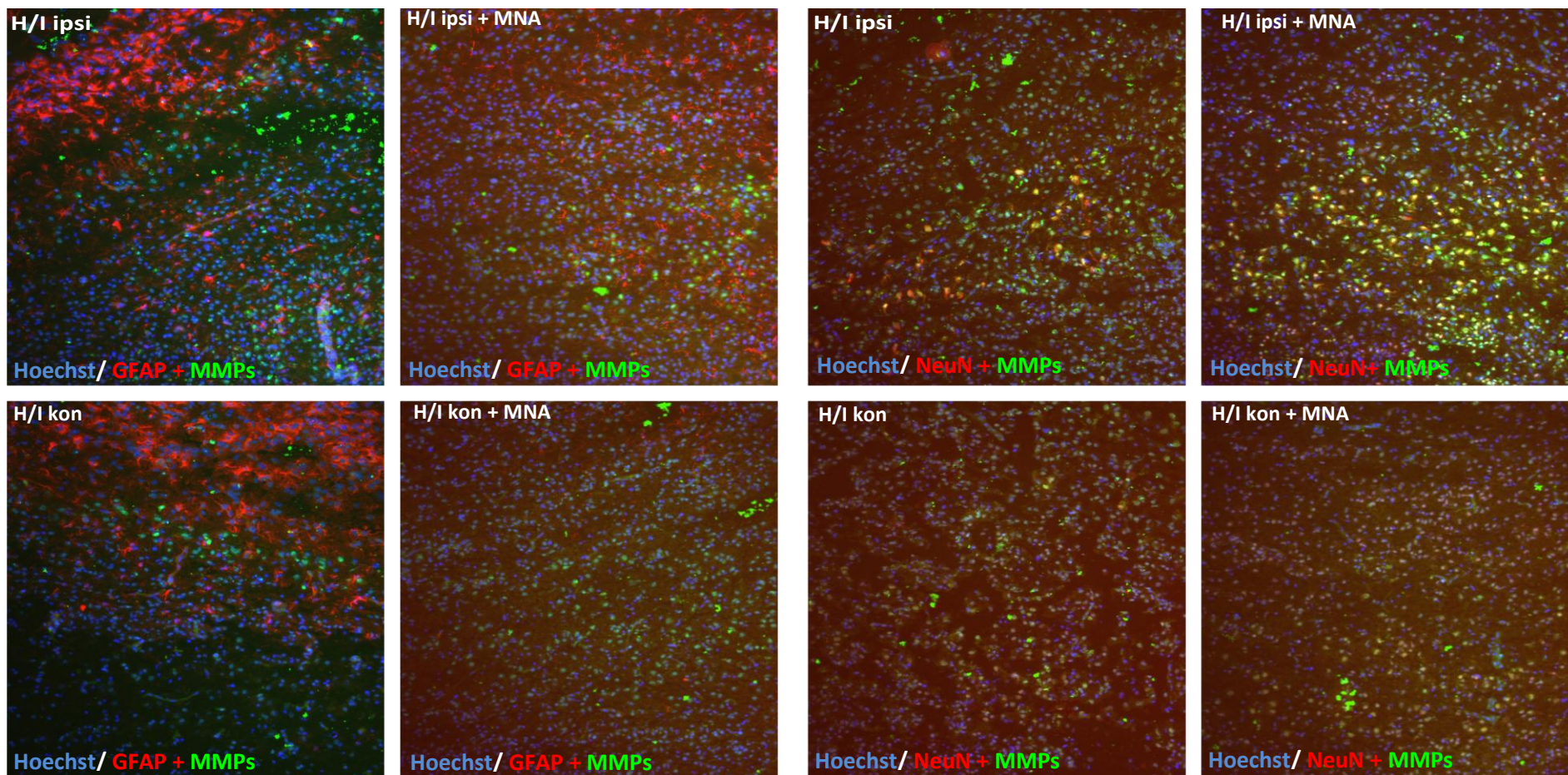
MNA wykazuje zdolność wiązania się do składników macierzy zewnątrzkomórkowej oraz może wpływać na ich przebudowę w sercu szczurów (zjawisko dokładniej opisane we Wstępie do tej rozprawy). Dlatego też postanowiono zbadać wpływ MNA na zmianę profilu aktywności metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (*ang. matrix metalloproteinases, MMPs*): dziewiątej (MMP9) oraz drugiej (MMP2) u osesków szczurzych, które przebyły asfiksję okołoporodową. Jak opisano w pracy Dragun i wsp. (2008) doświadczalna asfiksja okołoporodowa skutkowała znaczącym wzrostem aktywności MMP9 w 48 godzinie oraz po 7 dniach, powracającym do poziomu wyjściowego w 14 dniu od uszkodzenia. W przypadku MMP2 obserwowano słaby, ale stabilny wzrost jej aktywności od 24 godziny do 14 dnia od wystąpienia ischemii.

Ponieważ we wcześniejszych eksperymentach (podpunkt 4.5.1) wykazano, że MNA w dawce 62,5 mg/kg istotnie statystycznie hamuje rozwój uszkodzeń w badanym modelu, w dalszych doświadczeniach zastosowano wyłącznie taką dawkę. Zamieszczone na Ryc. 23 B wyniki zymografii żelowej wykazały, że w mózgu osesków po hipoksji/ischemii dochodzi do wzrostu aktywności MMP9 w półkuli ipsilateralnej, a MNA hamował znacząco ten wzrost aktywności po 48 godzinach. W przypadku MMP2 u zwierząt, którym podano MNA (Ryc. 23 A) po 14 dniach obserwowano znamieny wzrost aktywności MMP2, w porównaniu do grupy nieleczonej (sama hipoksja/ischemia). Podanie rozpuszczalnika (sól fizjologiczna) lub MNA zwierzętom z pozorowaną operacją – grupa sham pozostawało bez wpływu na aktywność MPPs (dane nie pokazane). Wyniki uzyskane metodą zymografii żelowej wskazują na indukowane epizodem niedokrwienym zmiany aktywności badanych MMPs (oraz zmianę ich aktywności przez MNA), nie zawierały informacji o poziomie aktywności endogennych metaloproteinaz *in situ*, prezentowanej w obecności ich specyficznych inhibitorów tkankowych. Dlatego, zbadano także wpływ MNA na aktywność żelatynolityczną *ex vivo* w skrawkach mózgu osesków po przebytej hipoksji/ischemii. Najbardziej istotne różnice między grupami leczonymi MNA i nieleczonymi zaobserwowano na zymogramach żelowych po 48 godzinach od zadziałania

bodźca uszkodzającego, dlatego też analizowano skrawki tylko w tym punkcie czasowym. Na Ryc. 24 przedstawiono aktywność MMPs w korze czołowej półkuli ipsi i kontrlateralnej zwierząt leczonych MNA. Barwienie uwidoczniało aktywację MMPs głównie w neuronach (komórki NeuN-pozytywne), chociaż obserwowano także kolokalizację z białkiem GFAP – markerem astrocytów. Nie zaobserwowano różnic w aktywności MMPs (objawiającej się zmianą poziomu zielonej fluorescencji) między zwierzętami leczonymi MNA a kontrolą.



Ryc. 23. Ocena aktywności MMP2 (A) i MMP9 (B) w półkuli ipsilateralnej w modelu asfiksji okołoporodowej szczurów poddanych leczeniu MNA (grupa MNA), w porównaniu do nieleczonych (HI), na podstawie densytometrycznego szacowania zymografii żelowej. Wykresy przedstawiają wielkości średnie \pm SD (n=5); **p<0,01 znacząco różne w porównaniu do grupy nielezionej poddanej ischemii (HI). Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-hoc Tuckey'a .

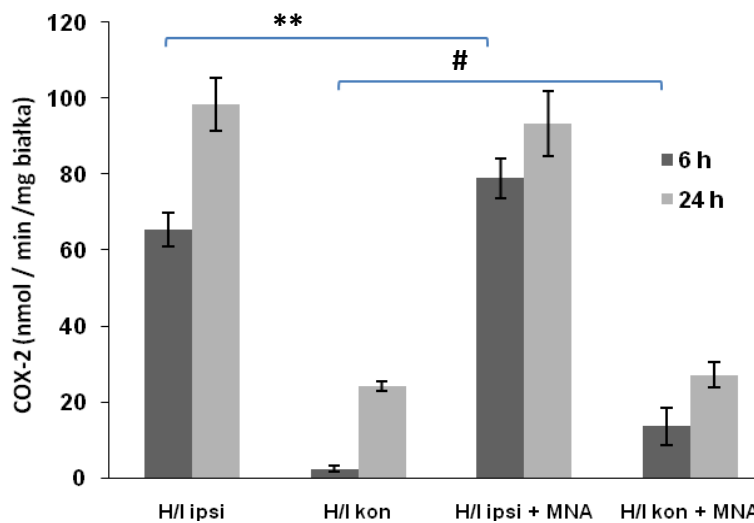


Ryc. 24. Oceana wpływu MNA na aktywność żelatynolityczną metaloproteinaz (MMPs) w półkulach ipsi (H/I ipsi) i kontralateralnej (H/I kon) w mózгах oseków poddanych hipoksji/ischemii wykonana metodą zymografii *in situ* – badania *ex vivo*. Zastosowano powiększenie x 20. Brak różnic między grupami.

4.5.8. Wpływ MNA na ekspresję cyklooksygenazy 2 (COX-2) w korze mózgu

7-dniowych szczurów poddanych hipoksji/ischemii

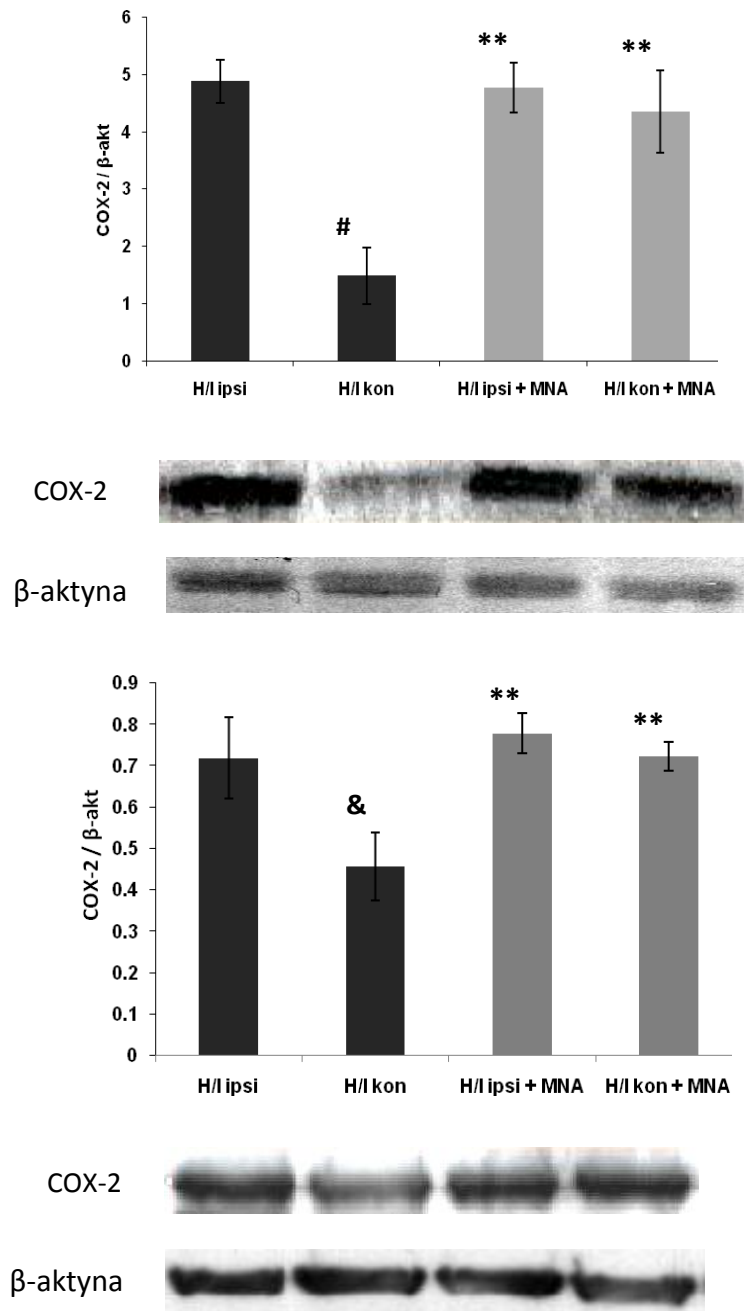
Prace, które ukazały się w latach 2007-2008 wskazują na powiązania mechanizmu cytoprotekcyjnego działania MNA na obwodzie z aktywnością COX-2 (Wstęp, podrozdział 1.4.2.1). W celu zbadania wpływu MNA na poziom białka i aktywność COX-2 u osesków szczurzych z wywołaną asfiksją podano testowany związek w dawce 62,5 mg/kg tuż po wystąpieniu ischemicznego bodźca. Następnie pobrano do badań materiał tj. korę mózgu w 6 oraz 24 godzinie od wystąpienia hipoksji/ischemii i oznaczono poziom oraz aktywność enzymatyczną COX-2. Jak zamieszczono na Ryc. 23 hipoksja/ischemia indukowała wzrost aktywności COX-2 w półkuli ipsilateralnej w porównaniu do kontrlateralnej w obu punktach czasowych. W 6 godzin po wystąpieniu epizodu ischemicznego w ipsilateralnej korze obserwowano wzrost aktywności COX-2, w porównaniu do półkuli kontrlateralnej. Podobny wzrost zanotowano 24 godziny później. Podanie MNA w dawce 62,5 mg/kg powodowało istotny statystycznie wzrost aktywności enzymatycznej COX-2 w porównaniu do półkuli ipsilateralnej jak i w kontrlateralnej w 6 godzin od wystąpienia hipoksji/ischemii (Ryc. 24).



Ryc. 24. Wpływ MNA na aktywność COX-2 w korze ipsilateralnej (H/I ipsi) i kontrlateralnej (H/I kon) mózgu osesków szczurzych w 6 oraz 24 godzinie po wystąpieniu hipoksji/ischemii. Badanie przeprowadzono z wykorzystaniem metody kolorymetrycznej. Wykresy stanowią średnią arytmetyczną z dwóch niezależnych doświadczeń \pm SD (n=6), **p<0,01 znamienne różnice w stosunku do grupy H/I ipsi, #<0,01 znamienne różnice w stosunku do grupy H/I kon. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-test Bonferroniego.

Jednocześnie wykazano, że podanie MNA wpływało na wzrost immunoreaktywności COX-2 w obrębie kontrlateralnej kory w 6 oraz 24 godziny od wystąpienia asfiksji. Podsumowując,

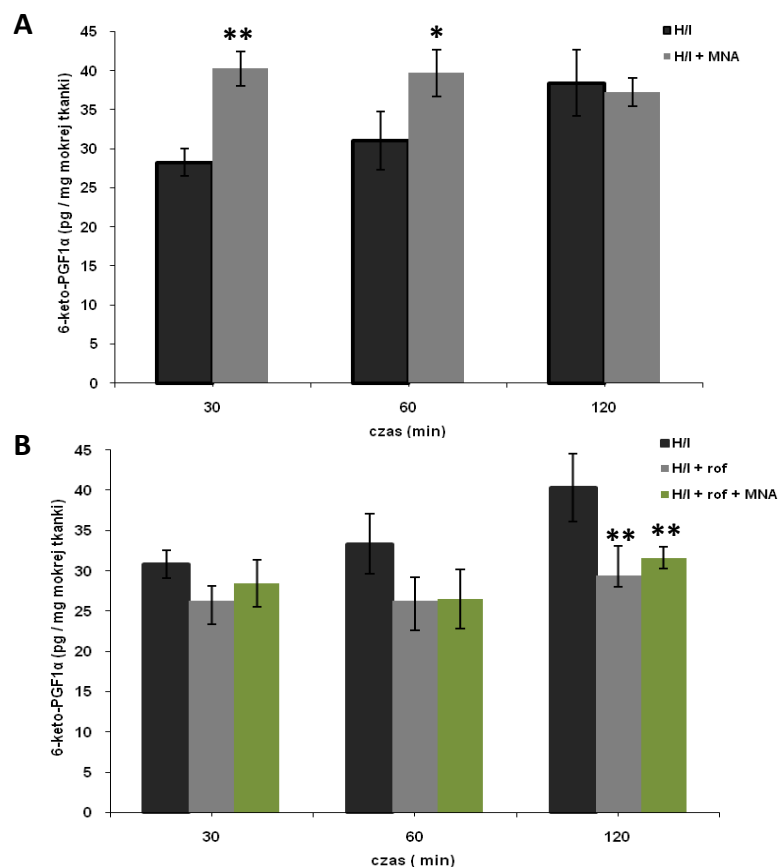
MNA powodował zarówno znaczący wzrost aktywności COX-2 jak i poziomu białka tego enzymu.

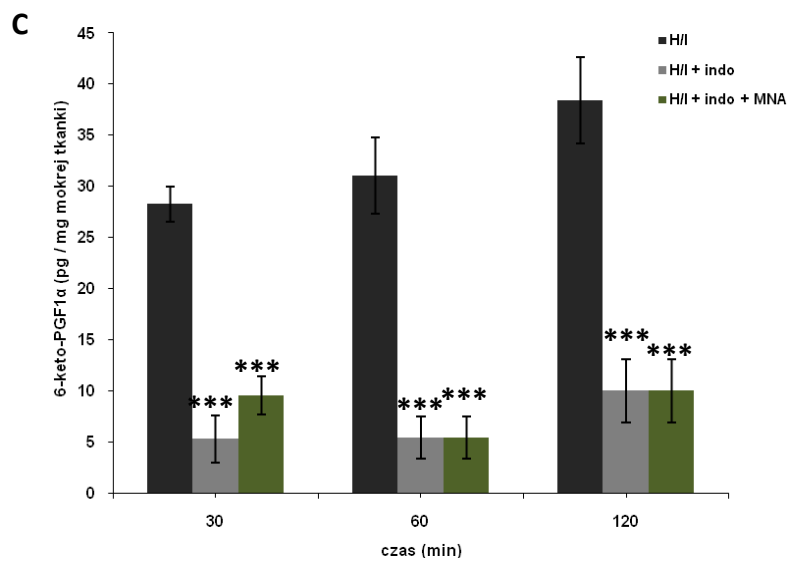


Ryc. 25. Wpływ dootrzewnowego podania MNA w dawce 62,5 mg/kg na poziom ekspresji COX-2 w 6 godzin (A) i 24 godziny (B) po wystąpieniu hipoksji/ischemii w półkuli ipsilateralnej (H/I ipsi) i kontralateralnej (H/I kon). Poziom białka COX-2 badano metodą Western blot. Wykres przedstawia wyniki analizy densytometrycznej normalizowane względem β-aktyny. Uzyskane wartości są średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń ± SD (n=4), **p<0,01 znamienne różne w stosunku do grupy H/I kon; #p<0,01; &p<0,05 znacząco różne w stosunku do grupy H/I ipsi. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-test Bonferroniego. Pod wykresami zamieszczono typowe obrazy Western blot.

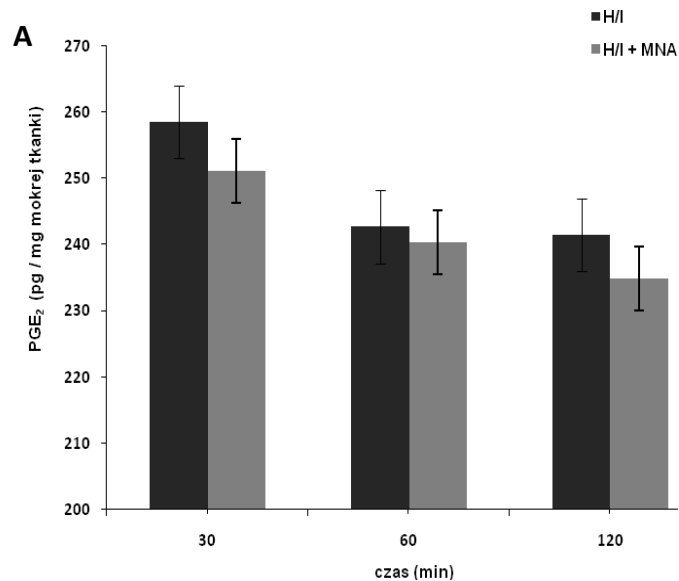
4.5.9. Badanie wpływu MNA na poziom syntezy prostanoidów w korze mózgu 7-dniowych oseków szczurzych poddanych hipoksji/ischemii

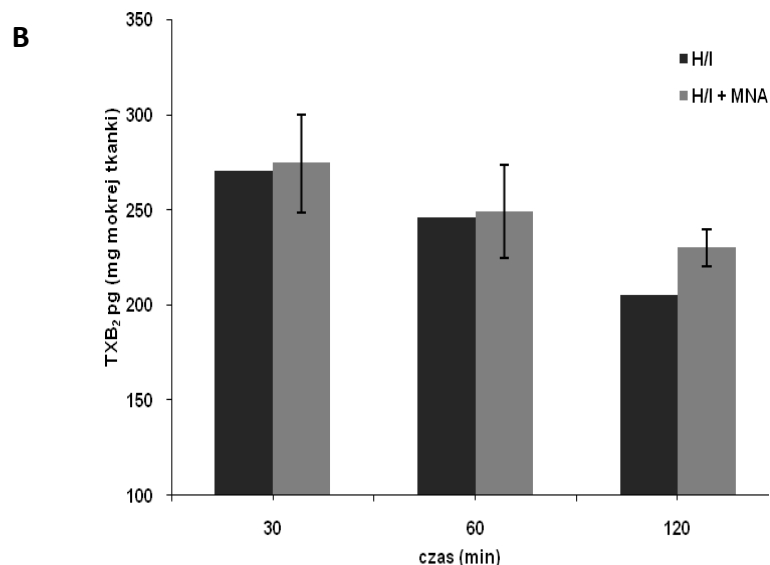
Przedmiotem odrębnym badań było określenie wpływu MNA na poziom syntezy prostanoidów: prostacykliny I₂ (PGI₂), prostaglandyny E₂ (PGE₂) oraz tromboksanu A₂ (TXB₂) w mózgzach 7-dniowych szczurów z wywołaną doświadczalnie asfiksją okołoporodową. Jak przedstawiono na Ryc. 25, MNA podany dootrzewnowo w neuroprotekcynnej dawce 65,2 mg/kg po indukcji niedokrwienia/niedotlenienia u szczurów powodował wzrost poziomu 6-keto-PGF_{1α} – stabilnej pochodnej PGI₂ w 30 i 60 minucie, licząc od zakończenia ischemii (Ryc. 25A). Aby sprawdzić jak zahamowanie aktywności cyklooksygenazy 1 (COX-1) oraz cyklooksygenazy 2 (COX-2) wpłynie na poziom 6-keto-PGF_{1α} stymulowany przez MNA, zastosowano nioselektywnego inhibitora COX- indometacynę oraz selektywnego inhibitora COX-2-rofecoxib. Zgodnie z danymi zamieszczonymi na Ryc. 25B i C, zarówno indometacyna jak i rofecoxib hamowały indukowany przez MNA wzrost poziomu 6-keto-PGF_{1α}. Podanie MNA nie wpłynęła w istotny statystycznie sposób na poziom PGE₂ oraz TXB₂- stabilnej pochodnej TXA₂ (Ryc. 26 A i B).





Ryc. 26. Ocena zawartości 6-keto-PGF_{1α} (A, B, C) w korze ipsilateralnej osesków szczurzych poddanych hipoksji/ischemii (H/I) - wpływ MNA. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z dwóch niezależnych doświadczeń ± SD (n=6); * p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001 znacząco różne w porównaniu do grupy H/I. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-hoc Bonferroniego.



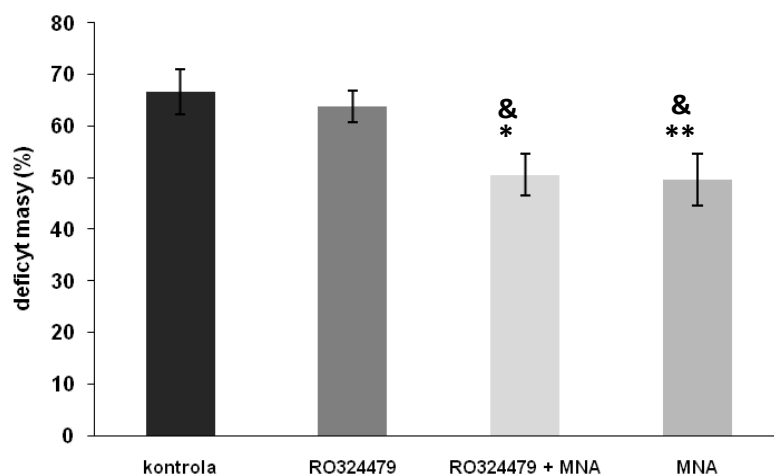


Ryc. 27. Ocena zawartości PGE₂ (A) oraz TXB₂ (B) w korze ipsilateralnej osesków szczurzych poddanych hipoksji/ischemii (H/I) - wpływ MNA. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z dwóch niezależnych doświadczeń ± SD (n=6). Nie stwierdzono różnic między grupami.

4.5.10. Ocena wpływu inhibitora receptora prostacyklinowego IP-RO324479 na działanie neuroprotecyjne MNA u 7-dniowych szczurów poddanych hipoksji/ischemii

Doświadczenia wykonane w podpunkcie 4.5.6. wykazały, że MNA podany dootrzewnowo indukuje wzrost poziomu PI₂ u 7-dniowych osesków szczurzych z wywołaną hipoksją/ischemią w 30 i 60 minucie pomiaru. Dlatego też postanowiono sprawdzić, czy blokada receptora prostacyklinowego zniesie neuroprotektoryjny efekt MNA.

Wyniki eksperymentu przedstawione na Ryc. 28 wykazały, że podanie inhibitora receptora IP- RO324479 w dawce 10 mg/kg nie ma do statystycznie znaczącego wpływu na ubytek masy półkuli ipsilateralnej, zarówno w kontroli jak i w grupie traktowanej MNA w dawce 62,5 mg/kg. W grupie leczonej MNA uzyskano wcześniej już opisywaną neuroprotekcję – zmniejszenie ubytku masy o około 16% w stosunku do nieleczonej, ipsilateralnej półkuli. Reasumując, podanie RO324479 nie miało wpływu na neuroprotektoryjne działanie MNA, co może świadczyć o innych, niezwiązanych z aktywacją receptora prostacyklinowego (IP) potencjalnie protekcyjnych mechanizmach aktywowanych przez MNA.



Ryc. 28. Wpływ inhibitora receptora prostacyklinowego IP- RO324479 na uszkodzenie mózgu wywołane przez hipoksję–ischemię oraz na neuroprotekcyny działanie MNA. Wykres przedstawia wartości średnie \pm SD (n=10), dane wyrażają ubytek masy półkuli ipsilateralnej w stosunku do kontralateralnej, wyrażone w %; *p<0,05 **p<0,01 znaczące różne w porównaniu do półkuli kontrolnej (uszkodzonej); & p<0,05 w porównaniu do grupy RO324479. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test Anova oraz post-hoc Bonferroniego.

V. Dyskusja

5.1. Wprowadzenie

Wyniki przedstawione w tej rozprawie nie potwierdziły doniesień o toksycznym wpływie MNA na neurony dopaminergiczne w mózgu *in vivo*, nie stwierdzono także ostrego działania neurotoksycznego na neurony glutaminianergiczne w hodowli pierwotnej. Z drugiej strony badania wykazały, że MNA wywiera działanie neuroprotekcyjne na mózg noworodków szczurzych poddanych hipoksji – ischemii lub ekscytotoksyczności indukowanej farmakologicznie. Próba wyjaśnienia mechanizmów tego efektu nie potwierdziła pierwotnych hipotez roboczych o działaniu antyekscytotoksycznym MNA poprzez bezpośrednie hamowanie receptorów NMDA lub wzrost aktywności receptorów GABA_A. Badania dostarczyły jednak wstępnych danych, wskazujących na możliwość nowych dróg ochronnego działania tej substancji, poprzez modulację szlaków przemian pochodnych kwasu arachidonowego w mózgu.

W niniejszym rozdziale postaram się przedstawić rozwój koncepcyjny badań, przeciwstawić wyjściowe koncepcje uzyskanym wynikom i zademonstrować końcową interpretację, jako wynik tej konfrontacji. Analiza uzyskanych wyników zwykle jest poprzedzona przedyskutowaniem trafności wyboru zastosowanych metod. Jednak przedstawiona rozprawa cechuje się dość znaczną różnorodnością zastosowanych metod, dobieranych często *ad hoc* w trakcie rozwoju badań. Z tego względu omówienie metod zostało rozproszone, a dyskusja każdej grupy wyników została poprzedzona wprowadzeniem, wyjaśniającym genezę tego etapu badań oraz dobór metod.

5.2. Neurotoksyczność 1-metylnikotynamidu w świetle danych literaturowych oraz badań własnych

Pierwotnym zamierzeniem omawianych badań było określenie działania MNA na przebieg procesów związanych z nadmiernym pobudzeniem receptorów dla glutaminianu, jak niedokrwienie mózgu, ze szczególnym uwzględnieniem zamartwicy noworodków. Wynikało to z oczekiwań, że MNA wykaże się właściwościami neuroprotekcijnymi podobnymi do substancji macierzystej, nikotynamidu (Chong i wsp., 2002; Maiese i Chong, 2003). Jednak niezbędnym wstępnym etapem badań okazała się ocena neurotoksyczności

tego związku w zastosowanych układach doświadczalnych, a zwłaszcza w mózgu *in vivo*. Do tego skłoniły mnie dostępne dane z literatury, wskazujące na toksyczne działanie MNA na neurony o fenotypie dopaminergicznym (Fukushima i wsp., 1995, 2002; Williams i Ramsden_{a,b,c,d}, 2005). Proponowany mechanizm toksyczności MNA, stanowiący w istocie kopię opisu neurotoksykologicznego działania MPP+, został już przedstawiony w rozdziale Wstęp, podrozdział 1.4.2.2., dlatego w tym paragrafie skupię się głównie na analizie otrzymanych danych eksperymentalnych. Z oczywistych powodów w tych badaniach zastosowałam MPP+ jako toksynę referencyjną. MPP+ stanowi aktywny metabolit MPTP (1-metyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydiny) szeroko stosowany w modelach zwierzęcych do indukcji eksperymentalnej choroby Parkinsona (Yazdani i wsp., 2006). Zgodnie z danymi literaturowymi MPP+ po domózgowym podaniu wywołuje degeneracje neuronów dopaminergicznych w ipsilateralnej istocie czarnej (Sayre i wsp., 1986; Banerjee i wsp., 2007). Rozmiar uszkodzenia określałam na podstawie ubytku liczby neuronów dopaminergicznych w rejonie istoty czarnej. Do ujawnienia neuronów reagujących z przeciwciałem przeciw hydroksylazie tyrozynowej (TH-pozytywnych) zastosowano standardową metodę immunocytochemiczną. Ponadto preparaty wybarwiałam na obecność komórek mikrogleju przy użyciu specyficznej lektyny z *Bandeirea simplicifolia* wyznakowanej fluorescencyjnie.

Wybrana droga podania MPP+ i MNA w postaci iniekcji domózgowej, a nie obwodowo - dootrzewnowo wynika z niskiej przepuszczalności bariery krew – mózg dla obu badanych substancji (Erb i wsp., 1999). Ten powód stracił częściowo na wartości w odniesieniu do mózgu w rozwoju, w świetle wyników własnych wskazujących na przenikanie MNA wstrzykniętego obwodowo do mózgu osesków szczurzych (Ryc. 1B). Ten wątek będzie przedyskutowany w dalszej części rozdziału.

Zapewnienie obu badanych substancjom, zarówno MPP+ jak i MNA, wstrzykniętym do istoty czarnej zbitej swobodnego dostępu do neuronów dopaminergicznych legitymizuje wnioski wyciągnięte z tych eksperymentów, wskazujące na praktyczny brak neurotoksyczności MNA. Moje badania nie wykazały u dorosłych szczurów objawów toksyczności MNA aplikowanego jednostronnie do istoty czarnej zbitej, w porównaniu do grupy referencyjnej z uszkodzeniami, którą stanowiły zwierzęta poddane iniekcji MPP+. Zgodnie z oczekiwaniami, wstrzyknięcie MPP+ wywołało ubytek liczby neuronów

dopaminergicznych w ipsilateralnej istocie czarnej rzędu 50%. Dodatkową ważną informacją wydaje się być obserwacja, że podaniu MNA nie obserwowano aktywacji komórek mikrogleju w miejscu podania. W przeciwieństwie do tego wyniku, zgodnie z obserwacjami innych badaczy (Miwa i wsp., 2004), MPP+, powodował znamienne aktywację mikrogleju w miejscu uszkodzenia.

Brak toksycznych właściwości MNA wobec neuronów dopaminergicznych dodatkowo potwierdzono w powszechnie stosowanym teście behawioralnym określającym stopień uszkodzenia ipsilateralnej istoty czarnej (Liou i wsp., 1996). Zgodnie z oczekiwaniami podanie apomorfiny zwierzętom poddanym iniekcji MPP+ wywoływało rotacje w kierunku kontrlateralnej istoty czarnej. U zwierząt, którym wstrzyknięto MNA nie obserwowano obrotów wymuszonych podaniem tego agonisty receptorów dopaminowych D2. Na podstawie testu z apomorfiną można także pośrednio wnioskować o wpływie MPP+ i MNA na poziom dopaminy. Ogólnie przyjmuje się, że dopiero ubytek poziomu dopaminy przekraczający 90% daje pozytywne wyniki w tym teście (Hudson i wsp., 1993). Trudno ocenić dokładnie, jak wykazany w tej pracy ubytek neuronów TH-pozytywnych w mózgu szczurów po iniekcji MPP+ rzędu 50% wpływa na stopień ubytku zawartości dopaminy. Jeśli jest prosta zależność między tymi wielkościami, to uzyskane przeze mnie wyniki sugerują, że test apomorficzny może być czulszy niż się to ogólnie przyjmuje i daje wyniki pozytywne nawet przy mniejszych ubytkach poziomu dopaminy.

W dotychczas omówionych wynikach wykazano, że MNA nie jest związkiem toksycznym dla dopaminergicznych neuronów w obrębie istoty czarnej mózgu u dorosłych szczurów. Jednak głównym obiektem badań w tej rozprawie nie były dojrzałe szczury, ale 7-dniowe oseski. W konsekwencji, następnym etapem badań było ocenienie toksyczności MNA w niedojrzałym mózgu szczura. Badanie przeprowadzono, jak opisano powyżej dla dojrzałych szczurów, stosując MPP+ jako toksynę referencyjną. Zgodnie z danymi z literatury (Kirschner i wsp. 1996), podanie MPP+ bezpośrednio do prądkowia osesków szczurzych wywołał uszkodzenie neuronów dopaminergicznych wyrażające się obniżeniem poziomu immunoreaktywności hydroksylazy tyrozynowej w rejonie ipsilateralnego prądkowia. Natomiast wstrzyknięcie MNA nie miało żadnego znaczącego wpływu na ten wskaźnik. Ponadto nie stwierdziłam oznak toksyczności MNA do stężenia 50 mM w warunkach *in vitro* w hodowli pierwotnej neuronów, które były użyte w dalszych częściach rozprawy w badaniach neuroprotekcijnego działania MNA.

Specyficzną dla rozwijającego się mózgu odmianą działania neurotoksycznego jest opisany w pracach Ikonomidou i wsp. (2009) wpływ proapoptotyczny wielu substancji skąd inąd mogących ochraniać mózg przed uszkodzeniem wywołanym przez ischemię, jak antagoniści receptorów NMDA lub agoniści receptorów GABA (Ikonomidou, 2009). Nowe wyniki badań z naszej pracowni (Makarewicz, dane nieopublikowane) potwierdziły takie toksyczne działanie MK-801 na mózg 7-dniowych szczurów, co wyrażało się zmniejszeniem masy mózgu w porównaniu do zwierząt nieleczonych. Z moich badań wynika (dane niezamieszczone w rozprawie), że MNA podany bezpośrednio do prądkowia 7-dniowych osesków nie powodował ubytku masy tkanek mózgu ocenianego po upływie 2 tygodni. Także jednorazowe obwodowe podanie MNA w dawkach indukujących neuroprotekcję (30 – 60 mg/kg masy ciała) oraz wyższych 125 i 250 mg/kg nie powodowało ubytku masy mózgu (dane nie pokazane w rozprawie). Ponadto podanie domózgowe znacznie wyższych (nieprotektoryjnych) dawek zgodnie z zamieszczonym wyżej opisem nie powodowały ubytku w masie półkul mózgowych. Potwierdza to brak uchwytne ostrego działania neurotoksycznego MNA także w rozwijającym się mózgu.

Reasumując, dotychczasowe obserwacje, nie wykazały ostrego neurotoksycznego działania MNA zarówno na neurony dopaminergiczne w mózgu szczurów dojrzałych i 7-dniowych osesków, jak i na neurony glutaminianergiczne w hodowli pierwotnej *in vitro*. Zaobserwowany w tej pracy brak efektów neurotoksycznych MNA można interpretować jako efekt ograniczonej biodostępności tej substancji. Pojawiło się więc pytanie o możliwość przenikania tego związku do mózgu, a następnie do neuronów w zastosowanych modelach doświadczalnych. Przeprowadzone przeze mnie doświadczenia przy użyciu metody HPLC wykazały, że MNA wstrzyknięty dootrzewnowo osiągał wykrywalne stężenia zarówno w surowicy, jak i w obrębie mózgu. Co ważniejsze, te wartości były zależne od zastosowanej dawki i czasu. Dynamika zmian stężeń MNA w obu badanych przedziałach wskazywała na przemieszczenie się MNA z krwioobiegu do mózgu. Jest to obserwacja istotna z punktu widzenia biologicznych właściwości MNA. MNA należy do grupy kationów organicznych o dużej masie cząsteczkowej, co praktycznie uniemożliwia przenikanie tego związku poprzez dojrzałą barierę krew-mózg (Erb i wsp., 1999). W literaturze znalazłam jedynie wzmiankę o możliwości przenikania MNA przez barierę krew – płyn mózgowo – rdzeniowy w rejonie splotu podpajęczynówkowego (Strazielle i wsp., 2004). Z tego powodu autorzy rozważający możliwość zastosowania terapeutycznego MNA, jako inhibitora wypływu z mózgu cholin,

eksperymentowali z wykorzystaniem proleku, pochodnej MNA swobodnie przechodzącej przez barierę krew – mózg (Erb i wsp. 1999). Potwierdzenie obecności MNA w mózgu 7-dniowych szczurów po podaniu dootrzewnowym świadczy o tym, że nie w pełni dojrzała bariera krew – mózg nie stanowi przeszkody w przenikaniu MNA do mózgu. Popierają tę konkluzję poprzednie obserwacje z naszej pracowni, wskazujące na neuroprotekcyjne działanie w modelu hipoksji/ischemii 7-dniowych osesków szczurzych substancji nominalnie nie przenikających przez dojrzałą barierę krew – mózg, to jest inhibitora receptorów rianodynowych - dantrolenu i niespecyficznego agonisty mGluR ABHxD-I (Makarewicz i wsp., 2006_{a,b}). Te wyniki wskazują, że zwierzęta z niedojrzałą barierą krew-mózg są odpowiednim modelem do badania nie tylko toksyczności ale i neuroprotekcji wywołanej przez MNA podawany obwodowo, co będzie przedmiotem dalszych rozważań.

Dalsze doświadczenia zmierzające do wykazania zdolności MNA do wnikania do wnętrza komórek, przeprowadzone *in vitro* na hodowlach komórkowych, wykazały pobieranie MNA zarówno przez neurony ziarniste mózdzku w hodowli pierwotnej, jak i przez komórki linii RBE-4, wyprowadzonej ze śródbłonna naczyń mózgu szczura. Uważa się, że linia komórek RBE-4 użyta do badań nad przenikaniem MNA posiada wiele fizjologicznych właściwości natywnego śródbłonna naczyń mózgowych, w tym brak przepuszczalności dla cząsteczek, które w warunkach fizjologicznych *in vivo* nie przekraczają bariery-krew mózg (BBB) (Roux i wsp., 2005). W związku z tym za zaskakujący uważam wynik, wskazujący na słabe, ale mierzalne po godzinnej inkubacji pobieranie MNA przez te komórki. Zgodnie z danymi literaturowymi, w których opisano swobodne przenikanie NAM przez BBB w linii RBE-4 obserwowałam znacznie wyższy, w porównaniu z MNA poziom znakowanego nikotynamidu w komórkach, co jest zgodne ze znaną niezbędnością tego związku dla prawidłowego metabolizmu mózgu. Zależne od czasu i dawki pobieranie MNA przez komórki ziarniste mózdzku można przypuszczalnie wiązać z działaniem obecnego w błonach plazmatycznych neuronów systemu transporterów dla kationów organicznych OCT1, 2 lub 3 (Mehrens i wsp., 2000; Lee i wsp., 2001; Shang i wsp., 2003). Należy zwrócić uwagę na wykazane w tej pracy znacznie szybsze nagromadzenie w badanych neuronach NAM w porównaniu do MNA. Po 15 min inkubacji obserwowano już plateau nagromadzenia NAM. Podobnie jak w przypadku komórek RBE-4, ta przewaga pobierania NAM nad MNA jest zrozumiała, uwzględniając normalne zapotrzebowanie neuronów na nikotynamid, niezbędnego kofaktora wielu procesów metabolicznych.

Dla wykazania, czy NAM nagromadzany w neuronach mózgu może być *in situ* przekształcany w MNA dzięki aktywności metyltransferazy nikotynamidowej (NNMT), zbadano ekspresję mRNA NNMT w różnych okolicach mózgu szczurów dojrzałych i osesków szczurzych. Zarówno w mózgu szczurów dojrzałych jak i osesków wykazano obecność mRNA specyficznego dla metyltransferazy nikotynamidowej (NNMT). Są to wyniki zgodne z doniesieniami Williams i Ramsden_{a,b,c,d} (2005) o obecności mRNA dla NNMT w neuronach oraz Fukushima i wsp. (2002), którzy wykazali aktywność tego enzymu w mózgu szczura. Ponieważ do badań nie zastosowano metody real time PCR nie można było przeprowadzić dokładnej analizy ilościowej pomiędzy młodymi a dorosłymi zwierzętami. Innym ograniczeniem w ocenie aktywności NNMT w mózgu było oparcie się wyłącznie na danych z literatury (Fukushima i wsp., 2002). Jednakże uzyskane wyniki własne i dane z literatury kolektywnie potwierdzają możliwość syntezy MNA *de novo* w mózgu, co z kolei może stanowić wsparcie dla hipotezy obciążającej endogenny MNA powstający w mózgu w przypadku dużej podaży NAM przewlekłym działaniem toksycznym wobec neuronów dopaminergicznych (Williams i Ramsden_{a,b,c,d}, 2005).

Reasumując, uzyskane w tej części rozprawy wyniki wykazały zdolność MNA podawanego obwodowo do wnikania do mózgu 7-dniowych osesków szczurzych, a także do przechodzenia do wnętrza neuronów. Uzyskano także wyniki wskazujące na możliwość syntezy MNA *de novo* w mózgu szczura. Nie wykazano natomiast objawów ostrej neurotoksyczności MNA zarówno wobec neuronów dopaminergicznych w mózgu *in vivo*, jak i *in vitro* wobec glutaminianergicznych neuronów ziarnistych mózdzku w hodowli pierwotnej. Te wyniki nie wykluczają jednak możliwości, że w warunkach przewlekłej wysokiej podaży NAM może dochodzić do nadprodukcji MNA w neuronach dopaminergicznych i do rozwinięcia się przewlekłej toksyczności, w sprzyjających warunkach mogącej się przyczyniać do rozwoju choroby Parkinsona.

5.3. Potencjał neuroprotekcyny 1-metylnikotynamidu *in vivo* w modelu hipoksji/ischemii 7-dniowych szczurów

W pierwszym etapie testowania potencjału neuroprotekcynowego MNA podjęłam się badań *in vivo*, korzystając z modelu hipoksji/ischemii 7-dniowych osesków szczurzych. Zastosowanie tej właśnie formy niedokrwienia mózgu w rozwoju wynikało z szeregu powodów. Modelowa asfiksja okołoporodowa u szczurów była poprzednio użyta przez

innych autorów przy badaniu działania neuroprotekcynnej substancji referencyjnej, NAM (Feng i wsp., 2006). Ten model badawczy nie był jednak użyty w badaniach dotyczących MNA. Ponadto ważnym argumentem zdecydowanie przemawiającym na rzecz podjęcia badań na niedojrzałym mózgu była przedyskutowana powyżej obserwacja własna, że MNA przenika przez nie w pełni dojrzałą barierę krew – mózg do tkanek mózgu, podczas gdy mózg zwierząt dojrzałych jest odcięty od działania MNA podawanego obwodowo (Vargas i wsp., 1996).

Należy także uwzględnić to, że zastosowany model hipoksji/ischemii mózgu szczurów w 7 dniu życia odpowiada patologii okołoporodowej obserwowanej w klinice. Zgodnie z danymi literaturowymi mózg 7-dniowego szczurka rozwojowo odpowiada mózgowi ludzkiego noworodka (Palmer i wsp., 1990). Ekspozycja noworodków szczurzych na warunki hipoksyjno-ischemiczne (zamknięcie tętnicy i 65 minutowa hipoksja) powoduje w mózgowiu badanych zwierząt uszkodzenie w rejonie unaczynionym przez końcowe odgałęzienia tętnicy szynnej wspólnej, w tym tętnicy środkowej mózgu. Uszkodzenie obejmuje korę, hipokamp, wzgórze i prążkowie (Koike i wsp., 2008). W naszych eksperymentach ubytek masy półkuli po stronie poddanej ischemii, wyrażony w stosunku do kontrolnej półkuli kontrlateralnej, badany dwa tygodnie po doświadczalnej asfiksji, wynosił średnio 51% u zwierząt nieleczonych. Wykazano więc, że poddanie siedmiodniowych szczurów eksperymentalnej hipoksji-ischemii powoduje rozległe uszkodzenie, którego rozmiar i lokalizacja odpowiada skutkom ciężkiej asfiksji okołoporodowej obserwowanej w neonatologii.

Badając zagadnienie neuroprotekcji indukowanej przez MNA nie sposób pominąć kwestii związanej z opisywanym w literaturze neuroprotekcynnym potencjałem jego związku prekursorowego – nikotynamidu (NAM). Wiadomo z literatury, że NAM zmniejsza obszar uszkodzenia i poprawia parametry hemodynamiczne w obrębie mózgu we wszystkich zastosowanych modelach eksperymentalnej ischemii u szczurów, przy czym skuteczność NAM obserwowano po jego podaniu nawet do 6 godzin po wywołaniu niedokrwienia mózgu (Ayoub i wsp., 2002; Yang i wsp., 2004). Mechanizm tego działania neuroprotekcynnego NAM wydaje się być bardzo złożony i zróżnicowany. Wykazano, że NAM m. in. zapobiegał deenergizacji mitochondriów oraz chronił przed szkodliwym działaniem wolnych rodników, hamował aktywność PARP oraz zależną od kaspaz indukcję apoptozy (zagadnienie dokładniej opisane we Wstępie). Ochronne działanie NAM w modelu asfiksji okołoporodowej zostało

opisane przez Fenga i wsp. (2006). W tej pracy opisano ochronne działanie NAM, w znanej już wcześniej z literatury, neuroprotektoryjnej dawce 500 mg/kg. W omawianej pracy oseski poddano leczeniu NAM dwukrotnie: bezpośrednio po ischemii oraz 6 godzin później, co w rezultacie zmniejszało ubytek masy półkuli ipsilateralnej oceniany w 22 dniu po wywołaniu hipoksji/ischemii. Dane uzyskane w niniejszej rozprawie potwierdziły neuroprotektoryjne działanie NAM, zarówno w dawce 500 mg/kg, jak i 250 mg/kg. Niewielkie różnice metodyczne między naszymi badaniami a pracą Fenga i współpracowników polegały na stosowaniu przez nas wyłącznie jednorazowego podania NAM (podobnie jak MNA), oraz ocenie wielkości lezji 14 dni po hipoksji / ischemii, co jest standardowym postępowaniem w tym modelu doświadczalnym. Bez względu na drobne różnice, zgodność naszych wyników z danymi opisanymi w literaturze potwierdza wartość stosowanego modelu doświadczalnego.

Badanie neuroprotektoryjnego działania MNA wykazało, że ta substancja w porównaniu do prekursora - NAM, powodowała zmniejszenie ubytku masy półkuli ipsilateralnej w znacznie niższych dawkach, a mianowicie 31,25 i 62,5 mg/kg, jednocześnie nie wykazując ochronnego działania w wyższych dawkach. Obserwowano wręcz tendencję do pogłębienia rozległości uszkodzenia w przypadku dawki 250 mg/kg. Być może wąski, wręcz subtelny zakres działających stężeń MNA związany jest z aktywacją zupełnie innych szlaków wiodących ku przeżyciu komórek w rejonie niedokrwienia, niż te zaangażowane w neuroprotekcję powodowaną przez NAM. Nasze wyniki wykazały, że MNA (w dawce neuroprotektoryjnej), podobnie jak jego prekursor NMA (Feng i wsp., 2006) zmniejszały poziom aktywnej kaspazy 3. Te wyniki mogłyby świadczyć, że za hamowanie przez NAM zależnego od kaspaz szlaku apoptozy może częściowo odpowiadać MNA. Jednakże to zagadnienie wymaga dalszych badań. Należy w nich uwzględnić złożoność procesów zachodzących w dojrzewającym mózgu, gdzie naturalnie dochodzi do usuwania "niepotrzebnych" lub nieprawidłowo funkcjonujących neuronów na drodze apoptoz w okresie rozwojowym.

W modelowej asfiksji okołoporodowej, podobnie jak w innych postaciach niedokrwienia mózgu, obniżenie temperatury mózgu hamuje rozwój uszkodzeń neuronów wywołanych niedokrwieniem (Bona i wsp. 1997, Caputa i wsp. 2001, Taylor i wsp. 2002, Shankaran i Laptok 2003). Bona i wsp. (1998), stosując model asfiksji okołoporodowej u 7-dniowych szczurów, analogiczny do użytego w tej rozprawie zaobserwowali, że umiarkowana

hipotermia w ciągu pierwszych 6 godzin po hipoksji - ischemii działa ochronnie na mózg, zmniejszając stopień uszkodzenia neuronów. Oprócz klasycznych badań morfologicznych znalazło to także potwierdzenie w testach behawioralnych. Dietrich i wsp. (1993) stwierdzili, że u zwierząt dorosłych hipotermia wydłuża czas otwarcia tzw. okna terapeutycznego dla zastosowania różnych strategii leczenia skutków ischemii. Długotrwałość utrzymywania się neuroprotekcji w niektórych modelach niedokrwienia jest jednak sporną sprawą. Jak twierdzą Dietrich i wsp. (1993), u dorosłych szczurów neuroprotektoryjne działanie hipotermii było znaczące 3 dni po ischemii, zauważalne 7 dni po ischemii, a ostatecznie zanikało, gdy badanie przeprowadzono 2 miesiące po niedokrwieniu. Są badacze wiążący neuroprotektoryjne działanie NAM w zwierzęcych modelach ischemii ze zjawiskiem indukcji hipotermii spowodowanej zahamowaniem aktywności nNOS (Faqi i wsp. 2004). Badanie neuroprotektoryjnego działania MNA (i NAM) wymagało więc przeprowadzenia pomiarów, umożliwiających wykluczenie lub potwierdzenie roli obniżenia temperatury ciała w wyniku podania tych substancji. Wyniki naszych eksperymentów nie wykazały obniżenia temperatury po podaniu zarówno NAM jak i MNA przez 8 godzin, licząc od początku hipoksji/ischemii. Uwzględniając przypuszczalny udział hamowania nNOS w mechanizmie hipotermii (Feng i wsp. 2004), zaobserwowany przez nas brak indukcji hipotermii poischemicznej po podaniu MNA pozostaje w zgodzie z danymi świadczącymi o braku wpływu tego związku na aktywność NOS (Chlopicki i wsp., 2007). Wynik negatywny otrzymany w przypadku zastosowania NAM jest zgodny z danymi opublikowanymi przez Feng i wsp. (2006), i może po części być związany z nie do końca rozwiniętym procesem termoregulacji u osesków szczurzych.

5.4. Wpływ 1-metylnikotynamidu na zjawisko ekscytotoksyczności związane z aktywacją receptorów NMDA *in vivo* i *in vitro*

Procesem nieodłącznie towarzyszącym hipoksji/ischemii jest zahamowanie produkcji związków wysokoenergetycznych w tym ATP, które prowadzi do depolaryzacji błony komórkowej neuronów i astrogleju, a w rezultacie do uwolnienia glutaminianu do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Z powodu załamania bilansu energetycznego nie dochodzi do jego wychwytu zwrotnego. Te procesy prowadzą do nadmiernego pobudzenia receptorów glutaminianergicznych, zwłaszcza receptorów NMDA (Dirnagl i wsp., 1999). To zjawisko określane jako ekscytotoksyczność odgrywa kluczową rolę w mechanizmie uszkodzenia neuronów mózgu wywołanego przez niedokrwienie. Świadczy o tym

neuroprotektoryjne działanie antagonistów receptorów NMDA w wielu modelach niedokrwienia mózgu. Dlatego pierwsza nasuwająca się hipoteza robocza tłumacząca mechanizm zaobserwowanego przez nas działania neuroprotektoryjnego MNA w hipoksji/ischemii mózgu wskazywała na możliwość hamowania przez ten związek ekscytotoksyczności, w której pośredniczą receptory NMDA. Dla jej weryfikacji w tej pracy zostały zastosowane modele toksyczności wymierzonej w neurony *in vivo* i *in vitro*, indukowanej przez selektywnego agonistę tych receptorów.

Wiadomo, że podanie domózgowe NMDA skutkuje rozległymi uszkodzeniami w obrębie kory, hipokampa oraz innych struktur (Wang i wsp., 2005). W tej rozprawie zaobserwowano silne neurotoksyczne działanie NMDA w mózgu 7-dniowych szczurów. Wiadomo, że nadmierne pobudzenie receptorów NMDA może być szczególnie szkodliwe w rozwijającym się mózgu, co wynika ze specyfiki składu podjednostkowego receptorów NMDA w tym okresie rozwojowym. U osesków w ciągu pierwszych 2 tygodni życia dominują receptory typu NR1/NR2B, podczas gdy u zwierząt dorosłych występują głównie podjednostki NR1/NR2A (Gurd i wsp., 2002; Dingledine i wsp., 1998). Odmienny skład podjednostkowy warunkuje u niedojrzałych zwierząt podwyższoną wrażliwość na glutaminian oraz wzmożony napływ Ca^{2+} związany z ekscytotoksyczną aktywacją receptorów NMDA. Sugerowano także, że silniejsza odpowiedź na NMDA obserwowana w mózгах siedmiodniowych szczurów może być efektem występowania różnic w regulacji receptora NMDA, w szczególności wiązano ten efekt ze słabszym działaniem zależnego od potencjału bloku magnezowego kanału NMDA (Tsumoto i wsp. 1987, Ben-Ari i wsp. 1988). Te okoliczności wskazują, że potencjalni antagoniści receptorów NMDA mogą wykazywać działanie neuroprotektoryjne zarówno w niedokrwieniu mózgu, jak i w modelach ekscytotoksyczności wywołanej przez agonistów tych receptorów. Jak przedstawiono w rozdziale Wyniki, w obecnej pracy podanie MNA w sposób zależny od dawki zmniejszało obszar uszkodzenia wywołanego domózgowym podaniem NMDA. Badanie oceniające uszkodzenie mózgu i neuroprotekcję prowadzono 5 dni po podaniu ekscytotoksyny, w okresie pełnego rozwinięcia się uszkodzenia w mózgu. Te wyniki popierały więc testowaną hipotezę o możliwości hamowania przez MNA aktywności receptorów NMDA.

Powszechnie stosowanym modelem badawczym, szczególnie przydatnym do oceny neurotoksyczności z udziałem receptorów NMDA, są hodowle pierwotne komórek

ziarnistych mózdku (Gallo i wsp., 1987). Są to neurony glutaminianergiczne, osiągające po 7 – 10 dniach hodowli ekspresję aktywnych receptorów NMDA (Marini i wsp., 1999). Słabą stroną tych neuronów, utrudniającą ich użycie w badaniach przewlekłej toksyczności jest podatność na spontaniczne wchodzenie w apoptozę po kilkunastu dniach hodowli, mimo stosowania bodźca troficznego w postaci hodowli w pożywce wzbogaconej w jony potasu (Schousboe i wsp., 1985). Ten model doświadczalny *in vitro* dobrze się jednak sprawdza w badaniach nad neuroprotekcją w ostrych i podostrych modelach ekscytotoksyczności, o czym świadczą między innymi wyniki poprzednich badań z naszej pracowni (Ziemińska i wsp., 2003; 2006). Dlatego został on użyty w dalszych badaniach nad neuroprotektoryjnym działaniem MNA, testujących hipotezę o możliwości hamowania przez ten związek aktywności receptorów NMDA. O takim działaniu mógłby świadczyć ochronny wpływ na neurony eksponowane na działanie glutaminianu i NMDA, oraz hamowanie pobierania wapnia przez neurony poddane takiemu testowi. W warunkach fizjologicznych jony wapnia pełnią w receptorach NMDA funkcję przekaźnika aktywującego zależne od wapnia szlaki transdukcji sygnału, natomiast patologicznie wysoki napływ wapnia i wzrost jego stężenia wewnątrz komórki powoduje uszkodzenie i śmierć neuronów. Choć wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia jest ważnym wskaźnikiem potencjalnych patologicznych procesów, to jednak uważa się, że całkowita ilość nagromadzonych jonów wapnia oraz droga wejścia (szczególnie za pośrednictwem receptorów NMDA) decyduje o tym, czy komórka ulegnie degeneracji (Eimerl i wsp. 1994; Sattler i Tymianski, 2000).

W eksperymentach przedstawionych w tej rozprawie MNA w odróżnieniu od swej substancji macierzystej – NAM, nie działał ochronnie na neurony w modelu ostrej neurotoksyczności, indukowanej przez glutaminian. Zastosowano 30 minutową ekspozycję na tę neurotoksynę, a ocena przeżywalności neuronów była dokonana po 24 godzinach (Ziemińska i wsp., 2003; 2006). Warto dodać, że efekt neuroprotektoryjny NAM obserwowano jednak wyłącznie przy najwyższym, 25 mM zastosowanym stężeniu. Aby powiązać neuroprotekcję z hipotetycznym działaniem MNA (i NAM) na receptory NMDA, zbadano także wpływ MNA na neurotoksyczność wywołaną przez NMDA. W tym doświadczeniu w obu wypadkach zaobserwowano znaczną neuroprotekcję, wyłącznie przy stosowaniu najwyższych, 25 mM stężeń obu tych substancji. Te wyniki mogłyby sugerować, że w mechanizmie neuroprotektoryjnego działania MNA podstawową rolę odgrywa modulacja aktywności receptorów NMDA. Za właśnie takim wnioskowaniem świadczą też omówione

powyżej wyniki doświadczeń *in vivo*, w których wykazano jednoznacznie, że MNA zmniejszał o około 50% wielkość lezji powstałej na skutek podania NMDA bezpośrednio do prądkowia 7-dniowych szczurów.

Postawiono hipotezę roboczą, w myśl której mechanizm neuroprotekcynowego działania MNA mógłby mieć związek z bezpośrednim hamowaniem aktywności receptorów NMDA. Aby ocenić wpływ MNA, w porównaniu do związku referencyjnego – NAM, na aktywność receptorów NMDA w żywych komórkach, posłużono się metodą pomiaru pobierania wapnia radioaktywnego przez komórki inkubowane w obecności glutaminianu lub NMDA. Napływ znakowanego wapnia do neuronów podczas krótkiej inkubacji z ekscytotoksyną jest dobrym miernikiem ich obciążenia wapniem. Otrzymane wyniki wykazały, że MNA w sposób zależny od dawki hamuje pobieranie wapnia radioaktywnego przez komórki inkubowane z 0,5 mM NMDA. W przypadku stymulacji 0,5 mM glutaminianem otrzymano również znamienne statystycznie obniżenie napływu ^{45}Ca z medium inkubacyjnego do neuronów, ale niezależną od dawki. Mogłoby to świadczyć o zaangażowaniu MNA w hamowanie innych mechanizmów związanych z ekscytotoksycznym napływem wapnia, nie tylko przez receptory NMDA.

Dodatkowo wykonano doświadczenia mające na celu określenie poziomu wapnia wewnątrzkomórkowego z użyciem sondy fluorescencyjnej Calcium OrangeTM. Wybór tej właśnie sondy wrażliwej na wapń wymusiły chemiczne właściwości MNA. Ten związek zmieniał fluorescencję powszechnie stosowanych sond wrażliwych na wapń, Fura-2 i Fluo-3, poprzez przesunięcie maksimum emisji dla widma. Ta obserwacja nakazuje ostrożność także przy interpretacji danych otrzymanych przy użyciu sondy Calcium OrangeTM, mimo, że jak stwierdziłam MNA nie interferował z widmem tej sondy. Zgodnie z oczekiwaniem po stymulacji glutaminianem zaobserwowano wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w neuronach, jednak wykazano jedynie tendencję do obniżenia poziomu wapnia wewnątrz neuronów przy najwyższych badanych stężeniach MNA, tj. 20 i 25 mM. Trudno wytłumaczyć rozbieżność między działaniem MNA na różne wskaźniki homeostazy wapnia w neuronach.

Kontynuując testowanie hipotezy o możliwości bezpośredniego działania MNA na receptor NMDA, zbadano wpływ tego związku na wiązanie znakowanego, bezkompetycyjnego inhibitora kanału NMDA - MK-801 do błon kory mózgu szczura. Ilość [^3H]MK-801 związanego w kanale receptora NMDA wskazuje na stopień aktywacji tego receptora. Wykazano, że NAM i MNA w przebadanych stężeniach nie powodowały obniżenia

wiązania MK-801, co świadczy przeciw bezpośredniemu oddziaływaniu obu tych związków, w szczególności MNA na aktywność receptora NMDA.

W sytuacji, w której MNA hamował napływ jonów wapnia przez receptory NMDA w nietkniętych neuronach, ale nie miał wpływu na aktywność tego receptora w izolowanych błonach, wzięłam pod uwagę możliwość pośredniego działania hamującego tego związku, oraz substancji referencyjnej – NAM, na kanał receptora NMDA. Byłoby to możliwe w przypadku stabilizacji potencjału błonowego, utrwalającego zależny od potencjału blok magnezowy kanału NMDA. Najbardziej prawdopodobnym mechanizmem wchodzącym w grę mogłoby być pobudzenie aktywności hamującego receptora GABA_A. W dojrzałych neuronach transmisja GABA-ergiczna hamuje aktywność receptorów jonotropowych dla glutaminianu poprzez hiperpolaryzację błony komórkowej (Ben-Ari i wsp., 1997). Zgodnie z danymi literaturowymi NAM jest naturalnym pozytywnym modulatorem miejsca benzodiazepinowego na receptorze GABA_A. Brak jednak informacji o wpływie MNA na aktywność tego receptora. Zjawisko zmiany aktywności receptora poprzez bezpośrednie, allosteryczne oddziaływanie związków farmakologicznie czynnych z miejscem benzodiazepinowym na tym receptorze opisywano już w latach 80-tych. Badania nad tym zjawiskiem zwróciły uwagę na znaczenie zaburzeń transmisji GABA-ergicznej, a także doprowadziły do poszukiwania endogennych modulatorów miejsca benzodiazepinowego. Opisano kilka endogennych związków wiążących się do tego miejsca, powodujących nasilenie prądów chlorkowych płynących przez kanał receptora GABA_A m.in. NAM, hipoksantynę czy inozynę (Lapin i wsp., 1981; Fujimoto i wsp., 1982). Jednak wyniki moich doświadczeń, w których badałam wypieranie radioaktywnej benzodiazepiny z miejsc wiązania w błonach kory mózgu szczura, które potwierdziły znany wpływ NAM, nie wykazały oddziaływania MNA z receptorem benzodiazepinowym. W przedstawionych badaniach nie udało się więc uchwycić mechanizmów zarówno bezpośredniego działania MNA na receptory NMDA, jak i wykazać działania pośredniego, poprzez wzrost aktywności receptora GABA_A.

Z zagadnieniem neuroprotekcynnego działania MNA poprzez hamowanie ekscytotoksyczności ściśle wiąże się wpływ tego związku na stres oksydacyjny. Nadmierne pobudzenie receptorów NMDA generuje aktywację nNOS (neuronalna syntaza tlenu azotu) i wzmożoną syntezę NO. Drugim ważnym elementem rodnicowym jest związana z ekscytotoksycznością dysfunkcja mitochondriów i towarzyszący jej wzrost poziomu rodników tlenowych (ROS), co w konsekwencji wywołuje w komórce uogólniony stres oksydacyjny

(Dugan i Choi, 1994). Hamowanie przez MNA produkcji wolnych rodników mogłoby tłumaczyć mechanizm neuroprotekcji w ekscytotoksyczności. Gębicki i wsp. (2003) wykazali słaby, ale dający się odnotować potencjał antyrodnikowy NAM i MNA, aczkolwiek oba związki nie mogą być rozpatrywane w kategorii wydajnych zmiataczy wolnych rodników tlenowych, takich jak rodnik nadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) oraz peroksyrodnik (OH^{\cdot}). Z drugiej strony wiadomo, że MNA może być jednym z substratów dla oksydazy ksantynowej, enzymu katalizującego przeniesienie wolnego protonu z jednoczesnym utworzeniem nadtlenków lub nadtlenku wodoru (Bunting i wsp., 1980). A zatem MNA sam może być źródłem wolnych rodników. Wykazano jednak, że MNA nawet w wysokich milimolarnych stężeniach nie powodował wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu związanych z aktywnością tego enzymu (Gębicki i wsp., 2002).

Wyniki moich eksperymentów z użyciem sondy DCFH-DA wykorzystywanej do detekcji wolnych rodników tlenowych potwierdziły, że podanie glutaminianu do hodowli neuronów ziarnistych indukuje stres oksydacyjny. Wyniki te pozostają w zgodności z licznymi danymi literaturowymi wskazującymi na generacje wolnych rodników na skutek podania glutaminianu (Dugan i wsp., 1995; Dykens i wsp., 1994). W literaturze można znaleźć informacje o protekcyjnym potencjale NAM w kontekście zjawisk patologicznych obrębie tkanki nerwowej, w których dochodzi do generacji wolnych rodników (Shen i wsp., 2004). Dlatego też NAM postrzegany jest jako wydajny zmiatacz wolnych rodników. Jednakże w zastosowanym w mojej pracy modelu NAM zawiódł, jako substancja hamująca powstawanie ROS. Natomiast analiza wrażliwości komórek na stres oksydacyjny wywołany podaniem glutaminianu wykazała, że neurony inkubowane z wysokimi milimolarnymi stężeniami MNA są mniej podatne na działanie wolnych rodników tlenowych. Wykazano niewielki, ale statystycznie istotny spadek generacji ROS mierzonych za pomocą sondy DCFH-DA w 60 minucie po podaniu glutaminianu. Reasumując, NAM – związek prekursorowy MNA nie wykazywał podobnych właściwości, co świadczy o nieco większym potencjale antyrodnikowym MNA w zastosowanym modelu.

5.5. Aktywacja metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej a protekcja MNA w modelowej hipoksji/ischemii u 7-dniowych szczurów

Macierz zewnątrzkomórkowa (*ang. extracellular matrix, ECM*) zapewnia stabilność mechaniczną i utrzymanie przestrzennej organizacji tkanki. Jednakże rola macierzy

zewnątrzkomórkowej nie ogranicza się wyłącznie do tworzenia podpory dla komórek nerwowych. Stanowi ona równocześnie magazyn cząsteczek sygnałowych, takich jak cytokiny oraz czynniki wzrostu (Venstrom i Reichardt 1993, Giancotti i Rouslahti 1999; Petitclerc i wsp. 2000; Sternlicht i Werb, 2001).

Metaloproteiny (MMPs) to enzymy proteolityczne biorące udział w fizjologicznej przebudowie składników macierzy zewnątrzkomórkowej niezbędnej do prawidłowego rozwoju oraz zachowania homeostazy w tkankach, w tym tkance nerwowej. Aktywność metaloproteinaz w warunkach fizjologicznych podlega ścisłej wielopoziomowej regulacji. Zaburzenie mechanizmów kontrolnych i nadmierna aktywacja zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych towarzyszy licznym stanom patologicznym OUN. Znaczącą aktywację metaloproteinaz w tkance nerwowej obserwowano między innymi w patologii niedokrwiennej mózgu i rdzenia, arteriosklerozie, w przewlekłych chorobach zwyrodnieniowych: w stwardnieniu rozsianym (SM), w chorobie Alzheimera (Leppert i wsp., 1998, 200; Lo i wsp., 2002). Ponadto MMPs mogą brać udział w licznych procesach patologicznych zachodzących pod wpływem bodźca ischemicznego w obrębie tkanek mózgu. Dane literaturowe wskazują na wzrost aktywności MMP9 i MMP2 (metaloproteiny z grupy żelatynaz A i B) w modelu globalnej i ogniskowej ischemii mózgu u szczurów (Romanic i wsp., 1998; Gasche i wsp., 2006). Znaczenie MMPs w patofizjologii udarów potwierdziły dodatkowo eksperymenty, w których zaobserwowano redukcje uszkodzonego niedokrwieniem obszaru na skutek farmakologicznej blokady ich aktywności (Copin i wsp., 2005). Brak natomiast danych opisujących rolę tych MMPs w ewolucji odpowiedzi poischemicznej w okresie kilku pierwszych tygodni rozwoju zwierząt, kiedy to mózg wykazuje wysoki stopień plastyczności. Pojawiające się w literaturze doniesienia o przeciwzapalnym działaniu MNA na obwodzie oraz możliwości oddziaływania ze składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej skłoniły mnie do zbadania wpływu tego związku na zmiany aktywności MMPs w niedojrzałym mózgu poddanym hipoksji/ischemii.

Etapem wstępnym dla zbadania wpływu MNA na ekspresję MMPs 2 i 9 było ustalenie wzoru aktywności obu enzymów w czasie po wystąpieniu hipoksji/ischemii.

W zastosowanym w tej rozprawie układzie modelowej asfiksji okołoporodowej szczurów stwierdzono znaczący wzrost aktywności MMP9 po 48 godzinach oraz 7 dnia w ipsilateralnej (uszkodzonej) półkuli. W przypadku MMP2 wysoki poziom aktywności obserwowano po 48 godzinach od zadziałania bodźca ischemicznego. W przeciwieństwie do MMP9 ekspresja

MMP2 wzrastała gwałtownie po 24 godzinach, wykazując podwyższony poziom do końca eksperymentu, to jest do 14 dnia od wywołania doświadczalnej asfiksji (Dragun i wsp., 2008).

Aplikacja MNA w dawce 62,5 mg/kg skutkowała spadkiem aktywności MMP9 w 48 godzinie od wystąpienia asfiksji. Z drugiej strony obserwowano narastający wzrost aktywności MMP2, w porównaniu z grupą nieleczoną, aż do 14 dnia obserwacji. Wydaje się, że hamowanie aktywności MMP9 w wyniku podania MNA może stanowić element protekcyjny w modelu asfiksji okołoporodowej, podczas gdy wzrost aktywności MMP2 w późniejszym okresie po wystąpieniu ischemii może sugerować zaangażowanie tej formy enzymu w procesy naprawcze bądź neurogenezę (Wojcik i wsp., 2009). Istnieją bowiem przesłanki z których wynika, że działalność MMPs w późniejszym okresie związana jest z neoangiogenezą, a także z wędrówką prekursorów neuronalnych ze specyficznych nisz w celu zastąpienia obumarłych komórek i przywrócenia (jakkolwiek w ograniczonym stopniu) plastyczności synaptycznej (Cunningham i wsp., 2005; Cramer i wsp., 2000). Za takim wnioskowaniem może świadczyć fakt, iż zablokowanie aktywności MMPs 7 dnia po wystąpieniu ischemii skutkowało zwiększeniem wielkości uszkodzenia oraz powstawaniem jam w obrębie kory (*ang. cortical cavitation*), 2 tygodnie od reperfuzji (Zhao i wsp., 2006). Z drugiej strony zmiana aktywności MMP2 w wyniku jednorazowego podania MNA 14 dnia od ischemii nie wydaje się być bezpośrednio związana ze zmianą aktywności tej metaloproteinazy. Dodatkowo badania przeprowadzone na zwierzętach z knockoutem genu dla MMP2 wykazały brak związku między zanikiem ekspresji MMP2 a neuroprotekcją w ischemii ogniskowej, jaki i w modelu asfiksji u mysich osesków (Asahi i wsp., 2001; Svedin i wsp., 2007). Nie można tu także wykluczyć możliwości oddziaływania pozytywnie naładowanej cząsteczki MNA z komórkami śródbłonna, przez co MNA mógłby bezpośrednio stabilizować barierę krew-mózg i dodatkowo hamować interakcję molekuł adhezyjnych takich jak ICAM1 lub ICAM2 z ich receptorami na powierzchni komórek.

Reasumując, zmiana aktywności MMPs 2 i 9 wywołana podaniem MNA w modelu asfiksji okołoporodowej wydaje się być korzystna i sprzyjać ograniczeniu skutków niedokrwienia/niedotlenienia. Powiązania przyczynowo-skutkowe są tu jednak niejasne. Z pewnością wpływ modulujący MNA na aktywność metaloproteinaz nie stanowi pełnego wytłumaczenia mechanizmu neuroprotekcijnego działania tego związku. Przy całej komplikacji patomechanizmów udaru trudno przypuścić by potencjalny związek

terapeutyczny, którego działanie opierałoby się jedynie na zmianie działalności MMPs warunkował całkowitą neuroprotekcję.

5.6. Wpływ podawania 1-metylnikotynamidu na poziom aktywności COX-2 oraz syntezę prostanoidów w modelu asfiksji okołoporodowej szczurów - możliwy mechanizm neuroprotekcijnego działania MNA

Interesująca wydaje się obserwacja dotycząca cytoprotekcijnego działania nikotynamidu w stosunku do komórek śródbłonna naczyń mózgowych poddanych uszkodzającym procesom podczas ischemii (Chong i wsp., 2002).

Wyniki badań z ostatnich lat prowadzone w zespołach prof. Chłopickiego oraz prof. Mogielnickiego, które zostały opublikowane po wykonaniu większości badań przedstawionych w tej rozprawie, jednoznacznie wskazują, że MNA jeszcze silniej niż nikotynamid może działać protekcyjnie na śródbłonek naczyniowy. Upośledzenie funkcji śródbłonna przejawia się zmniejszonym uwalnianiem naczynioprotekcyjnych przekaźników, takich jak tlenek azotu (NO) oraz prostacyklina I₂ (PGI₂) wytwarzana z kwasu arachidonowego (AA) przez cyklooksygenazy COX-1 lub/i COX-2. Z drugiej strony dochodzi do nadmiernej syntezy i ekspresji takich czynników patologicznych, jak anion nadadtlenkowy (O₂⁻), prozapalne cytokiny (np. IL-6, IL-8), chemokiny (np. MCP-1), cząsteczki adhezyjne takie jak selektyna P, selektyna E, ICAM-1, VCAM-1 (Drelicharz i wsp., 2005). Zachwianie równowagi funkcji śródbłonna rozpoczyna szereg procesów patologicznych, prowadzących m.in. do rozwoju blaszki miażdżycowej. Dodatkowo wzrost potencjału prozakrzepowego śródbłonna doprowadza wspólnie z miażdżycą do zakrzepicy tętniczej, która może być bezpośrednią przyczyną zawału serca oraz udarów mózgu i często przyczyną zgonu. Na istotny udział śródbłonna naczyniowego w przeciwwzakrzepowym działaniu MNA wskazywało kilka obserwacji poczynionych w powyższych badaniach. Zaobserwowano, że MNA działa przeciwpłytkowo, ale jedynie w warunkach *in vivo*, w obecności zarówno płytek krwi, jak i śródbłonna naczyniowego. Ponadto w osoczu zwierząt, którym podano MNA, wykazano wzrost 6-keto-PGF_{1α}, stabilnego metabolitu prostacykliny (PGI₂). Działanie MNA znosiło wcześniejsze podanie zarówno nieselektywnie blokującej COX 1 i 2 indometacyny, jak i selektywnego inhibitora COX-2 – rofecoxibu, natomiast nie L-NAME – inhibitora NOS (Chłopicki i wsp., 2007; Mogielnicki i wsp., 2007). Powyższe badania wskazały na MNA, jako na nowego potencjalnego, występującego endogennie w organizmie, nietoksycznego

induktora szlaku COX-2/PGI₂. Nie odpowiedziały one jednak jednoznacznie na pytanie, czy źródłem PGI₂ i jednocześnie punktem uchwytu działania MNA jest głównie śródbłonek naczyniowy. Próba odpowiedzi na to pytanie poprzez zastosowanie modelu eksperymentalnego, mierzącego jedynie odpowiedź śródbłonka naczyniowego, bez udziału elementów morfotycznych krwi, zakończyła się niepomyślnie (Mogielnicki i wsp., 2008).

Z drugiej jednak strony badania przeprowadzone na szczurach z hipertriglicerydemią i cukrzycą dowiodły, że MNA zapobiega rozwojowi dysfunkcji śródbłonka w tych modelach eksperymentalnych (Bartuś i wsp., 2008). Ponadto MNA działał skuteczniej przeciwzakrzepowo u zwierząt z wywołanym eksperymentalnie nadciśnieniem naczyniowo-nerkowym i rozwijającą się następnie dysfunkcją śródbłonka, aniżeli u szczurów zdrowych. To potwierdza istotną rolę wywoływanej przez MNA protekcji śródbłonkowej, zależnej od szlaku indukowanej COX-2/ PGI₂. Należy tutaj wyraźnie zaznaczyć, że mechanizm przeciwzapalnego działania MNA jest unikatowy i nie jest dzielony ze związkiem macierzystym – NAM (Chlopicki i wsp., 2007) . Dlatego ważne i celowe było zbadanie, czy szlak COX-2/ PGI₂ bierze udział w neuroprotekcijnym mechanizmie MNA.

Z danych uzyskanych na podstawie badań nad właściwościami MNA na obwodzie można jedynie pośrednio wnioskować o mechanizmach neuroprotekcji MNA w obrębie mózgu związanych ze szlakiem metabolitów kwasu arachidonowego. Mózg jest jednym z nielicznych miejsc w organizmie ssaków gdzie dochodzi do konstytutywnej ekspresji zarówno COX-1, jak i COX-2 (Seibert i wsp., 1994). Badania immunohistochemiczne wykazały, że COX-2 występuje głównie w neuronach (ale także w astrocytach) w rejonie hipokampa, zwłaszcza zakrętu zębatego, w korze gruszkowej, ciele migdałowatym oraz II i III warstwie kory nowej (Yamagata i wsp., 1993; Yermakova i wsp., 2001). W warunkach fizjologicznych aktywność COX-2 podlega regulacji w przebiegu transmisji synaptycznej, związanej z aktywnością receptorów NMDA, o czym świadczy hamowanie ekspresji mRNA dla COX-2 po podaniu MK-801 (Yamagata i wsp. 1993). Kluczowym dowodem na to, że COX-2 bierze udział w transmisji synaptycznej jest opisana przez Yamagatę i wsp. (1993) obecność tego enzymu w kolcach dendrytycznych, a także proces hamowania zjawiska zarówno LTP jak i LTD w hipokampie na skutek podania NS398 – specyficznego inhibitora COX-2 (Chen i wsp., 2002; Murray i wsp., 2003; Cowley i wsp., 2008). Z drugiej strony procesy patologiczne takie jak choroby zwyrodnieniowe oraz niedokrwienie mózgu wywołują zaburzenia w prawidłowej transmisji synaptycznej, co w rezultacie skutkuje nadekspresją COX-2 i jej czynnym udziałem w

procesach degeneracyjnych związanych ze wzmożoną aktywacją receptorów glutaminianergicznych jak i z późniejszymi procesami zapalnymi oraz/i indukcją wolnych rodników. Za takim negatywnym „dwukierunkowym” działaniem COX-2 w eksperymentalnej ischemii świadczą obserwacje Nogawa i wsp. (1997), gdzie w modelu MCAO podanie inhibitora NS398 nawet po 6 godzinach od przywrócenia krążenia zmniejszało wielkość uszkodzenia. Zgodnie z danymi literaturowymi po takim czasie obniżenie aktywności receptorów NMDA poprzez podanie ich antagonistów nie ma już efektu protekcyjnego (Hossman, 1994). Inną ciekawą obserwacją jest wykazane przez Hewett'a i wsp. (2000) zjawisko całkowitej protekcji powodowane przez inhibitory COX-2 przed toksycznością ze strony receptorów NMDA. Ponieważ nie zauważono podobnego działania w przypadku neurotoksyczności wywołanej kwasem kainowym, sugerowany jest unikalny i specyficzny charakter neuroprotekcji wywołanej przez inhibitory COX-2 w ekscytotoksyczności pobudzeniowej związanej z aktywacją receptorów NMDA (Strauss i wsp., 2002).

Wyniki wykazane w mojej rozprawie odbiegają od przedstawionych powyżej danych literaturowych. Podanie MNA zmniejszało uszkodzenia mózgu w zastosowanym przeze mnie modelu asfiksji okołoporodowej u szczurów, co może się wiązać z hamowaniem ekscytotoksyczności wywołanej nadmierną aktywacją receptora NMDA oraz napływem wapnia przez te receptory. Inne zamieszczone w niniejszej rozprawie wyniki dowodzą, że MNA w zastosowanej neuroprotekcijnej dawce powodował wzrost aktywności COX-2 w 6 i 24 godzinie od wystąpienia ischemii. Zgodnie z zamieszczonymi wyżej danymi literaturowymi można by oczekiwać w tych warunkach serii ekscytotoksycznych epizodów związanych z nadmiernym pobudzeniem receptorów glutaminianergicznych. Z drugiej strony badania immunochemiczne nie wykazały istotnych zmian w poziomie białka COX-2 w półkuli ipsilateralnej po podaniu protekcyjnej dawki MNA.

Wskazówką dla zrozumienia mechanizmu protekcyjnego działania MNA za pośrednictwem COX-2 mogą stanowić ostatnio opublikowane prace, w których wykazano, że u myszy z farmakologiczną inhibicją cyklooksygenazy 2 lub z delecją genu COX-2 (COX-2^{-/-}) dochodzi do rozległych uszkodzeń mózgu oraz deficytów behawioralnych po podaniu ekscytotoksyn, w tym NMDA (Toscano i wsp.^{a,b}, 2008; Kim i wsp., 2001; Candelario-Jalil i Fiebich, 2008). Można przyjąć założenie, że MNA najprawdopodobniej poprzez regulację aktywności COX-2, nie wpływając jednak na poziom samego białka tego enzymu, modyfikuje zaburzenia w transmisji glutaminianergicznej wywołane hipoksją/ischemią w kierunku

fizjologicznej transmisji synaptycznej. Za takim mechanizmem przemawia obserwowana w rejonie objętym niedokrwieniem protekcja mózgu po stronie ipsilateralnej. Natomiast wzrost poziomu COX-2 w półkuli kontralateralnej po obwodowym podaniu MNA może być przejawem mechanizmu adaptacyjnego. Nie można wykluczyć, że modulacja aktywności COX-2 to także mechanizm, poprzez który MNA pośrednio reguluje aktywność receptorów NMDA mimo, że nie wykazuje on bezpośredniego wpływu na te receptory. Jednakże takie wnioskowanie należy potwierdzić dalszymi badaniami na poziomie molekularnym, najlepiej z wykorzystaniem zwierząt z usuniętym genem COX-2.

Rozwijając tę interpretację należy przypomnieć, że COX-2 jest enzymem, którego aktywność generuje powstawanie PGH_2 , prekursora dla szeregu pochodnych kwasu arachidonowego, wspólnie określanych jako prostanoidy. To właśnie te związki odpowiedzialne są za biologiczną odpowiedź powiązaną z aktywnością COX-2. Działanie prostanoidów: prostaglandyn, prostacyklin i tramboksanu zależy ściśle od ich budowy chemicznej oraz rodzaju wiążących je receptorów, których aktywacja uruchamia wewnętrzne szlaki przekazywania sygnału w komórce. Dlatego też sprawdziłam jak podanie MNA wpłynie na zmianę we wzorze składu prostanoidów generowanych przez COX-2. Głównym produktem aktywności COX-2 jest prostaglandyna E_2 (PGE_2) uczestnicząca m.in. w regulacji transmisji synaptycznej (Chen i wsp., 2002; Chen i Bazan, 2005). Z drugiej strony istnieje ścisły związek między podwyższonym poziomem PGE_2 a indukcją ekscytotoksyczności poprzez receptory prostaglandynowe EP_1 . Aktywacja tych receptorów, poprzez przyłączenie liganda prowadzi do zaburzenia homeostazy wapniowej w komórce związanej z zaburzeniem wymiany Na^+ - Ca^{2+} , głównego mechanizmu służącego do eliminacji nadwyżki wapnia w neuronach (Kawano i wsp., 2006). Z drugiej strony przyłączenie PGE_2 do receptorów typu EP_2 i EP_3 wywołuje neuroprotekcję (McCullough i wsp., 2004; Li i wsp. 2008).

W zastosowanym w tej pracy modelu hipoksji/ischemii 7 dniowych szczurów przeprowadzono pomiary zmian poziomu PGE_2 , TXB_2 oraz PGI_2 w czasie u zwierząt kontrolnych i leczonych MNA. Wykazano brak wpływu MNA na poziom PGE_2 oraz TXB_2 mierzony w 30, 60 i 120 minucie licząc od jednorazowego podania badanej substancji. Natomiast zaobserwowano statystycznie istotny wzrost stężenia 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ (metabolitu PGI_2) w 30 i 60 minucie pomiaru. Jednocześnie zaobserwowano hamowanie wzrostu poziomu 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ u zwierząt otrzymujących MNA w wyniku podania rofecoxibu - selektywnego inhibitora COX-2 oraz indometacyny nieselektywnego inhibitora COX.

Wskazuje to, że mechanizm neuroprotekcji MNA można wiązać ze szlakiem COX-2/PI₂ podobnie jak w przypadku ochronnego działania MNA na obwodzie. PI₂ powstaje głównie w obrębie śródbłonna naczyń i należy do najsilniejszych naturalnych czynników antyagregacyjnych i rozszerzających naczynia w organizmie ssaków. Działanie PGI₂ pozostaje w antagonistycznej relacji z działaniem TXA₂, prostanoidu o właściwościach proagregacyjnych i kurczącym naczynia (Gryglewski, 2008). W obrębie układu nerwowego oprócz mięśniówki oraz płytek krwi TXA₂ syntetyzowany jest przez komórki astrogleju oraz w niewielkim stopniu przez neurony (Keller i wsp., 1985; Murphy i wsp., 1988). Schwartz-Bloom i wsp., (1996) opisali zjawisko hamowania aktywności receptora GABA_A przez stabilne analogi TXA₂. Jednakże jak wykazali Lazarewicz i wsp. (1994) brak jest korelacji między produkcją TXA₂ w czasie ischemii a uszkodzeniem neuronów. Al-Turaki i Armsted w 1998 roku wysunęli hipotezę, że w wyniku nagłych urazów mózgu dochodzi do upośledzenia syntezy PGI₂, co rzutuje na zwiększenie objętości uszkodzenia. Potwierdzenie neuroprotektoryjnego działania PGI₂ można odnaleźć w pracach Dogana i wsp. (1996), w których opisano pozytywny wpływ infuzji PGI₂ w modelu ischemii ogniskowej. Podanie PGI₂ zmniejszało także prawdopodobieństwo wystąpienia obrzęku i tworzenia zatorów, poprawiało parametry hemodynamiczne w obrębie mózgu, co w rezultacie skutkowało znaczącym zmniejszeniem obszaru uszkodzenia (Pluta i wsp., 1990; Bentzer i wsp., 2001; 2003). Podobne wyniki otrzymano stosując stabilne analogi PGI₂ (Cui i wsp. 1999). Dlatego też można wiązać nadzieje na skuteczne działanie neuroprotektoryjne ze związkami, które wywołują zwiększenie poziom PGI₂ w czasie rozwoju odpowiedzi mózgu na ischemię. Zgodnie z wynikami tej rozprawy do takich związków należy MNA.

W celu jednoznacznego potwierdzenia oddziaływania MNA poprzez PGI₂ i receptory prostacyklinowe w stosowanym modelu zwierzętom leczonym MNA podano inhibitora receptorów prostacyklinowych IP - RO324479 oczekując, że zablokowanie tychże receptorów zniesie protekcję MNA. Receptory IP występują powszechnie w korze, hipokampie i prążkowie (Cui i wsp. 1999). Jednak badanie obszaru uszkodzenia 2 tygodnie po epizodzie ischemicznym i podaniu związków farmakologicznie czynnych wykazało brak zależności między blokadą receptorów IP a protekcją powodowaną przez MNA. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń uważam, że nie można jednoznacznie wytłumaczyć tego zjawiska. Śledząc doniesienia literaturowe można odnaleźć informacje wskazujące na obecność dwóch podtypów receptorów IP w mózgu. Receptory IP₁ są nazywane

obwodowymi, natomiast IP_2 są określane jako centralne – specyficzne dla układu nerwowego (Watanabe i wsp. 1999). Dowiedziono, że ligand specyficzny dla IP_2 ; 15-deoxy-(16-m-tolyl)-17,18,19,20-tetranorisokarbacyklina (15-Deoxy-TIC) wykazywał właściwości protekcyjne w modelu ogniskowej ischemii mózgu szczurów w bardzo wąskim zakresie stężeń. Zarówno niskie jak i wysokie dawki 15-Deoxy-TICu pozostawały bez wpływu na obszar uszkodzenia (Takamatsu i wsp., 2002). Należy podkreślić, że uzyskana w ten sposób wydajność neuroprotekcji wynosiła 35%, co jest wartością porównywalną z efektem innych związków neuroprotekcyjnych. W tym samym modelu zastosowanie MK-801 redukowało obszar uszkodzenia o 31%, inhibitory receptorów AMPA oraz FK 506 były skuteczne odpowiednio w 36 i 30% (Takamatsu i wsp., 1998; 2002). Odnosząc zamieszczone informacje do obserwowanej w mojej pracy protekcji MNA w szczurzym modelu wydaje się prawdopodobne, że związek ten może generować wzrost puli PGI_2 , która wchodzi w swoistą interakcje głównie z receptorami IP_2 powodując neuroprotekcję. Na rzecz takiej interpretacji przemawia podobieństwo specyficznej zależności między dawkami MNA (wyniki tej rozprawy) i 12-Deoxy-TIC (Takamatsu i wsp., 2002), a efektem neuroprotekcyjnym. Jednakże potwierdzenie lub wykluczenie tej hipotezy wymaga przeprowadzenia dalszych eksperymentów.

Pozostaje też sprawą otwartą, czy MNA działa przede wszystkim na komórki naczyń mózgu czy także na komórki nerwowe? Wydaje się, że MNA posiada plejotropowy, złożony mechanizm działania skierowany na różne typy komórek zarówno śródbłonek naczyń jak i neurony, co plasuje go w kategorii pożądaných potencjalnych leków neuroprotekcyjnych mogących znaleźć zastosowanie w terapii patologii niedokrwiennej. Ponieważ wykazano, że MNA pobierany jest przez neurony, więc nie można wykluczyć tego, że spełnia on pewną rolę regulacyjną, kierującą szlaki sygnałowe w kierunku przeżycia oraz ku syntezie związków promujących przetrwanie neuronów po wystąpieniu niedokrwienia i/lub niedotlenienia. Najbardziej prawdopodobnym mechanizmem wydaje się jednak indukcja zależnej od COX-2 syntezy PGI_2 , zarówno przez komórki śródbłonek naczyń mózgu, ale przede wszystkim przez neurony. Wykazano, bowiem obecność syntazy prostacyklinowej (PGIS) w różnorodnych populacjach komórek nerwowych, a jej występowanie korelowało ściśle z obecnością receptorów IP_2 na powierzchni neuronów (Mehl i wsp., 1999; Fang i wsp., 2006).

VI. Podsumowanie wyników badań

- Badania tej rozprawy rozpoczęto od oceny potencjalnej neurotoksyczności 1-metylnikotynamidu (MNA) w zastosowanych układach doświadczalnych. Obecne w literaturze dane wskazywały na toksyczne działanie MNA na neurony o fenotypie dopaminergicznym w mechanizmie zbliżonym do toksyczności MPP+. Z tego względu doświadczenia wykonano z wykorzystaniem MPP+, jako kontroli pozytywnej uszkodzenia.

Wykazano, że:

1. MNA podany bezpośrednio do części zbitej istoty czarnej mózgu szczurów dorosłych nie powoduje obniżenia liczebności neuronów dopaminergicznych. Ponadto po iniekcji MNA nie dochodziło do rozwoju reakcji zapalnej wyrażonej napływem komórek mikrogleju w rejon podania.
 2. Test z apomorfiną, określający stopień uszkodzenia na poziomie behawioralnym, nie ujawnił wpływu MNA na aktywność ruchową szczurów dorosłych po wcześniejszym domózkowym podaniu tego związku.
 3. Podanie MNA do prądkowia 7-dniowych osesków szczurzych nie wywoływało zwyrodnienia neuronów w rejonie projekcji neuronów dopaminergicznych. Po podaniu MNA dootrzewnowo nie obserwowano u tych zwierząt ubytku masy mózgu.
 4. W warunkach *in vitro* podczas 24 godzinnej inkubacji, MNA nie powodował spadku przeżywalności hodowli pierwotnej neuronów ziarnistych mózdzku, w granicach wysokich stężeń milimolarnych.
- Zbadanie potencjału neuroprotekcijnego MNA w zastosowanych modelach badawczych zostało poprzedzona analizą biodostępności tego związku *in vivo* oraz *in vitro*. Doświadczenia przeprowadzone *in vivo* miały na celu ocenę wnikania MNA do mózgu 7-dniowych osesków szczurzych po podaniu *i.p.* Badanie to wykonano ze względu na znaną nieprzepuszczalność dojrzałej bariery krew-mózg dla MNA. Natomiast w eksperymentach *in vitro* testowano pobieranie MNA przez dwa typy komórek: neurony ziarniste mózdzku oraz komórki RBE4 wyprowadzone ze śródbłonna naczyń mózgu szczura. Dla oceny zdolności mózgu do syntezy MNA *in*

situ, zbadano też na poziomie mRNA ekspresję N-metylotransferazy nikotynamidowej w mózgu szczura

Stwierdzono, że:

1. MNA po podaniu dootrzewnowym osiąga oznaczalne stężenia zarówno w surowicy jak i w mózgu, których wartość jest zależna od zastosowanej dawki i czasu. Potwierdzenie przemieszczania się MNA z krwi do mózgu 7-dniowych szczurów świadczy o tym, że zwierzęta z nie w pełni wykształconą barierą krew-mózg są właściwym modelem badania neuroprotekcji i/lub toksyczności MNA podawanego obwodowo.
 2. Komórki linii RBE4 pobierają znakowany MNA słabo, jednak w sposób uchwytny. Neurony ziarniste mózdzku nagromadzają MNA w sposób zależny od czasu i dawki.
 3. W mózgu szczura wykazano obecność mRNA metylotransferazy nikotynamidowej.
- Przeprowadzono badanie potencjału neuroprotekcijnego MNA w modelowej asfiksji okołoporodowej noworodków, tj. w hipoksji/ischemii 7-dniowych szczurów, z uwzględnieniem wpływu MNA na temperaturę ciała zwierząt po ischemii.

Badania wykazały, że:

1. MNA podany jednorazowo po epizodzie niedotlenienia/niedokrwienia działa protekcyjnie w zastosowanym modelu w wąskim przedziale dawek rzędu 30 – 60 mg/kg masy ciała.
 2. MNA nie zmienia mierzonej w rectum temperatury ciała zwierząt poddanych hipoksji/ischemii, co świadczy przeciw możliwości neuroprotekcji poprzez indukcję hipotermii poischemicznej.
- Zjawiskiem nieodłącznie towarzyszącym ischemii mózgu, będącym zarazem podstawowym mechanizmem niedokrwienego uszkodzenia neuronów, jest ekscytotoksyczność, to jest nadmierne pobudzenie receptorów dla glutaminianu, głównie z udziałem receptorów NMDA. W poszukiwaniu dróg ochronnego działania MNA na mózg w hipoksji/ischemii, przeprowadzono badanie jego wpływu na

ekscytotoksyczność *in vivo* i *in vitro*. Wykonano także badania zmierzające do wykrycia mechanizmu wpływu MNA na ekscytotoksyczność.

Wykazano, że:

1. MNA po podaniu dootrzewnowym zmniejsza w sposób zależny od dawki wielkość uszkodzenia mózgu wywołanego miejscowym podaniem NMDA.
 2. W hodowli pierwotnej glutaminianergicznych neuronów ziarnistych mózdku *in vitro* MNA obniża neurotoksyczność wywołaną podaniem NMDA.
 3. *In vitro* MNA niezależnie od dawki hamuje napływ znakowanego wapnia do neuronów wywoływany podaniem glutaminianu, natomiast w sposób zależny od dawki hamuje napływ znakowanego wapnia do neuronów wywoływany podaniem NMDA.
 4. MNA obniża poziom wolnych rodników tlenowych w hodowli pierwotnej neuronów, ale nie hamuje spadku potencjału błony mitochondrialnej wywołanego przez podanie glutaminianu.
- Wykazanie w tej pracy objawów hamującego działania MNA na niektóre wskaźniki charakteryzujące ekscytotoksyczność skłoniło do testowania hipotezy, że mechanizm tego działania polega na bezpośrednim hamowaniu aktywności receptorów NMDA, lub też na działaniu pośrednim, przez zwiększenie aktywności receptorów hamujących GABA_A. Zakładano, że takie działanie może polegać na wiązaniu się MNA z receptorem benzodiazepinowym. Dla testowania tej hipotezy zbadano wpływ MNA na wiązanie znakowanych ligandów: MK-801 i diazepamu do frakcji błon mózgu szczura.

Stwierdzono, że:

1. MNA nie ma wpływu na wiązanie znakowanego MK-801 do błon, co przemawia przeciw bezpośredniemu działaniu MNA na aktywność receptora NMDA.
2. MNA nie wypiera znakowanego diazepamu z błon. Świadczy to przeciw hipotezie przypisującej MNA działanie obniżające pobudliwość neuronów i prawdopodobieństwo dezaktywacji receptora NMDA. Nie znaleziono argumentów na rzecz modulacji przez MNA aktywności receptora GABA_A, poprzez interakcje z miejscem benzodiazepinowym tego receptora.

- Podjęto dalsze badania zmierzające do wyjaśnienia mechanizmu neuroprotekcijnego działania MNA w hipoksji/ischemii 7-dniowych szczurów.

Wykonane eksperymenty wskazują, że:

1. Podanie MNA po hipoksji/ischemii w dawkach indukujących neuroprotekcję prowadzi do hamowania aktywności kaspazy-3 egzekutorowej.
2. Neuroprotekcyjne dawki MNA modulują aktywności MMP2 i MMP9, a co za tym idzie wpływają na poischemiczną przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej.
3. Po podaniu MNA dochodzi do wzrostu aktywności COX-2 zarówno natychmiast po ischemii jak i po 24 godzinach.
4. W początkowej fazie rozwoju odpowiedzi poischemicznej podanie MNA zwiększa poziom PGI₂ w mózgu.

WYNIKI

Wyniki przedstawione w tej rozprawie upoważniają do wyciągnięcia następujących wniosków:

1. Nie uzyskano dowodów na ostre neurotoksyczne działanie MNA w mózgu dorosłego szczura, jak też w mózgu osesków szczurzych i w hodowlach pierwotnych neuronów ziarnistych mózdzku.
2. MNA przenika przez niedojrzałą barierę krew-mózg 7-dniowych osesków szczurzych i jest pobierany przez neurony. Wykazanie na poziomie mRNA ekspresji N-metyltransferazy nikotynamidowej w mózgu szczura sugeruje, że MNA może być także syntetyzowany w mózgu.
3. MNA podany po hipoksji/ischemii w wąskim przedziale stężeń działa neuroprotekcyjnie w szczurzym modelu asfiksji okołoporodowej.
4. MNA obniża szereg wskaźników ekscytotoksyczności, indukowanej przez NMDA, obserwowanej zarówno *in vivo* w mózgu 7-dniowych osesków szczurzych, jak i *in vitro* na hodowlach neuronów. Mechanizm tego działania nie jest jasny; uzyskane wyniki sugerują, że nie obejmuje on bezpośredniego hamowania aktywności receptora NMDA ani też aktywacji miejsca benzodiazepinowego receptora GABA_A.

5. Mechanizm neuroprotekcijnego działania MNA w ischemii mózgu i ekscytotoksyczności jest plejotropowy, o niejasnych relacjach przyczynowo-skutkowych. Wydaje się, że do wtórnych efektów neuroprotekcyjnych MNA można zaliczyć hamowanie kaspazy-3 i modulację aktywności metaloproteinaz. Natomiast nowym mechanizmem neuroprotekcijnego działania MNA może być modulacja aktywności COX-2 w kierunku biosyntezy prostacykliny. Ta hipoteza wymaga dalszych badań.

VII. Literatura

- 1) Al-Turki A, Armstead WM. (1998) Altered release of prostaglandins by opioids contributes to impaired cerebral hemodynamics following brain injury. *Crit Care Med.* 26(5):917-25.
- 2) Andine P M, Thordstein I, Kjellmer I, Nardborg C, Thiringer K, Wennberg E, Hagberg H. (1990) Evaluation of brain damage in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic. *J. Neurosci. Meth.* 35 : 253-260.
- 3) Aoyama K, Matsubara K, Okada K, Fukushima S, Shimizu K, Yamaguchi S, Uezono T, Satomi M, Hayase N, Ohta S, Shiono H, Kobayashi S. (2000) N-methylation ability for azaheterocyclic amines is higher in Parkinson's disease: nicotinamide loading test. *J Neural Transm.* 107(8-9):985-95.
- 4) Asahi M, Sumii T, Fini ME, Itohara S, Lo EH. (2001) Matrix metalloproteinase 2 gene knockout has no effect on acute brain injury after focal ischemia. *Neuroreport* 12(13):3003-7.
- 5) Athwal NS, Ramsden DB, Simpson M, Williams AC. (1996) Inhibition of dopamine uptake into PC-12 cells by analogues of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Parkinsonism Relat Disord.* 2(1):1-6.
- 6) Ayoub IA, Maynard KI. (2002) Therapeutic window for nicotinamide following transient focal cerebral ischemia. *Neuroreport.* 13(2):213-6.
- 7) Baik EJ, Kim EJ, Lee SH, Moon C. (1999) Cyclooxygenase-2 selective inhibitors aggravate kainic acid induced seizure and neuronal cell death in the hippocampus. *Brain Res* 843:118–29.
- 8) Bartus M, Łomnicka M, Kostogryś RB, Kaźmierczak P, Watała C, Słomska EM, Smoleński RT, Pisulewski PM, Adamus J, Gebicki J, Chłopicki S. (2008) 1-Methylnicotinamide (MNA) prevents endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic and diabetic rats. *Pharmacol Rep.* 60 (1):127-38.
- 9) Beal MF. Bioenergetic approaches for neuroprotection in Parkinson's disease. (2003) *Ann Neurol* 53 (Suppl 3): 39–47.
- 10) Ben-Ari Y, Cherubini E, Krnjević K. (1998) Changes in voltage dependence of NMDA currents during development. *Neurosci Lett.* 94: 88-92.
- 11) Banerjee R, Sreetama S, Saravanan KS, Dey SN, Mohanakumar KP. (2007) Apoptotic mode of cell death in substantia nigra following intranigral infusion of the parkinsonian

neurotoxin, MPP+ in Sprague-Dawley rats: cellular, molecular and ultrastructural evidences. *Neurochem Res.* 32(7):1238-47.

12) Bentzer P, Mattiasson G, McIntosh TK, Wieloch T, Grande PO. (2001) Infusion of prostacyclin following experimental brain injury in the rat reduces cortical lesion volume. *J Neurotrauma.* 18(3):275-85.

13) Bentzer P, Venturoli D, Carlsson O, Grande PO. (2003) Low-dose prostacyclin improves cortical perfusion following experimental brain injury in the rat. *J Neurotrauma.* 20(5):447-61.

14) Bergersen LH, Gundersen IV. (2009) Morphological evidence for vesicular glutamate release from astrocytes. *Neuroscience* 12:260-265.

15) Birjmohun RS, Hutten BA, Kastelein JJP, Stores ESG. (2005) Efficacy and safety of High-Density Lipoprotein cholesterol-increasing compounds. A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Coll Cardiol* 45: 185-197.

16) Bolanos JP, Heales SJ, Land JM, Clark JB. (1995) Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture. *J Neurochem.* 64(5):1965-72.

17) Bold JM, Gardner CR, Walker RJ. (1985) Central effects of nicotinamide and inosine which are not mediated through benzodiazepine receptors. *Br J Pharmacol.* 84(3):689-96.

18) Bona E, Hagberg H, Loberg EM, Bagenholm R, Thoresen M. (1998) Protective effects of moderate hypothermia after neonatal hypoxia-ischemia: short- and long-term outcome. *Pediatr Res.*43:738-45.

19) Bond A, Jones NM, Hicks CA, Whiffin GM, Ward MA, O'Neill MF, Kingston AE, Monn JA, Ornstein PL, Schoepp DD, Lodge D, O'Neill MJ. (2000) Neuroprotective effects of LY379268, a selective mGlu2/3 receptor agonist: investigations into possible mechanism of action in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 294(3):800-9.

20) Bond A, Ragumoorthy N, Monn JA, Hicks CA, Ward MA, Lodge D, O'Neill MJ. (1999) LY379268, a potent and selective Group II metabotropic glutamate receptor agonist, is neuroprotective in gerbil global, but not focal, cerebral ischaemia. *Neurosci Lett.* 273(3):191-4.

21) Borkowski T, Kaminski R, Yuen A, Slominska EM, Raczak G, Smolenski RT. (2008) Abstract No. 259 Methylnicotinamide reduces diastolic stiffness and cardiac collagen

crosslinks in postinfarction remodeling in the rat. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* Volume 44, Issue 4.

- 22) Bradbury AJ, Costall B, Domeney AM, Testa B, Jenner PG, Marsden CD, Naylor RJ. (1985) The toxic actions of MPTP and its metabolite MPP+ are not mimicked by analogues of MPTP lacking an N-methyl moiety. *Neurosci Lett.* 61(1-2):121-6.
- 23) Bryniarski K, Biedron R, Jakubowski A, Chlopicki S, Marcinkiewicz J. (2007) Anti-inflammatory effect of 1-methylnicotinamide in contact hypersensitivity to oxazolone in mice; involvement of prostacyclin. *Eur J Pharmacol.* 14;578(2-3):332-8. Sep 26.
- 24) Brzozowski T, Konturek PC, Chlopicki S, Sliwowski Z, Pawlik M, Ptak-Belowska A, Kwiecien S, Drozdowicz D, Pajdo R, Slonimska E, Konturek SJ, Pawlik WW. (2008) Therapeutic potential of 1-methylnicotinamide against acute gastric lesions induced by stress: role of endogenous prostacyclin and sensory nerves. *J Pharmacol Exp Ther.* 326(1):105-16.
- 25) Bunting JW, Laderoute KR, Norris DJ. (1980) The pH dependence of xanthine oxidase catalysis in basic solution. *Can. J. Biochem.* 58, 394–398.
- 26) Cai Z, Xiao F, Fratkin JD, Rhodes PG. (1999) Protection of neonatal rat brain from hypoxic-ischemic injury by LY379268, a Group II metabotropic glutamate receptor agonist. *Neuroreport.* 16:10(18):3927-31.
- 27) Cambonie G, Laplanche L, Kamenka JM, Barbanel G. (2000) N-methyl-D-aspartate but not glutamate induces the release of hydroxyl radicals in the neonatal rat: modulation by group I metabotropic glutamate receptors. *J. Neurosci. Res.* 1;62(1):84-90.
- 28) Candelario-Jalil E, Bernd L, Fiebich L. (2008) Cyclooxygenase Inhibition in Ischemic Brain Injury. *Curr Pharml Design* 1401-1418 1401.
- 29) Caputa M, Rogalska J, Nowakowska A. (2001) Effect of temperature on postanoxic, potentially neurotoxic changes of plasma pH and free iron level in newborn rats. *Brain Res Bull.* 55: 281-286
- 30) Carlson LA. (2005) Nicotinic acid: the broad-spectrum lipid drug. A 50th anniversary review. *J Intern Med.* 258(2):94-114.
- 31) Cartwright L, Williams AC, Ramsden DB. (2004) Nicotinamide: neuroprotective effects against dopamine and MPP+. In: *Proceedings of the Global College of Neuroprotection and Neuroregeneration, Annual Conference, Zermatt.*

- 32) Chalimoniuk M, Strosznajder J. (1998) NMDA receptor-dependent nitric oxide and cGMP synthesis in brain hemispheres and cerebellum during reperfusion after transient forebrain ischemia in gerbils: effect of 7-Nitroindazole. *J Neurosci Res.* 54(5):681-90.
- 33) Chan PH. (1998) Oxygen radical mechanisms in cerebral ischemia and reperfusion. *Monogr. Clin. Neurosci.* 16, 14–27.
- 34) Chen C, Bazan NG. (2005) Lipid signaling: sleep, synaptic plasticity, and neuroprotection. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 77(1-4):65-76.
- 35) Chen C, J.C. Magee, N.G. Baan. (2002) Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E2 signaling in hippocampal long-term synaptic plasticity, *J. Neurophysiol.* 87: 2851–2857.
- 36) Chlopicki S, Swies J, Mogielnicki A, Buczko W, Bartus M, Lomnicka M, Adamus J, Gebicki J. (2007) 1-Methylnicotinamide (MNA), a primary metabolite of nicotinamide, exerts anti-thrombotic activity mediated by a cyclooxygenase-2/prostacyclin pathway. *Br J Pharmacol.* 152(2):230-9.
- 37) Chong ZZ, Lin SH, Maiese K. (2002) Nicotinamide modulates mitochondrial membrane potential and cysteine protease activity during cerebral vascular endothelial cell injury. *J Vasc Res* 39: 131-47.
- 38) Conn PJ, Pin JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. (1997) *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 37:205-37.
- 39) Copin JC, Goodyear MC, Gidday JM, Shah AR, Gascon E, Dayer A, Morel DM, Gasche Y. (2005) Role of matrix metalloproteinases in apoptosis after transient focal cerebral ischemia in rats and mice. *Eur J Neurosci.* 22(7):1597-608.
- 40) Cowley TR, Fahey B, O'Mara SM. (2008) COX-2, but not COX-1, activity is necessary for the induction of perforant path long-term potentiation and spatial learning in vivo. *Eur J Neurosci.* 7(11):2999-3008.
- 41) Coyle JT, Puttfarcken P. (1993) Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science,* 262, 689–695.
- 42) Cramer SC, Chopp M. (2000) Recovery recapitulates ontogeny. *Trends Neurosci* 23: 265-271.
- 43) Cui Y, Kataoka Y, Satoh T, Yamagata A, Shirakawa N, Watanabe Y, Suzuki M, Yanase H, Kataoka K, Watanabe Y. (1999) Protective effect of prostaglandin I(2) analogs on ischemic delayed neuronal damage in gerbils. *Biochem Biophys Res Commun.* 265(2):301-4.

- 44) Cunningham LA, Wetzel M, Rosenberg GA. (2005) Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. *Glia*; 50: 329-339.
- 45) Danysz W, Parsons CG. (2003) The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. *Int J Geriatr Psychiatry*. 18 (Suppl 1):S23-32.
- 46) Danysz W, Parsons CG. GlycineB recognition site of NMDA receptors and its antagonists. (1998) *Amino Acids*. 14(1-3):205-6.
- 47) Danysz W, Zajackowski W, Parsons CG, (1995) Modulation of learning processes by ionotropic glutamate receptor ligands. *Behav Pharmacol* 6 (5 and 6): 455-474.
- 48) Danysz W. (2001) Neurotoxicity as a mechanism for neurodegenerative disorders: basic and clinical aspects. *Expert Opin Investig Drugs*. 10(5):985-9.
- 49) Danysz W. LY-544344. Eli Lilly. (2005) *IDrugs*. 8(9):755-62.
- 50) Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA, Uhl GR, Snyder SH. (1993) Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J. Neurosci*. 13(6):2651-61.
- 51) De Keyser J, Sulter G, Luiten PG. (1999) Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: are we doing the right thing? *Trends Neurosci*. 22(12):535-40.
- 52) Delaney J, Hodson MP, Thakkar H, Connor SC, Sweatman BC, Kenny SP, McGill PJ, Holder JC, Hutton KA, Haselden JN, Waterfield CJ. (2005) Tryptophan-NAD⁺ pathway metabolites as putative biomarkers and predictors of peroxisome proliferation. *Arch Toxicol*. 79(4):208-23.
- 53) Dietrich W. d., Lin B., Globus M. Green E. J. Ginsberg M., D., Busto R. 1995 effect of delayed MK-801 (Dizocilipine) treatment with or without immediate postischemic hypothermia on chronic neuronal survival after global forebrain ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 15: 960-968.
- 54) Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. (1999) *Pharmacol Rev*. 51(1):7-61.
- 55) Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. (1999) *Trends Neurosci*. 22(9):391-7.
- 56) Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. (1999) *Pharmacol Ther*. 81(3):163-221.

- 57) Dogan A, Temiz C, Türker RK, Egemen N, Başkaya MK. (1996) Effect of the prostacyclin analogue, iloprost, on infarct size after permanent focal cerebral ischemia. *Gen Pharmacol.* 27(7):1163-6.
- 58) Dragun P, Makarewicz D, Wójcik L, Ziemka-Nałecz M, Słomka M, Zalewska T. (2008) Matrix metalloproteinases activity during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. The effect of 1-methylnicotinamide (MNA). *J Physiol Pharmacol.* 59(3):441-55.
- 59) Drelicharz Ł, Mikita J, Chabielska E, et al. (2005) Śródbłonkowe działanie aldosteronu – implikacje terapeutyczne płynące z badań podstawowych i klinicznych. *Kardiol Pol* 63: 409-19.
- 60) Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LM, Handran SD, Rothman SM, Lin TS, Goldberg MP, Choi DW. (1995) Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J Neurosci* 15: 6377-6388.
- 61) Dykens JA. (1994) Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca^{2+} and Na^{+} : implications for neurodegeneration. *J Neurochem* 63: 584-591.
- 62) Eimerl S, Schramm M. (1994) The quantity of calcium that appears to induce neuronal death. *J Neurochem.* 62(3):1223-6.
- 63) Emmerich MV, Velasco S., Muniz O.P., Oyarzun C.A., Claro J.C., Bastias M.J., Toro L.A. (2006) Nicotinamide protected first-phase insulin response (FPIR) and prevented clinical disease in first-degree relatives of type-1 diabetics. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 71: 320–333.
- 64) Erb C, Seidel A, Frank H, Platt KL, Oesch F, Klein J. (1999) Formation of N-methylnicotinamide in the brain from a dihydropyridine-type prodrug: effect on brain choline. *Biochem Pharmacol.* 57(6):681-4.
- 65) Faqi Li, Chong ZZ, Maiese K. (2004) Navigating novel mechanisms of cellular plasticity with the NAD^{+} precursor and nutrient nicotinamide. *Frontiers in Bioscience* 9, 2500-2520.
- 66) Feng Y, Paul IA, LeBlanc MH. (2006) Nicotinamide reduces hypoxic ischemic brain injury in the newborn rat. *Brain Research Bulletin* Vol. 69: 2, 31.
- 67) Ferrarese C. Beal M. F. Excitotoxicity in neurological diseases. New therapeutic challenge (2004). Wydanie ilustrowane, Walters Kluwer.

- 68) Fujimoto M, Hirai K, Okabayashi T. (1982) Comparison of the effects of GABA and chloride ion on the affinities of ligands for the benzodiazepine receptor. *Life Sci.* 30(1):51-7.
- 69) Fukushima T, Kaetsu A, Lim H, Moriyama M. (2002) Possible role of 1-methylnicotinamide in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Toxic Pathol* 53: 469–473.
- 70) Fukushima T, Tawara T, Isobe A, Hojo N, Shiwaku K, Yamane Y. (1995) Radical formation site of cerebral complex I and Parkinson's disease. *J Neurosci Res.* 15;42 (3):385-90.
- 71) Fukushima T. (2005) Niacin metabolism and Parkinson's Disease. *Environ. Health Prev. Med.* 10:3-8.
- 72) Fukuwatari T, Shibata K. (2007) Effect of nicotinamide administration on the tryptophan-nicotinamide pathway in humans. *Int J Vitam Nutr Res.* 77(4):255-62.
- 73) Gale EA, Bingley PJ, Emmett CL, et al. (2004) European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT): a randomised controlled trial of intervention before the onset of type 1 diabetes. *Lancet* 363: 925-31.
- 74) Gallo V, Suergiu R, Giovannini C, Levi G. (1987) Glutamate receptor subtypes in cultured cerebellar neurons: modulation of glutamate and gamma-aminobutyric acid release. *J Neurochem.* 49(6):1801-9.
- 75) Ganji S.H., Kamanna V.S., Kashyap M.L. (2003) Niacin and cholesterol: role in cardiovascular disease. *J. Nutr. Biochem.* 14: 298–305.
- 76) Gardoni F, Di Luca M. (2006) New targets for pharmacological intervention in the glutamatergic synapse. *Eur J Pharmacol.* Sep 1;545(1):2-10.
- 77) Gasche Y, Soccac PM, Kanemitsu M, Copin J-C. (2006) Matrix metalloproteinases and diseases of the central nervous system with a special emphasis on ischemic brain. *Front in Biosci* 11: 1289-1301.
- 78) Gebicki J, Sysa-Jedrzejowska A, Adamus J, Woźniacka A, Rybak M, Zielonka J. (2003) 1-Methylnicotinamide: a potent anti-inflammatory agent of vitamin origin. *Pol J Pharmacol.* 55(1):109-12.
- 79) Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999; 285(5430):1028-32.
- 80) Girouard H, Wang G, Gallo EF, Anrather J, Zhou P, Pickel VM, Iadecola C. (2009) NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2. *J Neurosci.* 29(8):2545-52.

- 81) Gosteli J. (2004) Nicotinamide trials in diabetes intervention Does a metabolite provide benefit? *Medical Hypotheses* Volume 64, Issue 5, Pages 1062-1063.
- 82) Grosser T. (2006) The pharmacology of selective inhibition of COX-2. *Thromb Haemost.* 96(4):393-400.
- 83) Groves P, Finn BE, Kuźnicki J, Forsén S. (1998) A model for target protein binding to calcium-activated S100 dimers. *FEBS Lett.* 421(3):175-9.
- 84) Gryglewski RJ. (2008) Prostacyclin among prostanoids *Farmacological Reports* 60 3-11.
- 85) Gurd JW, Bissoon N, Beesley PW, Nakazawa T, Yamamoto T, Vannucci SJ. (2002) Differential effects of hypoxia-ischemia on subunit expression and tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor in 7- and 21-day-old rats. *J Neurochem.* 82(4):848-56.
- 86) Hageman GJ, Stierum RH (2001). Niacin, poly(ADP-ribose) polymerase-1 and genomic stability. *Mutat. Res.* 475: 45–56.
- 87) Hartley DM, Kurth MC, Bjerckness L, Weiss JH, Choi DW. (1993) Glutamate receptor-induced 45Ca^{2+} accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration. *J Neurosci.* 13(5):1993-2000.
- 88) Hewett SJ, Uliasz TF, Vidwans AS, Hewett JA. Cyclooxygenase-2 contributes to N-methyl-D-aspartate-mediated neuronal cell death in primary cortical cell culture. (2000) *J Pharmacol Exp Ther* 293(2): 417-25.
- 89) Hossmann KA. (1994) Glutamate-mediated injury in focal cerebral ischemia: the excitotoxin hypothesis revised. *Brain Pathol.* 4(1):23-36.
- 90) Hudson JL, van Horne CG, Strömberg I, Brock S, Clayton J, Masserano J, Hoffer BJ, Gerhardt GA. (1993) Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res.* (1-2):167-74.
- 91) Ikonomidou C, Bittigau P, Koch C, Genz K, Hoerster F, Felderhoff-Mueser U, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW. (2000) Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem Pharmacol.* 62:401-5.
- 92) Ikonomidou C. Triggers of apoptosis in the immature brain. (2009) *Brain Dev.;* 31: 488-492.

- 93) Kakehi M, Koyabu N, Nakamura T, Uchiumi T, Kuwano M, Ohtani H, Sawada Y. (2002) Functional characterization of mouse cation transporter mOCT2 compared with mOCT1.. *Biochem Biophys Res Commun.* 296(3):644-50.
- 94) Kawano T, Anrather J, Zhou P, Park L, Wang G, Frys KA. (2006) Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity. *Nat Med* 12(2):225-229.
- 95) Keller M, Jackisch R, Seregi A, Hertting G. (1985) Comparison of prostanoid forming capacity of neuronal and astroglial cells in primary culture. *Neurochem. Int* 7: 655-665.
- 96) Kiedrowski L, Brooker G, Costa E, Wroblewski JT. (1994) Glutamate impairs neuronal calcium extrusion while reducing sodium gradient. *Neuron.* 12(2):295-300.
- 97) Kim EJ, Lee JE, Kwon KJ, Lee SH, Moon CH, Baik EJ. (2001) Differential roles of cyclooxygenase isoforms after kainic acid-induced prostaglandin E(2) production and neurodegeneration in cortical and hippocampal cell cultures. *Brain Res* 908(1):1-9.
- 98) Kirschner PB, Jenkins BG, Schulz JB, Finkelstein SP, Matthews RT, Rosen BR, Beal MF. (1996) NGF, BDNF and NT-5, but not NT-3 protect against MPP+ toxicity and oxidative stress in neonatal animals. *Brain Res.* 713(1-2):178-85.
- 99) Klaidman L, Morales m, Kem S, Yang J, Chang M-I, Adams JD. (2003) Nicotinamide Offers Multiple Protective Mechanisms in Stroke as a Precursor for NAD+, as a PARP Inhibitor and by Partial Restoration of Mitochondrial Function. *Pharmacology* 69:150-157.
- 100) Koike M, Shibata M, Tadakoshi M, Gotoh K, Komatsu M, Waguri S, Kawahara N, Kuida K, Nagata S, Kominami E, Tanaka K, Uchiyama Y. (2008) Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *Am J Pathol.* 172(2):454-69.
- 101) Kostyuk P, Verkhratsky A. (1995) Calcium signaling in the nervous system. John Wiley & Sons, Chichester, :1-206.
- 102) Koutsilieris E, Riederer P. (2007) Excitotoxicity and new antigitamatergic strategies in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Parkinsonism and Related Disorders* 13:329–331.
- 103) Kristian T, Siesjo BK. (1996) Calcium-related damage in ischemia. *Life Sci.*;59(5-6):357-67.
- 104) Laezza F, Dingledine R. (2004) Voltage-controlled plasticity at GluR2-deficient synapses onto hippocampal interneurons. *J Neurophysiol.* 92(6):3575-81.

- 105) Lapin IP. (1981) Nicotinamide, inosine and hypoxanthine, putative endogenous ligands of the benzodiazepine receptor, opposite to diazepam are much more effective against kynurenine-induced seizures than against pentylenetetrazol-induced seizures. *Pharmacol Biochem Behav.* 14(5):589-93.
- 106) Lazarewicz JW, Salinska E. (2005) Udział jonów wapnia w patologii niedokrwiennej mózgu. W: *Mózg a niedokrwienie* Strosznajder JB, Czernicki Z (eds), Platan, Kraków.
- 107) Lazarewicz JW, Salińska E, Speina E, Gadamski R. (1994) Effects of MK-801 and ganglioside GM1 on postischemic prostanoid release and hippocampal lesion in gerbil brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 54(4):293-305.
- 108) Lazarewicz JW, Ziembowicz A, Matyja E, Stafiej A, Zieminska E. (2003) Homocysteine-evoked 45Ca release in the rabbit hippocampus is mediated by both NMDA and group I metabotropic glutamate receptors: in vivo microdialysis study. *Neurochem. Res.* 28(2):259-69.
- 109) Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685..
- 110) Lee L, Stollar E, Chang J, Grossmann JG, O'Brien R, Ladbury J, Carpenter B, Roberts S, Luisi B. (2001) Expression of the Oct-1 transcription factor and characterization of its interactions with the Bob1 coactivator. *Biochemistry* 40(22):6580-8.
- 111) Leppert D, Ford J, Stabler G, Grygar C, Lienert C, Huber S, Miller KM, Hauser SL, Kappos L. Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is selectively elevated during relapses and stable phases of multiple sclerosis. *Brain* 1998; 121:2327-2334.
- 112) Li W, Wu S, Hickey RW, Rose ME, Chen J, Graham SH. (2008) Neuronal Cyclooxygenase-2 Activity and Prostaglandins PGE₂, PGD₂, and PGF₂α Exacerbate Hypoxic Neuronal Injury in Neuron-enriched Primary Culture. *Neurochem Res* 33(3):490-499.
- 113) Liou HH, Chen RC, Tsai YF, Chen WP, Chang YC, Tsai MC. (1996) Effects of paraquat on the substantia nigra of the wistar rats: neurochemical, histological, and behavioral studies. *Toxicol Appl Pharmacol.* 137(1):34-41.
- 114) Lo EH, Wang X, Cuzner ML. Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: role of plasminogen activators and matrix metalloproteinases. *J. Neurosci. Res.* 2002; 69:1-9.
- 115) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265 - 269.

- 116) Maiese K, Chong ZZ. (2003) Nicotinamide: necessary nutrient emerges as a novel cytoprotectant for the brain. *Trends Pharmacol Sci* 24: 228-232.
- 117) Maiza A, Waldek S, Ballardie FW, Daley-Yates PT. (1992) Estimation of renal tubular secretion in man, in health and disease, using endogenous N-1-methylnicotinamide. *Nephron.*;60(1):12-6.
- 118) Makarewicz D, Duszczak M, Gadamski R, Danysz W, Łazarewicz JW. (2006) Neuroprotective potential of group I metabotropic glutamate receptor antagonists in two ischemic models. *Neurochem Int.* 48(6-7):485-90. a
- 119) Makarewicz D, Gadamski R, Ziembowicz A, Kozikowski AP, Wroblewski JT, Lazarewicz JW. (2006) Neuroprotective effects of the agonist of metabotropic glutamate receptors ABHxD-I in two animal models of cerebral ischaemia. *Resuscitation.* Jan;68(1):119-26. b
- 120) Marini AM, Ueda Y, June CH. (1999) Intracellular survival pathways against glutamate receptor agonist excitotoxicity in cultured neurons. Intracellular calcium responses. *Ann N Y Acad Sci*; 890: 421-437.
- 121) Martin LJ, Blackstone CD, Haganir RL, Price DL. (1992) Cellular localization of a metabotropic glutamate receptor in rat brain. *Neuron.* 9(2):259-70.
- 122) Mayer ML, Westbrook GL. (1987) Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J. Physiol.* 394:501-27.
- 123) McCullough L, Wu L, Haughey N, Liang X, Hand T, Wang Q, Breyer RM, Andreasson K. (2004) Neuroprotective function of the PGE2 EP2 receptor in cerebral ischemia. *J Neurosci.* 7;24(1):257-68.
- 124) Mehl M, Bidmon H.-J, Hilbig H, Zilles K, Dringer R, Ullrich V. (1999) Prostacyclin synthase is localized in rat, bovine and human neuronal brain cells. *Neuroscience letters* , 271: 187-190
- 125) Mehrens T, Lelleck S, Cetinkaya I, Knollmann M, Hohage H, Gorboulev V, Bokník P, Koepsell H, Schlatter E. (2000) The affinity of the organic cation transporter rOCT1 is increased by protein kinase C-dependent phosphorylation. *J Am Soc Nephrol.* 11(7):1216-24.
- 126) Miwa H, Kubo T, Morita S, Nakanishi I, Kondo T. (2004) Oxidative stress and microglial activation in substantia nigra following striatal MPP+. *Neuroreport.* 29;15(6):1039-44.

- 127) Mogielnicki A, Kramkowski K, Hermanowicz JM, Buczko W. (2008) N-methylnicotinamide failed to induce endothelial prostacyclin release in perfused rat hindquarters. *Pharmacological reports* 60(6):1025-9.
- 128) Mogielnicki A, Kramkowski K, Pietrzak L, Buczko W. (2007) N-methylnicotinamide inhibits arterial thrombosis in hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol.* 58(3):515-27.
- 129) Montana V, Ni Y, Sunjara V, Hua X, Parpura V. (2004) Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci.* Mar 17;24(11):2633-42.
- 130) Montoliu C, Llansola M, Cucarella C, Grisolia S, Felipo V. (1997) Activation of the metabotropic glutamate receptor mGluR5 prevents glutamate toxicity in primary cultures of cerebellar neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281(2):643-7.
- 131) Murphy S, Pearce B, Jeremy J, Dandona P. (1988) Astrocytes as eicosanoid-producing cells. *Glia* 1(4):241-5.
- 132) Murray HJ, O'Connor JJ. (2003) A role for COX-2 and p38 mitogen activated protein kinase in long-term depression in the rat dentate gyrus in vitro. *Neuropharmacology.* 44(3):374-80.
- 133) Musfeld C., Biollaz J., Belaz N., Kesselring U. W. , Decosterd L. A. (2001) Validation of an HPLC method for the determination of urinary and plasma levels of N1-methylnicotinamide, an endogenous marker of renal cationic transport and plasma flow. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 24: 391–404.
- 134) Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C. (1997) Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci.* 17(8):2746-55.
- 135) Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307(5950):462-5.
- 136) O'Brien BA, Harmon BV, Cameron DP, et al. (2000) Nicotinamide prevents the development of diabetes in the cyclophosphamide-induced NOD mouse model by reducing beta-cell apoptosis. *J Pathol* 191: 86-92.
- 137) Olanow C.W. (1993) A radical hypothesis for neurodegeneration. *TINS.* 16: 439-444.
- 138) Olmos PR, Hodgson MI, Maiz A, Manrique M, De Valdes MD, Foncea R, Acosta AM, release in the rabbit hippocampus is mediated by both NMDA and group I metabotropic glutamate receptors: in vivo microdialysis study. *Neurochem. Res.* Feb;28(2):259-69.
- 139) Palmer C, Vannucci RC, Towfighi J. (1990) Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allopurinol. *Pediatr Res.* 27(4 Pt 1):332-6.

- 140) Palucha A, Pilc A. (2000) Glutaminianergiczne receptory metabotropowe (mGluR) XVII Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Przegorzały 2000:53-63.
- 141) Parsons CG, Danysz W, Zieglgansberger W. (2005) Excitatory amino acid neurotransmission. *Handb Exp Pharmacol.* 169:249-303.
- 142) Parsons RB, Smith ML, Williams AC, Waring RH, Ramsden DB (2002) Expression of nicotinamide N-methyltransferase (E.C. 2.1.1.1) in the Parkinsonian brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 111-124.
- 143) Parsons RB, Smith SW, Waring RH, Williams AC, Ramsden DB. (2003) High expression of nicotinamide N-methyltransferase in patients with idiopathic Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 342(1-2):13-6.
- 144) Petitclerc E, Boutaud A, Prestayko A, Xu J, Sado Y, Ninomiya Y, Sarras MP Jr, Hudson BG, Brooks PC. New functions for non-collagenous domains of human collagen type IV. Novel integrin ligands inhibiting angiogenesis and tumor growth in vivo. *J Biol Chem.* 2000; 275(11):8051-61.
- 145) Pias EK, Aw TY. 2002 Apoptosis in mitotic competent undifferentiated cells is induced by cellular redox imbalance independent of reactive oxygen species production. *FASEB J.* Jun;16(8):781-90.
- 146) Pilc A. (2003) Receptory metabotropowe dla glutaminianu (mGluR) w neuroprotekcji. Neuroprotekcja. XX Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Mogilany. Red. M. Śmiałowska, IF PAN, Kraków, str. 29-40.
- 147) Pluta R, Salińska E, Lazarewicz JW. (1990) Prostacyclin reduces early ischemic changes in central nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 50(4-5):295-302.
- 148) Pumpo R, Sarnelli G, Spinella A, Budillon G, Cuomo R. (2001) The metabolism of nicotinamide in human liver cirrhosis: a study on N-methylnicotinamide and 2-pyridone-5-carboxamide production. *Am J Gastroenterol.* 96(4):1183-7.
- 149) Rice J.E., R.C Vannucci, J.B.Brierley. (1981) The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann.Neurol.* 9: 131-141.
- 150) Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke.* 1998; 29(5):1020-30.

- 151) Rosa R, Sanfeliu C, Rodríguez-Farré E, Frandsen A, Schousboe A, Sunol C. (1997) Properties of ryanodine receptors in cultured cerebellar granule neurons: effects of hexachlorocyclohexane isomers and calcium. *J Neurosci Res.* Jan 1;47(1):27-33.
- 152) Rothman SM, Samaie M. (1985) Physiology of excitatory synaptic transmission in cultures of dissociated rat hippocampus. *J Neurophysiol.* Sep;54(3):701-13.
- 153) Roux F, Couraud PO. (2005) Rat brain endothelial cell lines for the study of blood-brain barrier permeability and transport functions. *Cell Mol Neurobiol* 25:41-58.
- 154) Sairam K, Saravanan KS, Banerjee R. (2003) Non-steroidal anti-inflammatory drug sodium salicylate, but not diclofenac or celecoxib, protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced dopaminergic neurotoxicity in rats. *Brain Res* 966:245–252.
- 155) Salińska E, Danysz W, Łazarewicz JW. (2005) The role of excitotoxicity in neurodegeneration. *Folia Neuropathol.* 43(4):322-39.
- 156) Sattler R, Tymianski M. (2000);Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med.* 78(1):3-13.
- 157) Sayre LM, Arora PK, Iacofano LA et al (1986) Comparative toxicity of MPTP, MPP+ and 3,3-dimethyl-MPDP+ to dopaminergic neurons of the rat substantia nigra. *Eur J Pharmacol*124:171–174.
- 158) Schoepp DD, Jane DE, Monn JA. (1999) Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology.* 38(10):1431-76.
- 159) Schousboe A, Drejer J, Hansen GH, Meier E. (1985) Cultured neurons as model systems for biochemical and pharmacological studies on receptors for neurotransmitter amino acids. *Dev Neurosci* 7: 252-262.
- 160) Schwartz-Bloom RD, Cook TA, Yu X. (1996) Inhibition of GABA-gated chloride channels in brain by the arachidonic acid metabolite, thromboxane A2. *Neuropharmacology* 35(9-10):1347-53.
- 161) Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P. (1994) Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(25): 12013-7.
- 162) Shang T, Uihlein AV, Van Asten J, Kalyanaraman B, Hillard CJ. (2003) 1-Methyl-4-phenylpyridinium accumulates in cerebellar granule neurons via organic cation transporter 3. *J Neurochem.* 85(2):358-67.

- 163) Shankaran S, Laptook A. (2003) Challenge of conducting trials of neuroprotection in the asphyxiated term infant. *Semin Perinatol.* 27: 320-332.
- 164) Shen CC, Huang HM, Ou HC, Chen HL, Chen WC, Jeng KC. (2004) Protective effect of nicotinamide on neuronal cells under oxygen and glucose deprivation and hypoxia / reoxygenation. *J Biomed Sci* 11: 472-481.
- 165) Sherwood NM, Timiras PS, (1970) A stereotaxic atlas of the developing rat brain. University of California Press Berkley, Los Angeles, London.
- 166) Sindhu KM, Banerjee R, Senthilkumar KS . (2006) Rats with unilateral median forebrain bundle, but not striatal or nigral, lesions by the neurotoxins MPP+ or rotenone display differential sensitivity to amphetamine and apomorphine. *Pharmacol Biochem Behav* 84:321–329.
- 167) Sirinathsinghji DJ, Heavens RP, Richards SJ. (1988) Experimental hemiparkinsonism in the rat following chronic unilateral infusion of MPP+ into the nigrostriatal dopamine pathway - Behavioural, neurochemical and histological characterization of the lesion. *Neuroscience* 27:117–128.
- 168) Somogyi A., Siebert D., Bochner F. (1990) Determination of endogenous concentration of N1-Methylnicotinamide in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 187: 160–165.
- 169) Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001; 17:463-516.
- 170) Stratford MR, Dennis MF, Hoskin P, Phillips H, Hodgkiss RJ, Rojas A. (1996) Nicotinamide pharmacokinetics in humans: effect of gastric acid inhibition, comparison of rectal vs oral administration and the use of saliva for drug monitoring. *Br J Cancer.* 74(1):16-21.
- 171) Strauss KI, Marini AM. (2002) Cyclooxygenase-2 inhibition protects cultured cerebellar granule neurons from glutamate-mediated cell death. *J Neurotrauma* 19(5): 627-38.
- 172) Strazielle N, Khuth T., Ghersi-Egea JF. (2004) Detoxification systems, passive and specific transport for drugs at the blood–CSF barrier in normal and pathological situations *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 1717– 1740.

- 173) Strosznajder J, Chalimoniuk M, Samochocki M, Gadamski R. (1994) Nitric oxide: a potent mediator of glutamatergic neurotoxicity in brain ischemia. *Ann N Y Acad Sci.*17;723:429-32.
- 174) Svedin P, Hagberg H, Sawman K, Zhu Ch, Mallard C. (2007) Matrix metalloproteinase-9 knock-out protects the immature brain after cerebral hypoxia-ischemia. *J Neurosci* 27: 1511-1518.
- 175) Szutowicz AJ. (2001) Aluminum, NO, and nerve growth factor neurotoxicity in cholinergic neurons. *Neurosci Res.* 66(5):1009-18.
- 176) Takamatsu H, Kondo K, Ikeda Y, Umemura K. (1998) Neuroprotective effects depend on the model of focal ischemia following middle cerebral artery occlusion. *Eur J Pharmacol.* 4;362(2-3):137-42.
- 177) Takamatsu H, Tsukada H, Watanabe Y, Cui Y, Kataoka Y, Hosoya T, Suzuki M, Watanabe Y. (2002) Specific ligand for a central type prostacyclin receptor attenuates neuronal damage in a rat model of focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 925(2):176-82.
- 178) Taylor DL, Mehmet H, Cady EB, Edwards AD. (2002) Improved neuroprotection with hypothermia delayed by 6 hours following cerebral hypoxia-ischemia in the 14-day-old rat. *Pediatr Res.* 51: 13-19.
- 179) Teismann P, Tieu K, Cohen O, Choi DK, Wudu C, Marks D. (2003) Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease. *Mov Disord* 18, 121– 129.
- 180) Toscano CD, Ueda Y, Tomita YA, Vicini S, Bosetti F. (2008) Altered GABAergic neurotransmission is associated with increased kainate-induced seizure in prostaglandin-endoperoxide synthase-2 deficient mice. *Brain Res Bull* 75:598–609.
- 181) Toscano CH D a, Philip J. Kingsley b, Lawrence J. Marnett b, Francesca Bosetti F. (2008) NMDA-induced seizure intensity is enhanced in COX-2 deficient mice. *NeuroToxicology* 29 1114–1120.
- 182) Tsumoto T, Hagihara K, Sato H, Hata Y. (1987) NMDA receptors in the visual cortex of young kittens are more effective than those of adult cats. *Nature* 327: 513-4.
- 183) Urbańska E, Ikonomidou C, Sieklucka M, Turski WA. (1991) Aminooxyacetic acid produces excitotoxic lesions in the rat striatum. *Synapse* 9(2):129-35.
- 184) Vargas HM, Jenden DJ. (1996) Elevation of cerebrospinal fluid choline levels by nicotinamide involves the enzymatic formation of N1-methylnicotinamide in brain tissue. *Life Sci.* 58(22):1995-2002.

- 185) Venstrom KA, Reichardt LF. Extracellular matrix. 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system. *FASEB J.* 1993; 7(11):996-1003.
- 186) Venucci SJ, Hagberg H. (2004) Hypoxia-ischemia in the immature brain *J Exp Biol* 207, 3149-3154.
- 187) Vivian VM, Chalupka MM, Reynolds MS. (1958) Some aspects of tryptophan metabolism in human subjects. I. Nitrogen balances, blood pyridine nucleotides and urinary excretion of N1-methylnicotinamide and N1-methyl-2-pyridone-5-carboxamide on a low-niacin diet. *J Nutr.* 66(4):587-98.
- 188) Wahlgren N, Ahmed N, Davalos A. (2007) for the SITS-MOST Investigators: thrombolysis with alteplase for acute ischemic stroke in the Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study. *Lancet*; 369: 275–282.
- 189) Wang CX, Shuaib A. NMDA/NR2B selective antagonists in the treatment of ischemic brain injury. (2005) *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 4(2):143-51
- 190) Wang Q, Yu S, Simonyi A, Sun GY, Sun AY. (2005) Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 31:3–16.
- 191) Wang X, Chen XQ, Yang HH, Hu GY. (1999) Comparison of the effects of cholinesterase inhibitors on [3H] MK-801 binding in rat cerebral cortex, *Neurosci. Lett.* 272 21–24.
- 192) Watała C, Kaźmierczak P, Dobaczewski M, Przygodzki T, Bartuś M, Łomnicka M, Słomińska EM, Durackova Z, Chłopicki S. (2009) Anti-diabetic effects of 1-methylnicotinamide (MNA) in streptozocin-induced diabetes in rats. *Pharmacol Rep.* 61(1):86-98.
- 193) Watanabe Y, Matsumura K, Takechi H, Kato K, Morii H, Björkman M, Långström B, Noyori R, Suzuki M, Watanabe Y. (1999) A novel subtype of prostacyclin receptor in the central nervous system. *J Neurochem.* 72(6):2583-92.
- 194) Wieloch T, Harris RJ, Siesjö BK. (1982) Brain metabolism and ischemia: mechanism of cell damage and principles of protection. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2 Suppl 1:S5-9.
- 195) Wilcock GK. (2003) Dementia with Lewy bodies. *Lancet.* 362(9397):1689-90.
- 196) Willets JM, Lunec J, Williams AC, Griffiths HR. (1993) Neurotoxicity of nicotinamide derivatives: their role in the etiology of Parkinson's disease. *Biochem Soc Trans* (3):299.

- 197) Williams AC, Cartwright LS, Ramsden DB. (2005) Parkinson's disease: the first common neurological disease due to auto-intoxication? *QJM* 98: 215-226. a
- 198) Williams AC, Ramsden DB. (2005) Autotoxicity, methylation and a road to the prevention of Parkinson's disease. *Journal of Clinical Neuroscience* 12(1), 6–11. b
- 199) Williams AC, Ramsden DB. (2005) Nicotinamide homeostasis: A xenobiotic pathway that is key to development and degenerative diseases . *Medical Hypotheses* 65, 353–362. c
- 200) Williams AC, Ramsden DB. (2005) Nicotinamide: A double edged sword. *Parkinsonism Relat Disord* 11: 413-420. d
- 201) Williams TL, Shaw PJ, Lowe J, Bates D, Ince PG. (1995) Parkinsonism in motor neuron disease: case report and literature review. *Acta Neuropathol.* 89(3):275-83.
- 202) Wojcik L, Sawicka A, Rivera S, Zalewska T. (2009) Neurogenesis in gerbil hippocampus following brain ischemia: focus on the involvement of metalloproteinases. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 69(1):52-61.
- 203) Wozniacka A, Wieczorkowska M, Gebicki J. (2005) Topical application of 1-methylnicotinamide in the treatment of rosacea: a pilot study. *Clin Exp Dermatol* 30: 632-5.
- 204) Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley . (1993) Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron*; 11(2): 371-86.
- 205) Yang J, Klaidman LK, Nalbandian A, Oliver J, Chang ML, Chan PH, Adams JD. (2002) The effects of nicotinamide on energy metabolism following transient focal cerebral ischemia in Wistar rats. *Neurosci Lett.* 22;333(2):91-4.
- 206) Yang J, Adams JD. (2004) Structure Activity Relationships for Nicotinamide in the Treatment of Stroke. *Letters in Drug Design & Discovery* 1:58-65(8).
- 207) Yao, Hiroshi MD; Sadanaga-Akiyoshi, Fumiko MD; Ibayashi, Setsuro MD; Iida, Mitsuo MD Nicotinamide Attenuates Focal Ischemic Brain Injury: Meta-Analysis or Mechanism of Protection. (2004) *Stroke* 35(12): 2757-2758.
- 208) Yazdani U, German DC, Liang CL, Manzino L, Sonsalla PK, Zeevalk GD. (2006) Rat model of Parkinson's disease: chronic central delivery of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+). *Exp Neurol.* 1:172-83.
- 209) Yermakova AV, O'Banion MK. (2001) Downregulation of neuronal cyclooxygenase-2 expression in end stage Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*; 22(6): 823-36.

- 210) Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. (1994) Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 263(5147):687-9.
- 211) Ziemska E, Lazarewicz JW. (2006) Excitotoxic neuronal injury in chronic homocysteine neurotoxicity studied in vitro: the role of NMDA and group I metabotropic glutamate receptors. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 66(4):301-9.
- 212) Ziemska E, Stafiej A, Lazarewicz JW. (2003) Role of group I metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in homocysteine-evoked acute neurodegeneration of cultured cerebellar granule neurones. *Neurochem. Int.* 43(4-5):481-92.

VIII. Streszczenie

1-metylnikotynamid (MNA) jest kluczowym metabolitem nikotynamidu (NAM), witaminy niezbędnej dla podtrzymania fizjologicznych procesów w komórkowych. NAM przekształcany jest w organizmach ssaków do MNA na drodze metylacji przez enzym cytoplazmatyczny, N-metyltransferazę nikotynamidową. NAM wywiera wykazane doświadczalnie działanie ochronne i lecznicze nie tylko na komórki śródbłonna naczyń, ale i na neurony *in vitro* oraz *in vivo* w ischemii mózgu. Sugerowany mechanizm tego działania wydaje się być złożony i ma polegać na hamowaniu szeregu szlaków indukujących śmierć neuronów oraz potęgowaniu mechanizmów promujących ich przeżycie. Ostatnio wykazano, że MNA wykazuje także potencjał cytoprotekcyjny na obwodzie, działa przeciwzakrzepowo i ochronnie na śródbłonek naczyń. Brak jednak danych dotyczących neuroprotekcyjnego działania tego związku. Dotyczy to w szczególności niedokrwienia mózgu oraz procesów ekscytotoksyczności. Z drugiej strony, są doniesienia wskazujące na selektywną toksyczność MNA w stosunku do neuronów układu dopaminergicznego, przy udziale mechanizmów zbliżonych do działania MPP+, modelowej toksyny stosowanej do indukcji doświadczalnego parkinsonizmu u zwierząt.

Głównym celem badań przedstawionych w niniejszej rozprawie było określenie neuroprotekcyjnego potencjału MNA w modelu asfiksji okołoporodowej u siedmiodniowych szczurów, oraz próba wyjaśnienia mechanizmów spodziewanego neuroprotekcyjnego działania tego związku, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu MNA na ekscytotoksyczność *in vivo* i *in vitro*. Te badania zostały poprzedzone oceną ostrej toksyczności MNA po domózgowym podaniu u szczurów dorosłych oraz oseków, a także wobec neuronów w hodowli *in vitro*, oraz zbadaniem biodostępności MNA, jego wnikania do mózgu siedmiodniowych oseków szczurzych po podaniu dootrzewnowym oraz pobierania przez neurony *in vitro*.

Prowadzone w układzie doświadczalnym *in vivo* z wykorzystaniem dorosłych szczurów badania potencjalnej neurotoksyczności MNA wykazały, że ta substancja podana bezpośrednio do części zbitej istoty czarnej nie powoduje spadku liczebności neuronów dopaminergicznych. Ponadto po iniekcji MNA nie dochodziło do rozwoju reakcji zapalnej wyrażonej aktywacją komórek mikrogleju w rejon podania. Zastosowanie testu z apomorfiną, określającego stopień uszkodzenia na poziomie behawioralnym, nie ujawniło

wpływu MNA na aktywność ruchową szczurów dorosłych po wcześniejszym domózgowym podaniu tego związku. Dalsze badania przeprowadzono na 7-dniowych oseskach szczurzych, którym podano MNA do prążkowiec. Nie wywoływało to zwyrodnienia neuronów w rejonie projekcji neuronów dopaminergicznych. Po podaniu MNA dootrzewnowo nie obserwowano u tych zwierząt ubytku masy mózgu. Także badania *in vitro*, z wykorzystaniem hodowli pierwotnych komórek ziarnistych mózdzku wykazały brak wpływu MNA stosowanego aż do wysokich stężeń milimolarnych na przeżywalności neuronów po 24 godzinnej inkubacji.

Analiza biodostępności MNA została przeprowadzona *in vivo* oraz *in vitro*. Doświadczenia przeprowadzone *in vivo* miały na celu ocenę wnikania MNA do mózgu 7-dniowych osesków szczurzych po *i.p.* podaniu. Badanie to wykonano ze względu na znaną nieprzepuszczalność dojrzałej bariery krew-mózg dla MNA. Natomiast w eksperymentach *in vitro* testowano pobieranie MNA przez dwa typy komórek: neurony ziarniste mózdzku oraz komórki RBE4 wyprowadzone z endotelium mózgu szczura. Ponadto, dla oceny zdolności mózgu do syntezy MNA *in situ*, zbadano też na poziomie mRNA ekspresję N-metyltransferazy nikotynamidowej w mózgu szczura. Stwierdzono, że MNA po podaniu dootrzewnowym osiąga oznaczalne stężenia zarówno w surowicy jak i w tkankach mózgu, których wartość jest zależna od zastosowanej dawki i czasu. Potwierdzenie przemieszczania się MNA z krwi do mózgu 7-dniowych szczurów świadczy o tym, że zwierzęta z nie w pełni wykształconą barierą krew-mózg są właściwym modelem badania neuroprotekcji i/lub toksyczności MNA podawanego obwodowo. Wykazano, że komórki linii RBE4 pobierają znakowany MNA słabo, jednak w sposób uchwytny, natomiast neurony ziarniste mózdzku nagromadzają MNA w sposób zależny od czasu i dawki. Ponadto w mózgu szczura wykazano obecność mRNA N-metyltransferazy nikotynamidowej.

Badanie potencjału neuroprotekcijnego MNA przeprowadzono z wykorzystaniem zwierzęcego modelu asfiksji okołoporodowej noworodków, tj. hipoksji/ischemii 7-dniowych szczurów. W badaniach uwzględniono wpływ MNA na temperaturę ciała zwierząt po ischemii. Wykazano, że MNA podany jednorazowo po epizodzie niedotlenienia/niedokrwienia działa protekcyjnie w zastosowanym modelu w wąskim przedziale dawek rzędu 30 – 60 mg/kg masy ciała. Ponadto stwierdzono, że MNA nie zmienia mierzonej w *rectum* temperatury ciała zwierząt poddanych hipoksji/ischemii, co świadczy przeciw możliwości neuroprotekcji poprzez indukcję hipotermii poischemicznej.

Badania mechanizmów neuroprotekcynnego działania MNA w hipoksji/ischemii 7-dniowych szczurów rozpoczęto od testowania hipotezy przypisującej temu związkowi działanie hamujące ekscytotoksyczność, w której pośredniczą receptory NMDA. Przeprowadzono badanie jego wpływu MNA na ekscytotoksyczność *in vivo* i *in vitro*. Wykonano także badania zmierzające do wykrycia mechanizmu wpływu MNA na ekscytotoksyczność. Wykazano, że MNA po podaniu dootrzewnowym zmniejsza w sposób zależny od dawki wielkość uszkodzenia mózgu wywołanego domózgowym podaniem NMDA. Dalsze badania wykonano *in vitro* na hodowlach pierwotnych glutaminianergicznych neuronów ziarnistych mózdzku. Stwierdzono, że MNA obniża neurotoksyczność wywołaną podaniem NMDA, niezależnie od dawki hamuje napływ znakowanego wapnia do neuronów wywoływany podaniem glutaminianu, a w sposób zależny od dawki hamuje napływ znakowanego wapnia do neuronów wywoływany podaniem NMDA. Ponadto wykazano, że MNA obniża poziom wolnych rodników tlenowych w hodowli pierwotnej neuronów, ale nie hamuje spadku potencjału błony mitochondrialnej wywołanego przez podanie glutaminianu. Dalszym etapem tych badań było testowanie hipotezy, że mechanizm działania MNA łagodzącego ekscytotoksyczność może polegać na bezpośrednim hamowaniu aktywności receptorów NMDA, lub też na działaniu pośrednim, przez zwiększenie aktywności receptorów hamujących GABA_A. Taki efekt mógł być wynikiem powinowactwa MNA do receptora benzodiazepinowego. Zbadano więc wpływ MNA na wiązanie znakowanych ligandów: MK-801 i diazepamu do frakcji błon mózgu szczura. Stwierdzono, że MNA nie ma wpływu na wiązanie znakowanego MK-801 do błon, co przemawia przeciw bezpośredniemu działaniu MNA na aktywność receptora NMDA. Ponadto wykazano, że MNA nie wypiera znakowanego diazepamu z błon. Świadczy to przeciw hipotezie przypisującej MNA działanie obniżające pobudliwość neuronów i prawdopodobieństwo aktywacji receptora NMDA. Brak więc danych rzecz pozytywnej modulacji przez MNA aktywności receptora GABA_A, poprzez interakcje z miejscem benzodiazepinowym tego receptora.

Prowadzono dalsze badania zmierzające do wyjaśnienia mechanizmu neuroprotekcynnego działania MNA w hipoksji/ischemii 7-dniowych szczurów. Wykazały one, że podanie MNA po hipoksji/ischemii w dawkach indukujących neuroprotekcję prowadzi do hamowania aktywności kaspazy-3 egzekutorowej. Ponadto neuroprotekcynne dawki MNA modulują aktywności MMP2 i MMP9, a co za tym idzie wpływają na poischemiczną

przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej. Trudno ocenić, w jakim stopniu są to efekty pierwotne, a w jakim wtórne do indukowanej przez MNA neuroprotekcji. Stwierdzono także, że po podaniu MNA dochodzi do wzrostu aktywności COX-2 zarówno natychmiast po ischemii jak i po 24 godzinach a także, że w początkowej fazie rozwoju odpowiedzi poischemicznej podanie MNA zwiększa poziom PGI₂ w mózgu. Ocena, czy te efekty są elementem mechanizmu działania neuroprotekcijnego MNA wymaga dalszych badań.

Wyniki przedstawione w tej rozprawie upoważniają do wyciągnięcia wniosku, że MNA podany po hipoksji/ischemii w wąskim przedziale stężeń działa neuroprotekcynie w szczurzym modelu asfiksji okołoporodowej. MNA obniża szereg wskaźników ekscytotoksyczności, indukowanej przez NMDA, obserwowanej zarówno in vivo w mózgu 7-dniowych osesków szczurzych, jak i in vitro na hodowlach neuronów. Mechanizm tego działania nie jest jasny; uzyskane wyniki sugerują, że nie obejmuje on bezpośredniego hamowania aktywności receptora NMDA ani też aktywacji miejsca benzodiazepinowego receptora GABA_A. Mechanizm neuroprotekcijnego działania MNA w ischemii mózgu i ekscytotoksyczności jest plejotropowy, o niejasnych relacjach przyczynowo-skutkowych. Wydaje się, że do wtórnych efektów neuroprotekcyjnych MNA można zaliczyć hamowanie kaspazy-3 i modulację aktywności metaloproteinaz. Natomiast nowym mechanizmem neuroprotekcijnego działania MNA może być modulacja aktywności COX-2 w kierunku biosyntezy prostacykliny. Z drugiej strony brak jest dowodów na ostre neurotoksyczne działanie MNA w mózgu dorosłego szczura, jak też w mózgu osesków szczurzych i w hodowlach pierwotnych neuronów ziarnistych mózdzku. MNA przenika przez niedojrzałą barierę krew-mózg 7-dniowych osesków szczurzych i jest pobierany przez neurony, a wykazanie na poziomie mRNA ekspresji N-metyltransferazy nikotynamidowej w mózgu szczura sugeruje, że MNA może być także syntetyzowany w mózgu.

