

**INSTYTUT MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ  
im. MIROSŁAWA MOSSAKOWSKIEGO  
POLSKA AKADEMIA NAUK  
ZAKŁAD KOMÓRKOWEJ TRANSDUKCJI SYGNAŁU**

***GRZEGORZ A. CZAPSKI***

**UDZIAŁ TLENKU AZOTU  
W USZKODZENIU KOMÓREK  
ŚRÓDBŁONKA NACZYNIOWEGO I MÓZGU  
W STRESIE OKSYDACYJNYM  
WYWOŁANYM LIPOPOLISACHARYDEM**

**Praca doktorska wykonana pod kierunkiem  
Prof. dr hab. Joanny B. Strosznajder**

**WARSZAWA 2005**

*Pani Profesor Joannie Strosznajder,  
promotorowi niniejszej pracy,  
składam serdeczne podziękowania  
za pomoc i wsparcie udzielone w trakcie pisania rozprawy  
oraz za opiekę naukową podczas całego okresu pracy.*

*Współpracownikom  
z Zakładu Komórkowej Transdukcji Sygnału  
dziękuję za pomoc, cenne uwagi i wskazówki  
w czasie przygotowywania tej pracy.*

*Pani Profesor Barbarze Gajkowskiej  
dziękuję za pomoc w wykonaniu badań  
z zakresu mikroskopii elektronowej.*

*Mojej Rodzinie serdecznie dziękuję za wsparcie i cierpliwość.*

*Badania prezentowane w niniejszej pracy wykonano częściowo w ramach grantów Ministerstwa Nauki i Informatyzacji nr 3 PO5A 110 25 i PBZ-MIN-001/PO5/16.*

Część wyników z niniejszej pracy prezentowana jest w poniższych publikacjach:

1. Czapski GA, Avram D, Wirtz KWA, Pap EHW i Strosznajder JB (2001) Detection of protein oxidation in endothelial cells by fluorescently labelled tyramine. *Med. Sci. Monit*, 7: 606-609
2. Czapski GA, Avram D, Sakharov DV, Wirtz KW, Strosznajder JB, Pap EH (2002) Activated neutrophils oxidize extracellular proteins of endothelial cells in culture: effect of nitric oxide donors. *Biochem J*, 365: 897-902
3. Czapski GA, Cakała M, Kopczuk D, Strosznajder JB (2004) Effect of Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on oxidative stress evoked hydroxyl radical level and macromolecules oxidation in cell free system of rat brain cortex. *Neurosci Lett*, 356: 45-48
4. Czapski GA, Cakała M, Kopczuk D, Kamińska M, Strosznajder JB (2004) Inhibition of nitric oxide synthase prevents energy failure and oxidative damage evoked in the brain by lipopolysaccharide. *Pol J Pharmacol*, 56: 643-646
5. Czapski GA, Cakała M, Kopczuk D, Strosznajder JB (2005) The inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 protects the brain against energy depletion and free radical damage to macromolecules during inflammation. *Neurosci Lett* -w przygotowaniu
6. Czapski GA, Cakała M, Kamińska M, Strosznajder JB (2005) The inhibition of nitric oxide synthesis protects the brain against inflammation related apoptosis. *J Neurochem* - w przygotowaniu

## SPIS TREŚCI

<b>I. SPIS SKRÓTÓW</b>	<b>8</b>
<b>II. WSTĘP</b>	<b>11</b>
1. Wprowadzenie	11
2. Lipopolisacharyd – budowa i działanie	12
2.1. Budowa LPS	13
2.2. Białka wchodzące w interakcje z LPS	14
3. Mózg a układ odpornościowy	18
4. Znaczenie wolnych rodników w stanach zapalnych mózgu	20
4.1. Rola syntazy tlenu azotu	21
4.1.1. Tlenek azotu jako wolny rodnik	27
4.1.2. Rola NO w dysfunkcji mitochondriów	31
4.2. Rola polimerazy poli(ADP-rybozy)	34
<b>III. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY</b>	<b>37</b>
<b>IV. MATERIAŁY I METODY</b>	<b>40</b>
1. Materiał doświadczalny	40
2. Przygotowanie materiału do doświadczeń i analiz	40
2.1. Przygotowanie materiału z półkul mózgu do oznaczeń biochemicznych	40
2.2. Otrzymywanie homogenatu z mózgu i frakcji podkomórkowych	40
2.3. Izolacja granulocytów obojętnochłonnych	41
3. Modele stresu oksydacyjnego	41
3.1. Model stresu oksydacyjnego wywołanego LPS <i>in vivo</i>	41
3.2. Model stresu oksydacyjnego <i>in vitro</i>	41
3.2.1. Model stresu oksydacyjnego wywołanego LPS w hodowli komórek śródbłonna	41
3.2.2. Model stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem aktywowanych granulocytów w hodowli komórek śródbłonna	42
3.2.3. Model stresu oksydacyjnego wywołanego jonami metali Fe <sup>2+</sup> i Cu <sup>2+</sup> w homogenacie mózgu	42
4. Farmakologiczne modyfikacje reakcji mózgu na stres oksydacyjny wywołany LPS	44
5. Metody biochemiczne oznaczania aktywności enzymów	45
5.1. Oznaczanie aktywności syntazy tlenu azotu	45
5.2. Analiza aktywności kaspazy-3	45
5.3. Oznaczanie aktywności polimerazy poli-(ADP-rybozy) metodą immunochemiczną	46
6. Metody biochemiczne i chromatograficzne	46
6.1. Analiza produktów oksydacji kwasu p-hydroksybenzoesowego	46
6.2. Analiza dityrozyny- produktu oksydacji egzogennej L-tyrozyny	46
6.3. Badanie oksydacji białek komórek śródbłonna naczyniowego (HUVEC) w hodowli przy użyciu sondy fluorescencyjnej Tyrfluo	47
6.3.1. Synteza sondy Tyrfluo	48
6.3.2. Badanie oksydacji białek zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych HUVEC	48
6.4. Oznaczanie zawartości grup karbonylowych w białkach	49
6.5. Analiza oksydacji lipidów przez pomiar stężenia dialdehydu malonylowego (TBARS)	50
6.6. Oznaczanie stężenia β-NAD <sup>+</sup>	50

6.7. Oznaczanie przeżywalności komórek HUVEC	50
6.8. Oznaczanie zawartości białka	51
7. Metody immunochemiczne	51
7.1. Analiza dityrozyny w białkach komórek śródbłonka w hodowli metodą immunochemiczną	51
7.2. Oznaczanie poli-(ADP-rybozy) metodą immunochemiczną	51
7.3. Oznaczanie czynnika indukującego apoptozę (AIF) metodą immunochemiczną	52
7.4. Oznaczanie ilości $\beta$ -aktyny metodą immunochemiczną	52
8. Metody analizy ekspresji genów	52
8.1. Przygotowanie tkanki mózgowej do izolacji RNA	52
8.2. Izolacja RNA	53
8.3. Reakcja odwrotnej transkrypcji	53
8.4. Reakcja łańcuchowa polimerazy	53
9. Badania w mikroskopie elektronowym transmisyjnym	55
9.1. Badania morfologiczne w mikroskopie elektronowym transmisyjnym	55
9.2. Badania immunocytochemiczne w mikroskopie elektronowym transmisyjnym	55
10. Statystyczne opracowanie wyników	56
<b>V. WYNIKI</b>	<b>57</b>
1. Część I – Działanie LPS na komórki śródbłonka naczyniowego w hodowli	57
1.1. Zależna od stężenia LPS przeżywalność komórek śródbłonka naczyniowego w hodowli	57
1.2. Zależny od stężenia wpływ LPS na poziom stresu oksydacyjnego w komórkach śródbłonka naczyniowego	58
1.3. Działanie inhibitorów syntaz NO na przeżywalność komórek i stres wolnorodnikowy w komórkach śródbłonka poddanych działaniu LPS	60
1.4. Wpływ aktywnych granulocytów i rodnika ponadtlenkowego na stres oksydacyjny oznaczany przez pomiar oksydacji białek zewnątrzkomórkowych	61
1.5. Oksydacja białek wewnątrzkomórkowych HUVEC poddanych działaniu aktywnych granulocytów i $H_2O_2$	63
1.6. Badanie roli tlenu azotu w procesie oksydacji białek zewnątrzkomórkowych przy użyciu donora DEANO	64
1.7. Ocena działania donora NO, DEANO, na proces oksydacji L-tyrozyny pod wpływem aktywnych granulocytów i $H_2O_2$ w obecności HRP	65
1.8. Podsumowanie wyników badań na komórkach śródbłonka HUVEC	67
2. Część II – uszkodzenie tkanki nerwowej	68
2.1. Obserwacje behawioralne myszy po podaniu LPS	68
2.2. Zmiany mikroskopowo-elektronowe morfologiczne istoty czarnej po podaniu LPS	68
2.3. Wpływ LPS na aktywność NOS w mózgu	71
2.4. Wpływ LPS na ekspresję genów dla poszczególnych izoform NOS i $TNF\alpha$	72
2.5. Aktywacja PARP-1 w stresie wolnorodnikowym	75
2.6. Wpływ inhibitorów PARP i NOS na obniżone przez LPS stężenie $\beta$ -NAD <sup>+</sup>	76

---

2.7. Wpływ inhibitorów PARP i NOS na zwiększoną aktywność PARP	77
2.8. Uwalnianie i translokacja czynnika indukującego apoptozę (AIF) z mitochondriów w wyniku działania LPS	77
2.9. Aktywacja peroksydacji lipidów przez zależny od LPS stres wolnorodnikowy. Rola NO	82
2.10. Wpływ inhibitorów PARP-1 na aktywowaną przez LPS peroksydację lipidów w mózgu	83
2.11. Ocena działania inhibitorów PARP i NOS na peroksydację lipidów błon mózgu	83
2.12. Porównanie antyoksydacyjnych właściwości inhibitorów PARP do działania antyoksydantów	86
2.13. Podsumowanie	86
<b>VI. DYSKUSJA</b>	<b>86</b>
<b>VII. PODSUMOWANIE I WNIOSKI</b>	<b>103</b>
<b>VIII. STRESZCZENIE</b>	<b>104</b>
<b>IX. PIŚMIENNICTWO</b>	<b>107</b>



**I. SPIS SKRÓTÓW**

1400W	– N-(3-aminometylo)benzyloacetamidyna
3-AB	– 3-aminobenzamid
7-NI	– 7-nitroindazol
AMP	– 5'-adenozynomonofosforan
AMPK	– kinaza białkowa aktywowana AMP (ang. AMP-activated protein kinase)
ATP	– 5'-adenozynotrifosforan
BAX	– białko proapoptyczne związane z BCL2 (ang. BCL2-associated X protein)
BBB	– bariera krew–mózg (ang. blood brain barrier)
BCL10	– białko kompleksu receptora TLR4 (ang. B cell lymphoma/leukemia 10)
BH4	– (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopteryna
BPI	– białko bakteriobójcze (ang. bactericidal/permeability increasing protein)
BRCT	– domena wiążąca białka ufosforylowane przez kinazy ATR i ATM (ang. breast cancer susceptibility protein C terminus motif )
CaM	– kalmodulina
CAPON	– białko wiążące się z C-końcem domeny PDZ białka nNOS (ang. COOH-terminal PDZ ligand of nNOS)
CAT1	– transporter kationów aminokwasów-1 (ang. cationic amino acid transporter)
Cdk	– kinaza cyklino-zależna (ang. cyclin-dependent kinase)
cGMP	– cykliczny 3',5'-guanozynomonofosforan
CSF1	– czynnik stymulujący wzrost kolonii (ang. colony stimulating factor 1)
CtBP	– białko wiążące się z C-końcem nNOS (ang. COOH terminal binding protein)
DD	– domena śmierci (ang. death domain)
DHIQ	– 1,5-dihydroxyisoquinolina
DPQ	– 3,4-dihydro-5[4-(1-piperindylo)butoksy]-1(2H)-isoquinolina
EBM-2	– podstawowa pożywka dla komórek śródbłonkowych (ang. endothelial cell basal medium -2)
Erk	– kinaza aktywowana przez sygnały zewnątrzkomórkowe (ang. extracellular signal-regulated kinases)
FADD	– białko z domeną śmierci towarzyszące Fas (ang. Fas associated death domain)
FBS	– cieleca surowica płodowa (ang. fetal bovine serum)
FLICE	– konwertaza interleukiny-1 podobna do FADD (ang. Fas-associated death domain-like interleukin 1 -converting enzyme)
FLIP	– białkowy inhibitor podobny do FLICE (ang. FLICE-like inhibitory protein)

---

GSH	– glutation (forma zredukowana)
HAEC	– ludzkie komórki śródbłonna naczyniowego aorty w hodowli (ang. human aortic endothelial cells)
HDL	– lipoproteiny o dużej gęstości (ang. high-density lipoproteins)
HRP	– peroksydaza chrzanowa (ang. horseradish peroxidase)
HSP	– białko szoku cieplnego (ang. heat shock protein)
HUVEC	– ludzkie komórki śródbłonna naczyniowego pępowiny w hodowli (ang. human umbilical vein endothelial cells)
ICAM-1	– białko adhezyjne-1 (ang. intracellular adhesion molecule-1)
IFN $\gamma$	– interferon $\gamma$
IKK $\alpha$	– izoforma $\alpha$ kinazy I $\kappa$ B (ang. I $\kappa$ B kinase $\alpha$ )
iNOS	– indukowana izoforma syntazy tlenu azotu
IRAK	– kinaza związana z receptorem interleukiny-1 (ang. interleukin-1 receptor-associated kinase)
IRF3	– czynnik regulatorowy interferonu (ang. interferon regulatory factor 3)
JNK	– kinaza N-końcowa c-JUN (ang. c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase)
Kdo	– kwas ketodeoksyoktulozonowy
LDL	– lipoproteiny o małej gęstości (ang. low-density lipoproteins)
LOX	– lipoksygenaza (ang. lipoxygenase)
LPS	– lipopolisacharyd
LRR	– powtórzenia sekwencji aminokwasowych bogatych w leucynę (ang. leucine rich repeat)
MAP	– białko aktywowane przez mitogeny (ang. mitogen activated protein)
MAPK	– kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny
MD2	– białko kompleksu receptorowego TLR4 (ang. myeloid differentiation-2)
MK-801	– maleinian dizocylpiny
MPO	– mieloperoksydaza
MTT	– błękit tiazolu; bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolylo)-2,5-difenylo-tetrazolowy
MyD88	– białko kompleksu receptorowego TLR4 (ang. myeloid differentiation Protein 88)
NAP	– białko hamujące iNOS (ang. NOS-associated protein-110 kDa)
NF- $\kappa$ B	– czynnik transkrypcyjny kappa B (ang. nuclear factor- $\kappa$ B)
NMDA	– kwas N-metylo-D-asparaginowy
NNLA	– N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina
NO	– tlenek azotu
NOS	– syntaza tlenu azotu
NOSIP	– białko wchodzące w interakcje z NOS (ang. nitric oxide synthase-interacting protein)

---

NOSTRIN	– białko wchodzące w interakcje z NOS (ang. eNOS traffic inducer)
PARP	– polimeraza poli(ADP-rybozy)
PDZ	– domena białek gęstości postsynaptycznej (PSD/Disc-large/ZO-1 homologous)
PIN	– białko hamujące NOS (ang. protein inhibitor of nNOS)
PKB/Akt	– kinaza białkowa B
PKC $\zeta$	– atypowa kinaza białkowa C
PKG	– kinaza białkowa G
PLC	– fosfolipaza C
PMA	– 12-mirystynian-13-octan forbolu
PSD	– gęstość postsynaptyczna
Rac1,2	– małe białko G z rodziny rho (ang. ras-related C3 botulinum toxin substrate)
RAF	– kinaza serynowo-treoninowa
RAGE	– receptor dla końcowych produktów procesu zaawansowanej glikacji (ang. receptor for advanced glycation end products)
RFT	– reaktywne formy tlenu
SAP	– amyloidowe białko osocza (ang. serum amyloid protein)
SAPK	– kinaza białkowa aktywowana w warunkach stresu (ang. stress activated protein kinase)
SEM	– błąd standardowy średniej
SNAP	– S-nitrozo-N-acetyloopenicylamina
SNP	– nitroprusydek sodu
SOCS	– supresor sygnalizacji zależnej od cytokin (ang. suppressor of cytokine signaling)
TAB1,2	– białko wiążące TAK-1 (ang. TAK-1 binding protein 1, 2)
TAK1	– kinaza aktywowana TGF $\beta$ (ang. transforming growth factor TGF $\beta$ activated kinase)
TIR	– domena białek kompleksów receptorowych receptorów Toll-like i interleukiny-1 (ang. Toll/IL-1R)
TLR4	– receptor lipopolisacharydu (ang. Toll-like receptor 4)
TNF $\alpha$	– czynnik martwicy nowotworu $\alpha$
Tollip	– białkowy inhibitor IRAK-1 (ang. Toll-interacting protein)
TRADD	– domena śmierci związana z receptorem TNF $\alpha$ (ang. TNF $\alpha$ receptor associated death domain)
TRAF6	– czynnik 6 związany z receptorem TNF $\alpha$ (TNF receptor associated factor 6)
VEGF	– czynnik wzrostowy śródbłonna naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor)

## II. WSTĘP

### 1. WPROWADZENIE

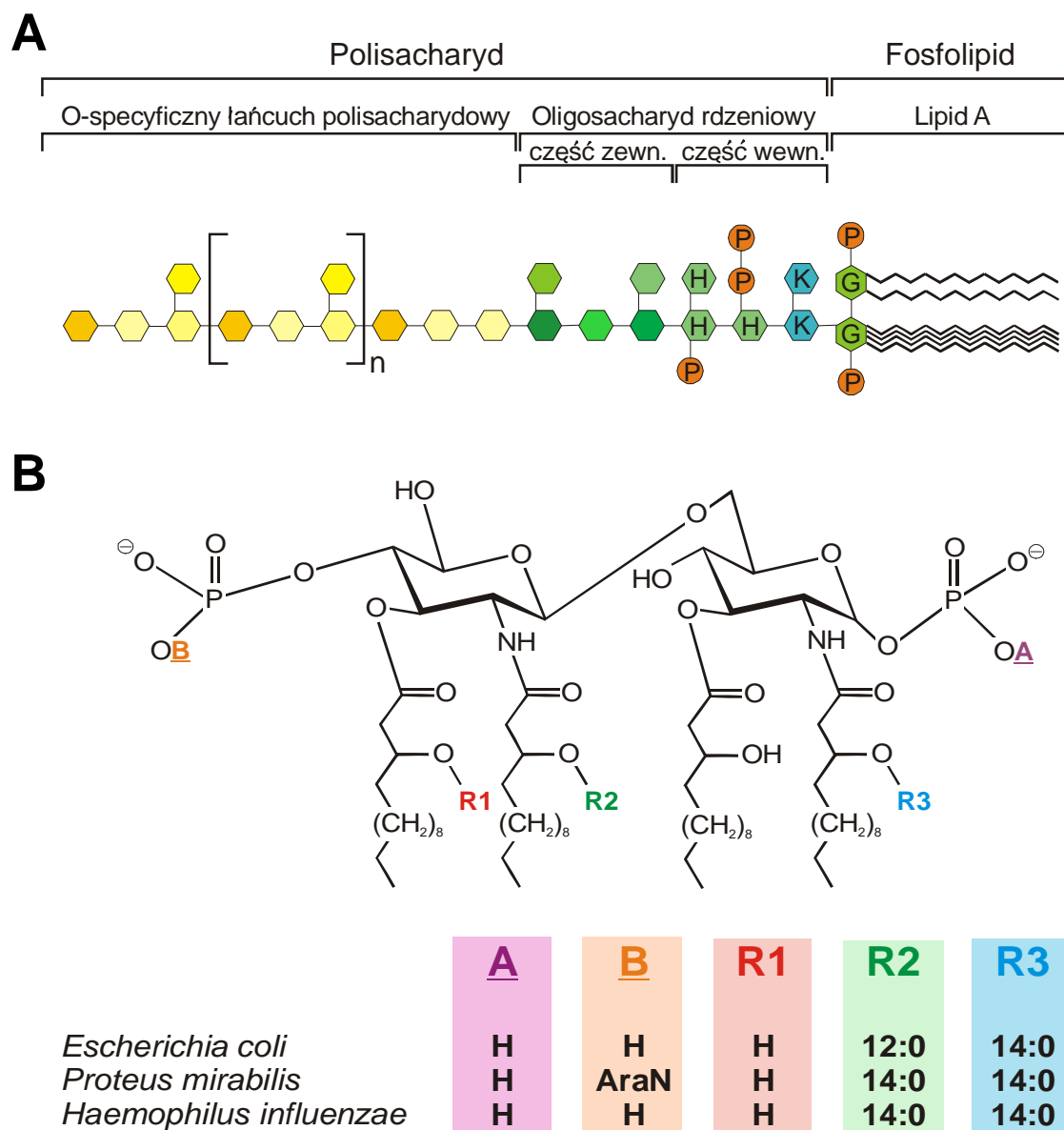
Stres oksydacyjny, definiowany jako stan braku równowagi pomiędzy produkcją i usuwaniem reaktywnych form tlenu, towarzyszy licznym chorobom ośrodkowego układu nerwowego. Pojawia się w schorzeniach nagłych, takich jak niedokrwienie, uraz, albo infekcja, oraz w przewlekłych schorzeniach neurodegeneracyjnych jak choroba Alzheimera, Parkinsona i Huntingtona. Wolne rodniki powstawać mogą w reakcjach enzymatycznych, katalizowanych przez syntazę tlenku azotu (NOS), oksydazę NADPH, mieloperoksydazę (MPO), oksydazę hipoksantyny (HO), kompleksy łańcucha oddechowego. Związki te mogą też być uwalniane w reakcjach nieenzymatycznych, w reakcji Fentona katalizowanej przez jony metali grup przejściowych ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{+}$ ). Jednym z głównych źródeł wolnych rodników są pobudzone komórki układu odpornościowego. Obecność czynników patogennych (zarówno zewnętrznych jak i wewnątrzustrojowych) powoduje odpowiedź ze strony układu odpornościowego, która ma za zadanie eliminację obcych, uszkodzonych lub zmienionych komórek z organizmu. W wyniku aktywacji układu odpornościowego rozwija się stan zapalny, któremu towarzyszy produkcja cytokin, wolnych rodników, cząsteczek adhezyjnych oraz aktywacja leukocytów. Prawidłowo przebiegająca reakcja immunologiczna kończy się zwykle korzystnym dla organizmu przywróceniem homeostazy. W przypadku, gdy odpowiedź układu odpornościowego nie może poradzić sobie z czynnikiem patologicznym, kończy się to dla organizmu powstaniem przewlekłego stanu zapalnego, a w niektórych przypadkach śmiercią. Chroniczną aktywację układu odpornościowego stwierdzono w przebiegu wielu chorób neurodegeneracyjnych, w tym w chorobie Parkinsona i Alzheimera (Wyss-Coray i Mucke, 2002). Amyloid- $\beta$ , rozważany jako czynnik patogenny w chorobie Alzheimera, pobudza układ odpornościowy poprzez bezpośrednią aktywację mikrogleju z udziałem receptora RAGE (ang. receptor for advanced glycation end products) lub receptora zmiatającego (Yan i wsp., 1999). Najnowsze badania wykazały, że amyloid- $\beta$  bezpośrednio aktywuje odpowiedź wrodzoną przez pobudzenie receptora TLR4 (ang. Toll-like receptor 4) przy udziale CD14 (Fessbender i wsp., 2003; Walter i wsp., 2004). W procesie aktywacji układu odpornościowego ważną rolę odgrywa czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B, który kontroluje ekspresję licznych genów związanych z odpowiedzią immunologiczną (Macdonald i wsp., 2003). Jednym z nich jest indukowana izoforma

syntazy tlenu azotu (iNOS, NOS-2). Przykładem niekorzystnej odpowiedzi układu odpornościowego na patogeny jest jego zbyt silna aktywacja w czasie sepsy. W wyniku nadmiernego pobudzenia układu odpornościowego przez składnik ściany komórkowej bakterii, lipopolisacharyd (LPS), dochodzić może do intensywnej produkcji tlenu azotu przez iNOS, do uszkodzenia ścian naczyń krwionośnych, zaburzeń przepływu krwi w tkankach i do ich obumierania. Uważa się, że tlenek azotu, który produkowany jest w dużych ilościach przez tę izoformę, odgrywa kluczową rolę w powstawaniu uszkodzeń związanych ze stanami zapalnymi. Niedawno odkryto jednak, że w czasie wstrząsu septycznego dochodzi do zaburzeń układu glutaminianergicznego w mózgu, co potencjalnie może powodować aktywację neuronalnej izoformy NOS (nNOS, NOS-1) i uszkodzenia cytotoksyczne (Lin i wsp., 1999; Anderson i wsp., 1999; Willard i wsp., 2000; Bal-Price i Prown, 2001; Biegon i wsp., 2002). Znaczenie konstytutywnych izoform NOS w stresie oksydacyjnym wywołanym w mózgu przez LPS jest nieznane. Innym bardzo ważnym enzymem zaangażowanym w kaskadę prowadzącą do śmierci komórek w stanach zapalnych jest polimeraza poli(ADP-rybozy)-1 (PARP-1). Enzym ten, nadmiernie aktywowany w wypadku wolnorodnikowego uszkodzenia DNA, może doprowadzić do zużycia komórkowych zapasów  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> i ATP, i w konsekwencji do śmierci komórki (Szabo i Dawson, 1998). PARP-1 może wpływać na procesy zapalne również poprzez interakcje z czynnikami transkrypcyjnymi, m.in. NF- $\kappa$ B. Obumieranie neuronów w stanach zapalnych, w zależności od nasilenia procesów, przebiegać może na drodze apoptozy lub nekrozy, a w procesach tych uczestniczą wolne rodniki i liczne białka, w tym zarówno NOS, jak i PARP.

## **2. LIPOPOLISACHARYD – BUDOWA I DZIAŁANIE**

Czynnikami odpowiedzialnymi za aktywację mechanizmów odporności wrodzonej układu odpornościowego w zakażeniach bakteryjnych są m.in. elementy ściany komórkowej bakterii. Największe znaczenie kliniczne ma wśród nich lipopolisacharyd (LPS), który jest odpowiedzialny za około 60% przypadków sepsy. LPS stanowi 3-5% suchej masy komórki bakterii gramujemnej. Cząsteczka LPS zbudowana jest z lipidu A, polisacharydowego rdzenia oraz O-swoistego łańcucha cukrowego zwanego antygenem O.

## 2.1. BUDOWA LPS

**Rycina 1. Budowa cząsteczki lipopolisacharydu**

A) Cząsteczka LPS zbudowana jest z lipidu A, oligosacharydowego rdzenia oraz O-swoistego łańcucha cukrowego zwanego antygenem O; (H) – heptoza, (K) – Kdo, (P) – grupa fosforanowa, (G) – N-acetylglukozamina. B) Struktura lipidu A – komponentu lipopolisacharydu (Holst i wsp., 1996, zmodyfikowano).

W zewnętrznej błonie bakterii LPS zakotwiczony jest poprzez hydrofobowy lipid A, który jest najbardziej konserwatywną częścią LPS, i podobny schemat ma u wszystkich bakterii gramujemnych (Rietschel i wsp., 1994). Część hydrofilowa lipidu A (na przykładzie *E. Coli*) jest disacharydem z podstawionymi dwoma grupami fosforanowymi,

jedna jest związana estrowo przy końcu nieredukującym, a druga  $\alpha$ -glikozydowo przy końcu redukującym. Disacharyd acylowany jest 4 resztami kwasu  $\beta$ -hydroksymirystynowego (lipid A jest heterogenny, niektóre jego cząsteczki mogą być nie w pełni acylowane). Grupy hydroksylowe reszt kwasów tłuszczowych przy nieredukującej cząsteczce glukozaminy są estrowo połączone z cząsteczkami kwasu laurynowego i mirystynowego. Lipid A połączony jest z częścią polisacharydową LPS poprzez kwas ketodeoksyoktulozonowy (Kdo). Różnice w budowie lipidu A mogą dotyczyć:

1. budowy szkieletu cukrowego;
2. liczby atomów w łańcuchach węglowodanowych;
3. typu i rozmieszczenia reszt kwasów tłuszczowych;
4. dodatkowych podstawień resztami fosforanowymi.

Polisacharydowy rdzeń, czyli oligosacharyd rdzeniowy, wykazuje bardzo dużą heterogenność, dzieli się na część wewnętrzną i zewnętrzną. Łączy się z lipidem A ketozydowo za pośrednictwem Kdo. W skład rdzenia wchodzić mogą różne obojętne cukry.

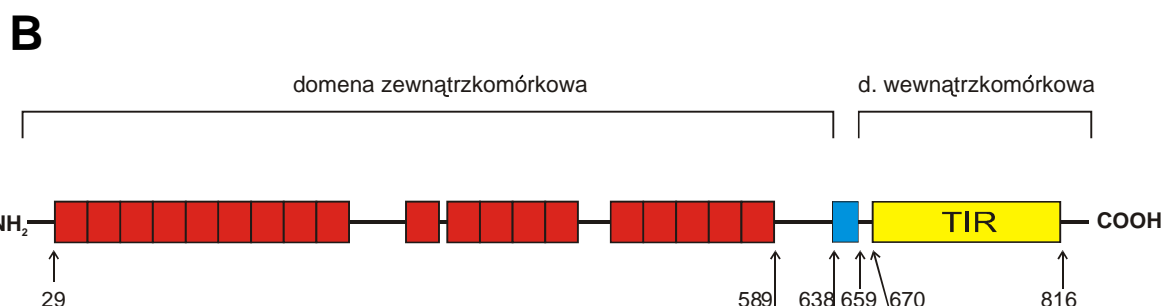
Polisacharydowe łańcuchy boczne determinują serologiczną swoistość LPS (swoistość O-antygenowa). W ich składzie wykryto około 40 różnych cukrów: obojętnych, aminocukrów i cukrów nietypowych (deoksyheksoza, dideoksyheksoza). Łańcuchy cukrowe zbudowane są z powtarzających się jednostek oligosacharydowych, tri- penta- tetra- lub heksasacharydowych, o zmiennej ilości powtórzeń) (Rietschel i wsp., 1994).

## 2.2. BIAŁKA WCHODZĄCE W INTERAKCJE Z LPS

Aby mogło dojść do aktywacji komórek układu odpornościowego przez LPS, konieczne jest jego oddziaływanie z licznymi białkami. Wymienić tu można białka zarówno komórkowe, jak i osoczowe. Najważniejszym białkiem komórkowym wchodzącym w interakcje z LPS jest jego receptor, TLR4 (ang. Toll-like receptor-4), białko należące do rodziny TIR (ang. Toll/IL-1R), wykazujące wiele wspólnych szlaków sygnałowych z receptorem Il-1 (Poltorak i wsp., 1998). Do chwili obecnej zidentyfikowano 13 typów receptorów TLR (Tabeta i wsp., 2004). Receptory te znajdują się głównie na komórkach linii mieloidalnej, tzn. dendrytycznych, monocytach, makrofagach, granulocytach, mikrogleju, ale również na niektórych neuronach, komórkach śródbłonna, fibroblastach, adipocytach, komórkach nabłonka (Laflamme i Rivest, 2001;

Chakravarty i Herkenham, 2005). Część zewnątrzkomórkowa receptora TLR zawiera domenę bogatą w reszty leucynowe LRR (ang. leucine rich repeat), która bierze udział w rozpoznawaniu agonisty (Gay i wsp., 1991). Zbudowana jest ona z różnej ilości powtórzeń odcinka 24-29 aminokwasów. Część wewnątrzkomórkowa receptora TLR ma cytozolową konserwatywną domenę TIR (Toll/IL-1R) zbudowaną z 200 aminokwasów. Domena ta bierze udział w transdukcji sygnału, wchodzi w interakcje z białkiem adaptorowym MyD88 (Myeloid Differentiation Protein 88) (Hallman i wsp., 2001).

A	TLR	Znani agoniści
	TLR1	tri-acetylowane lipopeptydy (LP), modulina
	TLR2	LP, peptydoglikan, kwas lipotejchojowy, kwas manuronowy, fimbrie bakteryjne, HSP60
	TLR3	dwuniciowy RNA
	TLR4	LPS, bakteryjny HSP60, polimery kwasu manuronowego, kwas teichuronowy, flawolipiny, pneumolizyna, fimbrie bakteryjne, Taxol, amyloid-β
	TLR5	flagellina
	TLR6	tri-acetylowane lipopeptydy (LP), modulina
	TLR7	imidazoquinolina, wirusowe jednoniciowe ssRNA
	TLR8	imidazoquinolina, wirusowe jednoniciowe ssRNA
	TLR9	bakteryjne DNA
	TLR10	?
	TLR11	? bakterie uropatogenne
	TLR12	?
	TLR13	?



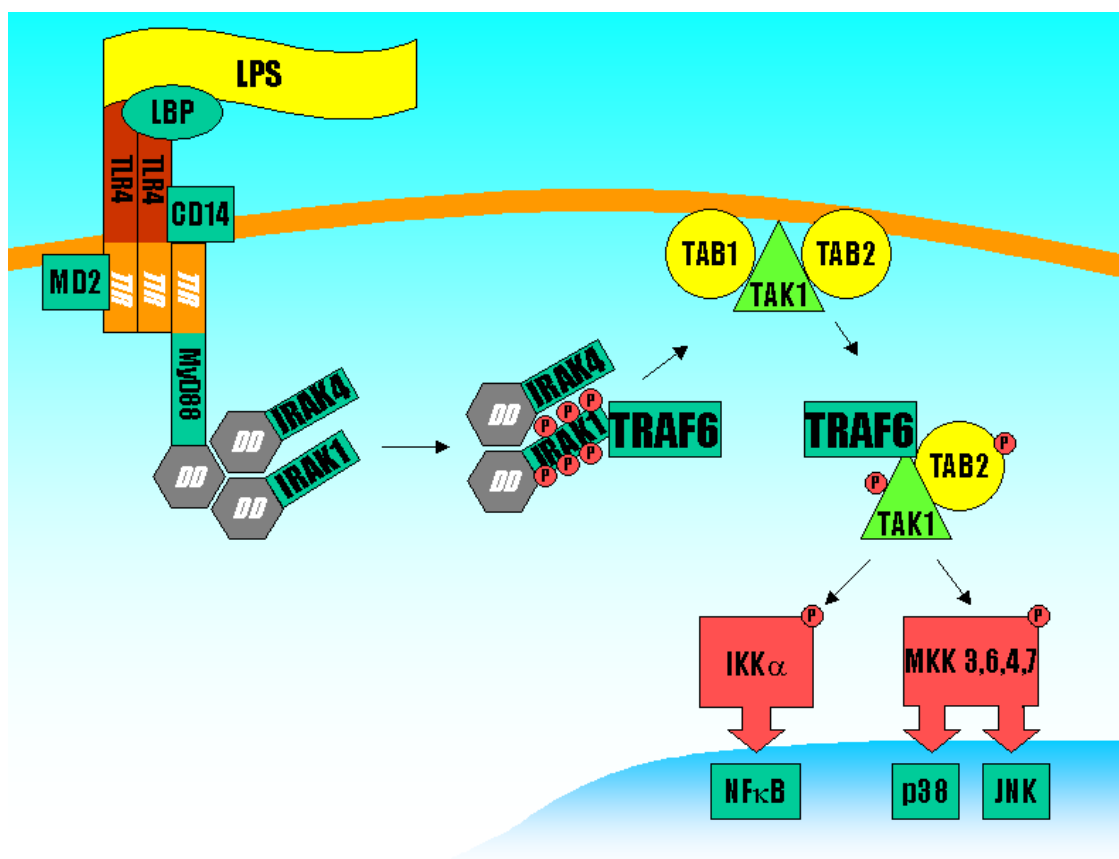
### Rycina 2. Charakterystyka receptorów TLR

A) Znani agoniści receptorów TLR; B) Schemat struktury białka receptorów TLR na przykładzie mysiego TLR4 (Boeckmann i wsp., 2003; Primary accession number: Q9QUK6). Zewnątrzkomórkową domenę LRR odpowiedzialną za rozpoznanie agonisty oznaczono kolorem czerwonym. Zbudowana jest ona z szeregu powtórzeń (18-24 razy) grupy 20-29 aminokwasów zawierającej motyw **XXLXLXX** i inne konserwowane reszty leucynowe. Domenę transbłonową zaznaczono na niebiesko, a cytozolową domenę TIR, odpowiedzialną za transdukcję sygnału, na żółto.

W procesie pobudzenia receptora TLR4 istotną rolę odgrywają 2 inne białka wchodzące w interakcje z LPS (Kawai i Akira, 2005). Białko CD14 występuje w formie błonowej



(mCD14; 53kDa) lub osoczowej (sCD14; 48kDa) i wchodzi w skład kompleksu receptorowego. LBP (ang. lipopolysaccharide binding protein; 50kDa) jest białkiem osoczowym i bierze udział w transporcie LPS z bakterii do CD14. LBP przenosi LPS również do HDL czego skutkiem jest neutralizacja LPS (Ulevitch i wsp., 1979). LBP wiąże się też z LPS w błonie bakterii ułatwiając jej sfagocytowanie. Istnieje szereg innych białek wchodzących w bezpośrednie interakcje z LPS. Wśród najważniejszych wymienić można komórkowe białka MD-2 (ang. myeloid differentiation-2), BPI (ang. bactericidal/permeability increasing protein), receptor zmiatający, i białka osoczowe takie jak albumina, transferyna, białko wiążące mannozę, hemoglobina, naturalne przeciwciała (IgM i IgG), SAP (ang. serum amyloid protein) (Tobias i wsp., 1997).



**Rycina 3. Uproszczony schemat kaskady sygnalizacyjnej wywołanej pobudzeniem receptora TLR4 przez LPS**

Aktywacja receptora TLR4 wymaga powstania wielobiałkowego kompleksu receptorowego, dochodzi do fosforylacji IRAK-1 przez IRAK-4, powstaje kompleks IRAK-4/IRAK-1/TRAF6, przyłącza się do niego kompleks TAK1/TAB1/TAB2, zachodzi fosforylacja TAB2 i TAK1, które w kompleksie z TRAF6 translokują się do cytoplazmy, gdzie po poliubikwitynacji TRAF6 zachodzi autofosforylacja TAK1. TAK1 fosforyluje kinazę IKK $\alpha$ , która aktywuje NF $\kappa$ B. TAK1 fosforyluje też kinazy MAP i JNK, aktywując w

*ten sposób białko p38 i czynniki jądrowe. Cały wielobiałkowy signalosom zgrupowany wokół TRAF6 dysocjuje.*

Aktywacja receptora TLR4 wymaga utworzenia kompleksu receptorowego, w skład którego wchodzi TLR4, MD-2 i CD14 wiążący LPS (Martina i Wesche, 2002) (Rycina 3). Po utworzeniu homodimeru TLR4 następują zmiany konformacyjne w obrębie domeny TIR (Toll/IL-1R), co pozwala na interakcje z białkami wewnątrzkomórkowymi. Zależnie od zestawu białek adaptorowych, LPS może aktywować kaskady sygnalizacyjne prowadzące do indukcji NF- $\kappa$ B, kinaz MAP lub IRF3 (Kawai i Akira, 2005). Klasyczny, najczęściej badany szlak transdukcji sygnału angażuje wiele białek (MyD88, białka rodziny Pellino, Rip2, BCL10, IRAK-1, IRAK-4, Tollip, TRAF6, TAK1, TAB1, TAB2). Białka te wchodząc w interakcje, wskutek kaskady reakcji fosforylacji powodują ostatecznie fosforylację kinazy IKK $\alpha$  (ang. I $\kappa$ B kinase  $\alpha$ ), która katalizuje fosforylację i degradację I $\kappa$ B, czyli aktywację NF $\kappa$ B. Aktywacji ulegają również kinazy MAPK (ang. mitogen activated protein kinase) i JNK (ang. c-Jun NH2-terminal kinase) prowadząc w ten sposób do aktywacji białka p38 i czynników jądrowych. LPS, poprzez interakcje MyD88 z białkami zawierającymi domenę DD (FADD i TRADD), może też aktywować apoptozę (Martin i Wesche, 2002).

Inne receptory z rodziny TIR funkcjonują jako heterodimery, aktywują jednak te same kaskady, z małymi różnicami, np. aktywacja receptora IL-1 powoduje aktywację PI-3-kinazy, PKB/Akt, małowcząsteczkowych białek G Rac1, atypowej kinazy białkowej C (PKC  $\zeta$ ), fosfolipazy C (PLC), PKC $\alpha$  i sfingomielinazy.

Pobudzenie TLR4 desensytyzuje jego aktywność, zjawisko to zachodzi także pomiędzy różnymi typami np. TLR2 i 4. Odbywa się to poprzez zwiększenie ekspresji inhibitorów (np. IRAK-M lub Tollip) lub wskutek zahamowania interakcji MyD88 z TLR4. Ponadto LPS stymuluje syntezę białek z rodziny SOCS (ang. suppressor of cytokine signaling), które również hamują kaskadę indukowaną przez LPS. Wykazano, że SOCS3 hamuje zarówno przyłączenie BCL10 do kompleksu receptorowego TLR4, jak również działa na interakcje pomiędzy białkami BCL10 i Pellino2 (Liu i wsp., 2004). Zidentyfikowano niedawno białko MD-2B, będące produktem alternatywnego składowania genu kodującego MD-2, które kompetycyjnie hamuje powstawanie kompleksu TLR4–MD-2 (Ohta i wsp., 2004). Również mikroorganizmy potrafią hamować aktywację receptorów TLR, produkując białko hamujące interakcje IRAK-TRAF6. Jest to proteaza hamująca sygnały „przeżycia”, ale nie hamująca sygnałów apoptozy.

LPS indukuje aktywność chemotrypsynową proteosomu 20S w makrofagach myszy w sposób niezależny od CD14 i LBP, co wskazuje, że istnieją również inne szlaki sygnalizacyjne aktywowane przez LPS. Wykazano, że LPS wiąże się bezpośrednio z podjednostkami C2 i N3 proteosomu (Qureshi i wsp., 2003). Aktywność proteosomu 20S generowana przez interakcje z LPS jest hamowana przez laktacystynę, która hamuje również sekrecję TNF $\alpha$  indukowaną przez LPS, indukcję genów kodujących TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12, COX-2, iNOS, TLT2 i 4, co wskazuje na ważną regulacyjną rolę proteosomu w kaskadzie sygnalizacyjnej LPS.

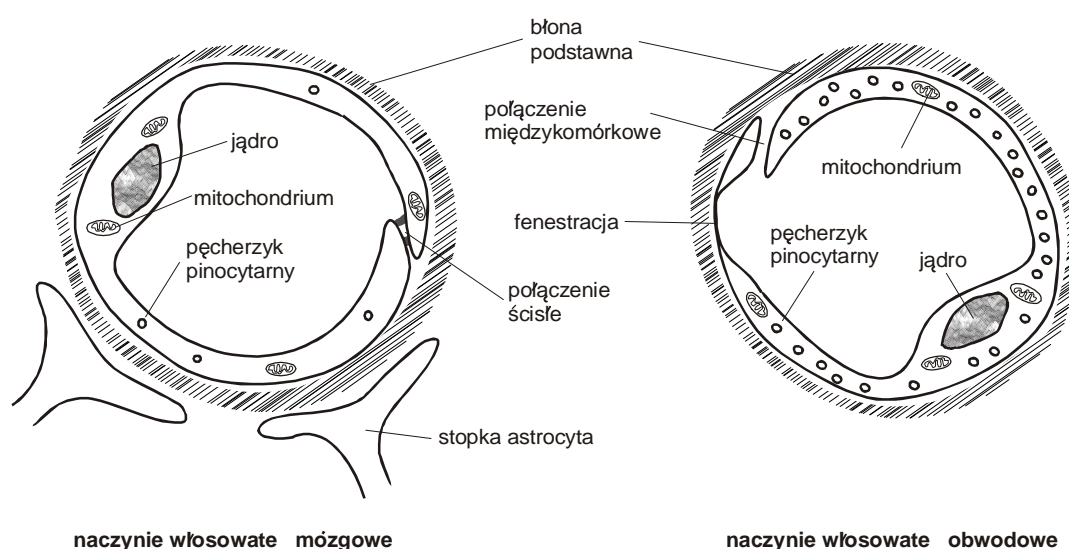
Aktywacja NF- $\kappa$ B przez LPS indukuje ekspresję wielu genów dla białek biorących udział w odpowiedzi immunologicznej, w tym około 30 różnych cytokin i chemokin, a także ICAM, MHC, iNOS, COX-2 (Macdonald i wsp., 2003). NF- $\kappa$ B bierze udział w regulacji ekspresji genów zaangażowanych w kontrolę proliferacji i apoptozy. W procesach odpowiedzi immunologicznej uczestniczą komórki śródbłonna naczyniowego. W odpowiedzi na LPS lub prozapalne cytokiny, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 na ich powierzchni pojawiają się cząsteczki adhezyjne ICAM-1 (ang. intracellular adhesion molecule-1). Pojawienie się związków adhezyjnych na powierzchni komórek śródbłonna pozwala na interakcje z leukocytami. Interleukina-1 i TNF $\alpha$  stymulują też syntezę osoczowych i tkankowych czynników krzepnięcia przez śródbłonek. Jednak LPS może też indukować apoptozę, np. w komórkach śródbłonna. Odbywa się to prawdopodobnie przy udziale białek TRADD (ang. TNF $\alpha$  receptor associated death domain) i FADD (ang. Fas associated death domain) (Choi i wsp., 1998). Białka te wchodząc w interakcje z domeną DD w białkach MyD88 lub IRAK1 mogą zapoczątkować kaskadę proteolityczną poprzez aktywację kaspaz, w tym prokaspazy-8. Proces ten jest hamowany przez konstytutywnie produkowane białko FLIP (Bannerman i wsp., 2001, 2004).

### **3. MÓZG A UKŁAD ODPORNOŚCIOWY**

Bodźce zewnętrzne odbierane i przetwarzane przez mózg wpływają na działanie i stan odporności organizmu. Jednocześnie stan funkcjonalny układu odpornościowego wpływa na określone funkcje mózgu. Układ odpornościowy i nerwowy blisko ze sobą współpracują. Ich komórki mają wiele wspólnych receptorów, część przekaźników jest również wspólna. Mózg jest oddzielony od układu krążenia dzięki barierze krew-mózg, przez co nie wszystkie procesy zachodzące w organizmie dotyczą mózgu (Jegliński, 1997).

Również komórki immunokompetentne mają utrudnione przenikanie do OUN, zdolne są do tego komórki tuczne i niektóre limfocyty, a także monocyty i makrofagi. Mózg posiada własne komórki odpowiedzialne za reakcję odpornościową, mikroglej i astrocyty:

- Astrocyty (komórki gwiaździste) utrzymują homeostazę jonową, regulują metabolizm i dostępność neuroprzekazników aminokwasowych, usuwają toksyczne substancje, ale współuczestniczą również w przekazywaniu sygnału przez neurony. Jest ich 10 razy więcej niż neuronów, ale są mniejsze niż neurony, więc zajmują mniejszą objętość (np. w korze stanowią 30% objętości).
- Mikroglej, tworzący układ odpornościowy mózgu, rekrutuje się głównie z komórek osiadłych w mózgu we wczesnych fazach rozwoju prenatalnego, jednak część komórek mikrogleju wywodzi się z komórek obwodowych (monocytów i makrofagów) osiadłych w mózgu po urazach i stanach zapalnych.



#### **Rycina 4. Porównanie włośniczki mózgowej i obwodowej**

*Uwidocznione zostały typowe różnice budowy ścian naczyń krwionośnych decydujące o szczelności bariery krew-mózg: obecność ścisłych połączeń, brak fenestracji i obniżona pinocytoza w komórkach śródbłonna naczyniowego.*

Istnieją dowody na to, że cytokiny mogą penetrować barierę krew-mózg i stymulować procesy immunologiczne w mózgu, co jest obecnie przedmiotem wielu badań (Pan i Kastin, 2003).

Jednym z głównych szlaków służących do komunikacji układu odpornościowego i ośrodkowego układu nerwowego (OUN) jest nerw błędny (Jegliński, 1997).

Podprzeponowe przecięcie włókien wstępujących nerwu błędnego, mających zakończenie w jądrze samotnym, hamuje powstawanie mózgowej odpowiedzi na LPS/IL-1, charakteryzującej się syntezą IL-1 w mózgu, gorączką, wzrostem poziomu kortykosteroidów we krwi, zmniejszeniem wydzielania noradrenaliny przez podwzgórze, nadwrażliwością na ból, brakiem łaknienia.

Są rejony OUN gdzie brak jest bariery krew-mózg, i składniki osocza mają swobodny dostęp do parenchymy mózgu. Bariera nie istnieje w kilku strukturach mózgu biorących udział w regulacji wydzielania hormonów peptydowych, dotyczy to narządów okołokomorowych: tylnego płata przysadki mózgowej, narządu naczyniowego blaszki krańcowej, narządu podsklepieniowego, narządu podspoidłowego, pola najdalszego oraz szyszynki i spłotów naczyniowych komór. W tych rejonach brak jest też ścisłego kontaktu komórek śródbłonkowych z astrocytami. Cytokiny indukują tam produkcję NO<sup>•</sup> i powodują wzrost temperatury ciała. Stwierdzono też istnienie swoistego systemu transportu cytokin przez BBB w obrębie tylnej części przegrody (Jegliński, 1997).

Cytokiny mogą też być wytwarzane przez komórki mózgu, i to zarówno przez glie jak i neurony, przy czym ich działanie nie ogranicza się do reakcji immunologicznych, ale dotyczyć może snu, zachowania, może mieć znaczenie w neurodegeneracji i patogenezie depresji. W obrębie OUN stwierdzono obecność receptorów dla IL-1, IL-2, IL-3, IL-6 zarówno na komórkach gleju jak i na neuronach. Najnowsze odkrycia wykazują obecność receptorów TLR4 w całym mózgu, z największym zagęszczeniem w oponach i w splocie naczyniowym. Receptory te zlokalizowano głównie na komórkach mikrogleju, ale również na niektórych neuronach tworzącego siatkowatego pnia mózgu (Lenhardt i wsp., 2003; Chakravarty i Herkenham, 2005). Badania te dowodzą, że aktywacja procesów zapalnych w mózgu przez LPS zachodzić może przez pobudzenie mózgowych receptorów TLR4.

#### **4. ZNACZENIE NO<sup>•</sup> i INNYCH WOLNYCH RODNIKÓW W STANACH ZAPALNYCH MÓZGU**

Wolne rodniki mają udział w uszkodzeniu białek, kwasów nukleinowych i lipidów. Oprócz wolnych rodniików, źródłem uszkodzeń oksydacyjnych są inne reaktywne formy tlenu (RFT) i azotu, np. nadtlenek wodoru i nadtlenoazotyn. W stanach zapalnych RFT produkowane są w wysokich stężeniach przez pobudzone komórki układu odpornościowego: makrofagi, granulocyty, komórki śródbłonka naczyniowego, astrocyty i

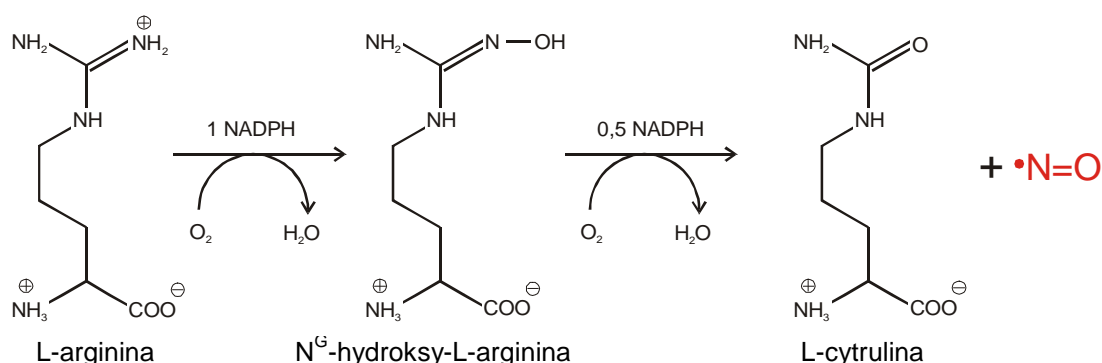
mikroglej. Zaburzenia funkcjonowania łańcucha oddechowego w mitochondriach są przyczyną zwiększonego uwalniania anionorodnika ponadtlenkowego i powstawania stresu oksydacyjnego w komórce. Istotne znaczenie ma także oksydaza NADPH i COX-2, oraz syntaza tlenu azotu (NOS).

Mózg chroniony jest przed wolnymi rodnikami zarówno przez enzymatyczne jak i nieenzymatyczne mechanizmy. Zaliczają się do nich dysmutaza ponadtlenkowa (SOD; EC. 1.15.1.1), katalaza (CAT; E.C. 1.11.1.6), peroksydaza glutationowa (GPX, E.C. 1.11.1.9) i reduktaza glutationowa (E.C. 1.6.4.2), a także związki niskocząsteczkowe takie jak glutation (GSH) oraz witaminy E i C. W warunkach nieefektywnego działania mechanizmów antyoksydacyjnych, tlenek azotu i inne wolne rodniki mogą przyczyniać się do powstawania uszkodzeń oksydacyjnych.

#### 4.1. ROLA SYNTAZY TLENKU AZOTU

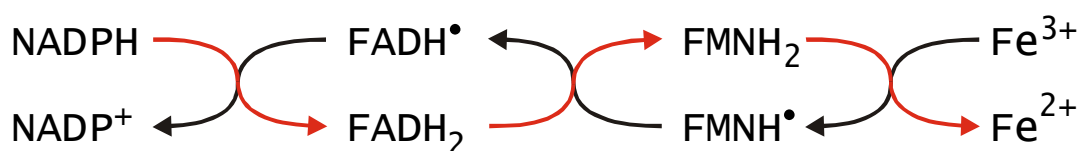
Tlenek azotu powstaje w wyniku reakcji utleniania argininy, katalizowanej przez syntazę tlenu azotu (NOS; E.C. 1.14.13.39) (Murad i wsp., 1999; Furchgott i wsp., 1999; Ignarro i wsp., 1999). Istnieją trzy główne izoformy NOS, neuronalna (nNOS, NOS-1), indukowana (iNOS, NOS-2), śródbłonkowa (eNOS, NOS-3), kodowane przez różne geny. Izofomy neuronalna i śródbłonkowa są konstytutywnie obecne w komórkach i są wapniowo-zależne. Aktywacja enzymu następuje w wyniku wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, i szybko zanika, gdy stężenie wapnia spada. iNOS jest enzymem indukowanym, nie wymaga dla swej aktywności ciągłej obecności wysokich stężeń  $\text{Ca}^{2+}$ , i po aktywacji wytwarza duże ilości  $\text{NO}^\bullet$ .

Syntaza tlenu azotu w aktywnej formie jest homodimerem, przyłączającym dwie cząsteczki kalmoduliny. Substratem dla tego enzymu jest L-arginina, kosubstratami reakcji są tlen i NADPH, kofaktorami FAD, FMN i tetrahydrobiopteryna ( $\text{BH}_4$ ), produktami tlenek azotu i L-cytrulina (Hevel i wsp., 1991; Bredt i wsp., 1992). W procesie syntezy  $\text{NO}^\bullet$  enzym przeprowadza 2 cykle oksydacji, w pierwszym powstaje  $\text{N}^G$ -hydroksy-L-arginina, a w drugim L-cytrulina i  $\text{NO}^\bullet$ .



**Rycina 5. Reakcja katalizowana przez NOS**

W reakcji powstaje prawdopodobnie pewna ilość anionu nitroksylowego ( $\text{NO}^-$ ), jednak głównym produktem jest tlenek azotu w formie wolnego rodnika ( $\text{NO}^\bullet$ ). W warunkach zmniejszonej dostępności L-argininy lub tetrahydrobiopteryny NOS (głównie nNOS) obok  $\text{NO}^\bullet$  produkować może również  $\text{O}_2^{\bullet-}$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Vasquez-Vivar i wsp., 1998). Ponieważ  $\text{NO}^\bullet$  i  $\text{O}_2^{\bullet-}$  reagują natychmiast ze sobą, ich wytworzenie przez jeden enzym skutkuje powstaniem nadtlenoazotynu ( $\text{ONOO}^-$ ) (Beckman i wsp., 1990). Nadtlenoazotyn powstaje również jako produkt reakcji anionu nitroksylowego z tlenem, która chociaż cechuje się mniejszą stałą szybkości, jednak ze względu na wysokie stężenie tlenu w komórce zachodzi szybko.



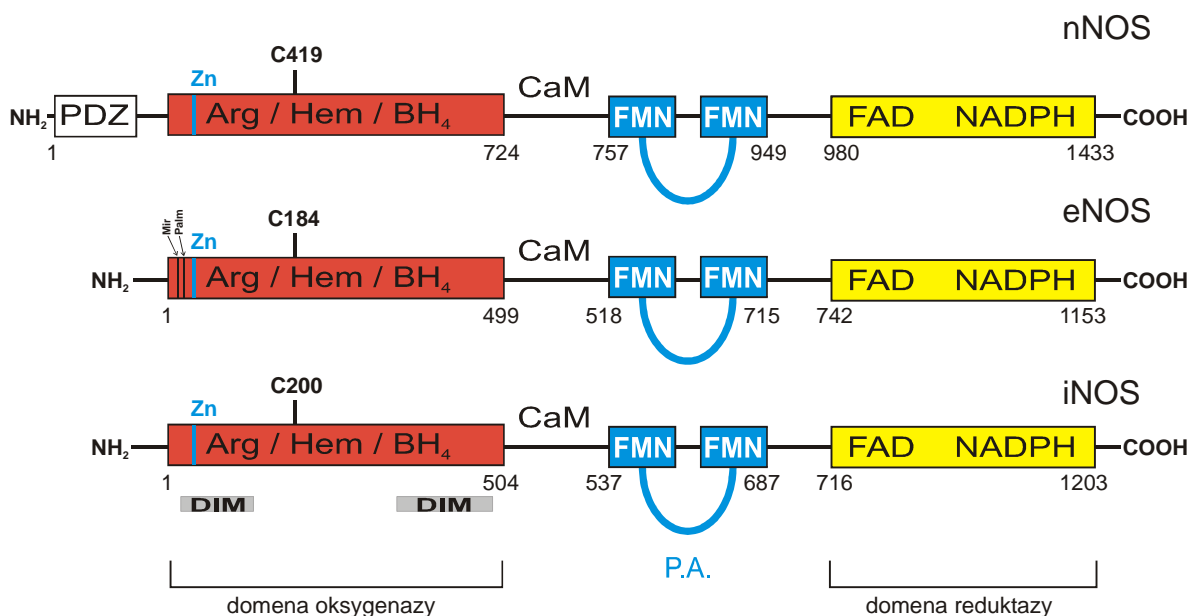
**Rycina 6. Droga przekazywania elektronów z NADPH na żelazo hemowe.**

W procesie przenoszenia elektronów pomiędzy FAD i FMN istotną rolę odgrywa  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  (Alderton i wsp., 2001).

NOS wykazuje znaczne podobieństwo w sekwencji aminokwasowej do reduktazy cytochromu p450 (Bredt i wsp., 1991). NADPH dostarcza elektronów, które przekazywane są kolejno poprzez FAD i FMN do domeny oksigenazowej, gdzie dzięki tetrahydrobiopterynie przenoszone są na hem, co umożliwia katalizę reakcji. W trakcie przenoszenia elektron musi przejść z domeny reduktazowej jednej podjednostki do domeny oksigenazowej drugiej podjednostki, co jest przyczyną braku aktywności monomerów NOS.

Jak pokazuje Rycina 7, w skład białka NOS wchodzi dwie zasadnicze domeny: N-końcowa domena oksigenazy i C-końcowa domena reduktazy. Enzym zawiera szereg

domen odpowiedzialnych za wiązanie kalmoduliny, FAD, FMN, NADPH, L-argininy i tetrahydrobiopteryny, a także miejsca wiązania hemu, cynku i domeny odpowiedzialne za dimeryzację i interakcje z innymi białkami. W utworzeniu i utrzymaniu stabilnego dimeru uczestniczą hem, BH<sub>4</sub>, L-arginina, a także reszty Cys tworzące mostek dwusiarczkowy lub wiążące cynk. Struktura przestrzenna dimeru tworzy w centrum aktywnym lejkowaty, głęboki na 30 Å kanał umożliwiający dyfuzję L-argininy i L-cytruliny.



### Rycina 7. Molekularna budowa syntaz tlenku azotu

Zaznaczono domenę oksygenazy, reduktazy i PDZ, miejsce wiązania hemu (cysteina 419, 184 i 200), kalmoduliny (CaM), miejsce mirystylacji (Mir) i palmitylacji (Palm), miejsca istotne dla utworzenia dimerów (Dim) (Alderton i wsp., 2001).

Neuronalna izoforma (161 kDa) kodowana jest przez gen zlokalizowany u człowieka na 12 chromosomie. Enzym ten występuje głównie w neuronach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego, a także w miocytach, komórkach nabłonka w płucach, w granulocytach obojętnochłonnych, i in. Lokalizacja wewnątrzkomórkowa zależy od typu komórki, i tak w neuronach znaleziono zarówno cytozoolową, jak i związaną z błonami formę nNOS. W komórce nerwowej nNOS (dominuje wariant nNOS  $\alpha$ ) dzięki swojej N-końcowej domenie PDZ tworzy dimer i wiąże się z białkiem szkieletowym gęstości synaptycznej PSD-95 w bezpośrednim sąsiedztwie receptora NMDA (Christopherson i wsp., 1999). To funkcjonalne i anatomiczne połączenie wyjaśnia efektywność i specyficzność aktywacji nNOS po otwarciu kanału NMDA i napływie Ca<sup>2+</sup>



do komórki. Powstający NO<sup>•</sup> dyfunduje do części presynaptycznej, gdzie aktywuje cyklazę guanylanową i zwiększa stężenie cGMP (Boulton i wsp., 1995). Tlenek azotu może również powodować S-nitrozylację i desensytyzację receptora NMDA. Fosforylacja nNOS w pozycji Ser<sup>847</sup> przez kinazy CaM-zależne zmniejsza aktywność enzymu (Hayashi i wsp., 1999). Defosforylacja natomiast powoduje aktywację enzymu. nNOS może wchodzić w interakcje z licznymi białkami gęstości postsynaptycznej, np. z białkami CAPON, CtBP, wapniową ATP-azą Ca<sup>2+</sup>/CaM –zależną, receptorami adrenergicznymi ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ), receptorem serotoniny 5-HT<sub>2B</sub>, receptorem bradykininy (Fang i wsp., 2000; Riefler i wsp., 2001).

Izofорма śródbłonkowa eNOS (133 kDa) kodowana jest u człowieka przez gen znajdujący się na 7 chromosomie. Występuje głównie w komórkach śródbłonka naczyniowego. Białko to stwierdza się także w neuronach, komórkach nabłonkowych, kardiomiocytach. Potranslacyjne modyfikacje białka eNOS decydują o komórkowej lokalizacji tego enzymu. Mirystylacja kieruje eNOS do aparatu Golgiego, gdzie zachodzi palmitylacja, po której eNOS jest kierowany do kaweoli, gdzie wchodzi w interakcje z kaweolinami 1 i 3. Przyłączenie kaweoliny-1 do reduktazowej domeny eNOS zmniejsza zdolność wiązania kalmoduliny i dezaktywuje enzym, dysocjacja kompleksu z kaweoliną-1 indukuje aktywację eNOS. Wśród mechanizmów regulacji aktywności eNOS znajduje się fosforylacja. Wykazano np., że przyłączenie grupy fosforanowej w pozycji Ser<sup>1177/1179</sup> przez kinazę serynowo-treoninową Akt/PKB albo PKC  $\epsilon$  zwiększa, natomiast fosforylacja Thr<sup>495</sup> przez kinazę APMK lub PKC zmniejsza aktywność eNOS (Dimmeler i wsp., 1999; Zhang i wsp., 2005). Sugerowane są też mechanizmy regulacji aktywności eNOS przez HSP90, w tym zależny i niezależny od kalmoduliny (Takahashi i Mendelson, 2003). Regulacja aktywności eNOS odbywać się może przez oddziaływanie z receptorem bradykininy B<sub>2</sub>. Przyłączenie wewnątrzkomórkowej domeny nieaktywnego receptora bradykininy do eNOS działa hamująco na aktywność eNOS (Golser i wsp., 2000). Inne białka zaliczające się do kompleksu błonowego eNOS i wchodzące w interakcje z enzymem to transporter argininy CAT1, poryna, NOSTRIN, NOSIP, dynamina-2, RAF, Erk, Akt (Kone i wsp., 2003)

Izofорма indukowana iNOS (131 kDa) u człowieka kodowana jest przez gen zlokalizowany na chromosomie 17. Wytwarzana jest w makrofagach, astrocytach, granulocytach obojętnochłonnych, neuronach, komórkach śródbłonkowych i mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Kontrola aktywności indukowanej izoformy NOS odbywa

się głównie na poziomie transkrypcji. Istnieją jednak dodatkowe mechanizmy kontroli. Białko NAP110 (ang. NOS-associated protein-110 kDa) w makrofagach wchodzi w interakcje z N-końcem iNOS i uniemożliwia powstanie dimeru. W neuronach podobnie działa kaliryna. Wzrost aktywności iNOS obserwowano wskutek interakcji z białkami Rac-1 i Rac-2. Zmiany aktywności iNOS zaobserwowano także wskutek zmienionej dostępności lub stabilności tetrahydrobiopteryny. Kompleksy iNOS z kaweoliną kierują enzym do degradacji.

Regulacja aktywności NOS odbywać się może na kilku poziomach. Pre-mRNA nNOS i iNOS podlega alternatywnemu składaniu, nNOS i eNOS są regulowane przez fosforylację, eNOS przez acylację, a wszystkie izoformy wchodzi w interakcje z białkami, np. z kalmoduliną, kaweoliną, PDZ, które wpływają na aktywność enzymu. Tlenek azotu w formie wolnego rodnika  $\text{NO}^\bullet$  tworzy trwałe kompleksy ze zredukowanym jodem żelazawym ( $\text{Fe}^{2+}$ ) w cząsteczce hemu ( $\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$ ), i w ten sposób hamuje NOS, podobnie działa na inne enzymy zawierające tę formę hemu (Cooper, 1999).

W regulacji aktywności NOS ważną rolę odgrywają interakcje z innymi białkami. Najważniejsze znaczenie ma kalmodulina (CaM), wapniowo-zależne białko regulatorowe o masie cząsteczkowej 17 kDa. Białko to, posiada 4 miejsca wiążące  $\text{Ca}^{2+}$ , po wysyceniu których zmienia się konformacja cząsteczki, co umożliwia interakcje z regulowanym enzymem. Konstytutywne izoformy NOS wymagają wyższych, niż izoforma indukowana, stężeń  $\text{Ca}^{2+}$  do aktywacji przez kalmodulinę. Rolą CaM jest udział w przenoszeniu elektronów. W domenie flawinowej konstytutywnych izoform NOS znajduje się tzw. pętla autohamująca, której działanie opiera się na destabilizacji wiązania NOS z CaM.

Białkowy inhibitor nNOS (ang. PIN; protein inhibitor of nNOS) wykazuje niewielki potencjał inhibicyjny w stosunku do wszystkich izoform NOS, a jego rola fizjologiczna jest ograniczona do sytuacji, gdy może występować w stężeniach znacznie przewyższających NOS (Hemmens i wsp., 1998). PIN wchodzi w interakcje z N-końcowym fragmentem łańcucha NOS. Innym białkowym inhibitorem, jest cytozolowe białko kaliryna, które wchodzi w interakcje z N-końcowym fragmentem łańcucha iNOS (70-220 aa) uniemożliwia powstanie dimeru (Ratovitski i wsp., 1999).

Białka szoku cieplnego HSP regulują NOS zarówno na poziomie ekspresji genu jak i aktywności. Stwierdzono, że HSP70 zmniejsza ekspresję iNOS w stanach zapalnych poprzez zahamowanie aktywności kinazy IKK i degradacji I $\kappa$ B (Chan i wsp., 2004). Białko HSP90 uczestniczy w aktywacji eNOS w śródbłonku w przypadku działania

czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF; vascular endothelial growth factor), jak również histaminy, bradykininy i siły ścinającej (ang. shear stress) (Garcia-Gardena i wsp., 1998). HSP90 wraz z CaM/Ca<sup>2+</sup> uczestniczy w translokacji eNOS do cytozolu, co umożliwia aktywację enzymu (Gratton i wsp., 2000). Wykazano, że HSP90 zwiększa aktywność eNOS poprzez kalmodulino-zależny mechanizm, który uwidacznia się przy niskich stężeniach Ca<sup>2+</sup> i polega na zwiększeniu powinowactwa eNOS do CaM. Ponadto HSP90 działa przez mechanizm kalmodulino-niezależny przy wysokich stężeniach Ca<sup>2+</sup>, który polega na stymulacji aktywności reduktazowej eNOS (Takahashi i wsp., 2003). Interakcja z HSP90 zwiększa również produkcję NO<sup>•</sup> katalizowaną przez nNOS. Wykazano, że HSP90 bezpośrednio hamuje reakcje prowadzące do powstania O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Song i wsp., 2002). Zredukowanie stężenia O<sub>2</sub><sup>•-</sup> zwiększa efektywne stężenie NO<sup>•</sup> dzięki zmniejszonemu powstawaniu nadtlenuoazotynu.

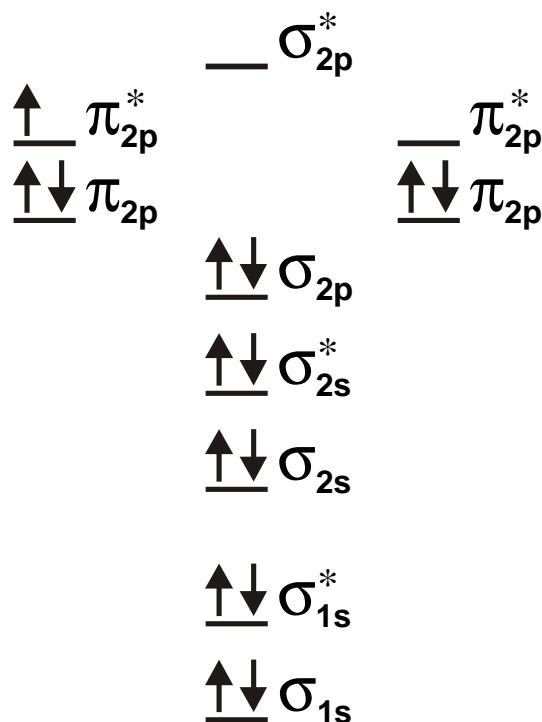
Białko wchodzące w interakcje z syntazą tlenku azotu NOSIP (ang. nitric oxide synthase-interacting protein) cechuje się kolokalizacją z NOS. Stwierdzono, że dystrybucja i ekspresja NOSIP zmienia się istotnie, w zależności od aktywności neuronalnej. NOSIP wchodzi w interakcje z nNOS i eNOS, i hamuje ich aktywność przez nieznaną dotychczas mechanizm (Dedio i wsp., 2001; Dreyer i wsp., 2004).

W przypadku iNOS w domenie wiążącej kalmodulinę znaleziono motyw wiążący polimer ADP-rybozy (PAR). Stwierdzono również, że polimery PAR wiążą się z białkiem iNOS, jednak wpływ tej modyfikacji na aktywność iNOS jest nieznaną (Pleschke i wsp., 2000).

Tlenek azotu jest zwrotnym przekaźnikiem informacji. Syntetyzowany dyfunduje swobodnie z części postsynaptycznej do części presynaptycznej zakończeń nerwowych i w ten sposób uczestniczy w procesie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego w hipokampie i długotrwałej depresji synaptycznej w mózdzku. Uważa się, że NO<sup>•</sup> jest istotnym związkiem zaangażowanym w mechanizmy uczenia i pamięci. Receptorem tlenku azotu jest cytozolowa cyklaza guanylanowa, która po aktywacji przez NO<sup>•</sup> katalizuje reakcję syntezy cGMP, który jest aktywatorem kinazy białkowej PKG (Russwurm i Koesling, 2004; Bellamy i wsp., 2002; Ballou i wsp., 2002). W układzie naczyniowym NO<sup>•</sup> powoduje rozkurcz mięśniówki ścian naczyń krwionośnych, hamuje agregację płytek krwi i adhezję leukocytów. Tlenek azotu może też modulować aktywność łańcucha oddechowego, wpływać na cykl komórkowy i apoptozę, aktywować procesy nitrozytacji i ADP-rybozylacji wielu białek (Brune i Lapetina, 1989).

#### 4.1.1. TLENEK AZOTU JAKO WOLNY RODNIK

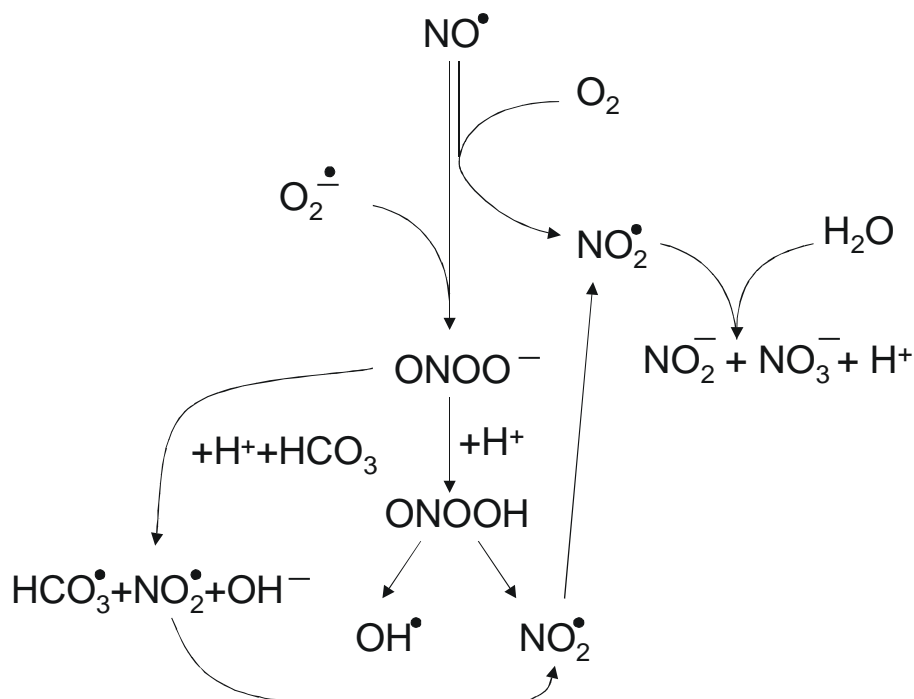
$\text{NO}^\bullet$  jest średnio rozpuszczalny w wodzie (do 2mM w 20°C) (Koppenol, 1998). Współczynnik podziału 1-oktanol/woda wynosi 6,5, co wskazuje, że rozpuszczalność  $\text{NO}^\bullet$  w błonach jest ponad 6 razy większa niż w wodzie, w związku z tym membrany stanowią mogą rezerwar  $\text{NO}^\bullet$  (Koppenol, 1998). Z grupą hemową cykazy guanylanowej  $\text{NO}^\bullet$  wiąże się w stężeniach nanomolarnych. Chociaż  $\text{NO}^\bullet$  może reagować z tlenem, jego czas półtrwania *in vivo* zdeterminowany jest przez zdolność wiązania się z grupami hemowymi, np. hemoglobiny. Przy stężeniu  $\text{NO}^\bullet$  10nM i  $\text{O}_2$  10 $\mu\text{M}$  czas półtrwania  $\text{NO}^\bullet$  wynosi 10<sup>6</sup>sek, co pozwala na dyfuzję na odległość 26 cm. Jednak z powodu szybkiej reakcji z hemoglobina, czas ten skraca się do 5 sek, co i tak pozwala na pokonanie znacznych odległości w tkance, gdyż błony nieznacznie tylko spowalniają dyfuzję  $\text{NO}^\bullet$ . Szacuje się, że w mózgu  $\text{NO}^\bullet$  występuje w stężeniu od 25nM do około 100nM lub nawet 170 nM (Cherian i wsp., 2000; Ohta i wsp., 1996; Mitchell i Michalis, 1998).



Rycina 8. Rozkład elektronów na orbitalach molekularnych cząsteczki tlenku azotu

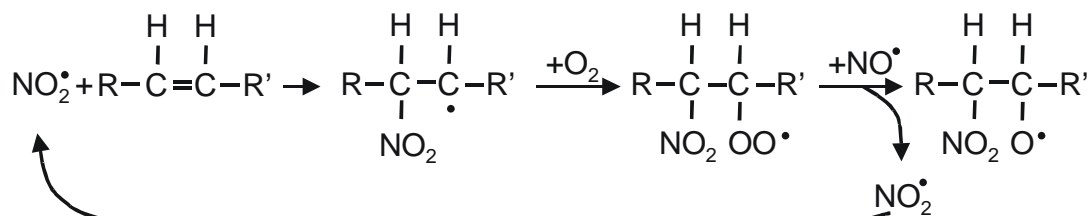
Tlenek azotu może występować jako  $\text{NO}^+$ ,  $\text{NO}^-$  lub  $\text{NO}^\bullet$ . Jeżeli ma jeden nie sparowany elektron, jest wolnym rodnikiem (Rycina 8). Jako wolny rodnik jest stosunkowo stabilny i mało reaktywny, ale może wchodzić w reakcje z innymi wolnymi rodnikami i zależnie od warunków wykazuje działanie pro- lub antyoksydacyjne.

Tlenek azotu wchodzi w reakcję z tlenem, dając wolny rodnik dwutlenek azotu ( $\text{NO}_2^\bullet$ ), który może reagować ze związkami nienasyconymi, np. kwasami tłuszczowymi, powodując ich uszkodzenia (Ryciny 9 i 10).



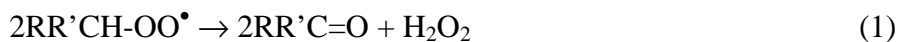
**Rycina 9. Główne reakcje tlenku azotu prowadzące do wzrostu stresu oksydacyjnego w komórce (objaśnienia w tekście)**

W takiej reakcji  $\text{NO}_2^\bullet$  tworzy rodnik węglowy, gdzie niesparowany elektron jest zlokalizowany na węglu. Większość rodników węglowych szybko reaguje z tlenem dając rodniki nadtlenowe, czyli peroksyłowe (Rycina 10).



**Rycina 10. Przykładowa reakcja dwutlenku azotu z nienasyconym kwasem tłuszczowym**  
Reakcja dwutlenku azotu z nienasyconym kwasem tłuszczowym prowadzi do powstania kolejno: rodnika węglowego, rodnika peroksyłowego i alkoksyłowego.

Rodniki peroksyłowe ( $\text{ROO}^\bullet$ ) biorą udział w wielu różnych reakcjach i prowadzą do powstania grup karbonylowych (1), alkoholi i wodoronadtlenków (2). Mogą też ulegać dimeryzacji z innymi rodnikami peroksyłowymi lub z anionorodnikiem ponadtlenkowym (3).

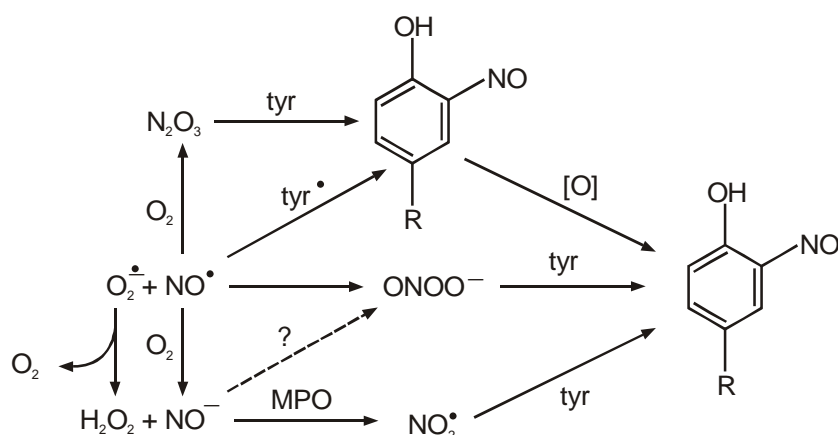


W roztworach wodnych o obojętnym pH  $\text{NO}_2^\bullet$  ulega reakcji dysproporcjonowania, tworząc aniony azotynowy  $\text{NO}_2^-$  i azotanowy  $\text{NO}_3^-$ . Najbardziej niebezpieczna jest jednak reakcja  $\text{NO}^\bullet$  z anionorodnikiem ponadtlenkowym  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , jest bardzo szybka i prowadzi do powstania nadtlenoazotynu (peroksyazotynu) (Saran i wsp., 1990; Crow i Beckman, 1996). Jego czas półtrwania w obojętnym pH wynosi około 1 sek., ma on właściwości silnie utleniające, reaguje łatwo z grupami tiolowymi i z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi. Ponadto nadtlenoazotyn nitruje reszty tyrozylowe białek i łatwo reaguje z anionem wodorowęglanowym  $\text{HCO}_3^-$  tworząc rodnik wodorowęglanowy o właściwościach utleniających. Ponieważ stężenie jonu wodorowęglanowego w tkankach jest duże, reakcja ta jest prawdopodobnie istotną reakcją nadtlenoazotynu *in vivo* (Squadrito i Pryor, 1998; Di Stasi i wsp., 1999). W fizjologicznym pH nadtlenoazotyn jest szybko protonowany, powstaje kwas nadtlenoazotawy  $\text{O=N-O-OH}$ , który po rearanżacji tworzy azotan, jako produkt główny. Kwestia homolitycznego rozszczepienia, w wyniku którego uwalniane były by dwa rodniki  $\text{NO}_2^\bullet$  i  $\text{OH}^\bullet$  nie jest ostatecznie wyjaśniona (Merényi i wsp., 1998; Kissner i wsp., 2003). Metale chelatowane, np.  $\text{Fe(III)-EDTA}$  lub  $\text{CuZnSOD}$  powodować mogą heterolityczny rozpad  $\text{ONOOH}$  na jon nitroniowy  $\text{NO}_2^+$  i  $\text{OH}^-$ . Anion nadtlenoazotynowy jest stabilny w zasadowych roztworach. Może reagować z  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  tworząc addukt nitrozonadtlenowęglan  $\text{O=N-OOCO}_2^-$ , który może powodować nitrację tyrozyny w białkach i powstawanie nitrotyrozyny. Nadtlenoazotyn jest bardzo silnym utleniaczem wywołującym peroksydację lipidów nawet w obecności lipofilnych antyoksydantów. Produktami *in vitro* są sprzężone dieny, MDA, nadtlenki lipidowe, wodorotlenki lipidów, F2-izoprostany, produkty oksysterolowe, a także produkty nitrowe.

Tlenek azotu nie reaguje bezpośrednio z grupami tiolowymi, potrzebny jest akceptor elektronów, którym może być wiele związków, nawet tlen cząsteczkowy (Butler i Rhodes, 1997). Powstaje wtedy anionorodnik ponadtlenkowy, co prowadzi do

powstawania nadtlenoazotynu. Tlenek azotu może też reagować z grupami tiolowymi po przekształceniu w bardziej reaktywną formę, np.  $N_2O_3$  lub  $ONOO^-$ . Rodnik tiolowy  $RS^\bullet$  może reagować bezpośrednio z  $NO^\bullet$ . Nitrozotiole wykrywa się we krwi np. S-nitrozoalbumina, nitrozoheoglobina, S-nitrozocysteina. Całkowite stężenie RSNO w surowicy wynosi ok.  $1\mu M$ , i jest to głównie nitrozoalbumina.  $NO^\bullet$  reaguje z glutationem (GSH) tworząc GSNO. W astrogleju i śródbłonku, gdzie stężenie GSH (mM) jest kilka rzędów wielkości wyższe niż  $O_2^{\bullet-}$  (nM) powstaje więcej GSNO niż  $ONOO^-$ . Nitrozotiole mogą działać tak jak tlenek azotu, mogą stanowić swego rodzaju „magazyn” dla  $NO^\bullet$ . GSNO jest 100 razy silniejszym antyoksydantem niż GSH (Ruahala i wsp., 1998). GSH jest produkowany w astrocytach, a  $NO^\bullet$  może ułatwiać jego transport do neuronów.

$NO^\bullet$  szybko reaguje z rodnikiem tyrozylowym. Ponieważ rodniki tyrozylowe odgrywają ważną rolę w miejscach aktywnych niektórych enzymów, np. reduktazy rybonukleotydów, reakcja z  $NO^\bullet$  może tu dać efekt toksyczny. Nitrotyrozyna może powstawać również w reakcji tyrozyny z nadtlenoazotynem,  $N_2O_3$  lub  $NO_2^\bullet$  (Reiter i wsp., 2000).



**Rycina 11. Typowe reakcje prowadzące do powstawania nitrotyrozyny**

Głównym mechanizmem powstawania nitrotyrozyny jest reakcja z nadtlenoazotynem, jednak możliwe są również reakcje tyrozyny z  $N_2O_3$  i  $NO_2^\bullet$  oraz reakcja rodnika tyrozylowego z  $NO^\bullet$ , i reakcja  $NO_2^-$  katalizowana przez peroksydazy.

Nitracja tyrozyny może czasami zaburzać funkcjonowanie szlaków sygnałowych, jednak nitrotyrozyna może podlegać denitracji, taki mechanizm jest obserwowany w mitochondriach (Koeck i wsp., 2004).

Reakcja  $\text{NO}^\bullet$  z rodnikiem hydroksylowym daje w efekcie  $\text{HNO}_2$ . Sugeruje się, że tlenek azotu może hamować uszkodzenia wolnorodnikowe powodowane przez metale grup przejściowych. Ich działanie prooksydacyjne wynika z ich katalitycznej roli w reakcji Fentona:



Utleniony atom metalu może być zredukowany, i ponownie może wchodzić w reakcję. Chociaż uważa się powszechnie, że powstający w tej reakcji rodnik hydroksylowy jest odpowiedzialny za większość uszkodzeń wolnorodnikowych, powstawać mogą w tej reakcji również addukty  $[\text{Fe}^\bullet\text{OH}]^{3+}$  lub ferryl  $[\text{Fe}=\text{O}]^{2+}$ , i to one mogą być odpowiedzialne za uszkodzenia przypisywane  $\text{OH}^\bullet$ . Opublikowane niedawno wyniki wskazują, że  $\text{NO}^\bullet$  zmniejsza uszkodzenia wolnorodnikowe wywołane przez reakcję Fentona poprzez interakcje z  $[\text{Fe}=\text{O}]^{2+}$  (Sharpe i wsp., 2003). Poprzez wygaszanie reakcji wolnorodnikowych w kwasach nienasyconych  $\text{NO}^\bullet$  hamuje peroksydację lipidów.

Decydujące znaczenie dla kierunku działania  $\text{NO}^\bullet$  w reakcjach wolnorodnikowych ma stosunek stężeń  $\text{NO}^\bullet$  i  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Nadmiar  $\text{NO}^\bullet$  może czasami chronić przed uszkodzeniami powodowanymi przez  $\text{ONOO}^-$ . Np. anionorodnik ponadtlenkowy i tlenek azotu, gdy występują w równych stężeniach mogą stymulować peroksydację lipidów poprzez formowanie  $\text{ONOO}^-$ . Nadmiar  $\text{NO}^\bullet$  zmniejsza peroksydację lipidów, gdyż wygasa rodniki peroksydowe i alkoksydowe (Rubbo i wsp., 1995).

#### 4.1.2. ROLA $\text{NO}$ W DYSFUNKCJI MITOCHONDRIÓW

W stanach zapalnych mitochondria narażone są na uszkodzenia ze strony wolnych rodników produkowanych w dużych ilościach. Istotne znaczenie ma tlenek azotu, który bezpośrednio lub pośrednio, poprzez swoje produkty, może hamować aktywność łańcucha oddechowego (Almeida i wsp., 2001).

Dysfunkcję mitochondriów wywołuje  $\text{NO}^\bullet$  syntetyzowany przez iNOS oraz prawdopodobnie przez obecny w mitochondriach mtNOS. Izoforma ta została zdefiniowana na podstawie jej lokalizacji komórkowej. Dotychczasowe obserwacje dotyczące mtNOS nie są w pełni jednoznaczne. Obecność NOS w mitochondriach mózgu stwierdzili Bates i wsp. (1995), Riobo i wsp. (2002), Lores-Arnaiz i wsp. (2004). Henrich i wsp. (2002) obserwowali NOS w bliskim sąsiedztwie mitochondriów. Badania wskazują, że to nNOS lub eNOS jest związany z błonami mitochondrium (Gao i wsp., 2004; Elfering



i wsp., 2002; Haynes i wsp., 2004). Natomiast Lacza i wsp. (2003, 2004) nie obserwowali obecności izoform NOS w mitochondriach mózgu. Sugeruje się również istnienie w mitochondriach innego, oprócz NOS, źródła  $\text{NO}^\bullet$  (Kozlov i wsp., 1999) Wykazano obecność aktywności reduktazy azotynowej w mitochondriach w cytochromie bc1 w kompleksie III. Proces ten zachodzi w obecności mocno zredukowanych przenośników elektronów, co ma miejsce np. w czasie ischemii. Recykling  $\text{NO}^\bullet$  z azotynów może prowadzić do wzrostu stężenia  $\text{NO}^\bullet$  i do hamowania oksydazy cytochromowej. Wzrost stężenia  $\text{NO}^\bullet$  przy udziale tego mechanizmu obserwowano np. w patologii niedokrwiennej nerki (Okamoto i wsp., 2005). Innym jeszcze enzymatycznym źródłem tlenu azotu może być oksydoreduktaza ksantynowa. Wykazano, że katalizuje ona redukcję organicznych (np. nitrogliceryna) i nieorganicznych azotynów i azotanów do tlenu azotu (Millar i wsp., 1998; Li i wsp., 2004).

Pomijając kwestię źródła tlenu azotu w mitochondriach, nie można zaprzeczyć istotnej roli tego związku w regulacji i zaburzeniu funkcji tego organelum. W fizjologicznych warunkach wewnątrzkomórkowe stężenie  $\text{NO}^\bullet$  hamuje aktywność mitochondrialnego kompleksu IV współzawodnicząc z  $\text{O}_2$  (Cleeter i wsp., 1994; Brown, 2001; Cadenas i wsp., 2000). Sugeruje to, że aktywność mitochondriów zależy może od współczynnika  $\text{NO}^\bullet/\text{O}_2$ . Fizjologiczne stężenia  $\text{NO}^\bullet$  około 200nM i  $\text{O}_2$  około 30  $\mu\text{M}$  powodują, że aktywność łańcucha oddechowego zahamowana jest tonicznie w około 50%. Wzrost stężenia  $\text{NO}^\bullet$  wywołuje zaburzenia funkcji mitochondriów, które obserwowane jest w starzeniu, w niektórych chorobach neurodegeneracyjnych oraz w niedokrwieniu/niedotlenieniu mózgu (Heales i wsp., 1999; Lacza i wsp., 2001). Tlenek azotu, poprzez zahamowanie kompleksu IV, powoduje zwiększenie produkcji anionorodnika ponadtlenkowego, co prowadzi nieuchronnie do powstawania nadtlenoazotynu. Wysokie stężenia  $\text{NO}^\bullet$  i  $\text{ONOO}^-$  nieodwracalnie hamują kompleksy mitochondrialne I, II, IV i V i zmniejszają produkcję ATP (Cadenas i wsp., 2000; Lizasoain i wsp., 1996). Powoduje to wyciek protonów, nadprzepuszczalność mitochondriów i uwalnianie mitochondrialnych białek proapoptotycznych (w tym AIF i cytochromu c), i w konsekwencji indukcję apoptozy (Bustamante i wsp., 2002; Heales i wsp., 1999). Tak więc apoptoza może być wynikiem nadmiernego hamowania aktywności łańcucha oddechowego przez  $\text{NO}^\bullet$  (Kantrow i wsp., 1997).

Uważa się, że zaburzenia funkcji mitochondriów są jedną z przyczyn uszkodzeń narządów w szoku septycznym (Carreras i wsp., 2004). Stwierdzono zmniejszenie aktywności mitochondrialnego kompleksu I i spadek stężenia ATP w miocytach u chorych z objawami posocznicy (Brealey i wsp., 2002). Obserwowano również zwiększoną produkcję  $O_2^{\bullet-}$  i  $H_2O_2$  w mitochondriach, a także spadek stężenia mitochondrialnego GSH. Parametry te skorelowane są z ostrością przebiegu sepsy i z końcowym rezultatem leczenia. Za zaburzenia bioenergetyczne odpowiada zwiększona produkcja  $NO^{\bullet}$  (Brealey i wsp., 2004). Uważa się, że głównym źródłem  $NO^{\bullet}$  w sepsie jest cytozolowa izoforma iNOS, jednak niedawno stwierdzono aktywność wapniowo zależnej izoformy NOS w mitochondriach, a ponadto translokację iNOS do mitochondriów (Lisdero i wsp., 2004). Patologiczne zmiany obserwowane w czasie sepsy wykazują duże podobieństwo do objawów genetycznych chorób mitochondrialnych (Carreras i wsp., 2004). W obu przypadkach obserwuje się zaburzenia ośrodkowego układu nerwowego, demencję, konwulsje, psychozy, ataksję. Stwierdza się również zaburzenia metaboliczne i endokrynne takie jak cukrzyca, niedoczynność tarczycy, kwasica metaboliczna i mleczanowa.

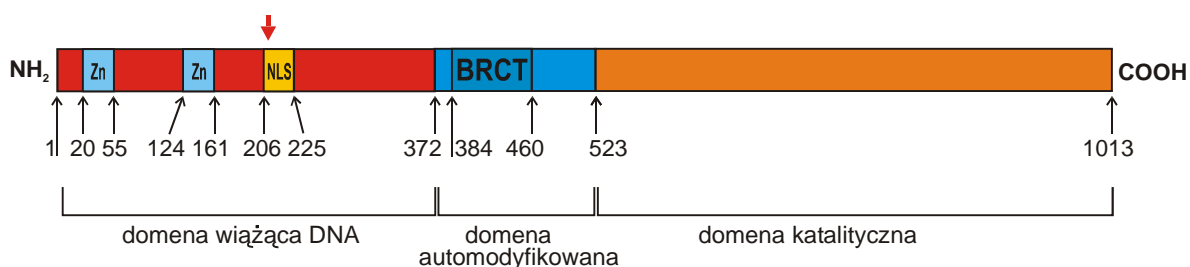
Mitochondria, pozostają w funkcjonalnym kontakcie z siateczką śródplazmatyczną i odgrywają istotną rolę w integracji szlaków sygnalizacyjnych prowadzących do zapoczątkowania procesu apoptozy. Uwalnianie do cytoplazmy międzybłonowych białek mitochondrialnych (np. cytochromu c, endonukleazy G) prowadzi do aktywacji kaspaz i fazy wykonawczej apoptozy. Aktywacja apoptozy może też przebiegać na szlaku niezależnym od kaspaz, z udziałem AIF. Tlenek azotu może wpływać na proces apoptozy zarówno aktywująco, jak i hamująco (Chung i wsp., 2001). Może aktywować apoptozę np. poprzez nitrozylację hemu w cytochromie c w mitochondriach (Schonhoff i wsp., 2003). Ponadto tlenek azotu aktywuje szlak JNK/SAPK i MAPK, zwiększa aktywność obojętnej sfingomielinazy (N-SMazy), enzymu produkującego ceramid (Zhang i wsp., 2004). Prooksydacyjne działanie  $NO^{\bullet}$ , które prowadzi do uszkodzeń wolnorodnikowych biomolekuł, może w istotny sposób przyczyniać się do aktywacji procesów apoptotycznych. Jednym z produktów prooksydacyjnego działania  $NO^{\bullet}$  jest nitrotyrozyna. Zhu i wsp. (2004) stwierdzili, że procesom apoptotycznym (translokacja AIF, aktywacja kaspazy-3) w niedotlenionych mózgach towarzyszy obecność nitrotyrozyny w białkach. Tlenek azotu reguluje aktywność czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B i w ten sposób może wpływać na ekspresję wielu genów (Katsuyama i wsp., 1998; Colasanti i wsp., 2000,

Connelly i wsp., 2001). W zależności od sytuacji może powodować indukcję genów kodujących białka proapoptotyczne (np. BAX, Fas, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) lub antyapoptotyczne (np. MnSOD, FLIP, IAPs, Bcl-2). Tlenek azotu na drodze S-nitrozylacji hamuje kaspazy, może też zwiększać aktywność antyapoptotycznych białek, np. Bcl-2, Akt/PKB, HSP70, HSP32. NO $\bullet$  może też działać antyapoptotycznie poprzez białka uczestniczące w regulacji cyklu komórkowego, kinazy cyklino-zależne (Cdk) i białko supresorowe p21(cip1/waf1) (Maejima i wsp., 2003). Ponadto aktywacja cytozolowej cyklazy guanylanowej i produkcja cGMP w niektórych typach komórek hamuje uwalnianie cytochromu c z mitochondriów i produkcję ceramidu.

Tlenek azotu, bezpośrednio i poprzez nadtlenoazotyn, może regulować aktywność cyklooksygenaz (COX). Stwierdzono, że w stanach zapalnych NO $\bullet$  stymuluje wzrost aktywności COX-1, jak również wzrost ekspresji COX-2. Uważa się, że nadmierna produkcja NO $\bullet$  może w ten sposób zaostczać przebieg stanu zapalnego, poprzez zwiększenie produkcji pro-zapalnych prostaglandyn, której towarzyszy powstawanie reaktywnych form tlenu (Salvemini, 2001).

#### **4.2. ROLA POLIMERAZY POLI(ADP)RYBOZY**

Uszkodzenia wolnorodnikowe DNA indukują aktywność jądrowego enzymu polimerazy poli(ADP)rybozy-1 (EC 2.4.2.30). Enzym ten należy do stale powiększającej się rodziny białek PARP. Analiza genomu człowieka wykazała obecność osiemnastu genów o wysokim stopniu podobieństwa do PARP-1. Dotychczas wykryto jednak tylko 7 białek z tej rodziny PARP-1, PARP-2, PARP-3, PARP-4 (VPARP), PARP-5a (tankyryza 1; TANK-1), PARP-5b (tankyryza 2; TANK-2) i PARP-7 (TiPARP) (Ame i wsp., 2004; Nguewa i wsp., 2005). W mózgu za 93% aktywności PARP odpowiedzialny jest PARP-1 (Pieper i wsp., 2000). Enzym ten (113 kDa) kodowany jest u człowieka na 1 chromosomie. Jak pokazano na rycinie 12, w strukturze PARP-1 wyróżnić kilka domen, z których szczególnie ważne są: domena wiążąca DNA, zawierająca 2 struktury palca cynkowego i sygnał lokalizacji jądrowej NLS (ang. nuclear localisation sequence) i miejsce cięcia kaspazy-9 (DEVD), domena automodyfikowana, jednocześnie uczestnicząca w interakcjach białko-białko dzięki motywowi BRCT, i domena katalityczna.



**Rycina 12. Molekularna budowa polimerazy poli(ADP-rybozy)-1**

Zaznaczono domenę wiążącą DNA, automodyfikowaną i katalityczną. Zn – struktura palca cynkowego, NLS – sekwencja lokalizacji jądrowej, BRCT – sekwencja wchodząca w interakcje białko-białko, czerwona strzałka wskazuje położenie miejsca cięcia kaspazy-9 (Ngueva i wsp., 2005, zmodyfikowano).

PARP-1 zlokalizowany jest głównie w jądrze, gdzie w odpowiedzi na jedno- lub dwuniciowe uszkodzenia DNA katalizuje, jako homodimer, reakcje syntezy polimerów ADP-rybozy (PAR), używając  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> jako substratu. Akceptorami poli(ADP-rybozy) są białka jądrowe, wliczając w to sam PARP-1, histony, NF- $\kappa$ B, AP-1, p53, topoisomery I i II, i kinazy DNA-zależne. PARP-1 uczestniczy w wielu procesach związanych naprawą i utrzymaniem integralności DNA (Strosznajder i wsp., 2000, 2003). Wykazano również udział PARP-1 w procesach transkrypcji, replikacji, różnicowania, kontroli długości telomerów. Niedawno zasugerowano udział nPARP-1 w procesach pamięci długotrwałej (Cohen-Armon i wsp., 2004). PARP-1 poprzez poli(ADP-rybozylację) lub przez bezpośrednie interakcje wpływa na szereg czynników transkrypcyjnych (m.in. NF- $\kappa$ B, p53, AP-2, BMYB, Oct-1, YY-1, TEF-1) i reguluje ekspresję genów kodujących m.in. iNOS, ICAM-1, MHC II (Chiarugi i Moskowitz, 2003). Polimery PAR mogą służyć jako źródło energii dla enzymów naprawczych DNA, poza tym łańcuchy PAR odcięte przez glikohydrolazę poli(ADP)rybozy (PARG; EC 3.2.1.143) mogą przez niekowalencyjne wiązanie się z białkami modyfikować ich aktywność. Stwierdzono również obecność PARP-1 w mitochondriach ((Mosgoeller i wsp., 1996; Du i wsp., 2003). W warunkach stresu PARP-1 staje się czynnikiem współodpowiedzialnym za uszkodzenia i śmierć komórki (Endres i wsp., 1998). Nadmiernie aktywowany PARP-1 wyczerpuje komórkowe zasoby  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>, co prowadzi do śmierci komórki. Dokładny mechanizm tego zjawiska ciągle jest niewyjaśniony. Najnowsze prace prowadzone na hodowlach astrocytów i neuronów wskazują na zahamowanie glikolizy wskutek niedoboru  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>, jako na ostateczną przyczynę załamania metabolizmu energetycznego komórki (Ying i wsp., 2002, 2005). Badania prowadzone przez Du i wsp. (2003) na komórkach śródbłonna

naczyniowego wykazały, że poli(ADP-rybozylacja) dehydrogenazy gliceraldehydu fosforanowego (GAPDH; EC 1.2.1.12) prowadzi do zahamowania tego enzymu, aktywacji NF- $\kappa$ B i zaburzeń metabolicznych. PARP-1 przez nieznaną dotychczas mechanizm indukuje apoptozę niezależną od kaspaz, na drodze translokacji mitochondrialnego czynnika indukującego apoptozę (AIF) do jądra (Yu i wsp., 2002). Zaproponowano również interakcje PARP-1 z antyapoptotycznym szlakiem PI3-kinazy i Akt/PKB (Veres i wsp., 2003; Veres i wsp., 2004). W świetle najnowszych badań PARP-1 jawi się jako jeden z ważniejszych uczestników procesów prowadzących do śmierci neuronów. Udział PARP-1 w procesach obumierania komórek stwierdzono w warunkach hipoksji, hiperglikemii, toksyczności NMDA, kwasu kainowego, cynku, amoniaku (Szabo i wsp., 1997; Endres i wsp., 1998; Strosznajder i wsp., 2003, 2005). W warunkach szoku septycznego rolę PARP-1 badano w narządach obwodowych, podobnie w miejscowych stanach zapalnych, jednak dotychczas nie podjęto próby zbadania roli PARP-1 w procesach indukowanych w mózgu w systemowym stanie zapalnym (Veres i wsp., 2003).

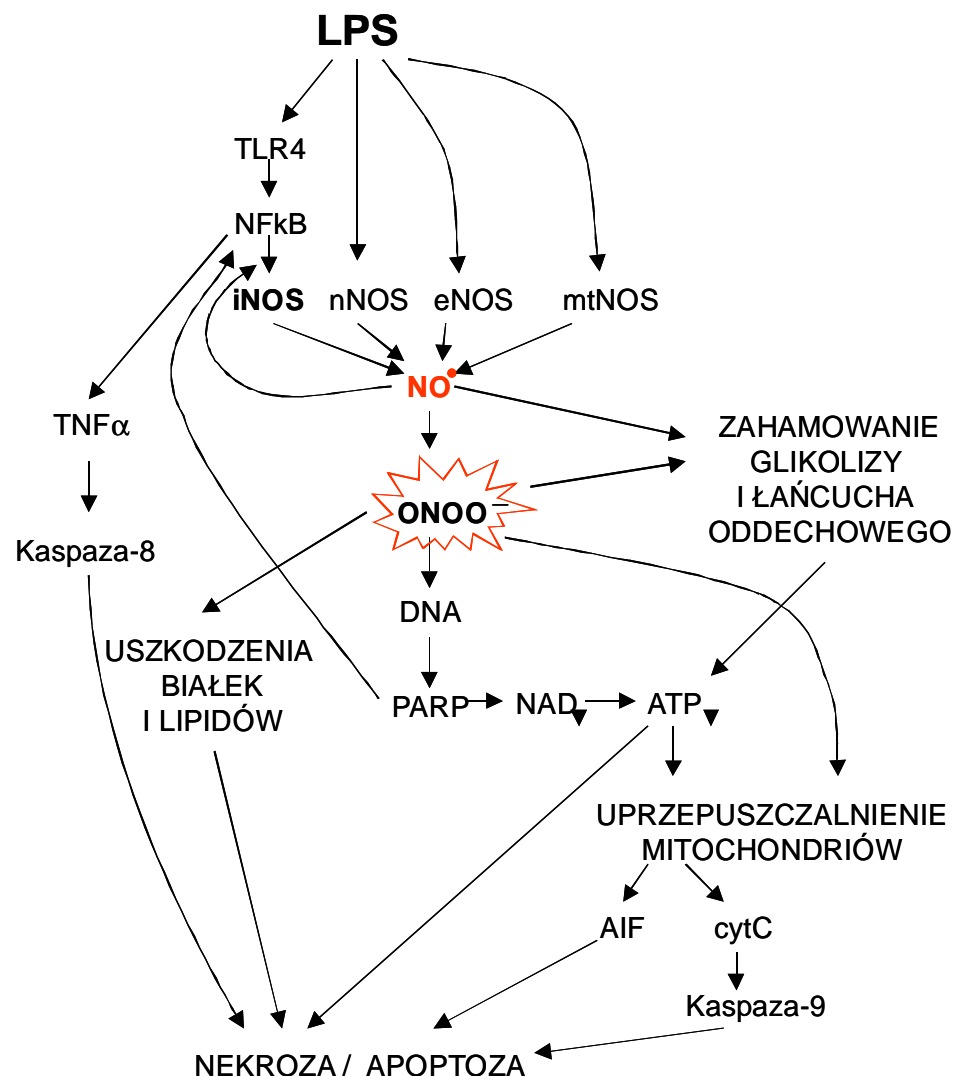
### III. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Stres wolnorodnikowy jest nieodłącznym elementem wielu ostrych i przewlekłych chorób układu nerwowego. Szczególnie istotne znaczenie odgrywa w stanach zapalnych, w których wolne rodniki produkowane są w celu eliminacji patogenów. Zbyt silna lub długotrwała aktywacja systemu immunologicznego we wstrząsie septycznym może być niebezpieczna dla organizmu. Stres oksydacyjny jest znaczącym zjawiskiem w przewlekłych stanach zapalnych, w tym w chorobach neurodegeneracyjnych np. w chorobie Alzheimera i Parkinsona. Uszkodzenia wolnorodnikowe obserwowane są też w okresie reperfuzji po niedokrwieniu mózgu. Sepsa, choć znana medycynie od wieków, ciągle jest poważnym wyzwaniem dla badaczy i lekarzy klinicystów. Jest pierwszą przyczyną zgonów na oddziałach intensywnej terapii. Około 60 % przypadków septycznych stanowią zakażenia bakteriami gram-ujemnymi, gdzie wrodzona odpowiedź układu immunologicznego na zakażenie wzbudzana jest przez lipopolisacharyd (endotoksyna; LPS), składnik ściany komórkowej bakterii. W czasie sepsy odpowiedź immunologiczna wymyka się często spod kontroli i prowadzi do uszkodzenia wielu narządów oraz często do śmierci.

Do dnia dzisiejszego nie udało się poznać wszystkich mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój sepsy, ani opracować w pełni skutecznej metody leczenia. Kluczową rolę w tej patologii przypisuje się tlenkowi azotu ( $\text{NO}^\bullet$ ), który produkowany jest w dużych ilościach przez aktywne komórki układu odpornościowego. Nadmierna synteza  $\text{NO}^\bullet$  może prowadzić do uszkodzeń wolnorodnikowych, w tym do zaburzeń metabolizmu energetycznego w wyniku hamowania procesu glikolizy i łańcucha oddechowego. Uważa się, że za wytwarzanie dużych ilości  $\text{NO}^\bullet$  odpowiedzialna jest indukowana izoforma syntazy tlenku azotu (iNOS) obecna nie tylko w komórkach krwi (makrofagach, granulocytach obojętnochłonnych), ale także w komórkach mikrogleju, astrocytach i neuronach mózgu. Niedawno odkryto jednak, że w czasie wstrząsu septycznego może dochodzić do zaburzeń układu glutaminianergicznego i uszkodzeń cytotoksycznych mózgu poprzez aktywację konstytutywnych izoform NOS (cNOS). Do chwili obecnej niewiele jednak wiadomo o udziale cNOS w stanach zapalnych wywołanych przez LPS.

Istotną rolę w sekwencji zdarzeń molekularnych prowadzących do obumierania komórek we wstrząsie endotoksycznym i w innych stanach zapalnych przypisuje się polimerazie poli(ADP-rybozy)-1 (PARP-1). Enzym ten nadmiernie aktywowany w

wypadku masowego wolnorodnikowego uszkodzenia DNA może doprowadzić do zużycia komórkowych zapasów  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> i ATP. W wyniku tych procesów dochodzi do obniżenia potencjału błonowego mitochondriów, uwalniania AIF i indukcji apoptozy, która może przebiegać na szlaku niezależnym od kaspaz. PARP-1 może wpływać na procesy zapalne również poprzez interakcję z czynnikami transkrypcyjnymi NF- $\kappa$ B, p53, AP-2, B-MYB, Oct-1, YY-1, TEF-1. W ten sposób PARP-1 wpływa na regulację ekspresji genu dla iNOS oraz ekspresji innych białek pro- i antyoksydacyjnych, oraz związanych z produkcją cytokin. Ponieważ mózg istotnie reguluje odpowiedź immunologiczną, ważne jest poznanie roli NOS i PARP-1 w mechanizmie uszkodzenia komórek mózgu w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego LPS.



Rycina 13. Procesy molekularne będące przedmiotem analizy niniejszej pracy

W niniejszej pracy do aktywacji reakcji immunologicznej używano LPS, który podawano dootrzewnowo. LPS powoduje aktywację wrodzonych mechanizmów reakcji immunologicznej za pośrednictwem receptorów błonowych TLR4. Reakcja ta, dzięki temu że jest niezależna od produkcji przeciwciał, jest bardzo szybka. Uważa się, że obecny w narządach obwodowych LPS może oddziaływać na mózg dwiema głównymi drogami. Aktywacja komórek układu odpornościowego w narządach obwodowych prowadzi do produkcji cytokin, które mogą następnie wpływać na procesy zachodzące w komórkach mózgu. LPS może oddziaływać również poprzez wpływ na obwodowy układ nerwowy. LPS ma utrudniony dostęp do komórek parenchymy całego mózgu w przypadku zachowanej bariery krew-mózg. Badania ostatnich lat wykazały jednak, że wysokie stężenia LPS mogą uszkadzać barierę krew-mózg, co umożliwia naciek leukocytów i dyfuzję LPS do mózgu. Udowodniono również, że receptory TLR4 zlokalizowane w parenchymie mózgu są pobudzane przez podany systemowo LPS. Wobec powyższego, bardzo istotne jest zbadanie znaczenia bezpośredniego działania wysokich stężeń LPS na komórki śródbłonna naczyniowego oraz poznanie mechanizmu uszkodzeń komórek mózgu w wyniku systemowego stanu zapalnego wywołanego dootrzewnowym podaniem LPS.

Celem niniejszej pracy jest analiza znaczenia tlenu azotu w stresie wolnorodnikowym wywołanym podaniem LPS. Badania szczegółowe dotyczą:

1. Udziału tlenu azotu w bezpośrednich i pośrednich mechanizmach działania LPS na komórki śródbłonna naczyniowego *in vitro*;
2. Indukcji degeneracji neuronów w mózgu przez systemowy stan zapalny;
3. Ekspresji i aktywności poszczególnych izoform NOS (nNOS, iNOS i eNOS) w mózgu po podaniu LPS;
4. Znaczenia NO w uszkodzeniach wolnorodnikowych makromolekuł, stanu energetycznego komórek i aktywacji procesów apoptotycznych po podaniu LPS;
5. Udziału PARP w analizowanym modelu eksperymentalnym.



## IV. METODY

### 1. Materiał doświadczalny

W badaniach *in vivo* używano dorosłych myszy o masie ciała ok. 20-25g szczepu C57BL6. Zwierzęta pochodziły z hodowli prowadzonej w IMDiK PAN, w Warszawie. Zwierzęta hodowano w warunkach stabilnej temperatury, wilgotności i diety. Po rozpoczęciu eksperymentu zwierzęta przetrzymywano w odpowiednich warunkach przez okres podany w opisie doświadczeń. Zwierzęta były traktowane zgodnie z zasadami prawa etycznego CMDiK PAN zgodnego z Konwencją Europejską. Zezwolenie na wykonanie doświadczeń wydała I Lokalna Komisja Etyczna do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa.

Do badań właściwości antyoksydacyjnych inhibitorów PARP w homogenacie mózgu używano dorosłych szczurów-samców stada Wistar z hodowli prowadzonej w IMDiK PAN, w Warszawie w wieku 3 miesięcy o masie ciała około 200-250g. Zwierzęta hodowano w warunkach stabilnej temperatury, wilgotności i diety.

Badania *in vitro* prowadzono w hodowli komórek śródbłonna z żyły pępowinowej HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), pochodzących z Zakładu Hematologii Centrum Medycznego Uniwersytetu w Utrechcie, Holandia.

Granulocyty obojętnochłonne izolowano z ludzkiej krwi pochodzącej od zdrowych wolontariuszy.

### 2. Przygotowanie materiału do doświadczeń i analiz

#### 2.1. Przygotowanie materiału z półkul mózgu do oznaczeń biochemicznych

Wyjściowym materiałem do badań były półkule mózgu dorosłych myszy. Zwierzęta dekapitowano, błyskawicznie zamrażano całe głowy w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . Z zamrożonych głów wydobywano mózg, izolowano półkule i rozcierano na proszek w kontakcie z ciekłym azotem. Proszek używano do analiz.

#### 2.2. Otrzymywanie homogenatu z mózgu i frakcji podkomórkowych

Zwierzęta dekapitowano, błyskawicznie schładzano głowę i w temperaturze  $+4^{\circ}\text{C}$  wydobywano mózg, usuwano naczynia krwionośne i substancję białą, izolowano korę mózgu, mózdzek, śródmózgowie wraz z międzymózgowiem albo istotę czarną. Bezpośrednio po izolacji tkankę nerwową używano do przygotowania homogenatu lub frakcji podkomórkowych wg metody opisanej przez Zhanga i wsp., 2002. Tkanek homogenizowano w 20 mM buforze HEPES-KOH pH 7,5 uzupełnionym 10 mM KCl, 1,5

mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT, 0,25M sacharozą i mieszaniną inhibitorów proteaz Complete (Roche Diagnostics GmbH). Homogenat (10% w/v) z poszczególnych części mózgu wirowano 5 min 500×g w 4°C. Osad P1, zawierający frakcję jądrową, zawieszano w buforze lizującym o składzie 0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 10 mM DTT inhibitory proteaz inkubowano w lodzie przez 15 min. Następnie wirowano 20 min 16000×g i supernatant zawierający białka jądrowe zamrażano do dalszego wykorzystania. Supernatant z pierwszego wirowania S1 poddano następnemu wirowaniu 20 min 10000×g. Osad używany był jako frakcja mitochondrialna, a supernatant jako frakcja cytozolowa.

### **2.3. Izolacja granulocytów obojętnochłonnych.**

Świeżo pobraną krew od zdrowych wolontariuszy rozcieńczano dwukrotnie buforem Hanks'a, nakładano delikatnie na powierzchnię Histopaque 1083, odwirowywano 40 min 1000 x g w temperaturze pokojowej w celu rozdzielania frakcji komórek krwi. Osad składający się z granulocytów obojętnochłonnych i erytrocytów poddawano działaniu 15 objętości NH<sub>4</sub>Cl (155 mM) przez 30 min. w +4°C w celu wywołania lizy erytrocytów. Granulocyty osadzano na dnie próbówki przez wirowanie przez 15 min 350 g w +4°C, a następnie przepłukiwano dwukrotnie buforem Hanks'a. Granulocyty zawieszono w buforze Hanks'a i zliczano w komorze Thoma (Draper i Hammock, 1999).

## **3. Modele stresu oksydacyjnego**

### **3.1. Model stresu oksydacyjnego wywołanego LPS *in vivo***

Stres wolnorodnikowy w mózgu myszy wywoływano przez dootrzewnową iniekcję lipopolisacharydu w dawce 1 mg/kg masy ciała (LPS; otrzymany z *E. coli* serotyp 055:B5; toksyczność 15000000 j./mg). Grupie kontrolnej podano dootrzewnowo sól fizjologiczną. Zwierzęta dekapitowano w czasie 3-48 godz. od podania LPS, materiał przygotowywano zgodnie z planowanymi oznaczeniami.

### **3.2. Model stresu oksydacyjnego *in vitro***

#### **3.2.1. Model stresu oksydacyjnego wywołanego LPS w hodowli komórek śródbłónka**

Komórki śródbłónka (HUVEC) namnażane były na szalkach pokrytych fibronektyną w medium EBM-2 uzupełnionym 2% FBS oraz czynnikami wzrostowymi, antybiotykami i hormonami (hydrokortyzon, hFGF-B, VEGF, R<sup>3</sup>-IGF-1, kwas askorbinowy, hEGF, GA-1000, heparyna, penicylina (100 jednostek/ml), streptomycyna (100 µg/ml) do gęstości ok. 90%, a następnie poddawano działaniu LPS (otrzymany z *E. coli* serotyp 055:B5; 0-100

µg/ml) przez okres do 48 godz. Maksymalne stężenie LPS ustalono na podstawie wstępnych eksperymentów, w których przyjmowano indukcję ekspresji cyklooksygenazy-2 jako wskaźnika specyficznego działania LPS na komórki śródbłonka. W badaniach używano pasaży od drugiego do piątego.

### **3.2.2. Model stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem aktywowanych granulocytów w hodowli komórek śródbłonka.**

Dla wywołania stresu oksydacyjnego w hodowli komórek HUVEC badania prowadzono w medium (Serum Free Medium-Gibco BRL) bez dodatku surowicy do osiągnięcia gęstości około 80%. W badaniach używano pasaży od 2 do 5. Komórki płukano dwukrotnie PBS-em i inkubowano w buforze Hanks'a zawierającym 6 µM TyrFluo, 10 mM Tris pH 7,5 i inhibitory proteaz. Stres oksydacyjny był wywoływany przez podanie do inkubacji:

- a) granulocytów obojętnochłonnych ( $3,3 \times 10^5$  komórek/ml) aktywowanych przez ester forbolu (PMA; 2 µg/ml);
- b)  $H_2O_2$  (100 µM);
- c) HRP/ $H_2O_2$  (4 mU/ml HRP i 10 µM  $H_2O_2$ ).

Inkubację prowadzono przez 15 min w 37°C. Naczynie z hodowlą było w czasie inkubacji delikatnie kołysane, aby nie dopuścić do adhezji granulocytów do komórek śródbłonka. W niektórych eksperymentach dodawano donora tlenu azotu DEANO (0-1 mM).

Ponadto badano oksydację egzogennej L-tyrozyny w układzie chemicznym, bez udziału materiału biologicznego. L-tyrozinę (0,5 mM) inkubowano w buforze PBS delikatnie mieszając. Stres oksydacyjny był indukowany przez:

- a) granulocyty obojętnochłonne ( $3,3 \times 10^5$  komórek/ml) aktywowane przez PMA (2 µg/ml);
- b) HRP/ $H_2O_2$  (4 mU/ml HRP i 10 µM  $H_2O_2$ );
- c)  $CuSO_4$  (25 µM) i  $H_2O_2$  (10 mM).

Inkubację prowadzono w 37°C przez 20 min.

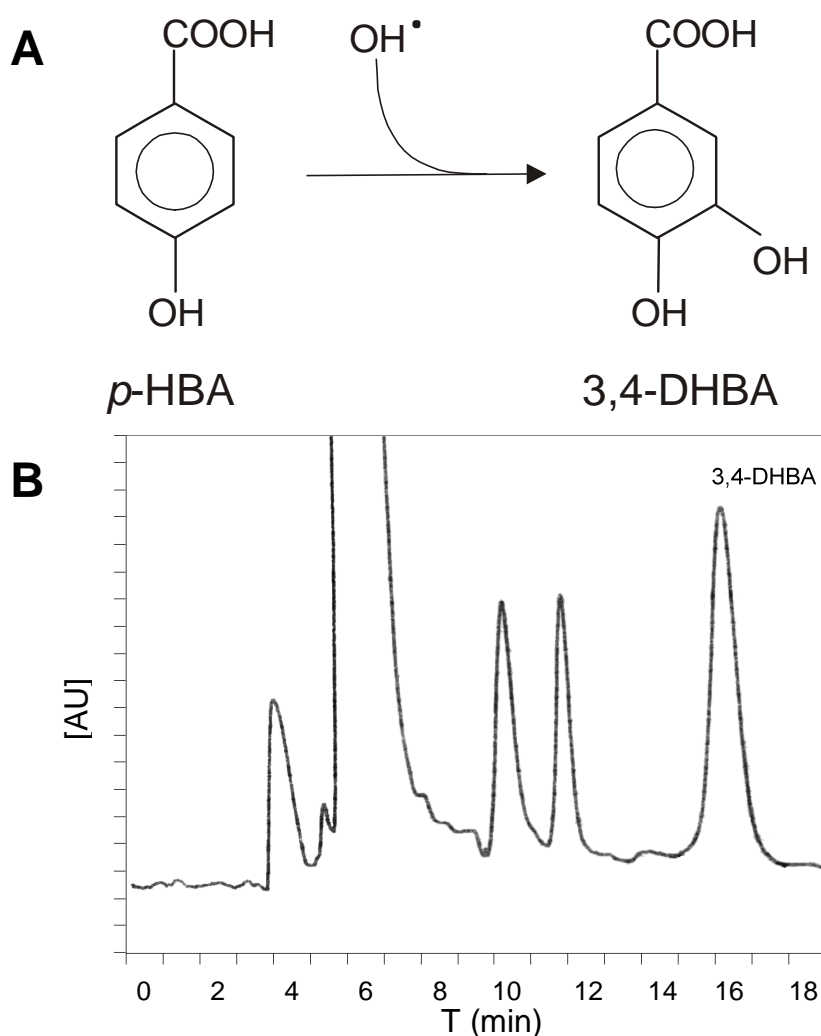
### **3.2.3. Model stresu oksydacyjnego wywołanego jonami metali $Fe^{2+}$ i $Cu^{2+}$ w homogenacie mózgu**

Do badań używano homogenatu z półkul mózgowych szczura (5mg białka/ml) przygotowanego w 50 mM Tris-HCl pH 7,4. Stres oksydacyjny wywoływano dodając:

- a)  $FeCl_2$  (25 µM) i kwas askorbinowy (10 µM);
- b)  $CuSO_4$  (25 µM) i  $H_2O_2$  (10 mM).

Homogenat inkubowano w obecności badanych związków 15 min. w 37°C i analizowano produkty reakcji wolnorodnikowych.

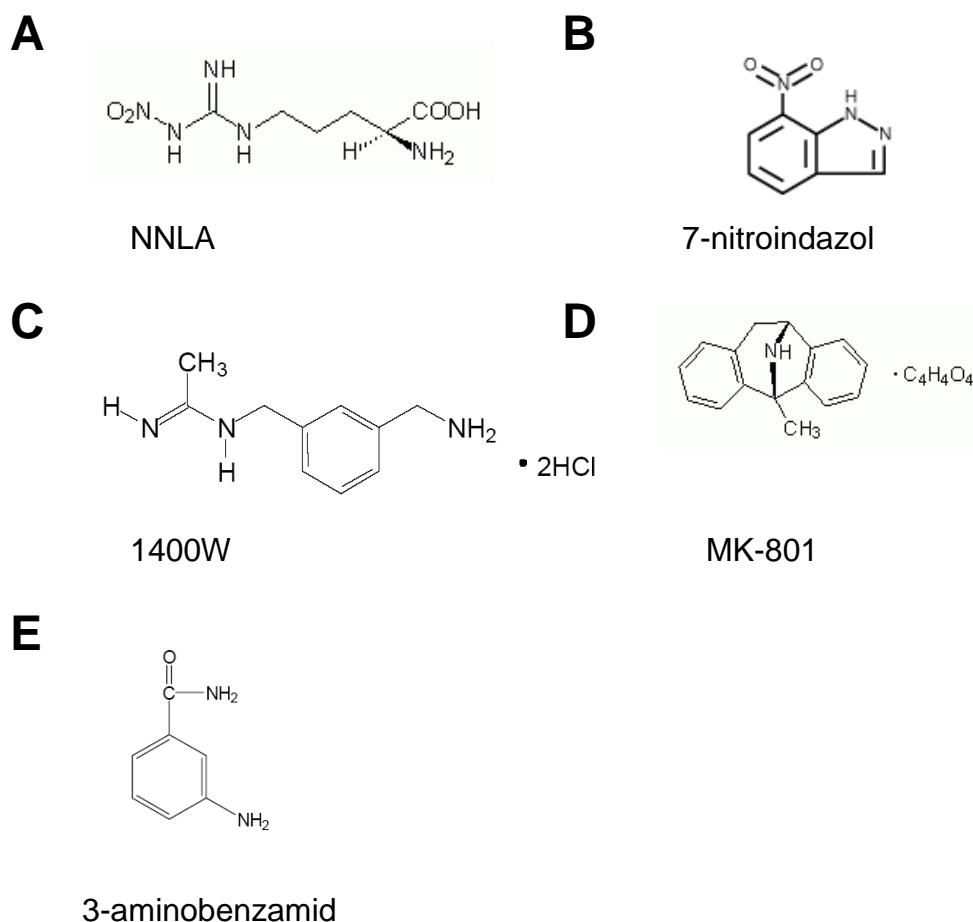
Ponadto reakcje z udziałem rodnika hydroksylowego badano w układzie chemicznym, bez udziału materiału biologicznego. Do wychwytu rodników hydroksylowych powstających w reakcji Fentona użyto kwasu *p*-hydroksybenzoesowego (Ryc. 14). Mieszaninę zawierającą kwas askorbinowy (2 mM), FeCl<sub>2</sub> (0,5 mM), kwas *p*-hydroksybenzoesowy (*p*-HBA; 1mM) w 50 mM buforze fosforanowym o pH 7,4 inkubowano 30 sekund w 37°C, następnie dodawano 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, i ponownie inkubowano 1 min w 37°C w obecności badanego związku (1-300 mM). Reakcję zatrzymywano dodaniem 2 mM DMSO i 0,2 mM desferoksyaminy (Czapski i wsp., 2004).



**Rycina 14. Zasada działania pułapki spinowej**

A) Reakcja addycji rodnika hydroksylowego do kwasu *p*-hydroksybenzoesowego (*p*-HBA) prowadzi do powstania kwasu 3,4-dihydroksybenzoesowego (3,4-DHBA), który może być następnie wykrywany metodami elektrochemicznymi; B) Przykładowy zapis chromatograficzny eksperymentu badania antyoksydacyjnych właściwości DHIQ za pomocą pułapki spinowej.

#### 4. Farmakologiczne modyfikacje reakcji mózgu na stres oksydacyjny wywołany LPS.



**Rycina 15. Wzory chemiczne związków używanych w eksperymentach**

W badaniach użyte były następujące związki, zgodnie z literaturą (Reif i wsp., 1995, 2000; Rankin i wsp., 1989):

- N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (NNLA; 30 mg/kg; podany dootrzewnowo) - inhibitor cNOS, może hamować również iNOS, jednak o wiele słabiej (IC<sub>50</sub> dla nNOS wynosi 0,3 μM, dla eNOS 0,6 μM, dla iNOS 6 μM);
- 7-nitroindazol (7-NI; 25 mg/kg; podany dootrzewnowo) - inhibitor nNOS, IC<sub>50</sub> dla nNOS wynosi 1,1 μM, dla eNOS 14,8 μM, dla iNOS 9 μM;
- N-(3-Aminometylo)benzyloacetamidyna (1400W; 5mg/kg) - inhibitor iNOS, IC<sub>50</sub> dla nNOS wynosi 7,3 μM, dla eNOS 1000 μM, dla iNOS 0,23 μM;

- d) maleinian dizocyliny (MK-801; 1 mg/kg; podany dootrzewnowo)
- e) 3-aminobenzamid (3-AB; 30mg/kg; podany dootrzewnowo) - inhibitor PARP, IC<sub>50</sub> wynosi 5,4 μM;

## 5. Metody biochemiczne oznaczania aktywności enzymów

### 5.1. Oznaczanie aktywności syntazy tlenu azotu

Aktywność syntazy NO oznaczano poprzez pomiar radioaktywnej [<sup>14</sup>C]L-cytruliny powstającej w ekwimolowych ilościach z NO, ze znakowanej [<sup>14</sup>C]L-argininy w reakcji katalizowanej przez syntazę NO w obecności kofaktorów wg metody opisanej przez Bredta i Snydera (1990), i zmodyfikowanej przez Chalimoniuk i Strosznajder (1998).

Tkanekę nerwową homogenizowano w buforze 50 mM Tris pH 7,4 zawierającym 0,32 M sacharozę i inhibitory proteaz, homogenat (300μg białka) inkubowano w środowisku zawierającym 100 μM [<sup>14</sup>C]L-argininę (0,1 μCi), 1 mM NADPH, 15 μM FAD, 10 μM tetrahydrobiopterynę (H<sub>4</sub>B), 1 μM kalmodulinę w buforze 50 mM Tris pH 7.4 zawierającym 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 2 mM CaCl<sub>2</sub> w końcowej objętości 300 μl. Próby zerowe nie zawierały białka. Inkubację prowadzono 30 min w 37°C. Następnie reakcję przerywano przez dodanie 1ml zimnego buforu 100mM Tris z 10mM EGTA, pH 5,5 i mieszaninę wirowano 3000 x g przez 10 min. 1 ml nadsącza nakładano na kolumnę chromatograficzną wypełnioną 500 mg Dowexu AG 50W-X8 (w formie Na<sup>+</sup>) i eluowano 2 ml H<sub>2</sub>O. 1 ml eluatu mieszano z 8 ml płynu scyntylnego Braya i mierzono radioaktywność [<sup>14</sup>C]L-cytruliny. Ilość powstającej radioaktywnej L-cytruliny w wyniku reakcji NOS-u obliczano odejmując radioaktywność próby zerowej. Do pomiaru aktywności poszczególnych izoform NOS używano specyficznych inhibitorów.

### 5.2. Analiza aktywności kaspazy-3

Analiza aktywności kaspazy-3 przeprowadzona była metodą fluorymetryczną z użyciem zestawu CASP-3-F firmy Sigma. Metoda wykorzystuje pseudosubstrat acetylo-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metylokumarynę (Ac-DEVD-AMC; odwzorowujący miejsce cięcia w PARP: Asp-Glu-Val-Asp) i specyficzny inhibitor kaspazy-3 (Ac-DEVD-CHO) (Thornberry, 1994). Cytozol przygotowywano poprzez homogenizację tkanki nerwowej w buforze lizującym (2,5 mM CHAPS, 2,5 mM DTT, 25 mM HEPES pH 7,4) 15-minutową inkubacją w lodzie i wirowanie 14000 x g 15 min. Supernatant (około 300 μg białka) inkubowany był 120 min. w obecności Ac-DEVD-AMC (16,66 μM) w roztworze zawierającym 5 mM DTT, 2 mM EDTA, 0,1% CHAPS, 20 mM HEPES pH 7,4 w

temperaturze pokojowej. Równolegle z próbą badaną wykonywano oznaczenie w obecności inhibitora kaspazy 3 (Ac-DEVD-CHO; 2  $\mu$ M). Pomiar stężenia fluorescencyjnego produktu uwolnionego w wyniku reakcji katalizowanej przez kaspazę 3 (7-amido-4-metylokumaryna) przeprowadzony był po zakończonej inkubacji za pomocą spektrofluorymetru Perkin-Elmer LS-50B przy długości fali pobudzającej Ex: 360 nm i emitowanej Em: 460 nm. Aktywność kaspazy 3 wyliczana była na podstawie krzywej wzorcowej AMC.

### **5.3. Oznaczenie aktywności polimerazy poli(ADP-rybozy) metodą immunochemiczną**

Aktywność polimerazy poli(ADP-rybozy) analizowano mierząc metodami immunochemicznymi ilość produktu reakcji, poli(ADP-rybozy), powstającej podczas inkubacji białka w obecności  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>. Tkanę nerwową homogenizowano w buforze zawierającym 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 92  $\mu$ M p-APMSF i 0,25 M sacharozę. Tak przygotowaną próbkę inkubowano 1 min w 37°C w obecności 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, i 0,2 mM  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>. Próbę ślepą wykonywano bez dodawania  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>. Po zakończonej inkubacji próbki schładzano w lodzie, białka denaturowano 5 min w 95°C. Białka rozdzielano w 7,5 % żelu poliakrylamidowym a następnie przenoszono na błonę nitrocelulozową i poddawano immunodetekcji.

## **6. Metody biochemiczne i chromatograficzne**

### **6.1. Analiza produktów oksydacji kwasu p-hydroksybenzoowego**

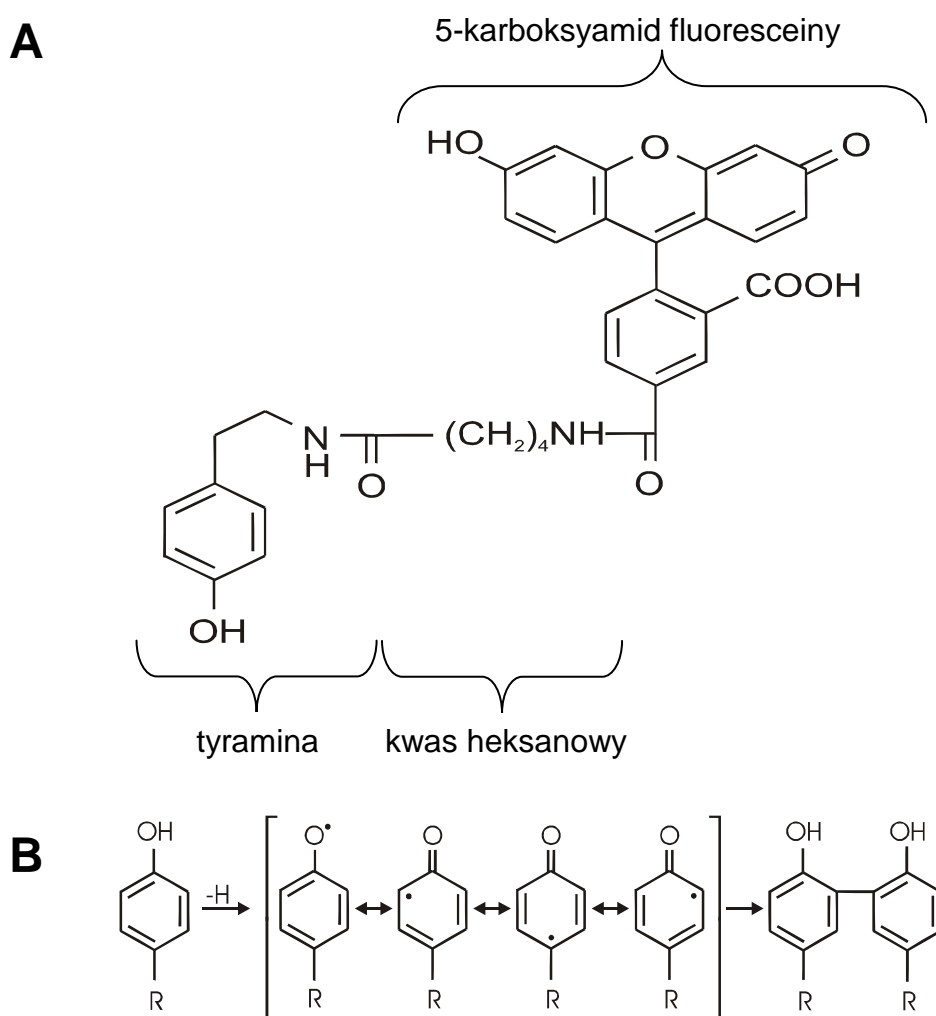
Stężenie kwasu 3,4-dihydroksybenzoowego w próbce analizowano za pomocą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej. Po zakończonej inkubacji próbki filtrowano i analizowano chromatograficznie, używając kolumny TSK-GEL SCX i detekcji elektrochemicznej (+0,6 V). Faza ruchoma składała się z 10% acetonitrylu, 1mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1mM KCl, 0,125mM EDTA.

### **6.2. Analiza dityrozyny- produktu oksydacji exogennej L-tyrozyny**

Oksydacja cząsteczek L-tyrozyny prowadzi do powstania rodników tyrozylowych, które reagując ze sobą tworzą produkt o własnościach fluorescencyjnych – dityrozynę (Rycina 16). L-tyrozynę inkubowano w buforze PBS w temperaturze 37°C przez 30 min. Stężenie powstającej dityrozyny badano przez pomiar fluorescencji ( $\lambda_{Ex}$ : 325 nm,  $\lambda_{Em}$ : 405 nm) przy użyciu spektrofluorymetru Perkin-Elmer LS-50B.

### 6.3. Badanie oksydacji białek komórek śródbłonka naczyniowego (HUVEC) w hodowli przy użyciu sondy fluorescencyjnej TyrFluo

Do badania oksydacji białek wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych HUVEC używano sondy TyrFluo. W warunkach stresu oksydacyjnego cząsteczka TyrFluo staje się wolnym rodnikiem, i tworząc mostki dityrozynowe, reaguje z rodnikami tyrozylowymi białek, wyznakowując tym samym uszkodzone białka. Detekcja możliwa jest dzięki wchodzącej w skład TyrFluo fluoresceinie.



#### Rycina 16. Chemiczna struktura TyrFluo i zasada powstawania rodnika tyrozylowego i dityrozyny

A) Struktura amidu tyraminy i kwasu 6-(fluoresceino-5-karboksyamido)heksanowego. Ponieważ TyrFluo jest mieszaniną izomerów, w skład TyrFluo wchodzi również amid tyraminy i kwasu 6-(fluoresceino-6-karboksyamido)heksanowego. B) Wskutek oderwania atomu wodoru z cząsteczki tyrozyny (lub tyraminy) pojawia się niesparowany elektron i dochodzi do powstania mostku dityrozynowego.

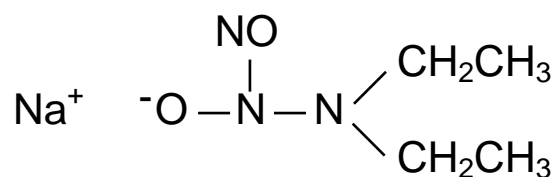
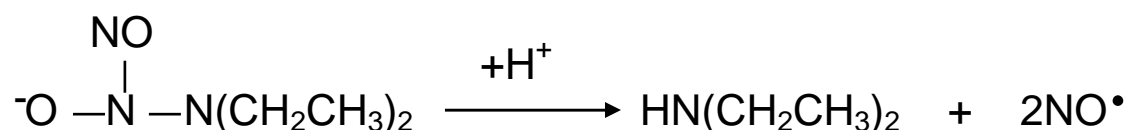


### 6.3.1. Synteza sondy TyrFluo

Sonda fluorescencyjna TyrFluo (TyrFluo) używana do badania oksydacji białek była syntezowana wg metody opisanej przez van der Vliesa (2001). Ester sukcyinoimidowy 6-(fluoresceino-5-(lub-6)-karboksyamido)kwasu heksanowego (1mg) był przyłączany do grupy aminowej tyraminy (3 mg) w czasie 2 godz. inkubacji w temperaturze pokojowej w środowisku metanolu z bicyną (200 mM), pH 8.5. Po inkubacji TyrFluo ekstrahowano przez dodanie mieszaniny chloroform / metanol / 25% amoniak (2/1/0,5 v/v/v). TyrFluo przechodziło do fazy organicznej, a nieprzereagowana tyramina pozostawała w fazie wodnej. Po wysuszeniu próżniowym za pomocą Rotofapora-R, TyrFluo rozpuszczano w PBS-ie. Do badania oksydacji białek wewnątrzkomórkowych używano acetylowanej pochodnej TyrFluo- acetylTyrFluo. Acetylację TyrFluo (10mM) przeprowadzano w 50  $\mu$ l tetrahydrofuranu w obecności 0,2 mg 4-(dimetyloamino)-pirydyny i 3  $\mu$ L bezwodnika octowego. Po zakończeniu reakcji (świadczy o tym utrata żółtego zabarwienia roztworu) dodawano etanol w celu eliminacji nadmiaru bezwodnika octowego. Stężenie TyrFluo w roztworze określano spektrofotometrycznie przy długości fali 495 nm (molowy współczynnik absorpcji wynosi  $74000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Sondę przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 6.3.2. Badanie oksydacji białek zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych HUVEC

Dla określenia oksydacji białek zewnątrzkomórkowych, hodowlę komórek HUVEC prowadzono w medium (Gibco BRL) bez dodatku surowicy do osiągnięcia gęstości około 90 %. Komórki płukano dwukrotnie PBS-em i inkubowano przez 15 min w  $37^{\circ}\text{C}$  w buforze Hanks'a zawierającym 6  $\mu\text{M}$  TyrFluo, 10 mM Tris pH 7,5 i inhibitory proteaz. Stres oksydacyjny był generowany przez dodanie do inkubacji: granulocytów obojętnochłonnych ( $3,3 \times 10^5$  komórek/ml) aktywowanych przez ester forbolu (PMA; 2  $\mu\text{g/ml}$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) i HRP/ $\text{H}_2\text{O}_2$  (4 mU/ml HRP i 10 $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Naczynie z hodowlą było w czasie inkubacji delikatnie kołysane, aby nie dopuścić do adhezji granulocytów do komórek śródbłonna. W niektórych eksperymentach dodawano donora tlenu azotu DEANO (0-1 mM) (Rycina 17). Po inkubacji usuwano medium, i komórki HUVEC płukano dwukrotnie PBS-em w celu usunięcia granulocytów, po czym dodano lizującego roztworu do przygotowywania próbek (62,5 mM Tris-HCl o pH 6,8, 10% glicerol, 2% SDS, 1,5%  $\beta$ -merkaptioetanol oraz 0,05% błękit bromofenolu) i denaturowano białka przez ogrzewanie w  $95^{\circ}\text{C}$  przez 5 min. Białka rozdzielano w 10 % żelu poliakrylamidowym a następnie przenoszono na błonę nitrocelulozową i poddawano immunodetekcji.

**A****B****Rycina 17. Zasada działania donora tlenku azotu DEANO**

A) Budowa cząsteczki DEANO (sól sodowa) B) DEANO w roztworze o pH 7,4 spontanicznie dysocjuje tworząc dwie cząsteczki NO i jedną cząsteczkę dietylaminy.  $T_{1/2}$  DEANO wynosi 2,1 min (Keefer i wsp., 1996).

Dla określenia oksydacji białek wewnątrzkomórkowych, komórki były preinkubowane w obecności acetylTyrFluo (6  $\mu\text{M}$ ) w buforze Hanks'a uzupełnionym 10 mM Tris HCl pH 7,5 w 37°C for 5 min. Po usunięciu nadmiaru sondy, który nie przeniknął do komórek, przez dwukrotne płukanie PBS-em, komórki traktowano jak opisano powyżej. W eksperymentach w których używano  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) lub HRP/ $\text{H}_2\text{O}_2$  (4 mU/ml HRP i 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) katalaza (250 U/ml) była używana do negatywnej kontroli.

**6.4. Oznaczanie zawartości grup karbonylowych w białkach.**

Stężenie grup karbonylowych w białkach badane było metodą kolorymetryczną, po derywatywacji dinitrofenylohydrazyną (DNPH) (Olivier i wsp., 1987). Białka w badanej próbce (co najmniej 1mg białka) wytrącano z homogenatu przez dodanie równej objętości 20% zimnego kwasu trójchlorooctowego (TCA), następnie osadzano na dnie próbówki przez wirowanie 15 min 10000 x g, po czym rozpuszczano je w 0,5 ml roztworu 10 mM DNPH w 2M HCl. Dla każdej próbki wykonana była równolegle kontrola bez DNPH. Po 60 min. inkubacji w temperaturze pokojowej białka były ponownie wytrącane 20% TCA i próbki trzykrotnie przepłukiwano 1 ml mieszaniny etanol : octan etylu (1:1) w celu usunięcia nieprzereagowanego DNPH. Osad rozpuszczano w roztworze 6 M guanidyny w 2 M HCl, po czym mierzono absorbancję przy 370 nm za pomocą spektrofotometru

Shimadzu UV-1202. Stężenie grup karbonylowych wyliczano na podstawie molowego czynnika absorpcji, który wynosi  $22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

**6.5. Analiza oksydacji lipidów przez pomiar stężenia dialdehydu malonylowego i innych produktów wolnorodnikowego uszkodzenia lipidów reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS).** Związki te mierzone były wg Asakawy i Matsushite, 1980. Do 1 ml 10% homogenatu dodawano 1 ml 30% kwasu trójchlorooctowego, 0,1 ml 5M HCl, 1 ml 0,75% kwasu tiobarbiturowego rozpuszczonego w 0,1M NaOH, ogrzewano preparat w  $100^{\circ}\text{C}$  przez 15 minut, wirowano 10 minut  $1500 \times \text{g}$ , i mierzono absorpcję nadsącza przy długości fali 535 nm przy użyciu spektrofotometru Shimadzu UV-1202. Stężenie TBARS wyliczano na podstawie krzywej standardowej.

#### **6.6. Oznaczanie stężenia $\beta\text{-NAD}^+$**

Stężenie  $\text{NAD}^+$  było oznaczane metodą enzymatyczną opisaną przez Nisselbauma i Greena (1969) z modyfikacjami Sterna i wsp. (2002). W stosowanej metodzie  $\beta\text{-NAD}^+$  jest wykorzystywany jako koenzym dla dehydrogenazy alkoholowej (ADH), a powstający w tej reakcji NADH redukuje za pośrednictwem metasiarczanu fenazyny (phenazine methosulphate-PMS) błękit tiazolowy (MTT), i daje barwny formazan. Szybkość redukcji błękitu tiazolowego jest proporcjonalna do stężenia  $\beta\text{-NAD}^+$  w próbce. W celu oznaczenia wyłącznie utlenionej formy  $\beta\text{-NAD}^+$  tkankę nerwową w postaci proszku azotowego (20 mg) homogenizowano w 0,5 ml 0,1 M HCl za pomocą strzykawki, ogrzewano przez 2 minuty w  $100^{\circ}\text{C}$  (w tych warunkach forma zredukowana się rozkłada), po czym schładzano, odwirowywano 10 min  $1000 \times \text{g}$  w  $4^{\circ}\text{C}$  i odbiałczony nadsącz doprowadzano do pH 7 za pomocą 2 M NaOH. Mieszanina reakcyjna (1,425 ml) zawierała badaną próbkę (25  $\mu\text{l}$ ), 0,1 mg/ml ADH, 1 mM PMS, 0,25 mM MTT, 2,5 mM EDTA i 50 mM Tris-HCl  
pH 8,0.

W celu rozpoczęcia reakcji dodawano etanol (1,6%) i inkubowano 2 min w  $37^{\circ}\text{C}$ . Absorbancję (556 nm) mierzono przed i po zakończonej inkubacji. Równocześnie wykonywano próbę ślepą, nie zawierającą badanej próbki. Całe oznaczenie przeprowadzano w zaciemnionym pomieszczeniu. Stężenie  $\beta\text{-NAD}^+$  wyliczano z krzywej wzorcowej.

#### **6.7. Oznaczanie przeżywalności komórek HUVEC**

Komórki śródbłonna (HUVEC) namnażano na szalkach pokrytych fibronektyną w opisanych uprzednio warunkach do gęstości ok. 90%, a następnie poddano działaniu badanego czynnika. Bezpośrednio po zakończonym eksperymencie komórki HUVEC

płukano dwukrotnie buforem PBS i używano do analizy. Przeżywalność komórek oznaczano za pomocą testu redukcji błękitu tiazolowego (MTT), który w żywych komórkach redukowany jest do niebieskiego formazanu (Mosmann, 1983). Po zakończonej inkubacji do medium dodawano 0,5 mg/ml MTT i inkubowano 60 min w 37°C. Powstałe kryształki formazanu rozpuszczano w 40 mM HCl w izopropanolu, delikatnie mieszając 20 min, po czym mierzono absorbancję przy 590nm.

### **6.8. Oznaczanie zawartości białka**

Zawartość białka w preparacie oznaczano metodą Lowry'ego przy użyciu fenolowego odczynnika Folina (Lowry i wsp., 1951).

## **7. Metody immunochemiczne**

### **7.1. Analiza dityrozyny w białkach komórek śródbłonna w hodowli metodą immunochemiczną**

Zdenaturowane białka rozdzielano na 10% żelu poliakrylamidowym, a następnie przenoszono na błonę nitrocelulozową. Membranę inkubowano w celu zablokowania niespecyficznego wiązania się przeciwciał w roztworze odtłuszczonego mleka w TBS-T (2×10 min 0,2% mleko i 2×20 min 2% mleko w TBS-Tween). Dla wykrycia białek wyznakowanych sondą TyrFluo, membranę inkubowano 1 godz. w 2% roztworze mleka w TBS-T zawierającym przeciwciała przeciw fluoresceinie sprzężone z HRP (roztwór 1:1500; Biogenesis Ltd.). Niezwiązane przeciwciała usuwano przez kilkakrotne płukanie membrany kolejno przez 5 min, 3×10 min, 5 min w TBS-T zawierającym odpowiednio 2%, 0,2% i 0% odtłuszczonego mleka. Następnie błonę poddawano reakcji chemiluminescencyjnej przy użyciu odczynnika firmowego ECL (Amersham), po czym użyto jej do naświetlenia filmu światłoczułego HYPERFILM<sup>TM</sup>-ECL (Amersham).

### **7.2. Oznaczanie poli(ADP-rybozy) metodą immunochemiczną**

Białka rozdzielano na 7,5 % żelu poliakrylamidowym i przenoszono na błonę nitrocelulozową. Membranę płukano 5 min w PBS-Tween, następnie inkubowano w celu zablokowania niespecyficznego wiązania się przeciwciał w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w PBS-Tween przez noc w 4°C. Następnie membranę inkubowano 2 godz w temperaturze pokojowej w 0,25% roztworze mleka w PBS-Tween zawierającym mysie monoklonalne przeciwciała przeciw poli(ADP-rybozie) (1:400; MA b (10H); Alexis Corp.), po czym płukano membranę 3 x 15 minut w 0,25% mleku w PBS-Tween i inkubowano 1 godz w roztworze drugorzędowego przeciwciała (1:4000; Anti-mouse IgG NA931V, Amersham Biosciences) w 5% mleku w PBS-Tween. Niezwiązane specyficznie przeciwciała usuwano przez płukanie błony 2 x 15 min w 0,25% mleku w PBS-Tween i 2

x 15 min w PBS-Tween. Następnie błonę poddano reakcji chemiluminescencyjnej, jak opisano powyżej.

### **7.3. Oznaczanie czynnika indukującego apoptozę (AIF) metodą immunochemiczną**

Białka rozdzielano na 12,5 % żelu poliakrylamidowym i przenoszono na błonę nitrocelulozową. Po wykonaniu barwienia białek za pomocą roztworu PonceauS membranę płukano 5 min w TBS-Tween, następnie inkubowano w temperaturze pokojowej przez 60 min w celu zablokowania niespecyficznego wiązania się przeciwciał w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w TBS-Tween. Następnie membranę inkubowano przez noc w 4°C w 5% roztworze mleka w TBS-Tween, zawierającym mysie monoklonalne przeciwciało przeciw AIF (1:500; Mab (E-1); Santa Cruz Biotechnology, Inc.), po czym płukano membranę 3 x 5 minut w TBS-Tween, i inkubowano 1 godz w roztworze drugorzędowego przeciwciała (1:4000; Anti-mouse IgG NA931V, Amersham Biosciences) w 5% mleku w TBS-Tween. Niezwiązane specyficzne przeciwciała usuwano przez płukanie błony 3 x 5 min w TBS-Tween i 5 min w TBS. Następnie błonę poddano reakcji chemiluminescencyjnej, jak opisano powyżej.

### **7.4. Oznaczanie ilości $\beta$ -aktyny metodą immunochemiczną**

Membrany wykorzystane uprzednio do analizy TyrFluo, PAR i AIF inkubowano 30 min w roztworze 1% SDS i 50 mM glicyny-HCl o pH 2,0 w celu oderwania związanych przeciwciał i płukano 5 x 15 min w TBS-Tween. Następnie inkubowano w temperaturze pokojowej przez 60 min w celu zablokowania niespecyficznego wiązania się przeciwciał w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w TBS-Tween, po czym inkubowano 120 min w 0,1% roztworze BSA w TBS-Tween, zawierającym mysie monoklonalne przeciwciało przeciw  $\beta$ -aktynie (1:400; Mab (C4); MP Biomedicals, Inc.), po czym płukano membranę 3 x 5 minut w TBS-Tween, i inkubowano 1 godz w roztworze drugorzędowego przeciwciała (1:4000; Anti-mouse IgG NA931V, Amersham Biosciences) w 5% mleku w TBS-Tween. Niezwiązane specyficzne przeciwciała usuwano przez płukanie błony 3 x 5 min w TBS-Tween i 5 min w TBS. Następnie błonę poddano reakcji chemiluminescencyjnej, jak opisano powyżej. Po analizie densytometrycznej odczytów używano do normalizacji wyników analizy innych białek.

## **8. Metody analizy ekspresji genów**

### **8.1. Przygotowanie tkanki nerwowej do izolacji RNA**

Zwierzęta dekapitowano, błyskawicznie schładzano głowę, i w temperaturze +4°C wydobywano mózg i izolowano badane części mózgu. Tkanekę nerwową używano bezpośrednio po izolacji lub zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

## 8.2. Izolacja RNA

Całkowite RNA izolowano w warunkach sterylnych z kory mózgu zgodnie z metodą opisaną przez Chomczyński i Sacchi (1987), zmodyfikowaną, używając odczynnika TRI-reagent (Tel-TEST Inc., Sigma). Do izolacji używano świeżej tkanki, lub przechowywanej w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ ). Tkanekę w postaci proszku azotowego zawieszano w 1ml odczynnika TRI-reagent, homogenizowano i inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie do 1ml homogenatu dodawano 200  $\mu\text{l}$  chloroformu, mieszano łagodnie przez 15 sekund, a następnie wirowano 9000 x g przez 10 min. w  $4^{\circ}\text{C}$ . Górną fazę wodną zawierającą RNA przenoszono do nowej probówki, dodawano 1ml zimnego izopropanolu i mieszano. Następnie próby inkubowano w  $-70^{\circ}\text{C}$  przez 30 min. Po inkubacji wirowano 9000 x g przez 15 min., a osad RNA trzykrotnie przemywano 75% etanolem, 1ml. Po kilkuminutowym odparowaniu etanolu z próbek, osad RNA zawieszano w 30 $\mu\text{l}$  wody „RNase-free” (Promega). Następnie mierzono ilość otrzymanego RNA metodą spektrofotometryczną przy długości fali  $\lambda = 260$ , oraz zanieczyszczenie RNA białkami i DNA przy długości fali  $\lambda = 280$ . Stosunek  $\lambda_{260}/\lambda_{280}$  wynosił od 1,6 do 1,9. Ilość RNA oznaczano z następującej zależności:  $A_{260} = 1$  odpowiada 40 $\mu\text{g}$  RNA w 1ml.

## 8.3. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Całkowite wyizolowane RNA (5 $\mu\text{g}$ ) było matrycą dla działania odwrotnej transkryptazy, w reakcji odwrotnej transkrypcji otrzymywano DNA komplementarne do mRNA (cDNA). Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano w  $42^{\circ}\text{C}$  przez 60 min. Przy użyciu zestawu odczynników firmy Promega w końcowej objętości 20 $\mu\text{l}$ . W celu inaktywacji odwrotnej transkryptazy mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 5 min. w  $90^{\circ}\text{C}$ , a następnie schładzano przez 5 min. w lodzie.

## 8.4. Reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction, PCR)

Uzyskane cDNA (5 $\mu\text{g}$ ) amplifikowano metodą PCR używając starterów dla nNOS, iNOS, eNOS, TNF $\alpha$ , wykonanych przez Pracownię Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN według sekwencji komplementarnych do sekwencji uzyskanych z banku genów. Jednocześnie analizowano poziom ekspresji genu kodującego konstytutywne białko  $\beta$ -aktynę, jako wewnętrzną kontrolę. Reakcję łańcuchową polimerazy przeprowadzano przy użyciu zestawu odczynników firmy Qiagen wg zaleceń producenta.

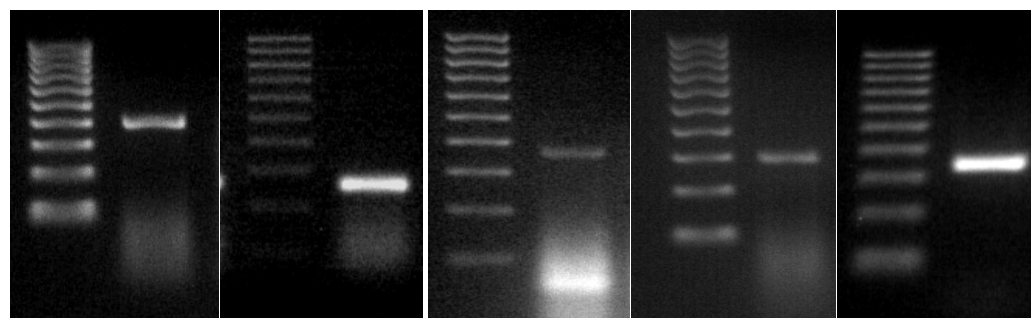
Do badań użyto następujących starterów:

<i>nNOS</i>	5'-CCTTAGAGAATAAGGAAGGGGGCGGG-3'	
	5'-GGGCCGATCATTGACGGCGAGAATGATG-3'	(De Sanctis i wsp., 1997)
<i>eNOS</i>	5'-GGGCTCCCTCCTTCCGGCTGC-3'	
	5'-GGATCCCTGGAAAAGGCG-3'	(Strosznajder i wsp., 2004)
<i>iNOS</i>	5'-GCCTCATGCCATTGAGTTCATCAACC-3'	
	5'-GAGCTGTGAATTCCAGAGCCTGAAG-3'	(Baylis i wsp., 1999)
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	5'-CCCCAAAGGGATGAGAAGTT-3'	
	5'-GTGGGTGAGGAGCACGTAGT-3'	(Liao i wsp., 2002)
<i><math>\beta</math>-aktyna</i>	5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'	
	5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'	(Song i wsp., 1999)

Próbki cDNA z mieszaniną PCR były inkubowane w aparacie GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) w następujących warunkach:

	<b>nNOS</b>	<b>eNOS</b>	<b>iNOS</b>	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<b><math>\beta</math>-aktyna</b>
<b>Wstępna denaturacja</b>	15min-95°C	15min-95°C	15min-95°C	15min-95°C	15min-95°C
	30 cykli:	30 cykli:	30 cykli:	28 cykli:	28 cykli:
<b>Denaturacja</b>	1min-94°C	1min-94°C	35 sek-96°C	1min-94°C	1min-94°C
<b>Asocjacja starterów</b>	1min-66°C	2 min-60°C	2 min-62°C	1min-60°C	1min-62°C
<b>Wydłużanie łańcucha</b>	2 min-72°C	3 min-72°C	2min-72°C	2min-72°C	2min-72°C
<b>Końcowe wydłużanie łańcucha</b>	7min-72°C	7min-72°C	7min-72°C	7min-72°C	7min-72°C
<b>Schłodzenie</b>	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C

Produkty PCR (10–20  $\mu$ l) poddawano elektroforezie w 2% żelu agarozowym z bromkiem etydyny w buforze 1 x TAE (45 mM Tris-octan, 0,1 mM EDTA) przy napięciu 100V. Żel fotografowano w świetle UV, obraz analizowano densytometrycznie przy użyciu programu TotalLab 4.0, ilość produktu przeliczano w odniesieniu do ekspresji genu kodującego  $\beta$ -aktynę. Specyficzność reakcji weryfikowano na podstawie wielkości otrzymanego produktu (Rycina 18).



	nNOS	eNOS	iNOS	TNF $\alpha$	$\beta$ -aktyna
T/U	404 / 390	259 / 253	372 / 376	270 / 272	348 / 334

### **Rycina 18. Analiza specyficzności reakcji PCR**

Wielkość produktu reakcji PCR analizowano za pomocą programu TotalLab. Pokazane markery wielkości zawierają oligonukleotydy w zakresie 100-1000 par zasad. Tabela zawiera teoretyczne (T) i uzyskane (U) długości oligonukleotydów (pz).

## **9. Badania w mikroskopie elektronowym transmisyjnym**

### **9.1. Badania morfologiczne w mikroskopie elektronowym transmisyjnym**

Z utrwalonego drogą perfuzji mózgu myszy pobierano skrawki tkanki mózgowej zawierające istotę czarną. Dalsze utrwalanie materiału prowadzono jeszcze przez 1 godz. w tym samym utrwalaczu tzn. w 2,5% aldehydzie glutarowym w 0,1M buforze kakodylanowym pH = 7,4 przez 1 godzinę w 4°C. Po utrwaleniu płukano w tym samym buforze i powtórnie utrwalano w 1% OsO<sub>4</sub> w 0,1M PBS, przez 30 minut. Utrwalone fragmenty tkanek przeprowadzano przez szereg alkoholi o rosnącym stężeniu oraz tlenek propylenu, w celu odwodnienia i zatapiano w Eponie 812. Ultracienkie skrawki cięto przy użyciu noża o ostrzu diamentowym na Ultramikrotomie – Reichert 2 i zbierano na miedziane siatki, a następnie barwiono octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Skrawki analizowano i fotografowano w mikroskopie elektronowym (JEOL 1200EX) przy napięciu przyspieszającym 80kV.

### **9.2. Badania immunocytochemiczne w mikroskopie elektronowym transmisyjnym**

Skrawki tkanki mózgowej do badań ultrastrukturalnych, immunocytochemicznych utrwalano w 0,1% aldehydzie glutarowym i 4% paraformaldehydzie w 0,1M PBS przez 1 godzinę w temperaturze 4°C, a następnie płukano w PBS i ostatecznie utrwalano w 1% OsO<sub>4</sub> przez 30 minut, następnie odwadniano w gradiencie alkoholu etanolowego i zatapiano w Eponie 812. Ultracienkie skrawki poddawano procedurze pozatopieniowej



techniki immunogold. Skrawki umieszczano na niklowej siatce pokrytej błoną formwarową i inkubowano w 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, potem płukano w PBS i blokowano przez 10 minut w 3% BSA w PBS. Następnie inkubowano z monoklonalnym przeciwciałem przeciw mysiemu AIF (E-1) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), rozcieńczonym w PBS (1:20), w temperaturze 4°C przez noc. Po przepłukaniu w PBS inkubowano z skoniugowanym ze złotem przeciwciałem małpim anty-mysim IgG(H+L) (18nm), rozcieńczonym w PBS (1:50) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA USA) przez 1 godzinę, w temperaturze 37°C. Po przepłukaniu w PBS i H<sub>2</sub>O skrawki barwiono octanem uranylu i cytrynianem ołowiu, analizowano i fotografowano w mikroskopie elektronowym JEOL 1200EX przy napięciu przyspieszającym 80kV.

#### **10. Statystyczne opracowanie wyników**

Każde oznaczenie wykonywano w co najmniej trzech powtórzeniach. Za ostateczny wynik przyjmowano wartość średnią  $\pm$  błąd standardowy średniej (SEM) obliczone z indywidualnych pomiarów (średnich z powtórzeń). W celu ustalenia wiarygodności zaistniałych różnic w badaniach porównawczych, wartości z poszczególnych eksperymentów weryfikowano testem-t Studenta lub wieloczynnikową analizą wariancji (ANOVA) z użyciem testu post-hoc Newmana-Keuls. Wyniki uznawano za znamienne statystycznie przy poziomie istotności p poniżej 0,05.

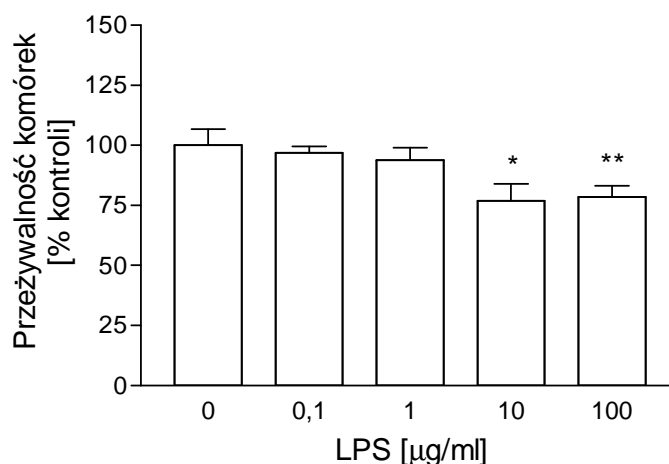
## V. WYNIKI

### 1. Część I – uszkodzenie komórek śródbłonka naczyniowego

Uważa się, że obecny w narządach obwodowych LPS oddziaływać może na mózg dwiema głównymi drogami. Aktywacja komórek układu odpornościowego w narządach obwodowych prowadzi do produkcji cytokin, które mogą modulować procesy zachodzące w mózgu bezpośrednio, poprzez działanie na komórki mózgu, lub pośrednio, poprzez stymulację nerwów obwodowych. LPS ma utrudniony dostęp do komórek parenchymy całego mózgu ze względu na obecność bariery krew-mózg. Badania ostatnich lat sugerują, że wysokie stężenia LPS mogą barierę krew-mózg uszkadzać (Bannerman i Goldblum, 1999), co umożliwia naciek leukocytów i przedostanie się LPS do mózgu. Ponadto LPS może przenikać przez obszary pozbawione bariery krew-mózg.

#### 1.1. Zależna od stężenia LPS przeżywalność komórek śródbłonka naczyniowego w hodowli

Wyniki naszych badań wykazały zwiększoną umieralność komórek śródbłonka naczyń (HUVEC) (Rycina 19), mierzoną za pomocą testu redukcji MTT po 18 godz. inkubacji z LPS. Stężenia 10 i 100  $\mu\text{g/ml}$  LPS powodowały śmierć około 25% komórek.

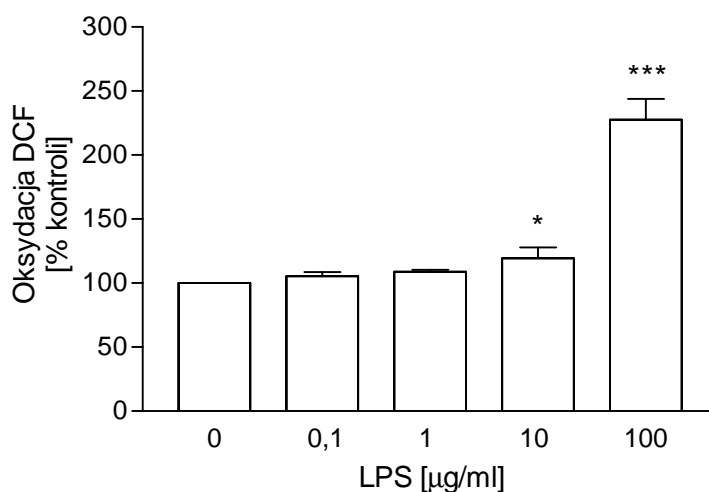


#### **Rycina 19. Zależny od stężenia wpływ LPS na przeżywalność komórek śródbłonka w hodowli (HUVEC)**

Komórki HUVEC inkubowano w obecności LPS (0-100 $\mu\text{g/ml}$ ) przez 18 godz., a następnie badano cytotoksyczny efekt LPS stosując test redukcji MTT. Prezentowane wyniki to średnie  $\pm$  SEM z 3 eksperymentów wykonanych w trzech powtórzeniach. \*,\*\* – statystycznie znamienne różnice w porównaniu do kontroli, odpowiednio\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

## 1.2. Zależny od stężenia wpływ LPS na poziom stresu oksydacyjnego w komórkach śródbłonna naczyniowego

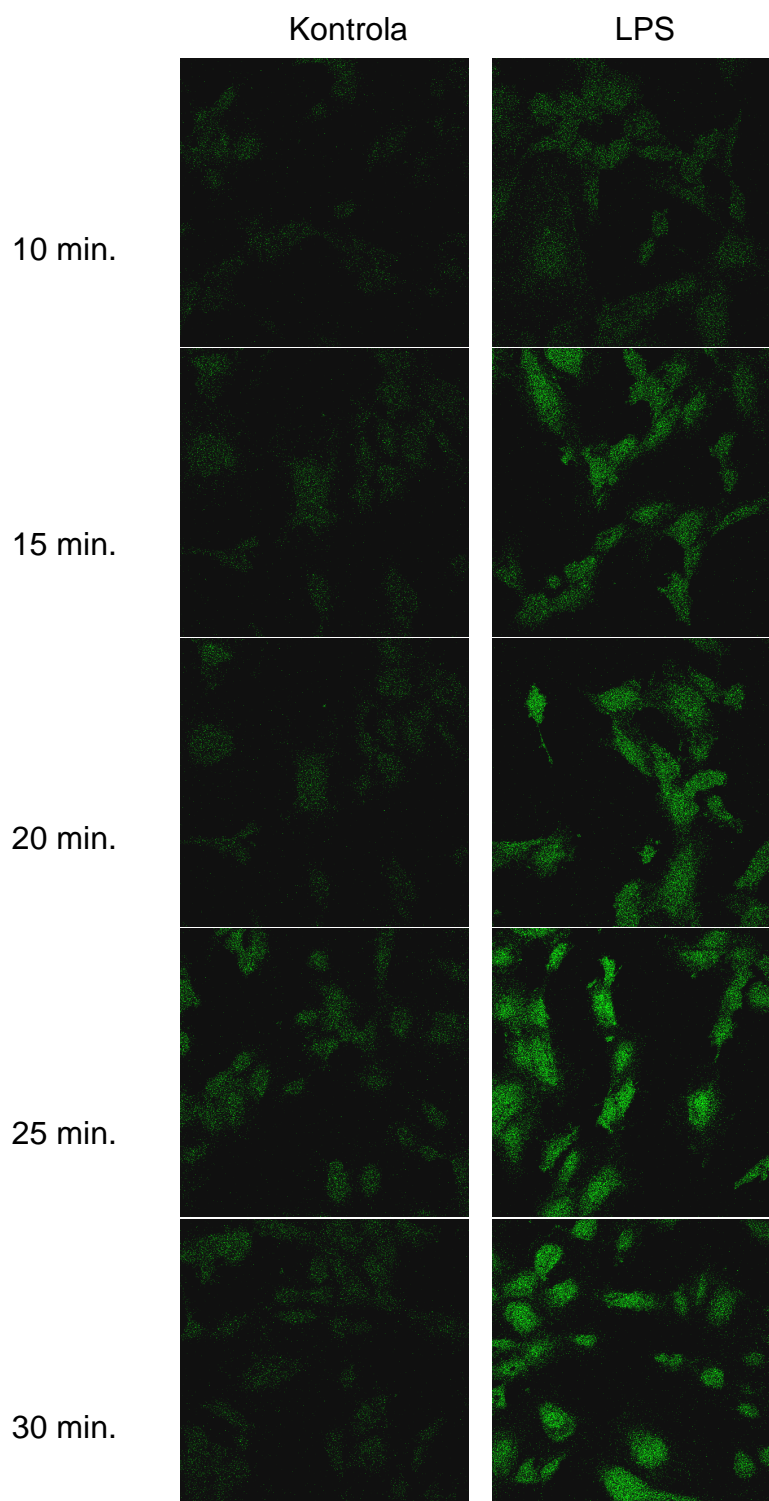
Poziom wolnych rodników oznaczano przy użyciu sondy fluorescencyjnej CM-H<sub>2</sub>DCF-DA w komórkach HUVEC w czasie 1 godz. inkubacji w obecności LPS w stężeniu 0-100 µg/ml, (Rycina 20). LPS 10 µg/ml powodował 20%-owy, statystycznie znamieny wzrost stresu oksydacyjnego, natomiast w stężeniu 100 µg/ml poziom ten wzrastał do 225% kontroli.



### **Rycina 20. Zależny od stężenia LPS wzrost stresu wolnorodnikowego w komórkach HUVEC w hodowli**

Stres wolnorodnikowy w komórkach śródbłonna w hodowli (HUVEC) analizowano przy użyciu sondy fluorescencyjnej CM-H<sub>2</sub>DCF DA (5µM). Komórki inkubowano 15 min w 37°C w obecności sondy, następnie dodawano LPS (0-100µg/ml) i po 60 min inkubacji mierzono fluorescencję DCF (Ex. 488nm, Em. 525nm). Prezentowane dane to średnie ± SEM pochodzące z 3 eksperymentów. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,005$  w porównaniu do kontroli.

Obserwacje te potwierdzono w badaniach z użyciem mikroskopu konfokalnego (Rycina 21). LPS powodował wzrost sygnału fluorescencyjnego w komórkach, w porównaniu do kontroli.

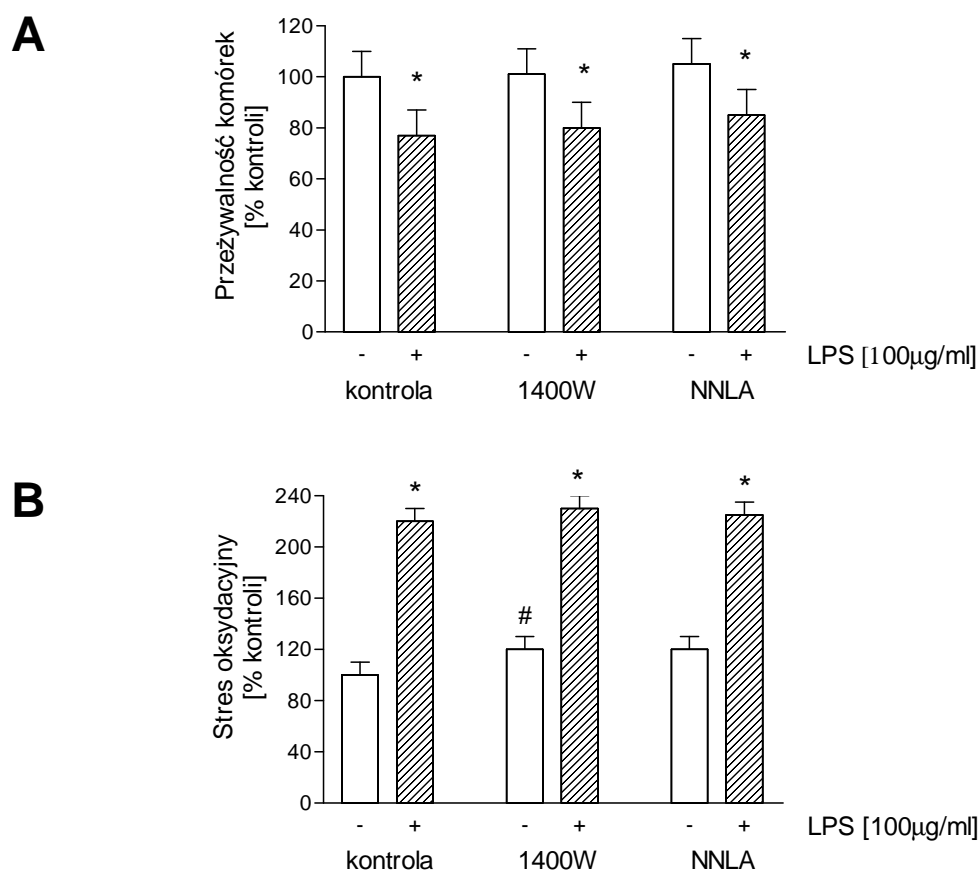


**Rycina 21. Poziom stresu wolnorodnikowego w komórkach HUVEC w zależności od czasu inkubacji z LPS**

Komórki HUVEC preinkubowano w obecności sondy CM-H<sub>2</sub>DCF DA w celu wprowadzenia jej do wnętrza komórek, a następnie dodano LPS (100µg/ml) i obserwowano zmiany fluorescencji sondy w mikroskopie konfokalnym. Wyniki z reprezentatywnego eksperymentu.

### 1.3. Działanie inhibitorów syntaz NO na przeżywalność komórek i stres wolnorodnikowy w komórkach śródbłonna poddanych działaniu LPS

Inhibitory NOS nie miały wpływu na przeżywalność komórek HUVEC w warunkach kontrolnych, ani podczas inkubacji w obecności LPS (Rycina 22). Preinkubacja komórek HUVEC z inhibitorami NOS nie wpływała również na oksydację DCF wywołaną przez LPS. Inhibitor iNOS 1400W powodował niewielki wzrost stresu oksydacyjnego o 20% w porównaniu do kontroli, co wskazuje na ochronne znaczenie NO<sup>•</sup> w komórkach śródbłonna.

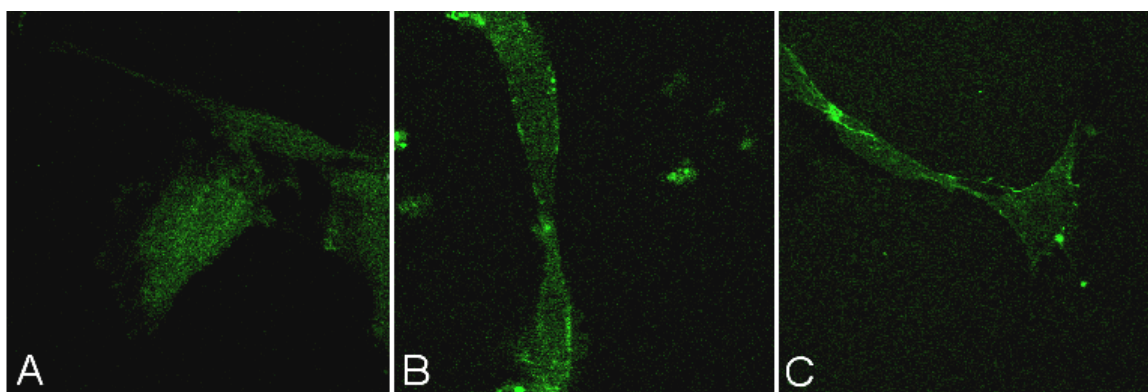


**Rycina 22. Inhibitor iNOS zwiększa stres wolnorodnikowy w komórkach HUVEC, ale pozostaje bez wpływu na zmieniony przez LPS poziom stresu oksydacyjnego i przeżywalność komórek**

Komórki HUVEC preinkubowano w obecności inhibitorów NOS 1400W (10 $\mu$ M) i NNLA (100 $\mu$ M) 2 godz., po czym dodano LPS (0-100 $\mu$ g/ml) i: A- inkubowano przez 18 godz., a następnie badano przeżywalność komórek HUVEC stosując test redukcji MTT; B- inkubowano 60 min w obecności sondy CM-H<sub>2</sub>DCF DA, a następnie mierzono fluorescencję DCF. Prezentowane wyniki to średnie  $\pm$  SEM z 3 eksperymentów wykonanych w trzech powtórzeniach. \*  $p < 0,05$  w porównaniu do grupy bez LPS; #  $p < 0,05$  w porównaniu kontroli bez LPS.

#### 1.4. Wpływ aktywnych granulocytów i rodnika ponadtlenkowego na stres oksydacyjny oznaczany przez pomiar oksydacji białek zewnątrzkomórkowych

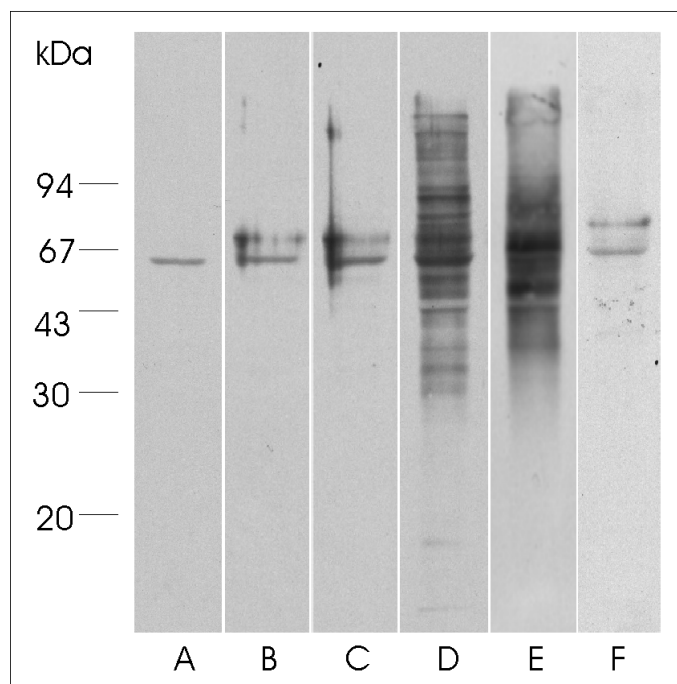
W stanach zapalnych dochodzi do aktywacji komórek układu odpornościowego, które poprzez produkcję wolnych rodników są potencjalnym źródłem uszkodzeń własnych tkanek. Szczególne znaczenie mają interakcje między granulocytami obojętnochłonnymi i komórkami śródbłonna naczyniowego. Badania nad uszkodzeniami komórek śródbłonna w hodowli wywołanymi przez aktywne granulocyty wykazały, że 15-min inkubacja komórek HUVEC w obecności aktywnych granulocytów oraz sondy TyrFluo powodowała wyraźne zwiększenie wiązania sondy do białek zewnątrzkomórkowych, w porównaniu do kontroli. Wskazuje to na uszkodzenia wolnorodnikowe białek zewnątrzkomórkowych (Rycina 23,B). Podobny obraz uzyskano podczas inkubacji HUVEC w obecności HRP i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Rycina 23,C).



#### **Rycina 23. Wpływ aktywnych granulocytów na oksydację białek zewnątrzkomórkowych HUVEC.**

*Komórki śródbłonna naczyniowego w hodowli (HUVEC) inkubowano 15 min w 37 °C w obecności TyrFluo (6 μM) w warunkach kontrolnych i w obecności aktywnych granulocytów obojętnochłonnych. Po odplukaniu niezwiązanej sondy komórki analizowano pod mikroskopem konfokalnym; (A) warunki kontrolne; (B) inkubacja w obecności granulocytów obojętnochłonnych stymulowanych PMA (2 μg/ml); (C) inkubacja w obecności HRP (4 mU/ml) i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 μM). Dane reprezentatywne z przeprowadzonych 4 doświadczeń.*

Oksydację białek zewnątrzkomórkowych HUVEC analizowano również metodą immunochemiczną (SDS-PAGE i Western-bloting) (Rycina 24). W warunkach kontrolnych stwierdzono obecność niewielkiej ilości sondy TyrFluo związanej z białkami, co wskazuje na małą intensywność reakcji wolnorodnikowych w medium inkubacyjnym w warunkach kontrolnych (Rycina 24,B). W obecności niestymulowanych granulocytów obojętnochłonnych nie obserwowano zwiększenia uszkodzeń wolnorodnikowych białek. Istotny wzrost następował po inkubacji w obecności granulocytów aktywowanych PMA (Rycina 24,D). Wzrost oksydacji białek zewnątrzkomórkowych następował też podczas inkubacji HUVEC w obecności 4mU/ml HRP i 10  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Rycina 24,E). Nadtlenek wodoru bez HRP nie powodował wzrostu oksydacji białek zewnątrzkomórkowych (Rycina 24,F).

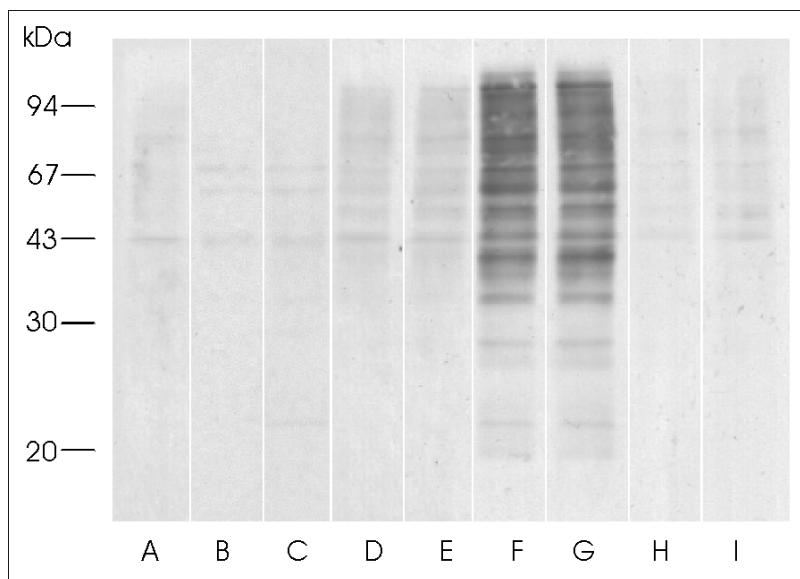


**Rycina 24. Oksydacja białek zewnątrzkomórkowych HUVEC pod wpływem granulocytów obojętnochłonnych i nadtlenu wodoru.**

Komórki śródbłonna naczyniowego w hodowli (HUVEC) inkubowano 15 min w 37 °C w obecności TyrFluo (6  $\mu$ M) w warunkach kontrolnych i po wywołaniu stresu wolnorodnikowego: (A) kontrola bez sondy ; (B) kontrola inkubacyjna; (C) inkubacja w obecności granulocytów obojętnochłonnych nie stymulowanych; (D) inkubacja w obecności granulocytów obojętnochłonnych stymulowanych PMA (2 $\mu$ g/ml); (E) inkubacja w obecności HRP (4 mU/ml) i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 $\mu$ M); (F) inkubacja w obecności H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 $\mu$ M). Po inkubacji obecność TyrFluo w białkach analizowano metodą SDS-PAGE i Western-blotingu. Dane reprezentatywne z przeprowadzonych 3 doświadczeń.

### 1.5. Oksydacja białek wewnątrzkomórkowych HUVEC poddanych działaniu aktywnych granulocytów i $H_2O_2$

Oksydację białek wewnątrzkomórkowych badano przy użyciu acetylowanej formy TyrFluo. AcetylTyrFluo po przeniknięciu do wnętrza komórki jest deacetylowana przez komórkowe esterazy, i w warunkach stresu wolnorodnikowego wyznakowuje uszkodzone białka wewnątrzkomórkowe (Rycina 25).



**Rycina 25. Zmiany oksydacji białek wewnątrzkomórkowych HUVEC poddanych działaniu aktywnych granulocytów obojętnochłonnych, HRP i  $H_2O_2$**

Badanie oksydacji białek wewnątrzkomórkowych przeprowadzono z wykorzystaniem acetylTyrFluo ( $6 \mu M$ ). Po 5 min inkubacji nadmiar sondy odplukano i komórki HUVEC inkubowano dalsze 15 min w  $37^\circ C$ . Oksydację białek analizowano po rozdzielaniu elektroforetycznym metodą western-blotingu. (A) kontrola; (B) inkubacja w obecności granulocytów obojętnochłonnych nie stymulowanych; (C) inkubacja w obecności granulocytów obojętnochłonnych stymulowanych PMA ( $2 \mu g/ml$ ); (D)  $H_2O_2$  ( $10 \mu M$ ); (E) HRP ( $4 mU/ml$ ) i  $H_2O_2$  ( $10 \mu M$ ); (F)  $H_2O_2$  ( $100 \mu M$ ); (G) HRP ( $4 mU/ml$ ) i  $H_2O_2$  ( $100 \mu M$ ); (H)  $H_2O_2$  ( $100 \mu M$ ) i katalazy ( $250 U/ml$ ); (I) HRP ( $4 mU/ml$ ),  $H_2O_2$  ( $100 \mu M$ ) i katalazy ( $250 U/ml$ ). Obraz pochodzi z reprezentatywnego eksperymentu.

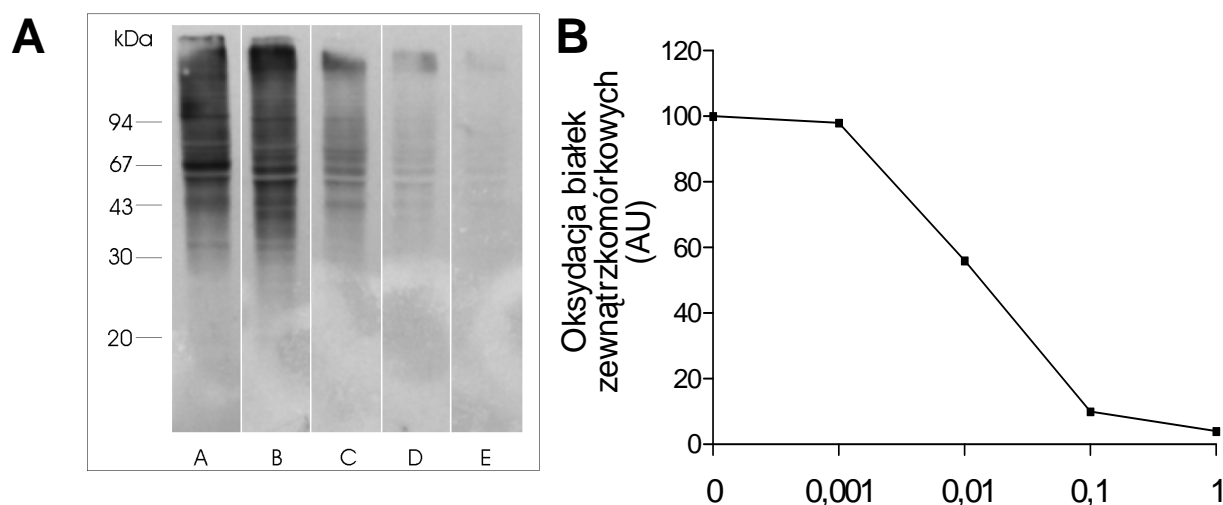
W warunkach kontrolnych, jak również w obecności nieaktywnych granulocytów obojętnochłonnych, obserwowano bardzo niski poziom oksydacji białek (Rycina 25 A, B). Aktywowane granulocyty, które powodowały zwiększenie uszkodzeń wolnorodnikowych w białkach zewnątrzkomórkowych po 15 min inkubacji, nie wpływały na białka wewnątrzkomórkowe (Rycina 25 B, C). Niewielki wzrost oksydacji pojawił się, gdy komórki HUVEC inkubowano w obecności  $4 mU$  HRP /  $10 \mu M$   $H_2O_2$  (Rycina 25, E),



jednak wynikał on z obecności  $H_2O_2$ , (Rycina 25,D). Znaczny wzrost oksydacji białek wewnątrzkomórkowych obserwowano, gdy komórki HUVEC inkubowano w obecności  $100 \mu M H_2O_2$  (Rycina 25,F). Inkubacja z  $4 mU HRP / 100 \mu M H_2O_2$  powodowała oksydację o tej samej intensywności (Rycina 25,G). Dodanie katalazy ( $250 U/ml$ ) całkowicie zapobiegało oksydacji białek wewnątrzkomórkowych (Rycina 25,HI). Oksydacja białek wewnątrzkomórkowych przez  $H_2O_2$  nie ulegała zmianie w obecności inhibitora NOS, estru metylowego  $N^G$ -nitro-L-argininy (L-NAME), ani antyoksydanta Troloxu.

### 1.6. Badanie roli tlenu azotu w procesie oksydacji białek zewnątrzkomórkowych przy użyciu donora DEANO

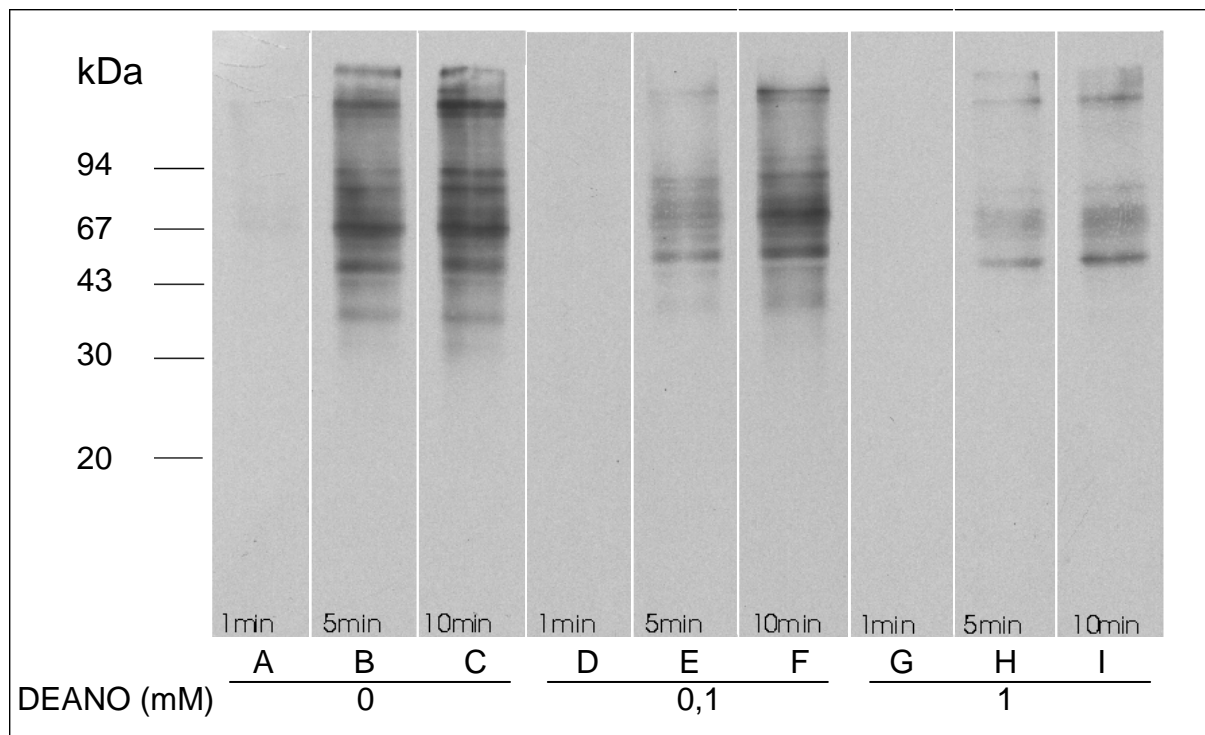
W badaniach użyto DEANO, jako donora tlenu azotu, w celu zbadania roli NO w oksydacji białek zewnątrzkomórkowych HUVEC wywołanej przez aktywne granulocyty. DEANO w stężeniu  $100 \mu M - 1 mM$  prawie całkowicie hamowało oksydację białek, Rycina 26. DEANO nie zmieniało oksydacji białek zewnątrzkomórkowych komórek śródbłonna hodowanych pod nieobecność aktywnych granulocytów.



#### **Rycina 26. Wpływ DEANO na oksydację białek zewnątrzkomórkowych indukowaną w komórkach śródbłonna przez aktywne granulocyty obojętne**

Komórki HUVEC inkubowano 15 min w obecności aktywowanych granulocytów obojętne, TyrFluo ( $6 \mu M$ ) i DEANO ( $0-1 mM$ ). Po zakończonej inkubacji obecność TyrFluo w białkach analizowano metodą immunochemiczną (SDS-PAGE i Western-blotting). (A) Reprezentatywne dane; (B) Densytometryczna analiza obrazu A.

Oksydacja białek zewnątrzkomórkowych, mierzona poziomem powstającej dityrozyny, wzrastała w czasie inkubacji z HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Rycina 27,A-C). DEANO (1 mM) hamowało tworzenie dityrozyny w każdym analizowanym punkcie czasowym (Rycina 27, G-I). Działanie DEANO w istotny sposób zależy od jego stężenia (Rycina 27, D-F).

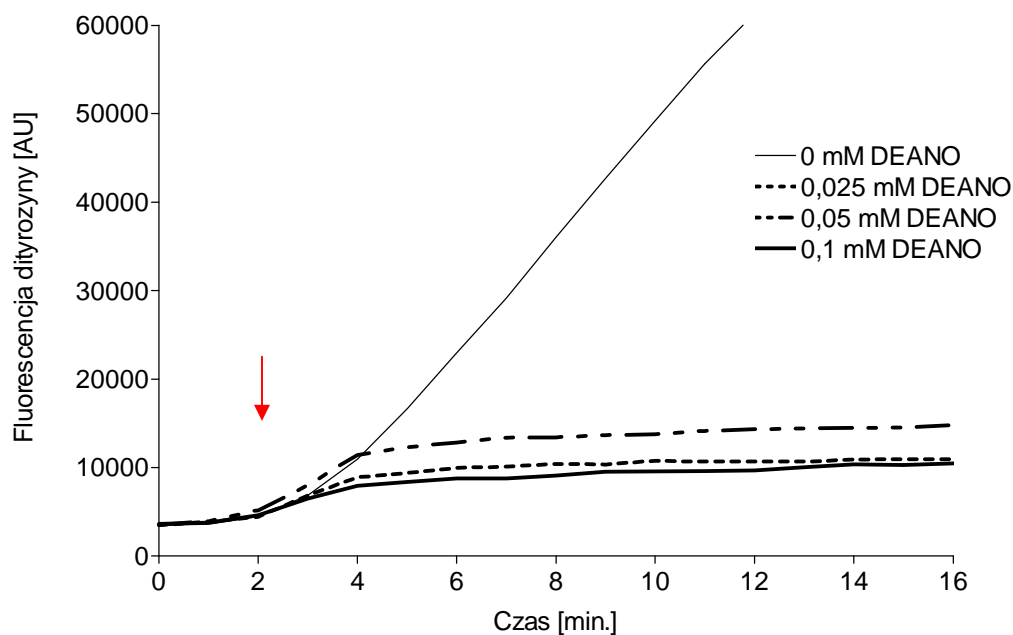


**Rycina 27. Zależny od czasu i stężenia wpływ DEANO na oksydację białek zewnątrzkomórkowych HUVEC wywołaną przez HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Komórki śródbłonna inkubowano 1, 5 i 10 min w obecności nieacetylowanej sondy TyrFluo (6 μM). Stres oksydacyjny indukowano przez dodanie HRP (4mU/ml) i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 μM), DEANO użyto w stężeniach 0 - 1 mM. (A-C) Poziom oksydacji białek zewnątrzkomórkowych po 1, 5 i 10 min inkubacji w obecności HRP i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (D-F) Wpływ DEANO (0,1mM) podczas 1, 5 i 10-min inkubacji w obecności HRP i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (G-I) Wpływ DEANO (1 mM) podczas 1, 5 i 10-min inkubacji w obecności HRP i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Prezentowany obraz z reprezentatywnego doświadczenia.

**1.7. Ocena działania donora NO, DEANO, na proces oksydacji L-tyrozyny pod wpływem aktywnych granulocytów oraz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w obecności HRP**

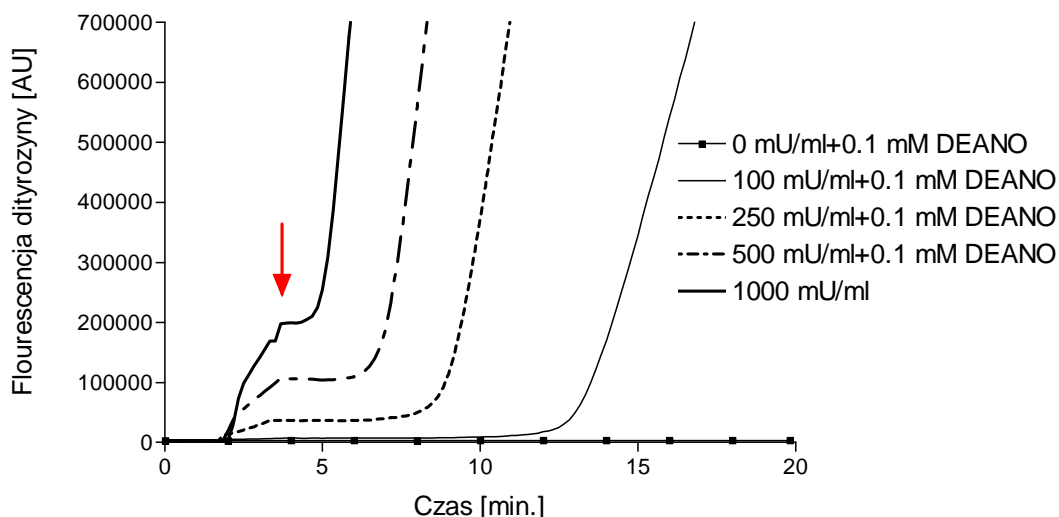
Aktywne granulocyty obojętnochłonne indukują oksydację L-tyrozyny prowadząc do powstawania dityrozyny. Powstawanie tego produktu monitorowane było dzięki jego właściwościom fluorescencyjnym (Rycina 28). Po 2 minutach fazy lag następował szybki wzrost stężenia dityrozyny. W badanym czasie inkubacji (15 min) DEANO we wszystkich użytych stężeniach (0,025-0,1 mM) hamowało powstawanie dityrozyny.



**Rycina 28. Zależny od stężenia wpływ DEANO na oksydację L-tyrozyny przez aktywne granulocyty**

L-tyrozyna (0,5 mM) była inkubowana w buforze Hanks'a w 37°C z delikatnym mieszaniem. Stres oksydacyjny był indukowany przez dodanie granulocytów obojętnochłonnych ( $3,3 \times 10^5$  komórek/ml) aktywowanych PMA (2 µg/ml). DEANO (moment dodania wskazano strzałką) było użyte w stężeniach 0-0,1 mM. Podczas inkubacji stężenie dityrozyny monitorowano przez pomiar fluorymetryczny (pobudzenie: 325 nm, emisja: 405 nm). Dane z reprezentatywnego doświadczenia.

Inkubacja L-tyrozyny w obecności HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prowadziła do powstawania dityrozyny (Rycina 29). DEANO w stężeniu 0,1 mM hamował wzrost stężenia dityrozyny, jednak efekt zależny był od aktywności HRP. Wraz ze wzrostem aktywności HRP czas zahamowania oksydacji L-tyrozyny ulegał skróceniu, z czego wynika, że antyoksydacyjny efekt donora NO zależy nie tylko od jego stężenia, ale również od nasilenia stresu oksydacyjnego.



**Rycina 29. Zależny od nasilenia stresu oksydacyjnego wpływ DEANO na oksydację L-tyrozyny**

L-tyrozyna (0,5 mM) była inkubowana w buforze Hanks'a w 37°C z delikatnym mieszanym. Stres oksydacyjny był indukowany przez dodanie HRP (0-1000mU/ml) i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,5mM). DEANO (moment dodania wskazano strzałką) było użyte w stężeniach 0,1 mM. Podczas inkubacji stężenie dityrozyny monitorowano przez pomiar fluorymetryczny (pobudzenie: 325 nm, emisja: 405 nm). Prezentowane dane pochodzą z reprezentatywnego eksperymentu.

### 1.8. Podsumowanie wyników badań na komórkach śródbłonna HUVEC

W badaniach nad procesami wolnorodnikowymi zachodzącymi w komórkach śródbłonna naczyniowego HUVEC zaobserwowano wzrost stresu oksydacyjnego pod wpływem bezpośredniego lub pośredniego działania LPS. Zwiększona produkcja wolnych rodników wywołana bezpośrednim działaniem LPS na HUVEC powodowała śmierć części komórek. Jak wykazały badania z użyciem inhibitorów NOS, w procesach tych enzym ten nie uczestniczył, nie wykazywał ani pro- ani antyoksydacyjnego działania. W warunkach hodowli komórek stwierdzono niewielką aktywność iNOS o działaniu antyoksydacyjnym. Badania interakcji granulocytów i komórek HUVEC wykazały, że w warunkach aktywacji układu odpornościowego dochodzi do wolnorodnikowych uszkodzeń białek zewnątrzkomórkowych. Donor tlenu azotu DEANO zapobiegał tym uszkodzeniom wykazując właściwości antyoksydacyjne.

Wyniki prezentowane w niniejszej pracy wykazują, że LPS w wysokich stężeniach oddziaływać może bezpośrednio lub pośrednio na śródbłonek naczyniowy, powodując

uszkodzenia wolnorodnikowe i śmierć części komórek. Skutkiem może być uszkodzenie i dysfunkcja bariery krew-mózg, inicjacja reakcji zapalnej w mózgu.

## **2. Część II – uszkodzenie tkanki nerwowej**

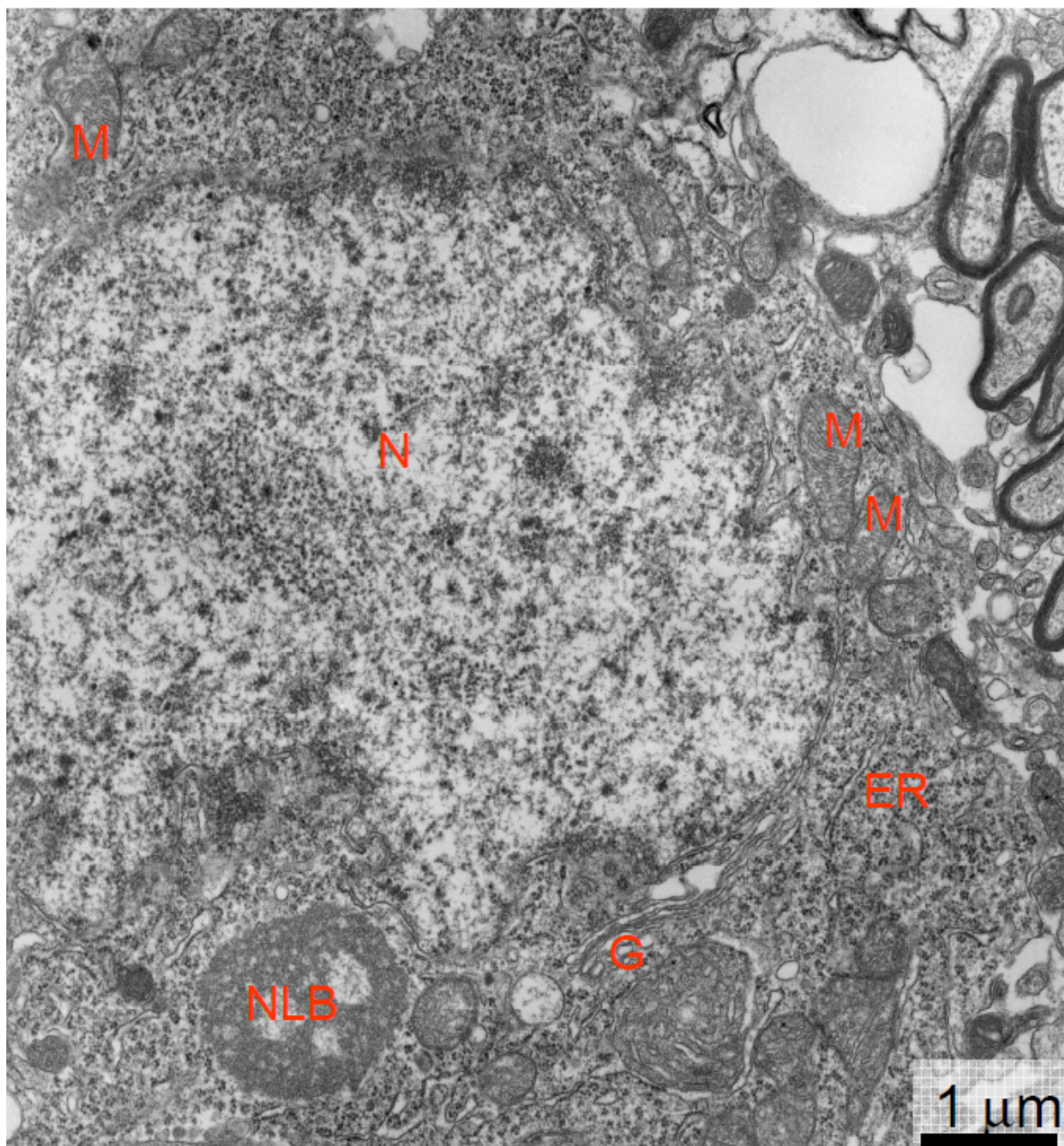
### **2.1. Obserwacje behawioralne myszy po podaniu LPS**

Do badań *in vivo* wybrano dawkę LPS 1 mg/kg m.c. Jak ustalono we wstępnych badaniach, nie jest to dawka letalna, ale wywołuje objawy stresu wolnorodnikowego w mózgu. Podanie myszom LPS w dawce 1mg/kg m.c. powodowało rozwój objawów ogólnoustrojowego stanu zapalnego, z którym wiązały się apatia, hipokineza i brak łaknienia (tzw. „sickness behaviour”). Objawy te ustępowały w ciągu kilkunastu godzin od iniekcji LPS.

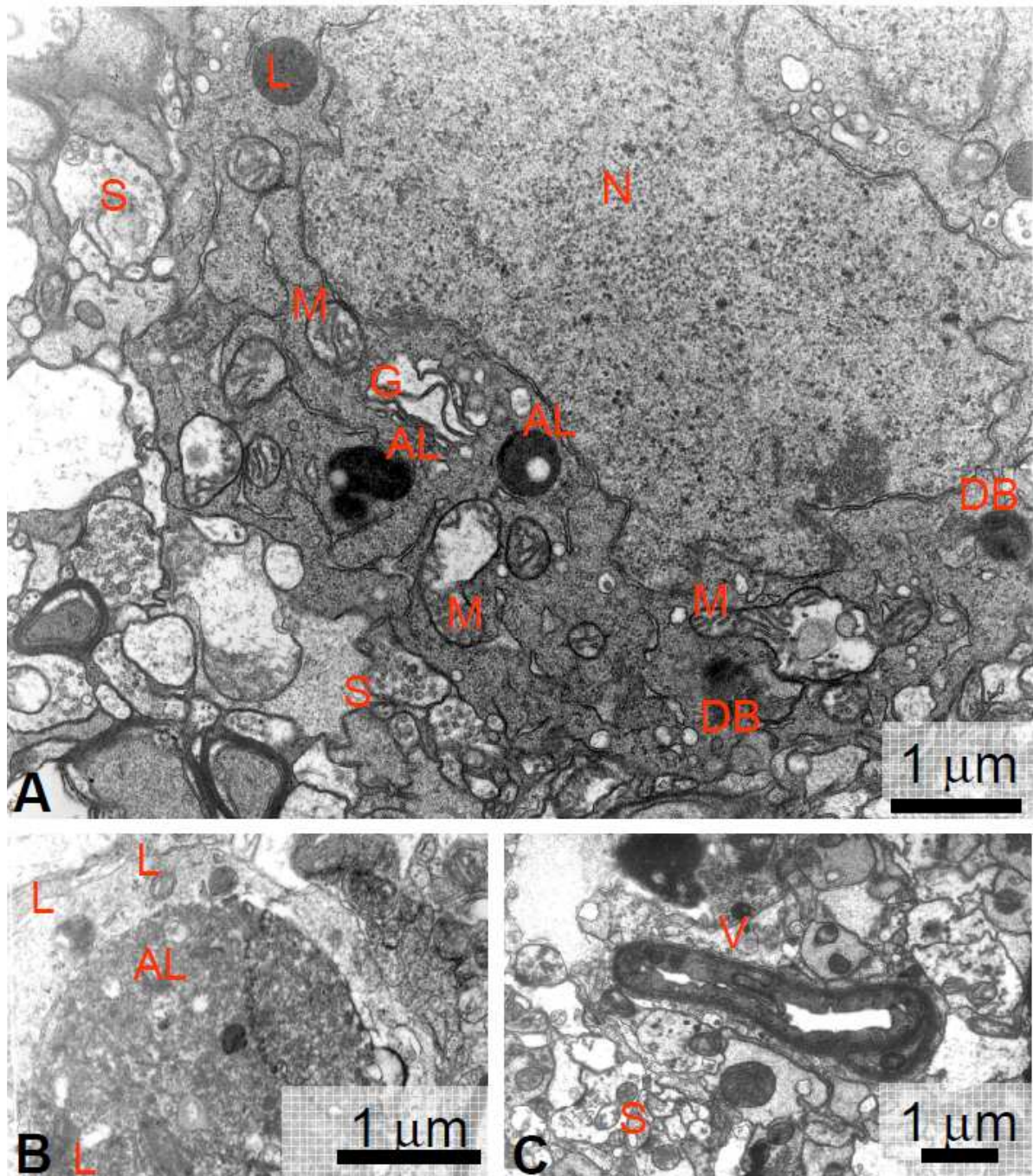
### **2.2. Zmiany mikroskopowo-elektronowe morfologiczne istoty czarnej po podaniu LPS**

Zmiany morfologiczne wywołane podaniem LPS analizowano za pomocą mikroskopu elektronowego w obszarze istoty czarnej 48 godz. po podaniu LPS. W warunkach kontrolnych (iniekcja soli fizjologicznej) neurony zachowywały prawidłową ultrastrukturę (Rycina 30). Neurony charakteryzowały się obecnością licznych, ultrastrukturalnie niezmiennych mitochondriów, dobrze rozbudowanym aparatem Golgiego umiejscowionym w obszarze okołojądrowym, oraz obfitą siateczką śródplazmatyczną szorstką. Duże, okrągłe jądra komórkowe o niezmiennym ultrastrukturze wykazywały równomiernie rozmieszczoną chromatynę i obecność jąderek. W cytoplazmie obserwowano obfitą ilość rybosomów i polirybosomów oraz ciała jąderkopodobne. Pozostałe elementy komórkowe takie jak komórki glejowe, synapsy, zmielinizowane i niezmielinizowane włókna nerwowe oraz naczynia krwionośne posiadały również prawidłową budowę ultrastrukturalną.

Dootrzewnowe podanie LPS wywoływało patologiczne zmiany naczyń włosowatych mózgu. Obserwowano trzy typy zmian w ultrastrukturze: 1) zagęszczenie i ściemnienie cytoplazmy komórek śródbłonna naczyniowego (Rycina 31, C); 2) obrzmienie komórek śródbłonna naczyniowego prowadzące do całkowitego zamknięcia światła włosniczki. W obu przypadkach brak było zmian w błonie podstawnej.



**Rycina 30. Ultrastrukturalnie niezmienna komórka nerwowa istoty czarnej**  
Prawidłowa struktura mitochondriów (M), aparatu Golgiego (G), siateczki śródplazmatycznej (ER) i jądra (N) o równomiernie rozmieszczonej chromatynie. W cytoplazmie obfita ilość rybosomów i polirybosomów oraz ciało jąderkopodobne (NLB).



**Rycina 31. Zmiany ultrastrukturalne w istocie czarnej mózgu 48 godz. po podaniu LPS**

A) Cytoplazma neuronu uległa obkurczeniu, jest zagęszczona, ciemna. Jądro (N) posiada głębokie wgłobienia. Brak jest polirybosomów. Wyraźne jest obrzmienie mitochondriów (M) i aparatu Golgiego (G). W cytoplazmie są obecne autofagolizosomy (AL), lizosomy (L) i ciała gęste (DB). Widoczne jest obrzmienie synaps w neuropilu (S).

B) Przekrój poprzeczny dendrytu o cechach degeneracji – widoczna olbrzymia wakuola autofagowa.

C) Zaciśnięte na skutek obrzmienia neuropilu naczynie włosowate (V) o zmniejszonym świetle, komórki śródbłonna o zagęszczonej cytoplazmie i gładkiej powierzchni luminalnej. Widoczny brak zmian w błonie podstawnej.

3) Niektóre naczynia włosowate charakteryzowały się proliferacją błony podstawnej przy braku wyżej opisanych zmian w komórkach śródbłonka. Liczne naczynia włosowate miały znacznie zmniejszone światło wskutek obrzmienia neuropilu.

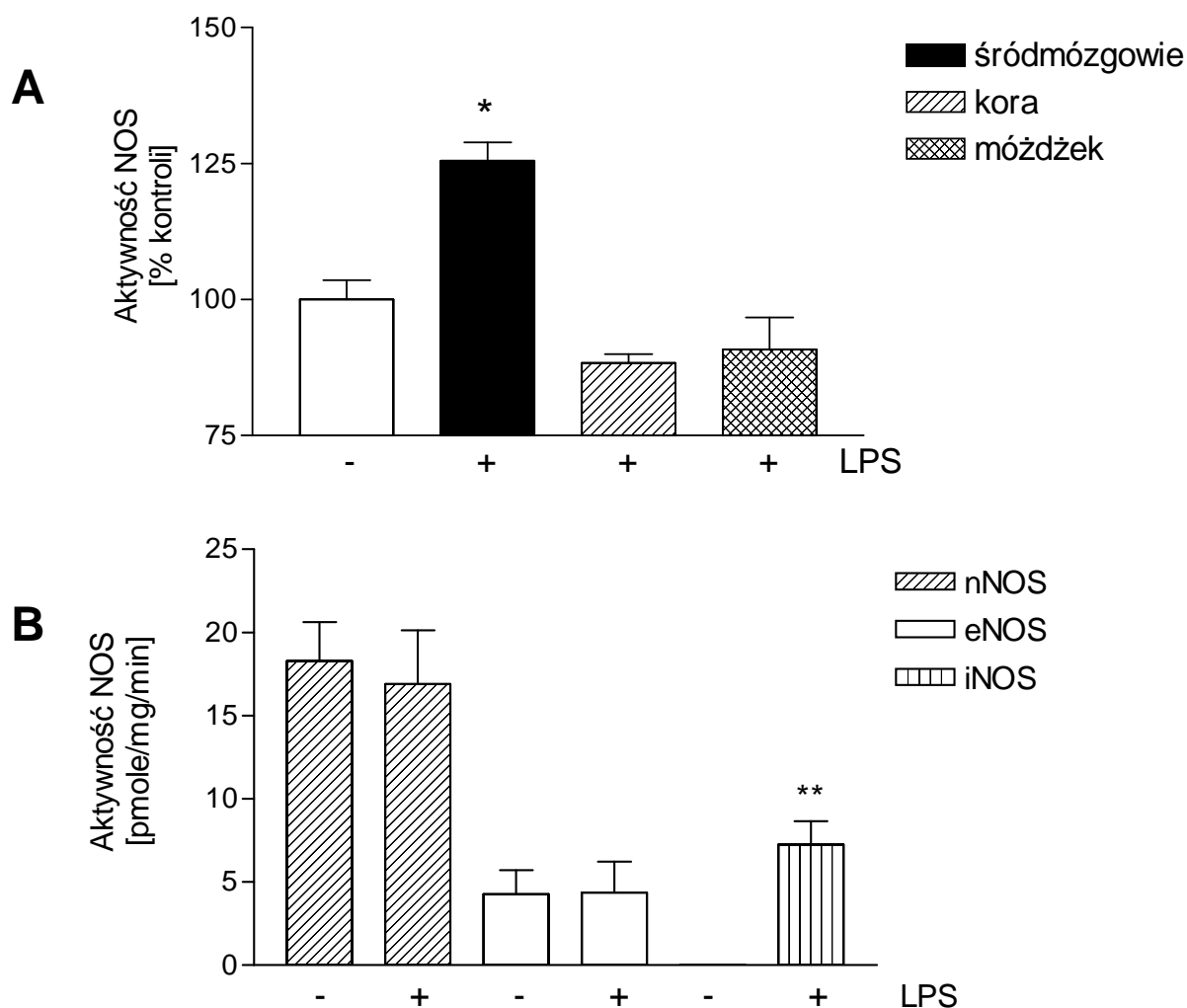
LPS wywoływał również ultrastrukturalne zmiany w morfologii wielu neuronów istoty czarnej (Rycina 31, A). Cytoplazma uległa obkurczeniu, była zagęszczona, ciemna, zaobserwowano także znaczny ubytek polirybosomów. Obrzmienie licznych mitochondriów i niektórych cystern aparatu Golgiego było wyraźnie zaznaczone. W cytoplazmie stwierdzono także obecność autofagolizosomów, lizosomów i ciałek gęstych. Widoczne było obrzmienie licznych synaps w neuropilu. Zaobserwowano także zmiany degeneracyjne w niektórych dendrytach neuronów istoty czarnej polegające na obecności licznych lizosomów, autofagolizosomów, elektronowo-pustych wakuoli i olbrzymich wakuoli autofagowych (Rycina 31, B). Te zmiany sugerują, że LPS uruchomił w niektórych neuronach istoty czarnej mechanizmy odpowiedzialne za proces autofagii.

Oprócz wyżej opisanych zmian obserwowano również neurony, w których budowa ultrastrukturalna jądra i cytoplazmy wykazywała cechy morfologiczne wskazujące również na apoptozę. Wiele neuronów o ciemnej i obkurczonej cytoplazmie, z dobrze zachowanymi organellami, posiadało typowe pyknotyczne jądra o charakterystycznie, marginalnie zagęszczonej chromatynie. W tej grupie doświadczalnej obserwowano także dość licznie występujące komórki mikrogleju. Zwracało uwagę także obrzmienie niektórych struktur neuropilu np. synaps oraz wypustek astrocytarnych.

### **2.3. Wpływ LPS na aktywność NOS w mózgu**

Niedawno odkryto, że w warunkach systemowego stanu zapalnego dochodzi do zaburzeń układu glutaminianergicznego w mózgu. Zmiany te mogą potencjalnie prowadzić do aktywacji konstytutywnych izoform NOS w mózgu i do uszkodzeń ekscytotoksycznych. W prowadzonych badaniach zaobserwowano znamienny wzrost całkowitej aktywności NOS w śródmózgowiu myszy 6 godz. po wstrzyknięciu LPS (Rycina 32). Taką samą zmianę aktywności NOS obserwowano w istocie czarnej. Aktywność NOS w korze mózgu i mózdzku nie ulegała istotnym zmianom w tym czasie. Ponadto nie obserwowano zmian aktywności NOS w wymienionych strukturach mózgu po 3, 12 i 48 godz. (dane nie prezentowane). Badania przeprowadzone z użyciem specyficznych inhibitorów dla różnych izoform NOS wykazały, że za obserwowany wzrost aktywności NOS w śródmózgowiu odpowiedzialna jest izoforma indukowana.





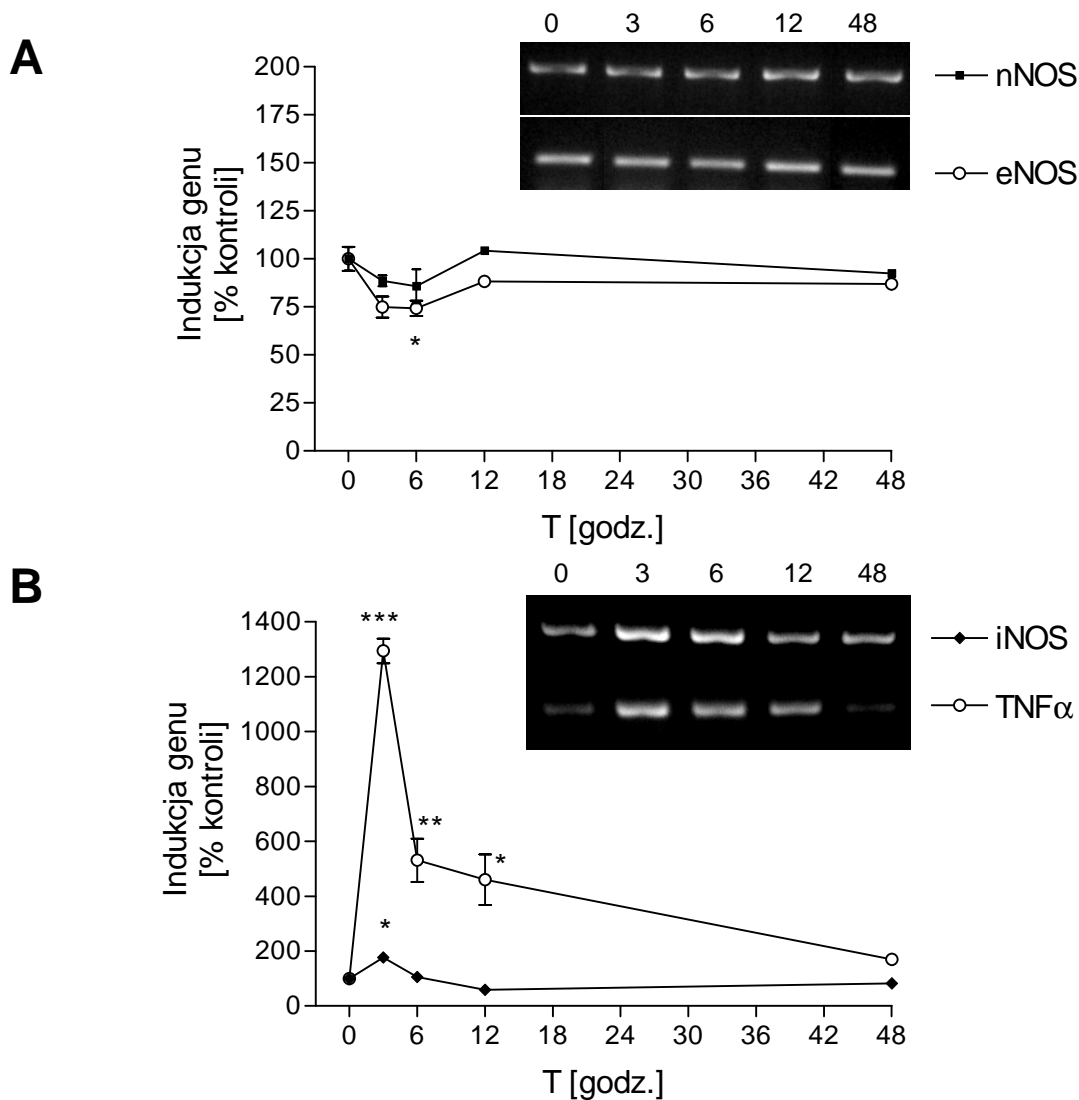
### Rycina 32. Wzrost aktywności syntazy tlenku azotu po podaniu LPS

LPS (1mg/kg) podawano myszom, i po 6 godz. izolowano badane części mózgu, a następnie oznaczano aktywność NOS. A) Wzrost aktywności całkowitej NOS w śródmózgowiu/międzymózgowiu; B) Aktywność poszczególnych izoform NOS w śródmózgowiu po podaniu LPS. Prezentowane dane to średnie+SEM pochodzące z 3 zwierząt. \* – statystycznie znamiennej różnica w porównaniu do kontroli,  $p < 0,05$ . \*\* – statystycznie znamiennej różnica w porównaniu do kontroli,  $p < 0,01$ .

### 2.4. Wpływ LPS na ekspresję genów dla poszczególnych izoform NOS i TNF $\alpha$

Dootrzewnowe wstrzyknięcie LPS indukowało ekspresję związanych ze stanem zapalnym genów w mózgu, co stwierdzono za pomocą metody RT-PCR. Po 3 godzinach od iniekcji endotoksyny pojawiał się w mózgu statystycznie istotny wzrost ilości mRNA genu kodującego iNOS, po czym następował stopniowy spadek. Zmianom o podobnej kinetyce podlegała ekspresja genu dla TNF $\alpha$ . Transkrypcja genu dla nNOS była wyraźna i ulegała

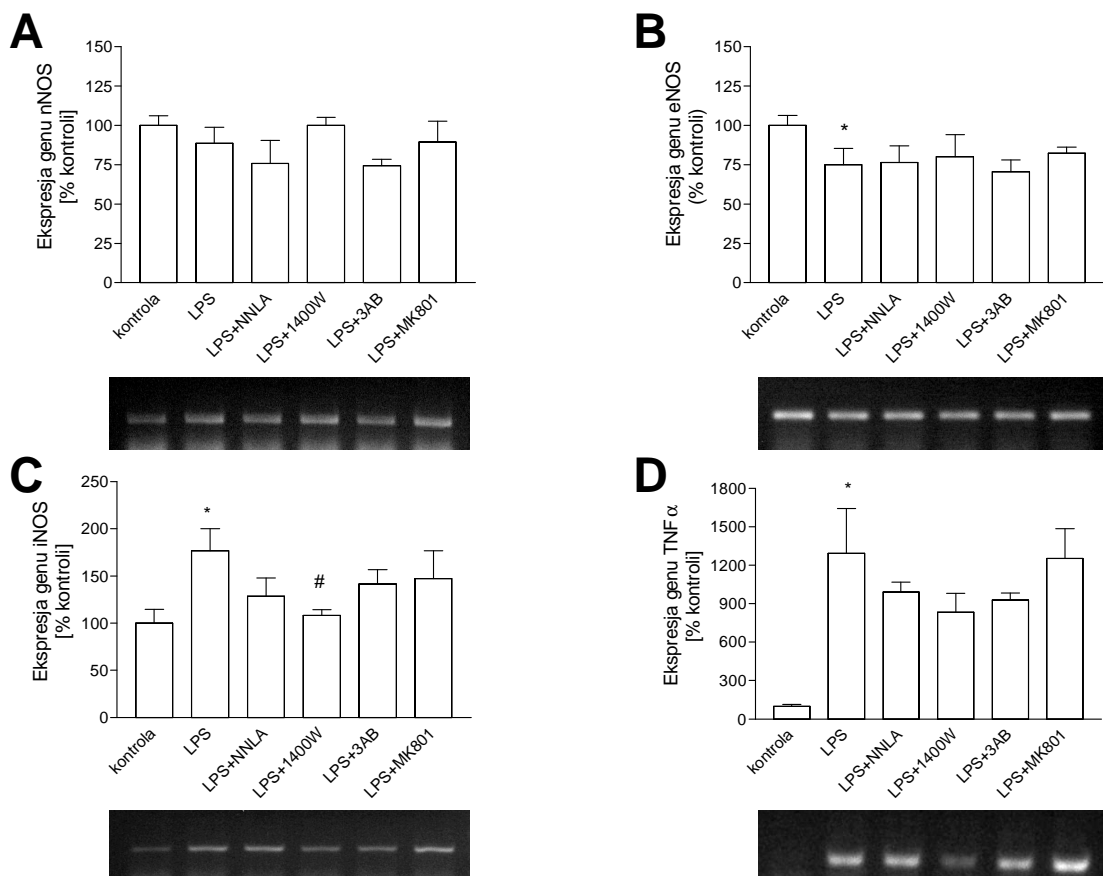
przejściowemu, nieznacznemu obniżeniu, jednak bez istotności statystycznej. Ekspresja eNOS zmniejszała się o około 25% 6 godz. po podaniu LPS, po czym wracała do poziomu kontrolnego (Rycina 33).



**Rycina 33. Zmiany ekspresji genów dla izoform NOS i TNFα w śródmózgowiu/międzymózgowiu pod wpływem LPS**

LPS podawano myszom w dawce 1mg/kg m.c. i.p. i po 3, 6, 12 i 48 godzinach izolowano śródmózgowie/międzymózgowie, z którego następnie izolowano RNA. RNA analizowano metodą RT-PCR, produkt reakcji rozdzielano na żelu agarozowym, analizowano densytometrycznie i normalizowano wg β-aktyny. A) Ekspresja genów dla konstytutywnych izoform NOS po podaniu LPS. B) Ekspresja genów kodujących iNOS i TNFα po podaniu LPS. Prezentowane dane to średnie ± SEM pochodzące z 3 eksperymentów. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$  w porównaniu do kontroli.

Stosowane inhibitory (NNLA, 1400W, 3-AB, MK-801) nie miały wpływu na ekspresję badanych genów 3 godz. po podaniu LPS. Indukowana przez LPS ekspresja genów kodujących iNOS i TNF $\alpha$  wykazywała tendencje do obniżania się pod wpływem NNLA, 1400W i 3-AB jednak statystyczną znamienność uzyskał jedynie efekt 1400W na ekspresję genu dla iNOS 3 godz. po podaniu LPS. MK-801 nie wykazywał istotnego wpływu na ekspresję badanych genów (Rycina 34). W warunkach kontrolnych użyte inhibitory nie wpływały na transkrypcję.

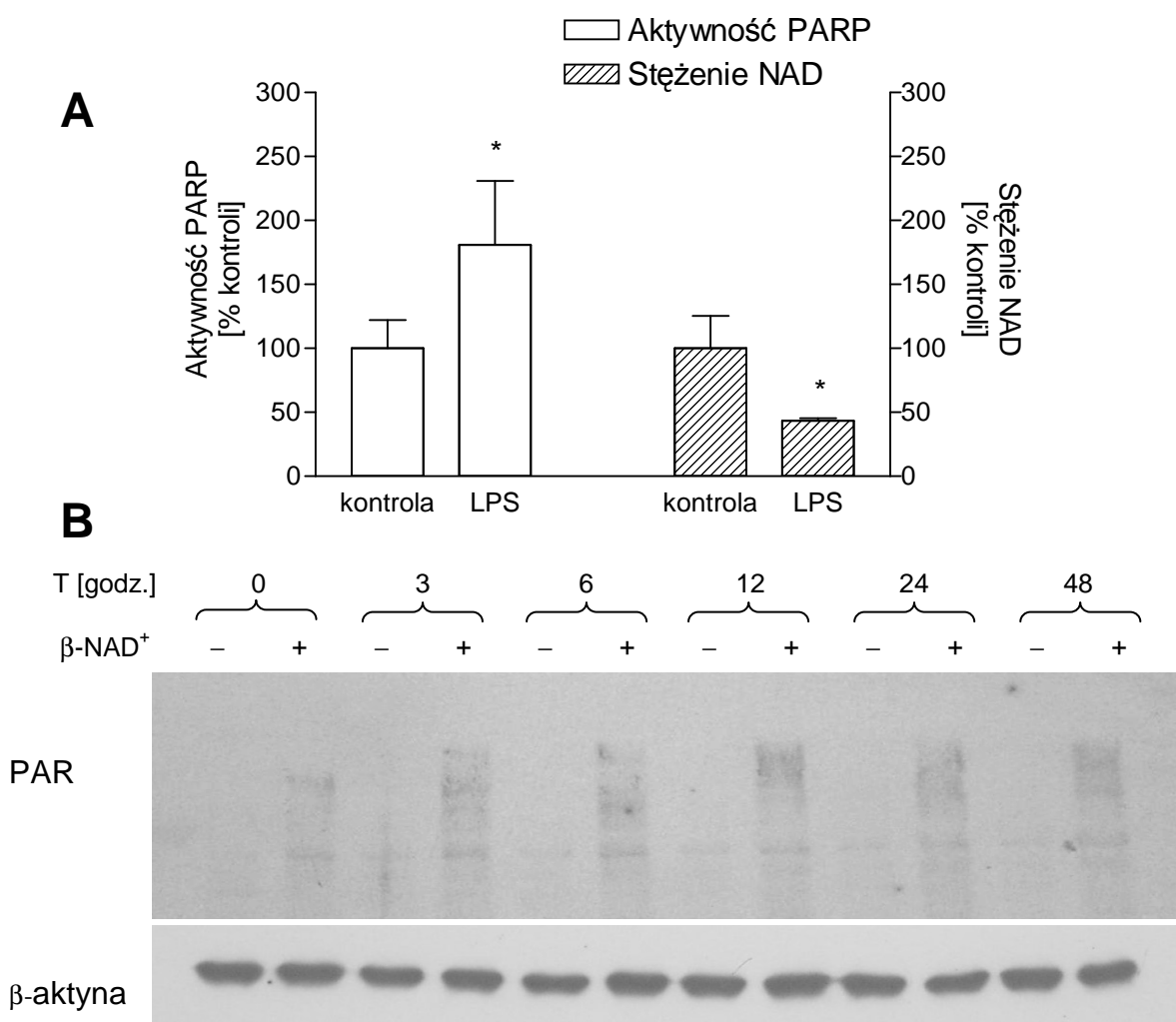


**Rycina 34. Zmiany ekspresji wybranych genów w śródmózgowiu/międzymózgowiu pod wpływem LPS**

LPS podawano myszom w dawce 1mg/kg m.c. i.p. i po 3 godzinach izolowano śródmózgowie/międzymózgowie, z którego następnie izolowano RNA. RNA analizowano metodą RT-PCR, produkt reakcji rozdzielano na żelu agarozowym i analizowano densytometrycznie.) Wpływ inhibitorów NOS i PARP na ekspresję genu w 3 godz. po podaniu LPS a) nNOS; B) eNOS; C) iNOS; D) TNF $\alpha$ . Prezentowane dane to średnie  $\pm$  SEM pochodzące z 3 eksperymentów. \*  $p < 0,05$  w porównaniu do kontroli; #  $p < 0,05$  w porównaniu do grupy traktowanej LPS. Prezentowane zdjęcia pochodzą z typowych eksperymentów.

### 2.5. Aktywacja PARP-1 w stresie wolnorodnikowym

LPS (1mg/kg) powodował wzrost aktywności PARP-1 w mózgu. 12 godz. po dootrzewnowej iniekcji, co świadczy o uszkodzeniach wolnorodnikowych DNA (Rycina 35). Aktywacja PARP powoduje wzrost zużycia  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>, który jest substratem i źródłem ADP-rybozy w procesie poli(ADP-rybozylacji) białek. Zaobserwowany spadek stężenia  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>, obserwowany w mózgu 12 godz. po podaniu LPS, jest dodatkowym potwierdzeniem wzrostu aktywności PARP-1.

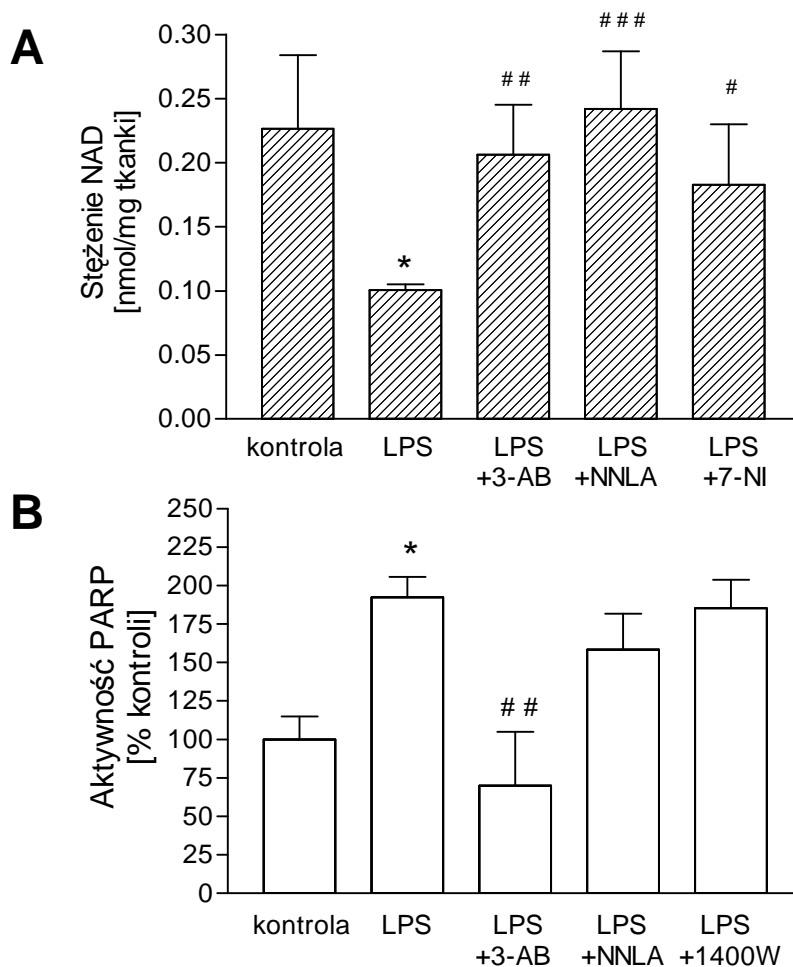


#### Rycina 35. Aktywacja PARP-1 i spadek stężenia $\beta$ -NAD<sup>+</sup> w mózgu w stresie wolnorodnikowym wywołanym LPS

Myszom podawano dootrzewnowo LPS (1mg/kg m.c.) lub PBS i po 12 godz. oznaczano aktywność PARP i stężenie  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>. A) Przedstawione dane są wartościami z trzech niezależnych eksperymentów (średnia  $\pm$  SEM). \*  $p < 0,05$  względem kontroli. B) Obraz z reprezentatywnego doświadczenia pomiaru zmian aktywności PARP w czasie, wraz z analizą ekspresji  $\beta$ -aktyny.

## 2.6. Wpływ inhibitorów PARP i NOS na obniżone przez LPS stężenie $\beta$ -NAD<sup>+</sup>

Inhibitor PARP, 3-aminobenzamid, zapobiegał obniżeniu stężenia  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> po iniekcji LPS, co sugeruje udział PARP-1 w tym procesie. W celu zbadania roli NO w uszkodzeniach wolnorodnikowych prowadzących do obniżenia stężenia  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> w mózgu zastosowano inhibitory konstytutywnych izoform NOS. Obydwa związki, NNLA i 7-NI zapobiegały spadkowi stężenia  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> (Rycina 36,A). W warunkach kontrolnych użyte inhibitory nie wpływały na stężenie  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>.



**Rycina 36. Wpływ inhibitorów PARP-1 i NOS na wywołany przez LPS spadek stężenia  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> i aktywność PARP-1 w mózgu**

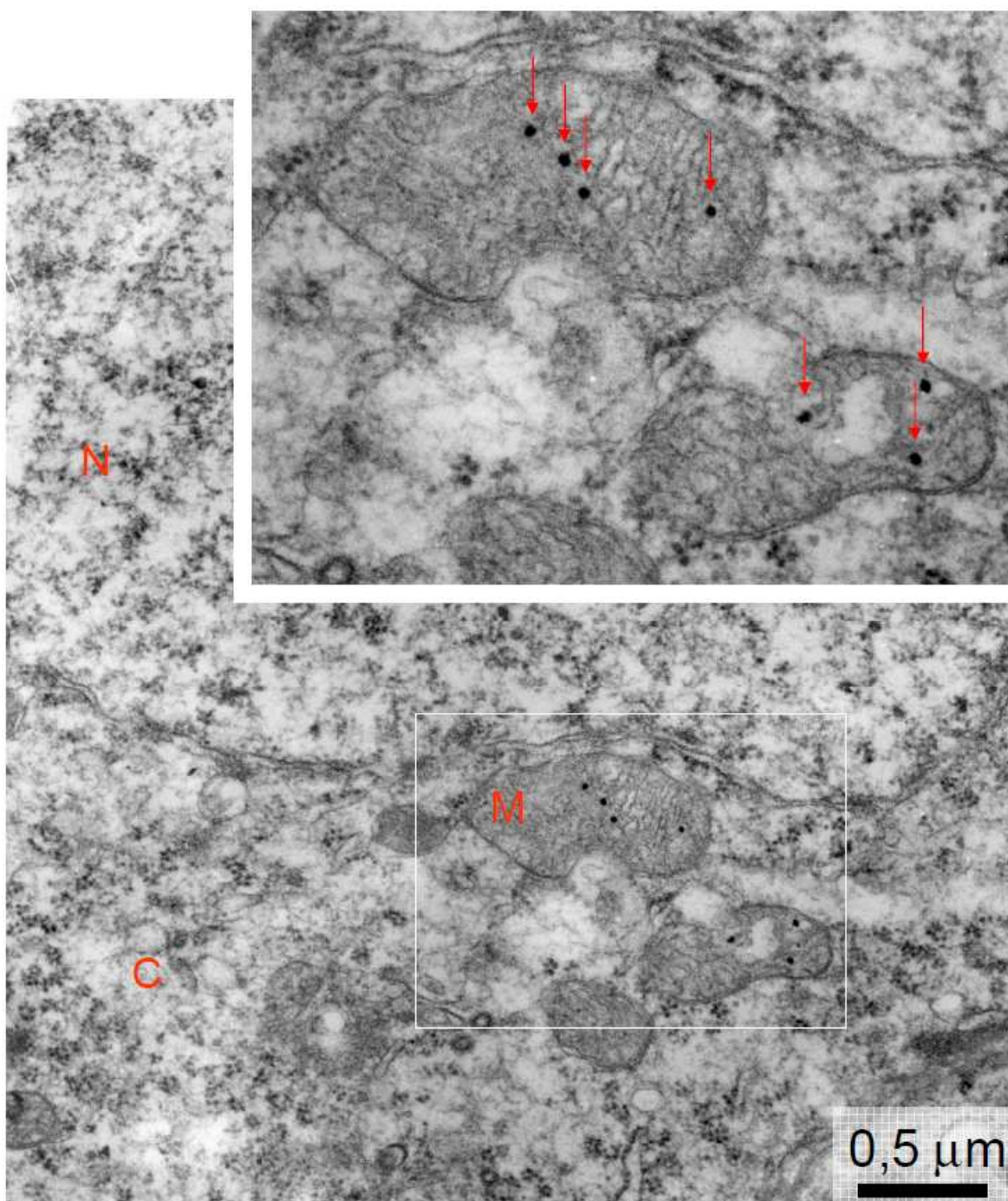
Myszom podawano dootrzewnowo LPS (1mg/kg m.c.) lub PBS oraz inhibitory (3-AB; 30mg/kg, NNLA; 30 mg/kg, 7-NI; 25 mg/kg, 1400W; 5 mg/kg) i po 12 godz. oznaczano stężenie  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> i aktywność PARP. Przedstawione dane są wartościami z trzech niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w trzech powtórzeniach (średnia  $\pm$  SEM). \*  $p < 0,05$  różnica względem kontroli; #  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$  - różnica względem grupy traktowanej LPS.

### **2.7. Wpływ inhibitorów PARP i NOS na zwiększoną aktywność PARP**

Inhibitor PARP, 3-aminobenzamid, obniżał do poziomu kontroli aktywność PARP we frakcji P1, jednak inhibitory NOS, NNLA i 1400W nie miały istotnego wpływu (Rycina 36,B), co sugeruje, że do aktywacji PARP dochodzi wskutek procesów niezwiązanych z aktywnością NOS.

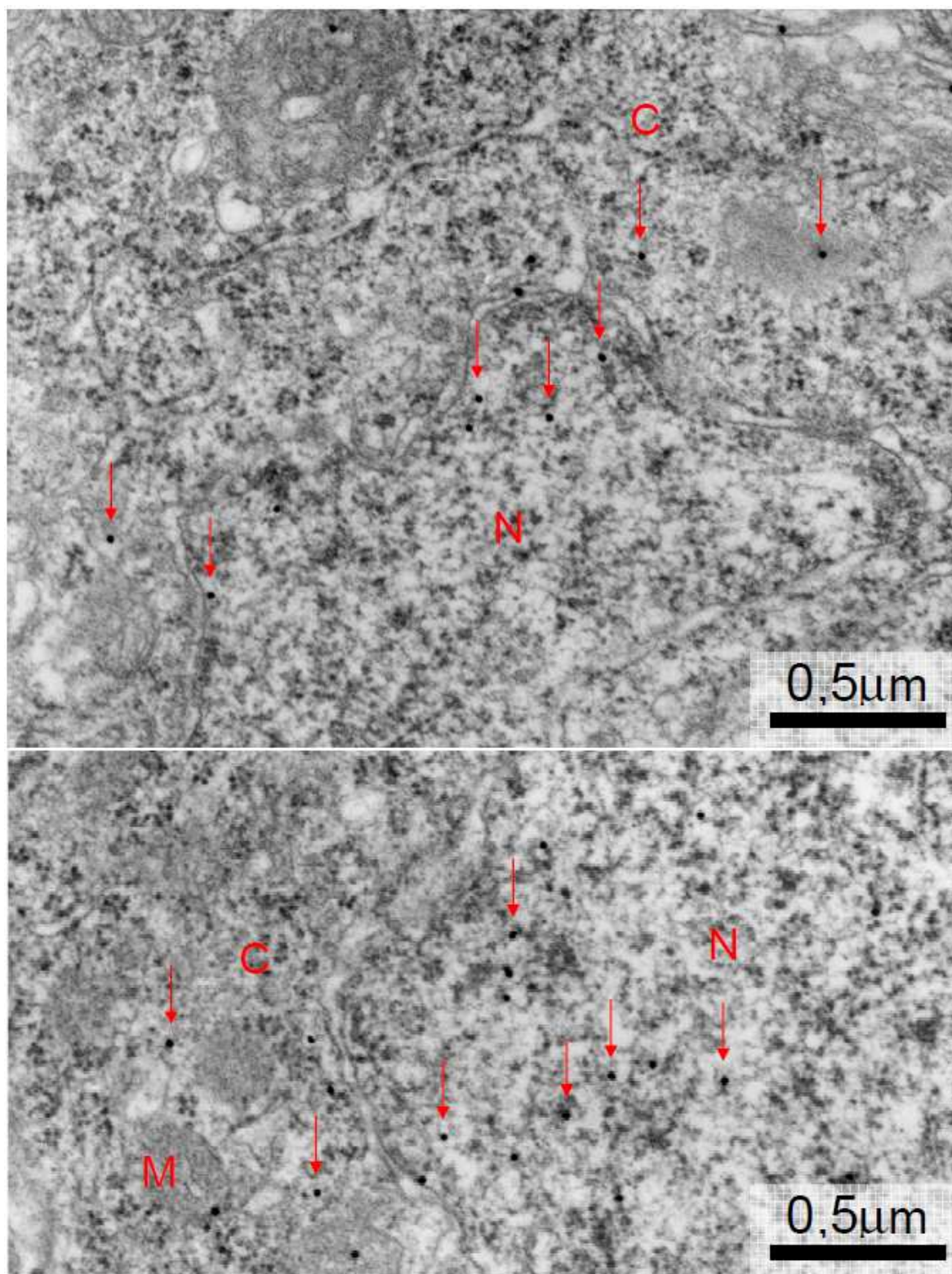
### **2.8. Uwalnianie i translokacja czynnika indukującego apoptozę (AIF) z mitochondriów w wyniku działania LPS**

Stwierdzono, że LPS powoduje uwalnianie i translokację czynnika indukującego apoptozę (AIF) z mitochondriów do jądra komórkowego. Zjawisko to obserwowano za pomocą technik immunocytochemicznych metodą post-embedding immunogold, wykorzystujących mikroskopię elektronową. W warunkach kontrolnych obecność AIF stwierdzono jedynie w obrębie mitochondriów, nie obserwowano natomiast AIF w cytoplazmie ani w jądrze komórkowym (Rycina 37). Podanie LPS powodowało masywną translokację AIF z mitochondriów już 3 godz. po podaniu LPS. Obecność AIF stwierdzono także w cytoplazmie i w jądrach neuronów. Zaobserwowano również obecność AIF w niektórych mitochondriach, co wskazuje, że wypływ AIF nie dotyczy wszystkich mitochondriów, lub wszystkich cząsteczek tego białka (Rycina 38). Badania prowadzone metodą immunochemiczną potwierdziły wzrost stężenia AIF we frakcji jądrowej po dootrzewnowym podaniu LPS (Rycina 39). W celu analizy roli NOS i PARP-1 w indukcji translokacji AIF do jądra zbadano wpływ specyficznych inhibitorów enzymów na ten proces. Stwierdzono, że zarówno inhibitory NOS (NNLA; 30 mg/kg m.c. i 1400W; 5 mg/kg m.c.) jak również inhibitor PARP (3-AB; 30 mg/kg m.c.) zapobiegały translokacji AIF.



**Rycina 37. Mitochondrialna lokalizacja czynnika indukującego apoptozę (AIF) w warunkach kontrolnych**

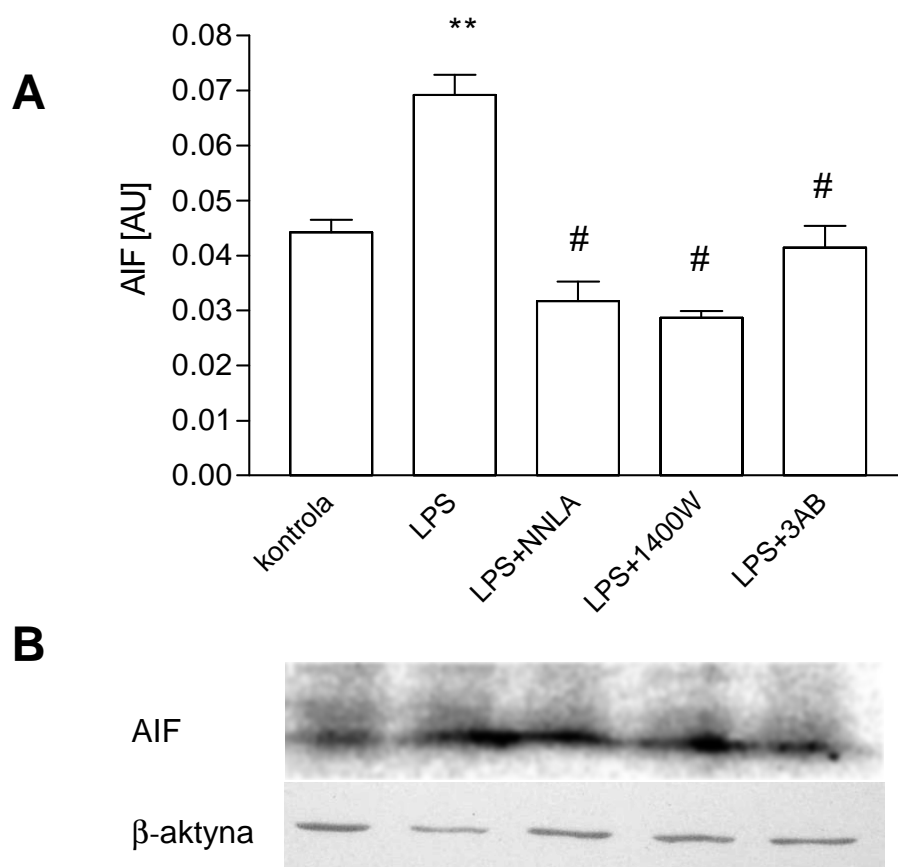
Reakcję immunocytochemiczną wykonano z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko AIF. Wyraźną obecność AIF stwierdzono jedynie w mitochondriach (M). Nie znaleziono AIF w cytoplazmie (C) ani w jądrze (N). Prezentowany obraz pochodzi z typowego eksperymentu.



**Rycina 38. Translokacja czynnika indukującego apoptozę (AIF) w neuronach istoty czarnej po podaniu LPS**

Reakcję immunocytochemiczną wykonano z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko AIF. Stwierdzono obecność AIF w jądrze (N), ale również w cytoplazmie (C) i mitochondriach (M) Czerwone strzałki wskazują AIF.

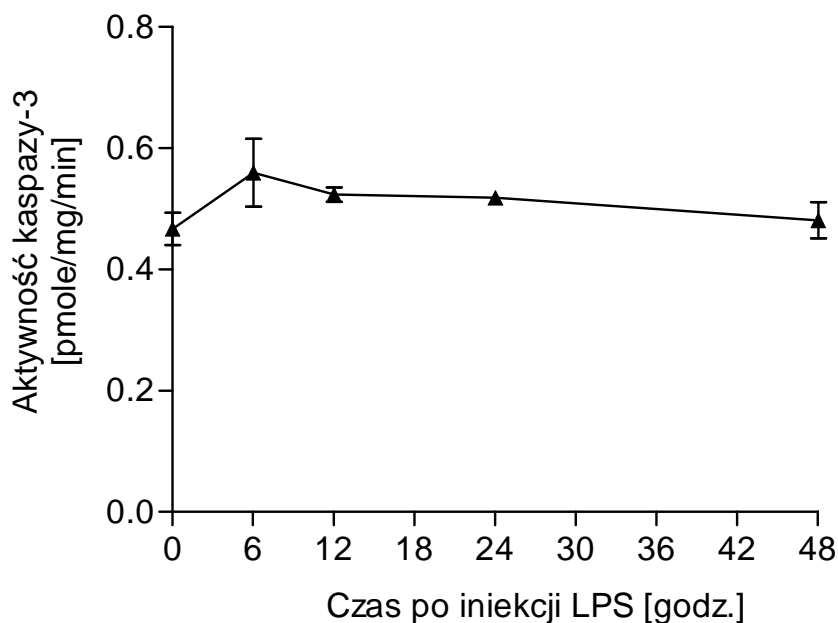




**Rycina 39. Translokacja AIF z mitochondriów do jąder w istocie czarnej myszy po podaniu LPS**

LPS (1mg/kg m.c.) oraz inhibitory (NNLA;30 mg/kg, 1400W;5 mg/kg, 3-AB; 30mg/kg) podawano myszom dootrzewnowo i po 24 godz. izolowano frakcje komórkowe z istoty czarnej, a następnie analizowano obecność AIF. A) Analiza densytometryczna obecności AIF we frakcji jądrowej. B) Przykładowe zdjęcia Western blotów z wybranych doświadczeń. Prezentowane dane to średnie  $\pm$  SEM pochodzące z 3 oznaczeń. \*\*  $p < 0,01$  różnica względem kontroli; #  $p < 0,05$  różnica względem grupy traktowanej LPS.

Analizowano także aktywność kaspazy 3 w śródmózgowiu po dootrzewnowym podaniu LPS (Rycina 40). Aktywność kaspazy 3 wynosiła w warunkach kontrolnych w śródmózgowiu/ międzymózgowiu  $0,47 \pm 0,03$  pmole/mg białka/min, i nie zmieniała się po podaniu LPS.



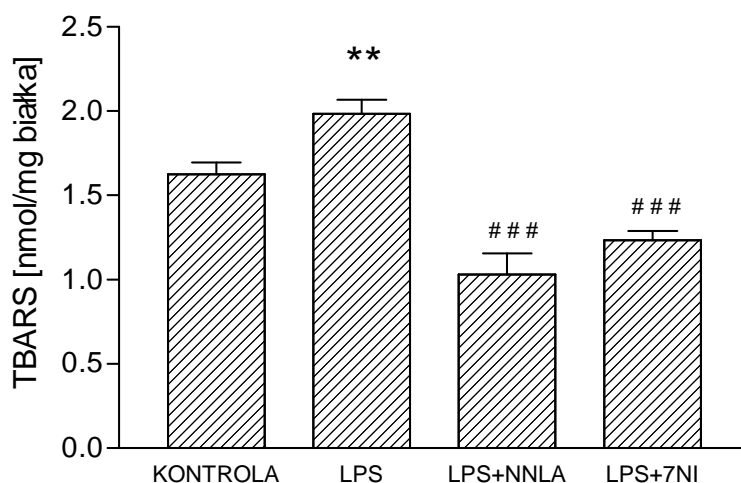
**Rycina 40. Aktywność kaspazy-3 w śródmózgowiu/międzymózgowiu myszy po podaniu LPS**

LPS podawano myszom w dawce 1mg/kg m.c., po 6, 12, 24 i 48 godz. izolowano śródmózgowie/międzymózgowie, a następnie oznaczano aktywność kaspazy 3. Prezentowane dane to średnie  $\pm$  SEM pochodzące z 3 oznaczeń wykonanych w trzech powtórzeniach.

## 2.9. Aktywacja peroksydacji lipidów przez zależny od LPS stres wolnorodnikowy.

### Rola NO

Uszkodzenia wolnorodnikowe błon oznaczano przez pomiar stężenia końcowych produktów procesu peroksydacji lipidów, za pomocą reakcji z kwasem tiobarbiturowym. Stwierdzono wzrost uszkodzeń wolnorodnikowych lipidów w 48 godz. po iniekcji LPS. Podanie zwierzętom inhibitorów syntazy NO hamowało wzrost stężenia TBARS wywołany przez LPS, wskazując na udział konstytutywnych izoform w kaskadzie prowadzącej do powstania stresu oksydacyjnego (Rycina 41). W warunkach kontrolnych użyte inhibitory nie wpływały na stężenie TBARS. Nie stwierdzono zmian stężenia grup karbonylowych po podaniu LPS (dane nie pokazane).

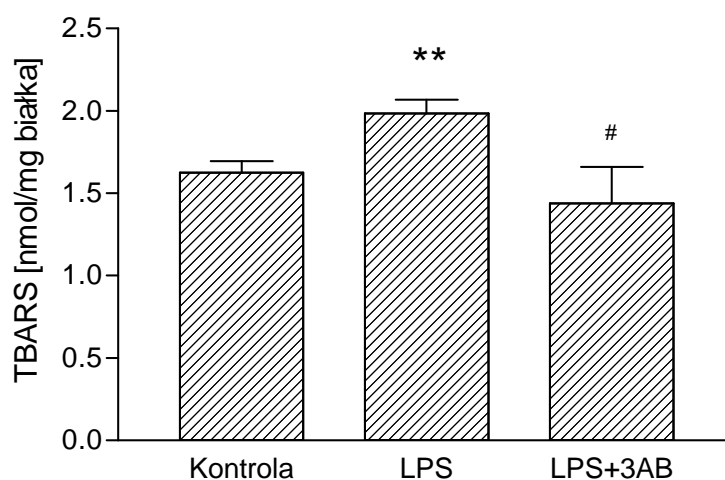


### Rycina 41. Wpływ inhibitorów NOS na wywołany przez LPS wzrost stężenia TBARS w mózgu

Myszom podawano dootrzewnowo LPS (1mg/kg m.c.) lub PBS oraz inhibitory (NNLA; 30 mg/kg, 7-NI; 25 mg/kg) i po 48 godz. oznaczano stężenie TBARS. Przedstawione dane są wartościami z trzech niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w trzech powtórzeniach (średnia  $\pm$  SEM). Statystycznie znamienne różnice względem kontroli, \*\*  $p < 0,01$ ; statystycznie znamienne różnice względem grupy traktowanej LPS, ###  $p < 0,005$ .

### 2.10. Wpływ inhibitorów PARP-1 na aktywowaną przez LPS peroksydację lipidów w mózgu

Zbadano również efekt inhibitora PARP na peroksydację lipidów. Wzrost stężenia TBARS po iniekcji LPS był hamowany przez inhibitor PARP, 3-AB. Wynik ten sugeruje, że PARP-1 jest nie tylko odbiorcą sygnału o uszkodzeniach wolnorodnikowych, ale może też sam się do takich uszkodzeń przyczyniać (Rycina 42). W warunkach kontrolnych 3-AB nie wpływał na stężenie TBARS.

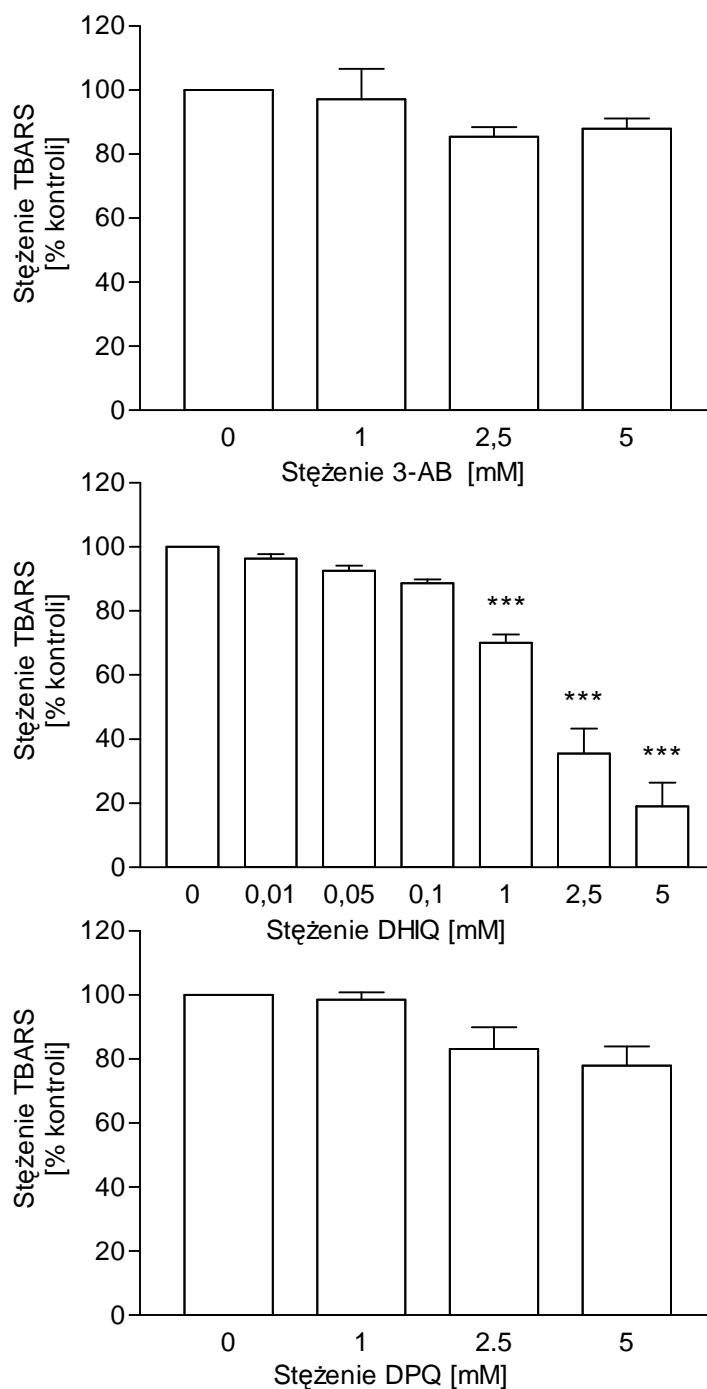


**Rycina 42. Wpływ inhibitora PARP na wywołany przez LPS wzrost stężenia TBARS w mózgu**

Myszom podawano dootrzewnowo LPS (1mg/kg m.c.) lub PBS oraz 3-AB (30mg/kg) i po 48h oznaczano stężenie TBARS w półkulach mózgu. Przedstawione dane są wartościami z trzech niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w trzech powtórzeniach (średnia  $\pm$  SEM). \*\*  $p < 0,01$  statystycznie znamiennej różnica względem kontroli, #  $p < 0,05$  różnica względem grupy traktowanej LPS.

### 2.11. Ocena działania inhibitorów PARP i NOS na peroksydację lipidów błon mózgu

W celu oceny antyoksydacyjnych właściwości stosowanych inhibitorów, zbadano ich wpływ na generowaną *in vitro* peroksydację lipidów błon. Spośród przebadanych inhibitorów PARP, DHIQ w zależny od stężenia sposób hamował peroksydację lipidów, natomiast 3-AB i DPO nie miały istotnego wpływu (Rycina 43). Żaden z używanych inhibitorów NOS nie posiadał właściwości antyoksydacyjnych (dane nie pokazane).



**Rycina 43. Wpływ inhibitorów PARP na peroksydację lipidów *in vitro***

Antyoksydacyjne właściwości inhibitorów PARP badano przez pomiar stężenia końcowych produktów peroksydacji lipidów w homogenacie z całego mózgu. Homogenat inkubowano w obecności inhibitora (0-5mM), 25  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_2$  i 10  $\mu\text{M}$  kwasu askorbinowego w temperaturze 37°C przez 15 min, następnie mierzono stężenie TBARS. \*\*\*  $p < 0,001$  – statystycznie znamiennej różnicy w porównaniu do kontroli, którą w tym doświadczeniu stanowiła próba inkubowana w obecności 25  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_2$  i 10  $\mu\text{M}$  kwasu askorbinowego, ale bez inhibitorów.

## 2.12. Porównanie antyoksydacyjnych właściwości inhibitorów PARP do antyoksydantów

Porównano antyoksydacyjne właściwości inhibitorów PARP z działaniem kilku wybranych, powszechnie stosowanych antyoksydantów. W badaniach uwzględniono flawonoid resveratrol, Trolox- rozpuszczalny w wodzie analog witaminy E i Tempol- małocząsteczkowy związek o aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (ang. SOD mimetic). Wartości  $IC_{50}$  przedstawione w Tabeli 2 wskazują, że 3-AB, DHIQ, DPQ cechują się niskim potencjałem antyoksydacyjnym w porównaniu do badanych antyutleniaczy.

**Tabela 2. Wpływ inhibitorów PARP i antyoksydantów na peroksydację lipidów**

Badany związek	$IC_{50}$ (mM)
3-AB	> 5,00
DHIQ	1,75
DPQ	> 5,00
Resveratrol	0,02
Trolox	0,07
Tempol	0,08

*Homogenat inkubowano w obecności  $FeCl_2$  ( $25 \mu M$ ) i kwasu askorbinowego ( $10 \mu M$ ) przez 15 min w  $37^\circ C$ . Inhibitory PARP i antyoksydanty dodano w stężeniach 0-5 mM. Peroksydację lipidów analizowano przez pomiar stężenia produktów reagujących z TBA (TBARS).*

## 2.13. Podsumowanie

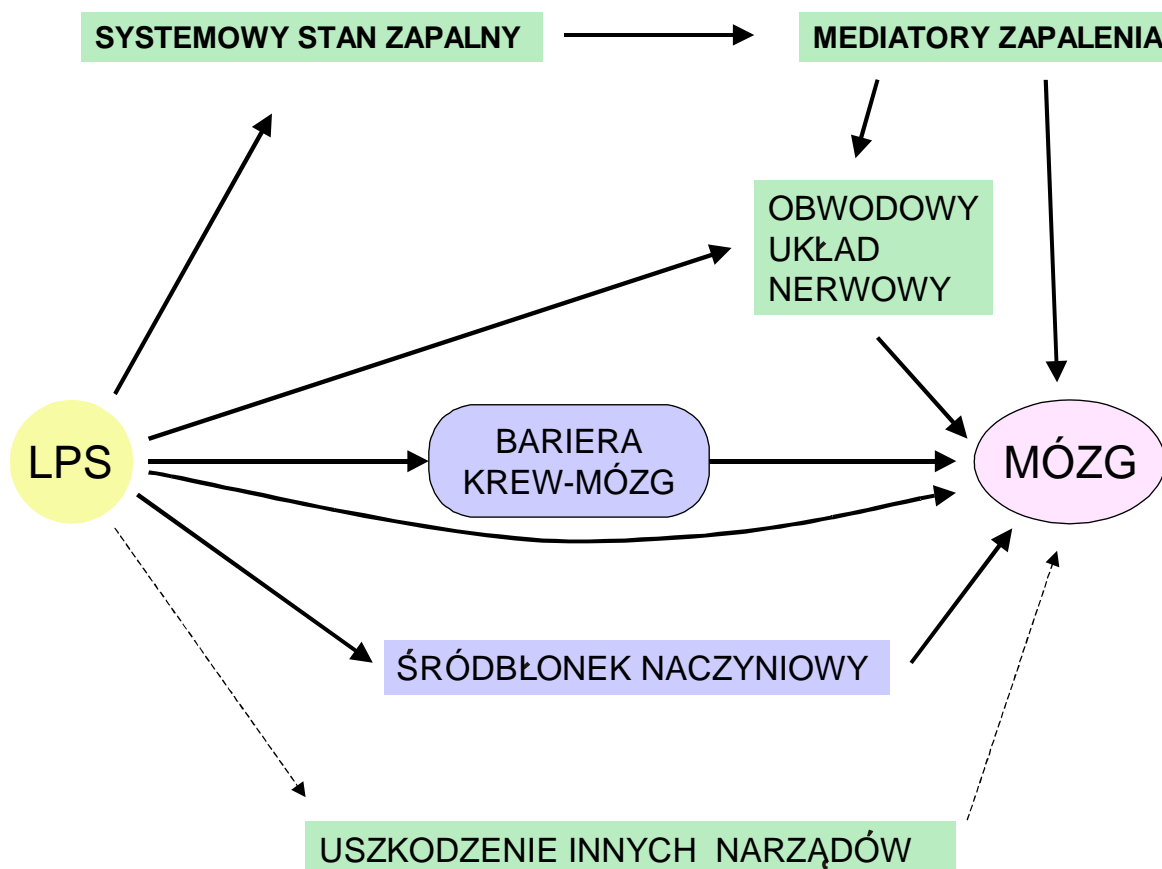
Dootrzewnowe podanie myszom LPS powodowało rozwój ogólnoustrojowego stanu zapalnego z charakterystycznymi objawami chorobowymi. Zaobserwowano indukcję genów dla iNOS i  $TNF\alpha$ , a także wzrost aktywności NOS i PARP. Stwierdzono uszkodzenia wolnorodnikowe i aktywację procesów apoptotycznych w mózgu. Zmianom biochemicznym towarzyszyły zmiany morfologiczne neuronów. Zaobserwowano nieprawidłową ultrastrukturę wielu neuronów, oraz zmiany degeneracyjne w obrębie niektórych dendrytów. Inhibitory NOS i PARP wykazywały działanie protekcyjne, wskazując na istotny udział obu enzymów w prooksydacyjnej kaskadzie wywołanej w mózgu w wyniku systemowego podania LPS.

## VI. DYSKUSJA

Reaktywne formy tlenu, w tym wolne rodniki, powstają w normalnym metabolizmie komórki, a ich stężenie jest utrzymywane na niskim poziomie dzięki komórkowym mechanizmom antyoksydacyjnym. Jednak w sytuacjach patologicznych, równowaga pomiędzy produkcją i usuwaniem wolnych rodników zostaje zachwiana i narasta stres oksydacyjny, objawiający się uszkodzeniami makromolekuł i w konsekwencji prowadzący do poważnych zaburzeń funkcjonowania komórki. Stres oksydacyjny obserwowany jest zarówno w ostrych, jak i w przewlekłych schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego. W przebiegu wielu z tych chorób ważną rolę odgrywa nieprawidłowo pobudzony układ odpornościowy. W eksperymentalnych modelach nadmiernej aktywacji układu odpornościowego LPS jest często używany jako immunogen aktywujący wrodzone mechanizmy reakcji immunologicznej. W odpowiedzi na LPS organizm aktywuje wiele mechanizmów obronnych, którym towarzyszy zwiększona produkcja wolnych rodników. Tlenek azotu jest wolnym rodnikiem o szczególnym znaczeniu. Produkowany w wysokich stężeniach przez indukowaną izoformę NOS wytworzoną w odpowiedzi na LPS, ma istotny wpływ nie tylko na pracę układu naczyniowego, ale przez swoje wielostronne działanie na metabolizm komórki, może znacząco wpływać na przebieg stanu zapalnego. W badaniach klinicznych pacjentów w szoku septycznym nieselektywne inhibitory NOS nie wykazały jednak istotnej poprawy stanu, a w niektórych przypadkach powodowały zwiększoną śmiertelność (Bakker i wsp., 2004; Watson i wsp., 2004; Lopez i wsp., 2004). Zainteresowania badaczy były do niedawna skierowane głównie na narządy obwodowe, nie zajmowano się natomiast patologicznymi zmianami w mózgu. Ponieważ wyniki ostatnich badań sugerują udział układu glutaminianergicznego w reakcjach indukowanych przez LPS w mózgu (Guerra-Romero i wsp., 1993; Willard i wsp., 2000; Glezer i wsp., 2003b), przedmiotem zainteresowania niniejszej pracy był udział poszczególnych izoform NOS w stresie oksydacyjnym wywołanym w mózgu przez LPS.

Obecny w krwiobiegu LPS oddziaływać może na mózg pośrednio, poprzez aktywację komórek układu odpornościowego i produkcję mediatorów zapalenia (Rycina 44). Aktywacja, czy też uszkodzenie komórek śródbłonkowych przez LPS, również jest potencjalnym źródłem czynników działających bezpośrednio na mózg. LPS może też wpływać na pracę mózgu przez działanie na obwodowy układ nerwowy. Inną możliwą drogą oddziaływania LPS na mózg jest działanie poprzez mediatory uwalniane z uszkodzonych narządów obwodowych, takich jak płuca czy wątroba. Zjawiska te nie były

jednak przedmiotem zainteresowania niniejszej pracy, gdyż badano procesy zachodzące w krótkim czasie po podaniu LPS, kiedy nie dochodzi do poważnych zaburzeń narządów. Bezpośrednie działanie LPS na procesy zachodzące w mózgu jest ograniczone przez obecność bariery krew-mózg. Bariera nie istnieje w narządach okołokomorowych, biorących udział w regulacji wydzielania hormonów peptydowych, co umożliwia przenikanie LPS z krwi do mózgu. Najnowsze prace Chakravarty i Herkenham (2005) ukazują duże rozpowszechnienie mRNA dla receptora TLR4 w parenchymie mózgu myszy i najintensywniejszą ekspresję w splocie naczyniowym i oponach. Ponadto stwierdzono ekspresję TLR4 w niektórych neuronach tworzących siatkowatego pnia mózgu, co sugeruje możliwość bezpośredniego działania LPS na komórki mózgu.



**Rycina 44. Możliwe drogi działania LPS na mózg**

Wyniki publikowane w niniejszej pracy wskazują na indukcję procesów zapalnych w mózgu i na udział konstytutywnych izoform NOS w procesach zależnych od stresu wolnorodnikowego wywołanego obwodowym podaniem LPS.



Badania ostatnich lat wykazały, że wysokie stężenia LPS mogą uszkadzać barierę krew-mózg (Bannerman i wsp., 1999), co umożliwia naciek leukocytów i dyfuzję LPS do mózgu. Wobec powyższego niezwykle istotne było poznanie mechanizmu bezpośredniego działania wysokich stężeń LPS na komórki śródbłónka naczyniowego i udziału NO<sup>•</sup> w tym procesie.

Wykazano w niniejszej pracy, że LPS dodany do medium hodowlanego w wysokich stężeniach powoduje obumieranie komórek śródbłónka naczyniowego w hodowli (HUVEC; Human Umbilical Vein Endothelial Cells). Obserwowano śmierć około 25% komórek po 18 godz. inkubacji z LPS 100µg/ml. Mechanizm tej reakcji nie jest znany, *in vivo* LPS oddziaływać może na komórki śródbłónka naczyniowego za pośrednictwem aktywnych komórek krwi lub bezpośrednio, poprzez aktywację receptora TLR4 na powierzchni śródbłónka. Aktywacja taka wymaga obecności białka pomocniczego CD14. Stwierdzono uprzednio, że w rejonach okołokomorowych, bogatych w splot naczyniowy, zachodzi konstytutywna ekspresja białka błonowego CD14 (Lacroix i wsp., 1998; Rivest i wsp., 2000). Ścisłe połączenia pomiędzy komórkami śródbłónka są tu zmienione, co pozwala na dyfuzję makromolekuł do przestrzeni okołonaczyniowej i na szybką indukcję transkrypcji CD14 przez LPS w tych strukturach. Tak więc, LPS może indukować syntezę receptorów w strukturach mózgu z osłabioną barierą krew-mózg, a następnie działać na pozostałe struktury mózgu. Cytotoksyczne działanie LPS na komórki śródbłónka wykazali Haendeler i wsp. (1996). LPS indukuje apoptozę komórek śródbłónka w hodowli, równocześnie indukuje procesy anty-apoptotyczne, co utrudnia zaobserwowanie apoptozy *in vitro* bez zastosowania inhibitorów transkrypcji lub translacji (Haendeler i wsp., 1996). W hodowli komórek HUVEC obserwowano po zadziałaniu LPS wzrost białka pro-apoptotycznego Bax i spadek anty-apoptotycznego Bcl-2. Zmianom tym zapobiegało użycie w eksperymencie antyoksydantów, co wskazuje na wolnorodnikowy mechanizm indukcji apoptozy przez LPS (Haendeler i wsp., 1996; Gross i wsp., 1999). LPS indukuje również ekspresję TNFα w komórkach HUVEC (Kim i wsp., 2002). TNFα może działać proapoptotycznie (Bohler i wsp., 2000), może też uruchamiać szlak antyapoptotyczny (Shinpo i wsp., 1999). Sytuację komplikuje dodatkowo proliferacyjne działanie LPS. W badaniach *in vivo* wykazano, że LPS stymuluje ekspresję oksydazy NADPH w naczyniach krwionośnych szczura (Brandes i wsp., 1999), a w badaniach *in vitro* zwiększona aktywność oksydazy NADPH prowadzi do stymulacji proliferacji komórek HUVEC (Heinloth i wsp., 2000). W takim wypadku, proliferacyjne działanie LPS

mogło by maskować jego efekt cytotoksyczny. Groźną konsekwencją uszkodzenia komórek śródbłonka naczyniowego może być uwalnianie z nich neurotoksycznych czynników, np. trombiny (Grammas i wsp., 2004).

W celu zbadania, czy LPS może powodować wzrost produkcji wolnych rodników, przeprowadzono w tej pracy eksperymenty z wykorzystaniem specyficznych wskaźników fluorescencyjnych DCF i TyrFluo. Zaobserwowano wzrost stresu wolnorodnikowego w komórkach HUVEC inkubowanych w obecności LPS już po 60 min. Statystycznie znamiennej wzrost oksydacji DCF pojawiał się przy stężeniu LPS 10 µg/ml, a przy stężeniu 100 µg/ml wzrost wynosił 225% kontroli. Wzrost produkcji wolnych rodników w komórkach śródbłonka *in vitro* obserwowany był również przez Zapolską i wsp. (2002). Mechanizm uwalniania wolnych rodników przez LPS nie jest jednak do końca wyjaśniony. Zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w komórkach śródbłonka (HUVEC) spowodowane LPS (100µg/ml) sugerują możliwość, że potencjalnym źródłem stresu oksydacyjnego może być wapniowo-zależna NOS (Kanayama i wsp., 1997). Wyniki prezentowane w niniejszej pracy wskazują jednak, że NOS nie bierze udziału w pro-oksydacyjnej kaskadzie wywołanej przez LPS i nie uczestniczy w procesach prowadzących do obumierania komórek. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia może wywoływać zwiększenie stresu oksydacyjnego nie tylko na drodze aktywacji NOS. Innymi potencjalnymi źródłami wolnych rodników mogą być oksydaza ksantynowa (E.C. 1.17.3.2), oksydaza NADPH (E.C. 1.6.3.1), metabolizm kwasu arachidonowego oraz uszkodzenie mitochondriów. Wykazano, że za zaburzenia czynnościowe naczyń krwionośnych w czasie endotoksemii szczura odpowiedzialna jest zwiększona produkcja  $O_2^{\bullet-}$  przez oksydazę ksantynową i oksydazę NADPH (Brandes i wsp., 1999). Wewnątrzkomórkowy antagonistą wapnia TMB-8, jak również antagoniści kalmoduliny (trifluopirazylna i W-7) hamowały stres oksydacyjny wywołany w komórkach śródbłonka przez oksydazę NADPH (Holland i wsp., 2000), co wskazuje na wapniowo-zależną aktywację tego pro-oksydacyjnego enzymu. Zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia (w obecności jonoforu A23187) mogą również być źródłem rodników ponadtlenowych poprzez aktywację fosfolipaz(y)  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>) i metabolizmu kwasu arachidonowego (Cosentino i wsp., 1994). Aktywacja PLA<sub>2</sub> przez  $[Ca^{2+}]_i$  prowadzi do zwiększonego uwalniania kwasu arachidonowego, który jest substratem dla cyklooksygenaz (COX) i lipoksygenaz (LOX). Podczas tego procesu powstaje  $O_2^{\bullet-}$  (Kukreja i wsp., 1986), który reagując z  $NO^{\bullet}$  tworzyć może ONOO<sup>-</sup> (Beckman i wsp.,

1990; Beckman i wsp., 1996). Istnieje również odwrotna zależność, mianowicie zmiany potencjału redoks w komórkach śródbłonna powodować mogą oscylacje  $[Ca^{2+}]_i$ . Aktywacja oksydazy NADPH powoduje takie oscylacje w komórkach HAEC (Hu i wsp., 1998). Te obserwacje wskazywać mogą, że zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia mogą być następstwem, a nie przyczyną stresu wolnorodnikowego w komórkach HUVEC.

W stanach zapalnych dochodzi do stymulacji komórek układu odpornościowego, makrofagów i granulocytów obojętnochłonnych, które po aktywacji wchodzi w interakcje z komórkami śródbłonna naczyniowego i wytwarzają wolne rodniki, cytokiny, chemokiny, białka adhezyjne. Wśród białych krwinek szczególną rolę przypisuje się granulocytom obojętnochłonnym. LPS stymuluje granulocyty i powoduje zwiększoną ich adhezję do komórek śródbłonna naczyniowego oraz produkcję wolnych rodników i enzymów proteolitycznych (Fittschen i wsp., 1988). Równocześnie LPS i cytokiny działają antyapoptotycznie na aktywne granulocyty, co wydłuża czas ich życia poza normalne 24-48 godz. W celu zanalizowania roli wolnych rodników w interakcjach pomiędzy granulocytami obojętnochłonnymi i komórkami śródbłonna użyto sondy reagującej z rodnikiem tyrozylowym w białkach. Stwierdzono silną pro-oksydacyjną aktywność granulocytów obojętnochłonnych, które już po 15-minutowej inkubacji powodowały wolnorodnikowe uszkodzenia białek zewnątrzkomórkowych. W badanych warunkach nie zaobserwowano oksydacji białek wewnątrzkomórkowych. Granulocyty wytwarzają wolne rodniki na drodze enzymatycznej, dzięki mieloperoksydazie (MPO; E.C. 1.11.1.7) i oksydazie NADPH (E.C. 1.6.3.1). Brak uszkodzeń białek wewnątrzkomórkowych wskazuje, że w krótkim czasie inkubacji związki odpowiedzialne za uszkodzenia wolnorodnikowe nie dyfundują do wnętrza komórek. To sugeruje, że mimo bardzo silnego uszkodzenia białek zewnątrzkomórkowych nie dochodzi w tym czasie (15 min.) do przerwania ciągłości błony komórkowej. Badania Tatsumi i wsp. (1994) oraz Daphna i wsp. (1998) wykazały, że oksydanty wytwarzane przez aktywne granulocyty obojętnochłonne zwiększają przepuszczalność błony komórek śródbłonna naczyniowego i wpływają na receptory zlokalizowane na błonie. Wynika z tego, że w celu ochrony komórek śródbłonna naczyniowego przed oksydacyjnym uszkodzeniem wywołanym przez aktywne granulocyty obojętnochłonne, działania należy podjąć na wczesnych etapach wybuchu tlenowego, kiedy integralność błony komórkowej pozostaje jeszcze zachowana.

Granulocyty aktywowane przez ester forbolu (PMA) wydzielają mieloperoksydazę (MPO) i  $O_2^{\bullet-}$ , który jest następnie przekształcany przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD) w reakcji dysmutacji do  $H_2O_2$  (Heinecke i wsp., 1993). Układ MPO/ $H_2O_2$  może przekształcać tyrozynę w rodnik tyrozyłowy, prowadząc do powstania mostków dityrozynowych w białkach. Podobny wynik otrzymano w czasie inkubacji HUVEC w obecności peroksydazy chrzanowej (HRP) i nadtlenu wodoru. Układ HRP/ $H_2O_2$  powodował uszkodzenia białek wewnątrzkomórkowych w takim samym stopniu, jak sam  $H_2O_2$ , z czego wnioskować można, że za uszkodzenia wewnątrzkomórkowe odpowiedzialny jest sam  $H_2O_2$ . Ta obserwacja jest zgodna z wcześniejszymi badaniami Van der Vliesa i wsp. (2001), które wykazały wewnątrzkomórkowe uszkodzenia spowodowane przez  $H_2O_2$  w fibroblastach. Nadtlenek wodoru może być przekształcany w bardzo reaktywny rodnik hydroksylowy  $OH^{\bullet}$  w reakcji Fentona. Nadtlenek wodoru może również indukować wewnątrzkomórkowe oscylacje  $Ca^{2+}$  w komórkach śródbłona naczyńowego (Hu i wsp., 1998). Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia prowadzi może z kolei do zwiększonej produkcji  $O_2^{\bullet-}$  w mitochondriach, może również aktywować prooksydacyjne enzymy, w tym cNOS (Busse i wsp., 1990).

Ponieważ oksydacyjne uszkodzenia komórek śródbłona wywołane przez aktywację granulocytów dotyczyły tylko białek zewnątrzkomórkowych, w kolejnych eksperymentach analizowano rolę  $NO^{\bullet}$  w tych procesach.  $NO^{\bullet}$  zależnie od warunków działać może pro- lub antyoksydacyjnie. Otrzymane z użyciem donora  $NO^{\bullet}$  (DEANO) wyniki wskazują, że  $NO^{\bullet}$  hamuje oksydację białek zewnątrzkomórkowych wywoływaną zarówno przez aktywne granulocyty obojętnochłonne jak i przez HRP/ $H_2O_2$ . DEANO jest spontanicznym donorem  $NO^{\bullet}$  o czasie półtrwania około 2 min w buforze fosforanowym pH 7,4 w 37°C (Keefer i wsp., 1996).  $NO^{\bullet}$  może hamować aktywność MPO i HRP poprzez interakcję z grupą hemową w centrach aktywnych tych enzymów. Wykryto stabilne kompleksy  $NO^{\bullet}$  z MPO (n.p. MPO-Fe(III)·NO i MPO-Fe(II)·NO) (Abu-Soud i wsp., 2000). Wykazano również, że NO hamuje oksydację LDL indukowaną przez rodniki peroksyłowe (Goss i wsp., 1999). Badania z egzogenną L-tyroziną wykazały, że powstawanie dityrozyny pod wpływem aktywnych neutrofilów jest hamowane przez DEANO, i że ten efekt zanika, gdy stężenie DEANO spada poniżej 20 nM (wyliczone z czasu półtrwania DEANO). Oksydacja  $NO^{\bullet}$  przez  $O_2$  prowadzi do powstania azotynów ( $NO_2^-$ ) (Ignarro i wsp., 1993). Azotyny mogą być następnie utleniane przez peroksydazy w

obecności  $H_2O_2$  do azotanów, które zdolne są do nitracji tyrozyny (Van der Vliet i wsp., 1997; Shibata i wsp., 1995). Jednak w naszych badaniach ten mechanizm nitracji jest mało prawdopodobny, gdyż  $NO^\bullet$  hamuje aktywność MPO. Możliwe jest natomiast, że  $NO^\bullet$  reaguje bezpośrednio z rodnikiem tyrozylowym tworząc nitrotyrozynę (Gunther i wsp., 1997). Taka modyfikacja aminokwasów wydaje się być mniej szkodliwa, gdyż nie powoduje powstawania niepożądanych mostków dityrozynowych, które zaburzają strukturę białek. Ponadto komórki posiadają mechanizmy denitracji tyrozyny, co umożliwia szybkie usunięcie nitrotyrozyny (Kuo i wsp., 1999; Koeck i wsp., 2004).

$NO^\bullet$  może być syntetyzowany zarówno przez komórki śródbłonna jak i przez granulocyty (Lowenstein, 1999). Rola  $NO^\bullet$  w hamowaniu oksydacyjnych uszkodzeń komórek śródbłonna nie jest w pełni zbadana (Carey i wsp., 1992; Vanderford i wsp., 1994). Nasze wyniki demonstrują, że oksydanty produkowane przez aktywne neutrofile uczestniczą w uszkodzeniu białek zewnątrzkomórkowych śródbłonna naczyniowego, i że  $NO^\bullet$  może tym uszkodzeniom zapobiegać. Wolne rodniki są elementem międzykomórkowej sygnalizacji pomiędzy granulocytami obojętnochłonnymi i śródbłonkiem naczyniowym. Wykazano niedawno, że wolne rodniki produkowane przez granulocytarną oksydazę NADPH są niezbędne dla efektywnej aktywacji NF- $\kappa$ B w komórkach śródbłonna naczyniowego po stymulacji LPS lub TNF $\alpha$  (Fan i wsp., 2002; Fan i wsp., 2003). Ponieważ wyniki publikowane w niniejszej pracy sugerują, że uszkodzenia wolnorodnikowe wywołane przez granulocyty ograniczają się do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, sądzić można, że stężenia wolnych rodników przenikające do wnętrza komórek śródbłonna są za niskie aby wywołać istotne uszkodzenia.

Prezentowane w niniejszej pracy badania prowadzone na komórkach śródbłonna naczyniowego HUVEC wykazały wzrost stresu oksydacyjnego pod wpływem bezpośredniego lub pośredniego działania LPS. LPS powodował obumieranie 25% komórek. Stwierdzono, że indukcja iNOS w komórkach śródbłonna ma działanie korzystne, bowiem jej zahamowanie zwiększa stres oksydacyjny. Badania interakcji granulocytów i komórek HUVEC wykazały korzystne działanie  $NO^\bullet$ . Donor tlenku azotu DEANO, jak omówiono poprzednio, zapobiegał uszkodzeniom wolnorodnikowym białek błonowych, wykazując właściwości antyoksydacyjne.

Prezentowane w niniejszej pracy wyniki sugerują, że skutkiem działania LPS na ściany naczyń krwionośnych mózgu może być ich uszkodzenie, i w konsekwencji zaburzenie funkcji bariery krew-mózg i aktywacja reakcji zapalnej w mózgu. Ważnym

elementem tej reakcji w mózgu jest indukcja wapniowo-niezależnej izoformy NOS, która poprzez produkcję dużych ilości NO<sup>•</sup> wywoływać może szereg niekorzystnych zjawisk, m.in. stres oksydacyjny. Ostatnie badania sugerują, że w stanach zapalnych mózgu mogą brać udział również konstytutywne izoformy NOS. Badania nad znaczeniem poszczególnych izoform NOS w procesach wywołanych w mózgu przez szeroko stosowane systemowe podanie LPS prowadzono na modelu *in vivo* (Layé i wsp., 2001; Back i wsp., 2000; Li i wsp., 1999). W przypadku badania mózgu trudna jest analiza efektów LPS w modelach *in vitro*, gdyż odbiegają one znacznie od warunków *in vivo* ze względu na brak bariery krew-mózg, a także na strukturalne zróżnicowanie mózgu i znaczenie w tym procesie komórek glejowych. Badania w modelu *in vivo* bliższe są ponadto warunkom klinicznym. Dawkę LPS (1 mg/kg m.c.) wybrano na podstawie wstępnych eksperymentów, jest ona wielokrotnie niższa niż dawka letalna 50 mg/kg m.c. (Back i wsp., 2000). LPS podawano dootrzewnowo, aby uniknąć mechanicznego uszkodzenia mózgu w wyniku podania domózgowego. Wybrana dawka LPS wywoływała przejściowe objawy ogólnoustrojowego stanu zapalnego. Obserwowano zmiany temperatury charakterystyczne dla wysokich dawek LPS, tzn. przejściowe obniżenie temperatury ciała o ok. 1 °C w porównaniu do kontroli (Romanovsky i wsp., 1996). Przejściowa hipotermia może być spowodowana zwiększonym wydzielaniem wazopresyny w podwzgórzu w odpowiedzi na stymulowaną przez LPS produkcję NO<sup>•</sup> przez nNOS (Uribe i wsp., 1999; Giusti-Paiva i wsp., 2004). Wykazano niedawno, że systemowe podanie inhibitora NOS (L-NAME) powoduje obniżenie temperatury ciała, jednak zasięg wywołanych zmian (-1 °C) wyklucza istotny wpływ na stres oksydacyjny, gdyż jak wykazano w organotypowych hodowlach hipokampa, dopiero redukcja temperatury o około 4-5 °C zmniejsza uszkodzenia wolnorodnikowe (Giusti-Paiva i wsp., 2004; McManus i wsp., 2004). W celu zbadania, czy LPS powoduje patologiczne zmiany w komórkach mózgu, analizowano za pomocą mikroskopii elektronowej ultrastrukturę neuronów istoty czarnej, jako struktury szczególnie narażonej na działanie procesów wywołanych przez LPS. Stwierdzono obecność patologicznych zmian w wielu neuronach, m.in. obkurzoną cytoplazmę, wgłobienia otoczki jądrowej, obrzmienie mitochondriów i aparatu Golgiego. Obserwowano ponadto obecność autofagolizosomów, lizosomów i ciałek gęstych) a także procesy degeneracyjne w niektórych dendrytach (wakuolizacja, obrzmienie mitochondriów). Charakter obserwowanych zmian wskazuje na aktywację procesu autofagii w neuronach przez LPS, co jednak nie musi prowadzić do śmierci

komórki. Jest to pierwsza taka obserwacja, dotychczas nie zanotowano tego zjawiska w neuronach po podaniu LPS. Autofagia występuje jednak w wielu chorobach neurodegeneracyjnych, np. w chorobie Huntingtona, Alzheimera i Parkinsona, w których obserwuje się objawy stanu zapalnego. (Larsen i Syulzer, 2002). W ostatnich latach stwierdzono neurodegenerację po domózgowym wstrzyknięciu LPS, w tym degenerację drzewek dendrytycznych neuronów piramidowych po domózgowym wstrzyknięciu LPS (Arimoto i wsp., 2003; Milatovic i wsp., 2003).

W celu dokładniejszego zanalizowania roli poszczególnych izoform NOS w przebiegu stresu wolnorodnikowego wywołanego obwodowym podaniem LPS zbadano w niniejszej pracy aktywność enzymu w różnych częściach mózgu. Istotny statystycznie wzrost zaobserwowano w istocie czarnej, a także w całym śródmózgowiu/między-mózgowiu. W wybranych czasach po podaniu LPS (3, 6, 12, 48 godz.) nie stwierdzono uchwytanych zmian w pozostałych badanych częściach mózgu (korze i mózdzku). Zastosowanie *in vivo* inhibitorów cNOS przed podaniem LPS zapobiegało zaburzeniom w mózgu. Wyniki te wskazują na istotny udział cNOS w aktywacji peroksydacji lipidów błon w zaburzeniu procesów energetycznych w mitochondriach. Przeprowadzona w tej pracy analiza ekspresji genów w śródmózgowiu po podaniu LPS wykazała znaczny wzrost transkrypcji genów dla iNOS w śródmózgowiu z maksimum przypadającym na 3 godz. po iniekcji LPS. Ekspresja genu dla eNOS ulegała natomiast nieznacznemu krótkotrwałemu obniżeniu 6 godz. po iniekcji. Natomiast ekspresja genu dla nNOS nie zmieniała się po podaniu LPS. Równocześnie zbadano ekspresję genu dla TNF $\alpha$ , o którym wiadomo, że ulega aktywacji w stanach zapalnych. Poziom mRNA dla tego genu po podaniu LPS znacznie wzrastał, osiągał maksimum w 3 godz., po czym następował spadek do wartości kontrolnych w drugiej dobie eksperymentu. Inhibitor iNOS 1400W obniżał do poziomu kontroli ekspresję genu kodującego iNOS, oraz nieznamiennie obniżał ekspresję genu dla TNF $\alpha$ . Inhibitor konstytutywnych izoform NOS NNLA również wykazywał tendencję do obniżania ekspresji genów dla iNOS i TNF $\alpha$ , jednak otrzymane wyniki nie uzyskały statystycznej znamienności. Antagonista kanału NMDA MK-801, nie wykazywał żadnego efektu. Wymienione inhibitory nie wpływały na ekspresję konstytutywnych izoform NOS. Krótkotrwały wzrost aktywności nNOS po dożylnym podaniu LPS obserwowany był w jądrze przykomorowym podwzgórza szczura przez Uribe i wsp. (1999). W innych pracach nie stwierdzono zmian ekspresji nNOS w mózgu po systemowym podaniu LPS (Iwase i wsp., 2000). Ci sami autorzy zaobserwowali wzrost ekspresji białka eNOS w astrocytach,

efekt ten uzyskano przy wysokich dawkach LPS do 50 mg/kg m.c.; i.p. (Iwase i wsp., 2000). Ekspresja eNOS w organach obwodowych ulegała znacznemu obniżeniu. W badaniach Koedel i wsp., (2001) wykazano, że myszy z nieaktywnym genem eNOS są bardziej wrażliwe na zmiany wywołane zapaleniem opon indukowanym przez wstrzyknięcie *Streptococcus pneumoniae* do zbiornika mózdkowo-rdzeniowego niż myszy o fenotypie dzikim. U myszy eNOS<sup>-/-</sup> obserwowano zwiększoną ekspresję MIP-2, P-selektyny i IL-1 $\beta$ , ale nie zanotowano zmian poziomu mRNA dla nNOS, iNOS i TNF $\alpha$ . W innej pracy tej grupy badaczy analizowano rolę iNOS w zapaleniu opon, stwierdzając zmniejszenie uszkodzeń bariery krew-mózg, zmniejszenie stężenia nitrotyrozyny w białkach, obniżenie ekspresji genów dla MIP-1 $\alpha$ , MIP-2, a także zmniejszenie ilości (IL)-1 $\beta$ , IL-6 i TNF $\alpha$  (Winkler i wsp., 2001). Zaobserwowano również, że w tym modelu oprócz silnej indukcji mRNA dla iNOS (maksimum około 24 godz. od indukcji) następuje zwiększenie ekspresji eNOS. Najnowsze wyniki opublikowane przez Connelly i wsp. (2005) sugerują, że aktywacja eNOS po podaniu LPS następuje wskutek fosforylacji katalizowanej przez PI3-kinazę i Akt/PKB, i jest konieczna dla pełnej indukcji iNOS. Bandyopadhyay i wsp. (1997) obserwowali indukcję iNOS i zahamowanie ekspresji nNOS u szczura po podaniu LPS lub IFN $\gamma$ .

Strukturą szczególnie wrażliwą na działanie LPS jest istota czarna, prawdopodobnie ze względu na stosunkowo dużą zawartość komórek mikrogleju (Kim i wsp., 2000). W badaniach *in vivo* Iravani i wsp. (2002) stwierdzili aktywację mikrogleju oraz degenerację neuronów (głównie dopaminergicznym) pod wpływem LPS wstrzykniętego do istoty czarnej, natomiast efektu neurotoksycznego nie miało podanie LPS do hipokampa i kory mózgu. Sugeruje się, że NO $\bullet$  uwalniany przez iNOS w mikrogleju odpowiedzialny jest za degenerację neuronów dopaminergicznym. Indukcję iNOS wykazali w mikrogleju Possel i wsp. (2000), natomiast nie stwierdzili jej w astrocytach ani neuronach prążkowie, po wstrzyknięciu LPS do tej struktury. Podobne wyniki uzyskali Garcion i wsp. (1998) w mieszanych hodowlach mikroglejowo-astrocytarnych. Ponadto obserwowali oni indukcję iNOS w mikrogleju i astrocytach hipokampa, po wstrzyknięciu LPS do tej struktury. Badania Boveris i wsp. (2002) wykazały, że wzrost produkcji NO $\bullet$  w warunkach systemowego stanu zapalnego może dotyczyć także mitochondrialnej izoformy NOS. Obecność mtNOS w mitochondriach komórek mózgu jest do chwili obecnej kontrowersyjna (Lores-Arnaiz i wsp., 2004; Haynes i wsp., 2004; Lacza i wsp., 2004). Pomijając kwestię źródła tlenu azotu w



mitochondriach, nie można zaprzeczyć, że  $\text{NO}^\bullet$  jest uwalniany w mitochondriach i pełni istotną rolę w regulacji funkcji tego organelum. Giulivi i wsp. (1998) stwierdzili, że dodanie L-argininy do izolowanych mitochondriów powoduje spadek szybkości oddychania, natomiast odwrotne działanie wykazują inhibitory NOS. Dowodzi to tonicznej aktywności NOS w izolowanych mitochondriach, która reguluje pracę łańcucha oddechowego poprzez odwracalną inhibicję oksydazy cytochromowej (kompetycja z  $\text{O}_2$ ).  $\text{NO}^\bullet$  może też przez  $\text{ONOO}^-$  nieodwracalnie hamować reduktazę NADH-ubichinonu i reduktazę ubichinonu-cytochromu c. Zmniejszona aktywność łańcucha oddechowego koresponduje z obniżoną ciepłotą ciała i zmniejszonym zużyciem tlenu w sepsie. Badania Escames i wsp. (2003) wykazały, że aktywność NOS w mitochondriach jest indukowana przez LPS. W warunkach kontrolnych aktywność mtNOS była niewykrywalna. Dożylna iniekcja LPS (10mg/kg) zwiększała znacznie aktywność mtNOS w płucach szczura, przy czym u starych szczurów efekt był silniejszy.

Sugeruje się również, że wzrost produkcji  $\text{NO}^\bullet$  w stanach zapalnych odbywa się poprzez zależną od  $\text{IL-1}\beta$  indukcję ekspresji cyklohydrolazy-1 GTP, co prowadzi do zwiększonej produkcji tetrahydrobiopteryny ( $\text{BH}_4$ ), kofaktora NOS (Bhagat i wsp., 1999). Ponieważ tetrahydrobiopteryna jest również kofaktorem hydroksylazy tyrozynowej, zwiększenie dostępności  $\text{BH}_4$  prowadzi do wzrostu stężenia dopaminy i w rezultacie do degeneracji neuronów dopaminergicznym w istocie czarnej poprzez zależny od wolnych rodników mechanizm (Choi i wsp., 2003).

Zarówno iNOS jak i  $\text{TNF}\alpha$  należą do grupy białek, których ekspresja zależna jest od czynnika transkrypcyjnego  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  (ang. Nuclear Factor- $\kappa\text{B}$ ).  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  w neuronach może być obecny konstytutywnie lub może być indukowany przez różne bodźce. Bierze udział w rozwoju, plastyczności, neurodegeneracji. Indukowana aktywność  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  wykrywana jest w mikrogleju i astrocytach. Wykazano uprzednio, że w czasie systemowego stanu zapalnego dochodzi do aktywacji  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  w ośrodkowym układzie nerwowym. LPS podany obwodowo powoduje w parenchymie mózgu transkrypcję  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  oraz aktywację  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ . Aktywatorami ekspresji indukowanej izoformy NOS mogą być LPS,  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , dsRNA,  $\beta$ -amyloid. Jak wykazali Arimoto i wsp. (2003) NNLA istotnie hamuje wywołaną iniekcją LPS do istoty czarnej szczura aktywację mikrogleju, wzrost ekspresji i aktywności iNOS oraz degenerację neuronów dopaminergicznym, podobnie jak glukokortykoid deksometazon, który hamuje ekspresję

iNOS. NNLA hamuje głównie konstytutywne izoformy NOS i jest słabym inhibitorem iNOS ( $IC_{50}$  dla nNOS wynosi  $0,3 \mu\text{M}$ , dla eNOS  $0,6 \mu\text{M}$ , dla iNOS  $6 \mu\text{M}$ ) (Reif i wsp., 1995, 2000). Dlatego NNLA jest najczęściej stosowany jako inhibitor konstytutywnych izoform NOS, i tak był interpretowany w niniejszej pracy. Uzyskane wyniki sugerują, że jednym z możliwych mechanizmów protekcyjnego działania inhibitorów NOS może być wpływ na regulację ekspresji genów przez  $\text{NO}^\bullet$ . Zahamowanie iNOS wydaje się prowadzić do obniżenia ekspresji genów iNOS i  $\text{TNF}\alpha$ , co wskazuje, że tlenek azotu jest pozytywnym regulatorem tej ekspresji. W literaturze znaleźć można wyniki, które pokazują zarówno pozytywną, jak i negatywną regulację tych genów przez  $\text{NO}^\bullet$ . Glezer i wsp. (2003a) wykazali wpływ inhibitorów szlaku glutaminianergicznego na indukowaną aktywność NF- $\kappa\text{B}$ . Dożylna iniekcja LPS ( $1\text{mg/kg}$ ) powodowała wzrost aktywacji NF- $\kappa\text{B}$  po 1-2 godz (najwyższy w mózdzku i podwzgórzu), po którym następował spadek już po 6 godz. W skład kompleksu wchodziły podjednostki p50/p65. Iniekcja MK-801 ( $1\text{mg/kg}$  i.p.) lub 7-NI ( $25 \text{mg/kg}$  i.p.) powodowała częściowe zahamowanie aktywacji NF- $\kappa\text{B}$  w mózgu. MK-801 i 7-NI nie miały natomiast wpływu na aktywację NF- $\kappa\text{B}$  w śledzionie, co wskazuje na ich specyficzny mechanizm działania. W innej pracy ci sami autorzy, stosując domózgowe podanie LPS wykazali, że MK-801 zwiększa ekspresję niektórych genów indukowanych w mózgu przez LPS (Glezer i wsp., 2003b).

Sugerowane jest, że LPS aktywuje gładki, który zwiększa sygnalizację glutaminianergiczną poprzez uwalnianie glutaminianu i czynników zwiększających aktywność receptora NMDA (Piani i wsp., 1992; Kaul i wsp., 2001; Bezzi i wsp., 2001).

Negatywne sprzężenie zwrotne zaobserwowano pomiędzy izoformą indukowaną a konstytutywnymi izoformami NOS (Griskavage i wsp., 1993; Buga i wsp., 1993). Tlenek azotu może obniżać aktywność NOS przez interakcje z grupą hemową. Konstytutywnie produkowany przez nNOS tlenek azotu zmniejsza ekspresję iNOS w astrocytach (Togashi i wsp., 1997), również glutaminian hamuje wiązanie NF- $\kappa\text{B}$  do DNA w astrocytach, prawdopodobnie poprzez zwiększanie stężenia  $\text{NO}^\bullet$  (Lin i Murphy, 1997).  $\text{NO}^\bullet$  przeciwdziała aktywacji NF- $\kappa\text{B}$  w astrocytach poprzez oddziaływanie na wiązanie czynnika z miejscem promotorowym, nie wpływa bezpośrednio na aktywację i translokację NF- $\kappa\text{B}$  (Taylor i wsp., 1997). W innych typach komórek, np. mięśniach gładkich naczyń krwionośnych,  $\text{NO}^\bullet$  reguluje aktywność NF- $\kappa\text{B}$  poprzez wpływ na fosforylację i degradację I $\kappa\text{B}$  (Marumo i wsp., 1998). Istnieją również dane literaturowe

wskazujące, że niektóre aktywatory ekspresji iNOS działają poprzez obniżenie produkcji NO<sup>•</sup>. Przykładem może być LPS/IFN $\gamma$ , które zwiększając fosforylację nNOS w hodowli astrocytoma T67 hamują jej aktywność, i poprzez obniżenie bazalnego poziomu NO<sup>•</sup> wyzwalają aktywację NF- $\kappa$ B i ekspresję iNOS (Colasanti i wsp., 1997 i 1999). Inhibicję NF- $\kappa$ B przez NO<sup>•</sup> wykazano również w komórkach śródbłonkowych i w mięśniach gładkich. Indukcję NF- $\kappa$ B przez NO<sup>•</sup> (SNP i SNAP) po raz pierwszy wykazano w granulocytach obojętnochłonnych (Lander i wsp., 1993). NO<sup>•</sup> aktywuje p21<sup>ras</sup> z rodziny białek G poprzez S-nitrozylację, i w ten sposób aktywuje NF- $\kappa$ B w neuronach, limfocytach, hepatocytach, komórkach nabłonkowych, makrofagach (Chen i wsp., 1999).

Efekt NO<sup>•</sup> na NF- $\kappa$ B zależy od wielu czynników. W komórkach śródbłonka wysokie stężenia NO<sup>•</sup> hamują wywołaną TNF $\alpha$  lub PMA aktywację NF- $\kappa$ B, niskie indukują (Umansky i wsp., 1998). Również czas stymulacji i czas półtrwania donora NO<sup>•</sup> jest istotnym czynnikiem. Egzogenny NO<sup>•</sup> stymulował NF- $\kappa$ B w czasie pierwszych 5-15min., natomiast po upływie 1-4 godz. hamował NF- $\kappa$ B (Diaz-Cazorla i wsp., 1999). Także warunki redoks determinują kierunek działania NO<sup>•</sup>, poprzez ułatwianie tworzenia nitrozotoli powodują hamowanie lub aktywację NF- $\kappa$ B (Lander i wsp., 1995; Matthews i wsp., 1996). Również rodzaj aktywności NF- $\kappa$ B (bazalna czy indukowana), może mieć wpływ na kierunek działania NO<sup>•</sup>. Ten sam gen może być odmiennie regulowany przez NO<sup>•</sup> w różnych typach komórek, np. IL-8 w hodowli komórek czerniaka i śródbłonka (Andrew i wsp., 1995; De Caterina i wsp., 1995). NO<sup>•</sup> bierze też udział w regulacji aktywności NF- $\kappa$ B przez zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia żelaza (Xiong i wsp., 2003). Z opublikowanych danych wynika, że NO<sup>•</sup> może regulować aktywność NF- $\kappa$ B zarówno pozytywnie jak i negatywnie, zależnie od stężenia NO<sup>•</sup> i jego pochodnych, typu komórki, bodźca stymulującego. Literatura zawiera doniesienia, wykazujące aktywację NF- $\kappa$ B w neuronach przez NO<sup>•</sup> (Simpson i Morris, 1999) i hamowanie w astrocytach i innych komórkach (Togashi i wsp., 1997; Peng i wsp., 1995). Uważa się, że w ośrodkowym układzie nerwowym ekspresja iNOS ma miejsce głównie w astrocytach, mikrogleju i komórkach śródbłonka naczyniowego, a produkowany przez tę izoformę NO<sup>•</sup> może działać toksycznie lub protekcyjnie. Jednak istnieje wiele doniesień o indukcji iNOS w neuronach zarówno *in vitro* jak i *in vivo* pod wpływem cytokin, niedokrwienia, w chorobach neurodegeneracyjnych (Heneka i wsp., 2001).

W badaniach przedstawionych w obecnej pracy podjęto próbę określenia roli NO<sup>•</sup> w stresie oksydacyjnym wywołanym przez LPS. Wykazano, że podanie systemowe LPS powoduje zwiększoną produkcję wolnych rodników w mózgu. Wykryto wzmoczoną peroksydację lipidów błon komórek mózgu. Stwierdzono również wzrost aktywności PARP w mózgu i korelujący z nim spadek stężenia  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>, co świadczy o zwiększonej aktywacji polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP; E.C. 2.4.2.30). PARP jest enzymem zaangażowanym w wiele procesów fizjologicznych, uczestniczy w replikacji i naprawie DNA, ekspresji genów, procesach różnicowania, dekondensacji chromatyny i w apoptozie, a także w LTP (Gaal et al. 1987, Satoh et al., 1992). Jego zadaniem jest synteza długich, rozgałęzionych polimerów ADP-rybozy na białkach jądrowych, czego skutkiem jest rozluźnienie struktury chromatyny i tym samym udostępnienie nici DNA dla innych enzymów. Substratem PARP dla syntezy poli(ADP-rybozy) jest  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>. W przypadku silnych uszkodzeń DNA dochodzi do nadmiernej aktywacji PARP powodującej zużycie komórkowych zasobów  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> i ATP, używanego do resyntezy  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> przez komórkę. Taki mechanizm śmierci komórek zaobserwowano w wielu stanach patologicznych, między innymi w ekscytotoksycznej śmierci neuronów zarówno *in vitro* jak *in vivo* (Eliasson i wsp., 1997; Yu i wsp., 2002). Inhibitory PARP-1 wykazują działanie protekcyjne w stanach zapalnych oraz innych schorzeniach (Eliasson i wsp., 1997; Szabo i wsp., 1997; Thiemermann i wsp., 1997; Farkas i wsp., 2002; Strosznajder i wsp., 2003). Wyniki prezentowane w niniejszej pracy wskazują na udział zarówno iNOS jak i cNOS w wolnorodnikowej kaskadzie powstającej w mózgu po systemowym podaniu LPS. Inhibitory izoform NOS wykazywały protekcyjne działanie, zapobiegając obniżeniu stężenia  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> i wzrostowi peroksydacji lipidów. Działanie 7-NI, inhibitora neuronalnej izoformy NOS świadczy o udziale również tej izoformy w stresie wolnorodnikowym. Inhibitory NOS nie wpływały jednak w istotny sposób na aktywność PARP we frakcji jądrowej, co może wskazywać, że zmiany komórkowego stężenia  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> obserwowane po podaniu LPS nie są spowodowane wzrostem aktywności jądrowego PARP-1. Być może ważniejszą rolę w stosowanym modelu odgrywa PARP obecny w mitochondriach (Mosgoeller i wsp., 1996; Du i wsp., 2003; Pieper i wsp., 2000). Wyniki prezentowane w niniejszej pracy wykazują, że PARP odgrywa istotną rolę w obserwowanych procesach. Jest nie tylko odbiorcą sygnału o uszkodzeniach wolnorodnikowych DNA, ale sam może również uczestniczyć w kaskadzie prowadzącej do ich powstania. Inhibitor PARP, 3-AB, zapobiegał zmianom oksydacyjnym powstającym w mózgu po systemowym podaniu LPS.

Po podaniu 3-AB zanotowano wzrost stężenia  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> i obniżenie stężenia PAR w mózgu, co wskazuje na zahamowanie aktywności PARP. Stwierdzono także, że 3-AB zapobiega również zwiększonej peroksydacji lipidów, co wskazuje, że zahamowanie PARP może zmniejszać uszkodzenia wolnorodnikowe. Wynik ten jest zgodny z danymi publikowanymi uprzednio, gdzie wykazano, że inhibitory PARP w modelach niedokrwienia mózgu i serca zapobiegają nie tylko obniżeniu stężenia  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> i ATP, ale też zmniejszają wolnorodnikowe uszkodzenia lipidów i białek (Szabados i wsp., 2000; Halmosi i wsp., 2001). Sugerowany mechanizm to zapobieganie zahamowania aktywności łańcucha oddechowego i związanej z tym produkcji wolnych rodników w mitochondriach (Halmosi i wsp., 2001). Wykazano też, że inhibitory PARP, w tym 3-AB, hamują aktywność innych mitochondrialnych enzymów transferazy mono-ADP-rybozy (E.C. 2.4.2.31) i glikohydrolazy NAD1 (E.C. 3.2.2.5) (Jorcke i wsp., 1998), ale brak jest w literaturze dowodów na ich bezpośredni udział w regulacji łańcucha oddechowego. Niedawno opublikowane prace wykazują, że protekcyjne działanie inhibitorów PARP częściowo opiera się na aktywacji antyapoptotycznego szlaku PI3-kinazy i Akt/PKB (Veres i wsp., 2003; Veres i wsp., 2004). Inna jeszcze możliwa droga działania inhibitorów PARP to zahamowanie aktywacji komórek układu immunologicznego. PARP może modulować proces transkrypcji wskutek bezpośrednich interakcji białko-białko (NF- $\kappa$ B, AP-2, BMYB, Oct-1, YY-1, TEF-1) lub na drodze poli(ADP-rybozylacji) (NF- $\kappa$ B, p53, fos) czynników transkrypcyjnych (Hassa i wsp., 1999; Chang i wsp., 2001; Kameoka i wsp., 2000). W ten sposób PARP-1 może wpływać na ekspresję białek pro- i antyoksydacyjnych, jak też związanych z produkcją cytokin, np. MIP-1 $\alpha$ , MIP-2 (Oliver i wsp. 1999; Kannan i wsp. 1999; Cervellera i wsp. 2000; Nie i wsp. 1998; Oei i wsp. 1997; Butler i wsp. 1999; Hasko i wsp. 2002). Jednym z białek, którego ekspresja wymaga obecności PARP-1 jest indukowana izoforma NOS. Badania La Page i wsp. wykazały, że 3-AB hamuje transkrypcję genu dla iNOS poprzez zahamowanie aktywności transkrypcyjnej promotora zależnego od NF- $\kappa$ B (La Page i wsp., 1998). W najnowszych badaniach Rapizzi i wsp. (2004) wykazano wpływ inhibitora PARG (glikohydrolazy poli(ADP)rybozy) na transkrypcję niektórych genów związanych ze stanami zapalnymi. Wzrost ekspresji obserwowano w przypadku mRNA dla iNOS i COX-2, natomiast TNF $\alpha$  pozostawał na nie zmienionym poziomie. Wyniki prezentowane w niniejszej pracy nie wykazały udziału PARP w regulacji transkrypcji genów dla iNOS i TNF $\alpha$ . Inhibitor PARP

3-AB powodował wprowadzenie obniżanie transkrypcji tych genów, jednak ten wynik nie uzyskał potwierdzenia na drodze analizy statystycznej. Przyczyną braku efektu 3-AB może być fakt, że badano zmiany ekspresji tylko po 3 godz. od podania LPS. Jak wykazano w pracy Park i wsp., (2004) inhibitor PARP może wzmacniać lub hamować ekspresję genu w zależności od czasu indukcji.

Wyniki prezentowane w niniejszej pracy wykazały, że w konsekwencji podania LPS zwiększa się produkcja wolnych rodników w mózgu, dochodzi do uszkodzenia DNA, aktywacji PARP i obniżenia stężenia  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>. Ponieważ zjawiska te mogą powodować indukcję apoptozy, podjęto próbę analizy tych procesów. Przy użyciu technik immunocytochemii i mikroskopii elektronowej zaobserwowano translokację czynnika indukującego apoptozę (AIF) z mitochondriów do jądra neuronów w istocie czarnej. Wynik ten potwierdzono metodami Western blottingu. Inhibitory NOS i PARP częściowo hamowały ten proces. Nie stwierdzono natomiast zmian aktywności kaspazy-3 w badanych strukturach mózgu. Pierwsze prace dotyczące udziału PARP w mechanizmach obumierania komórek sugerowały, że śmierć komórek powodowana przez nadmierną aktywację PARP ma cechy nekrozy (Eliasson i wsp., 1997), jednak niedawno odkryto udział PARP w translokacji AIF z mitochondriów do jądra (Yu i wsp., 2002). W tym typie śmierci komórki nie stwierdzono udziału kaspaz. Inhibitor PARP hamował translokację AIF z mitochondriów do jądra, co zgodne jest z wynikami publikowanymi wcześniej (Yu i wsp., 2002; Du i wsp., 2003). Wykazano, że w izolowanych preparatach mitochondriów nadtlenoazotyn wywołuje depolaryzację błony mitochondrialnej, uwalnianie AIF i cytochromu C, ale zahamowanie PARP nie zapobiega uwalnianiu cytochromu C, co wskazuje na wybiórczy wpływ aktywacji PARP na uruchomienie zależnej od AIF apoptozy.

Aby określić specyficzność działania inhibitorów NOS i PARP, sprawdzono ich zdolność zmiatania wolnych rodników. Ponieważ inhibitory PARP są powszechnie używane w badaniach nad udziałem tego enzymu w stanach patologicznych związanych ze stresem wolnorodnikowym, rozróżnienie specyficznego (inhibicja aktywności PARP) i niespecyficznego (zmiatanie wolnych rodników) ich działania jest szczególnie ważne (Hwang i wsp., 2002; Strosznajder i wsp., 2003; Tentori i wsp., 2002). Wyniki badań wskazują, że DHIQ i 3-AB, mają pewne antyoksydacyjne właściwości. 3-AB, strukturalny analog amidu kwasu nikotynowego, jest klasycznym kompetycyjnym inhibitorem PARP, powszechnie używanym przez wielu badaczy. Jednak jego potencjał inhibicyjny jest

stosunkowo niewielki,  $IC_{50}$  wynosi około 33  $\mu$ M (Banasik i wsp., 1992). Wykazano poprzednio, że w stężeniach powyżej 100 mM chroni przed oksydacją wywołaną przez nadtlenek wodoru (Szabo i wsp., 1998). DHIQ ma  $IC_{50}$  dwa rzędy wielkości niższy niż 3-AB (Banasik i wsp., 1992), cechuje się jednak małą specyficznością (Weltin i wsp., 1995). DPQ nie ma właściwości antyoksydacyjnych i jest silnym inhibitorem PARP ( $IC_{50}$  1,9  $\mu$ M), ale nie jest rozpuszczalny w wodzie. Inhibitory PARP o antyoksydacyjnym charakterze mogą zmniejszać aktywność PARP w sposób pośredni, poprzez zmniejszanie uszkodzeń wolnorodnikowych DNA. Pojawia się również pytanie, czy po reakcji z wolnym rodnikiem pozostają specyficznymi inhibitorami PARP. Używany w niniejszej pracy inhibitor PARP – 3-AB wykazuje pewne właściwości antyoksydacyjne, jednak są one niewielkie w porównaniu do powszechnie używanych antyoksydantów, jak np. resveratrol, Trolox czy Tempol. Spośród przebadanych inhibitorów NOS żaden nie wykazywał właściwości antyoksydacyjnych.

Z danych literaturowych wynika, że zmiany wywoływane przez LPS są często zależne od wybranego modelu zwierzęcego, dawki i sposobu podania LPS, a także wybranego do analizy czasu. Również sposób podania inhibitorów NOS (miejscowo lub systemowo), ma decydujący wpływ na ich efekt działania (Paul-Clark i wsp., 2001). Systemowe podanie inhibitorów NOS łagodziło przebieg zapalenia opłucnej, natomiast podane miejscowo te same inhibitory pogarszały stan, co sugeruje, że  $NO^{\bullet}$  miejscowo może działać protekcyjnie. Lokalne zahamowanie syntezy  $NO^{\bullet}$  powodowało wzrost stężenia histaminy, chemokin i anionorodnika ponadtlenkowego i leukotrienu B4 w miejscu zapalenia.

Wyniki prezentowane w niniejszej pracy wskazują, że cNOS bierze udział w generowaniu stresu wolnorodnikowego w mózgu po systemowym podaniu LPS. Oprócz bezpośredniego pro-oksydacyjnego działania  $NO^{\bullet}$  możliwe jest też działanie polegające na modulowaniu transkrypcji genów zależnych od NF- $\kappa$ B.

**VII. PODSUMOWANIE I WNIOSKI:**

1. Działanie LPS, bezpośrednie lub pośrednie, na komórki śródbłónka naczyniowego w hodowli (HUVEC), powoduje uwalnianie wolnych rodników i uszkodzenia makromolekuł, co potencjalnie może wpływać na stan funkcjonalny komórek naczyń krwionośnych. Uzyskane z zastosowaniem inhibitorów NOS i donorów NO wyniki wykazują, że we wczesnych etapach stresu oksydacyjnego tlenek azotu działa protekcyjnie na komórki śródbłónka.
2. Analiza ultrastrukturalna morfologiczna wykazała, że obwodowe podanie LPS powoduje zmiany degeneracyjne w licznych neuronach istoty czarnej. Obserwowano wśród nich morfologiczne odpowiedniki autofagii. Stwierdzono również zmiany morfologiczne w niektórych naczyniach włosowatych, co wskazuje, że LPS powodować może zaburzenie ich funkcji.
3. Obwodowe podanie LPS aktywuje procesy zapalne w mózgu, o czym świadczy indukcja ekspresji genów dla iNOS i TNF $\alpha$ . Stwierdzony wzrost aktywności iNOS w istocie czarnej, przy braku zmian w innych badanych częściach mózgu sugeruje, że struktura ta jest szczególnie wrażliwa na uszkodzenia.
4. LPS powoduje powstanie stresu oksydacyjnego w mózgu. Protekcyjne działanie inhibitorów poszczególnych izoform NOS w stosunku do uszkodzeń wolnorodnikowych lipidów, zaburzeń energetycznych i translokacji czynnika indukującego apoptozę (AIF) wykazuje, że nie tylko iNOS, ale również cNOS bierze udział w kaskadzie zjawisk indukowanych w mózgu przez dootrzewnowe podanie LPS.
5. Stres wolnorodnikowy wywołany podaniem LPS powoduje również wzrost aktywności PARP-1 w jądrze i spadek stężenia jego substratu  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>. Działanie inhibitora PARP-1 świadczy o istotnym znaczeniu tego enzymu w kaskadzie zjawisk molekularnych prowadzących do obumierania komórek mózgu.



## VIII. STRESZCZENIE

Oksydacyjne uszkodzenia makromolekuł, obserwowane w wielu chorobach układu nerwowego, są przyczyną dalszych poważnych zaburzeń metabolizmu i funkcji komórki. Do szczególnie biologicznie ważnych wolnych rodników należy tlenek azotu syntetyzowany przez syntazę tlenku azotu (NOS). Związek ten reguluje funkcje układu krążenia, odpornościowego i nerwowego. W zależności od stężenia i środowiska wykazuje zróżnicowane działanie. Fizjologiczne działanie tlenku azotu w głównej mierze zależy od aktywacji cykazy guanylanowej, co widoczne jest w regulacji napięcia mięśniówki naczyń krwionośnych i w jego funkcji jako zwrotnego przekaźnika informacji w synapsie. NO<sup>•</sup> może też hamować agregację płytek krwi, adhezję leukocytów, modulować aktywność czynników transkrypcyjnych i wielu enzymów. Tlenek azotu produkowany w nadmiernych ilościach hamuje łańcuch oddechowy i glikolizę, może wpływać na cykl komórkowy oraz aktywować procesy ADP-rybozylacji i nitrozytacji białek. Tlenek azotu jako wolny rodnik wchodzi w reakcje chemiczne indukujące powstawanie reaktywnych form tlenu, i w ten sposób przyczynia się do powstawania uszkodzeń wolnorodnikowych makromolekuł. Szczególnie reaktywnym produktem jest nadtlenoazotyn, który doprowadza do nadprzepuszczalności mitochondriów i uwalniania cytochromu C, a jego udział w uszkodzeniach oksydacyjnych udowodniono w wielu stanach patologicznych. Jednym z głównych źródeł wolnych rodników w organizmie są komórki pobudzonego układu odpornościowego. Stany zapalne towarzyszą zarówno ostrym, jak i przewlekłym schorzeniom ośrodkowego układu nerwowego. Obserwowane są po urazach i niedokrwieniu mózgu, ale również w chorobach neurodegeneracyjnych. Badania ostatnich paru lat wykazały, że także uogólniony stan zapalny, występujący w czasie sepsy (wywołanej najczęściej przez składnik ściany komórkowej bakterii gramujemnych, lipopolisacharyd (LPS)) może powodować patologiczne zmiany w funkcjonowaniu bariery krew-mózg i neurodegenerację w mózgu. Uważa się, że za uszkodzenia obserwowane w stanach zapalnych odpowiedzialny jest w dużym stopniu tlenek azotu syntetyzowany przez indukowaną izoformę NOS, zdolną do długotrwałej produkcji wysokich stężeń NO<sup>•</sup>. Niedawne odkrycia zasugerowały jednak, że również konstytutywne izoformy nNOS i eNOS mogą uczestniczyć w generowaniu wolnorodnikowych uszkodzeń mózgu w stanach zapalnych. Jądrowym odbiorcą wielu procesów zachodzących w komórce i molekularnym regulatorem jest polimeraza poli(ADP-rybozy)-1 (PARP-1). W wyniku nadmiernej aktywacji, wywołanej znaczącym wolnorodnikowym uszkodzeniem DNA, PARP-1 powodować może zużycie komórkowych zasobów energii, aktywację procesów apoptozy i

nekrozy. Ponadto PARP-1 wchodząc w interakcje z czynnikami transkrypcyjnymi może wpływać na przebieg stanu zapalnego, a więc i na stres wolnorodnikowy.

Celem niniejszej pracy była analiza znaczenia poszczególnych izoform NOS w stresie oksydacyjnym wywołanym w komórkach śródbłonna naczyniowego w hodowli oraz w mózgu w wyniku obwodowego podania lipopolisacharydu.

Badania prowadzono na dwóch modelach: 1) na komórkach śródbłonna naczyniowego w hodowli (HUVEC), gdzie analizowano rolę  $\text{NO}^\bullet$  w bezpośrednich (LPS; 0-100  $\mu\text{M}$ ) i pośrednich (aktywne granulocyty obojętnochłonne) mechanizmach oddziaływania LPS na wymienione komórki; 2) w modelu *in vivo* badano udział  $\text{NO}^\bullet$  w wolnorodnikowych uszkodzeniach komórek mózgu po podaniu LPS (1 mg/kg m.c. *i.p.*) dorosłym myszom C57Bl6. Przeżywalność komórek HUVEC w hodowli mierzono za pomocą testu redukcji błękitu tiazolowego (MTT), a patologiczne zmiany w neuronach oceniano przy użyciu mikroskopii elektronowej. Do pomiaru poziomu stresu oksydacyjnego użyto specyficznych sond fluorescencyjnych  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  i TyrFluo w połączeniu z technikami fluorymetrii, immunochemii i mikroskopii konfokalnej. Analizowano również stężenie produktów procesu oksydacji lipidów i białek (TBARS-y i grupy karbonylowe), a stan energetyczny oceniano na podstawie poziomu  $\beta\text{-NAD}^+$ . Aktywność NOS oznaczano metodą izotopową, mierząc ilość powstającej L-cytruliny. Aktywność PARP-1 oceniano przez immunochemiczną detekcję polimerów ADP-rybozy, a aktywność kaspazy-3 mierzono używając flourogennego substratu. Translokację mitochondrialnego czynnika indukującego apoptozę (AIF) do jądra badano metodami immunocytochemii i immunochemii. Zmiany ekspresji genów izoform NOS i  $\text{TNF}\alpha$  analizowano przy użyciu techniki RT-PCR. Udział poszczególnych izoform NOS i PARP-1 w badanych procesach oceniano przy użyciu ich specyficznych inhibitorów,  $\text{N}^G$ -nitro-L-argininy (NNLA) inhibitora nNOS i eNOS, 7-nitroindazolu (7-NI) preferencyjnego inhibitora nNOS, 1400W jako inhibitora iNOS i 3-aminobenzamidu (3-AB) inhibitora PARP-1. Do badania roli  $\text{NO}^\bullet$  *in vitro* zastosowano donor tlenku azotu DEANO.

W badaniach na komórkach HUVEC w hodowli stwierdzono, że wysokie stężenia LPS (10-100  $\mu\text{M}$ ) wywołują stres oksydacyjny i obumieranie komórek. Inhibitory NOS nie miały wpływu na obserwowane zjawiska. W obecności aktywnych granulocytów obojętnochłonnych zaobserwowano oksydację białek komórek HUVEC. W krótkich czasach inkubacji uszkodzenia dotyczyły wyłącznie białek zewnątrzkomórkowych, nie obserwowano oksydacji białek wewnątrzkomórkowych. DEANO w zależności od stężenia i czasu sposób zapobiegał uszkodzeniom oksydacyjnym białek spowodowanym przez aktywne granulocyty.

Dalsze badania przeprowadzono na modelu zwierzęcym. Dootrzewnowe podanie myszom LPS powodowało rozwój ogólnoustrojowego stanu zapalnego, któremu towarzyszył zespół objawów, takich jak hipotermia, apatia, hipokineza i brak łaknienia. Obserwowano patologiczne zmiany w ultrastrukturze wielu neuronów istoty czarnej oraz zmiany degeneracyjne w niektórych dendrytach wskazujące na uruchomienie mechanizmów związanych z apoptozą i/lub autofagią. Zanotowano wzrost aktywności iNOS w śródmózgowiu/międzymózgowiu 6 godz. od podania LPS, nie stwierdzono jednak w badanych punktach czasowych wzrostu aktywności NOS w korze ani w mózdzku. Systemowe podanie myszom LPS powodowało wzrost ekspresji genu dla iNOS i TNF $\alpha$  w śródmózgowiu, nie stwierdzono natomiast wzrostu transkrypcji genów dla nNOS i eNOS. Zaobserwowano wzrost aktywności PARP-1 i spadek stężenia  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>, co dowodzi, że systemowe podanie LPS powoduje wolnorodnikowe uszkodzenia DNA w mózgu. Również lipidy błon były uszkodzane, co potwierdził zależny od wolnych rodników wzrost stężenia TBARS. W badaniach biochemicznych i immunocytochemicznych mikroskopowo-elektronowych nad mechanizmami śmierci komórek stwierdzono translokację AIF z mitochondriów do jądra, nie zaobserwowano natomiast zmian aktywności kaspazy-3, co świadczy o aktywacji apoptozy na drodze niezależnej od kaspaz. Inhibitory NOS i PARP-1 wykazywały działanie protekcyjne. Spadkowi stężenia  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> zapobiegały zarówno inhibitory NOS jak i PARP, jednak inhibitory NOS nie miały wpływu na aktywność PARP, co sugeruje, że spadek stężenia  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> może być w pewnym stopniu niezależny od aktywności PARP-1, ale zależny od NO<sup>•</sup>. Zaobserwowano protekcyjne działanie inhibitorów NOS i PARP-1 w przypadku peroksydacji lipidów, a także translokacji AIF.

Otrzymane wyniki wskazują, że zarówno indukowana izoforma iNOS, jak i konstytutywna izoforma nNOS mają istotne znaczenie w powstawaniu uszkodzeń wolnorodnikowych w mózgu, i zależnych od nich procesów neurodegeneracji. Chociaż w wybranych czasach po podaniu LPS nie stwierdzono istotnego wzrostu aktywności konstytutywnych izoform, protekcyjne działanie NNLA i przede wszystkim 7-NI potwierdza udział nNOS w kaskadzie procesów wywoływanych przez LPS, której jądrowym odbiorcą jest PARP-1.

## PIŚMIENNICTWO

1. Abu-Soud HM i Hazen SL (2000) Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem*, 275: 5425-30
2. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, 357: 593-615
3. Almeida A i Bolaños JP (2001) A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. *J Neurochem*, 77: 676 - 690
4. Amé JC, Spenlehauer C, de Murcia G (2004) The PARP superfamily. *Bioessays*, 26:882-93
5. Anderson SA , Song S-K, Ackerman JJH i Hotchkiss RS (1999) Sepsis Increases Intracellular Free Calcium in Brain. *J Neurochem*, 72: 2617–2620
6. Andrew PJ, Harant H, Lindley IJ (1995) Nitric oxide regulates IL-8 expression in melanoma cells at the transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun*, 214: 3949-3956
7. Arimoto T, Bing G (2003) Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration. *Neurobiol Dis*, 12: 35-45
8. Asakawa T and Matsushita S (1980) Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids*, 15: 137-140
9. Back MR, Sarac TP, Moldawer LL, Welborn MB, Seeger JM, Huber TS (2000) Laparotomy prevents lethal endotoxemia in a murine sequential insult model by an IL-10-dependent mechanism. *Shock*, 14: 157-162
10. Bakker J, Grover R, McLuckie A, Holzappel L, Andersson J, Lodato R, Watson D, Grossman S, Donaldson J, Takala J, Glaxo Wellcome International Septic Shock Study Group (2004) Administration of the nitric oxide synthase inhibitor NG-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88) by intravenous infusion for up to 72 hours can promote the resolution of shock in patients with severe sepsis: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter study (study no. 144-002). *Crit Care Med*, 32: 1-12
11. Ballou DP, Zhao Y, Brandish PE, Marletta MA (2002) Revisiting the kinetics of nitric oxide (NO) binding to soluble guanylate cyclase: the simple NO-binding model is incorrect. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 12097-12101
12. Bal-Price A, Brown GC (2001) Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J Neurosci*, 21: 6480-6491
13. Banasik M, Komura H, Shimoyama M, Ueda K (1992) Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase. *J Biol Chem*, 267: 1569-1575
14. Bandyopadhyay A, Chakder S, Rattan S (1997) Regulation of inducible and neuronal nitric oxide synthase gene expression by interferon-gamma and VIP. *Am J Physiol*, 272: C1790-1797

15. Bannerman DD, Eiting KT, Winn RK, Harlan JM (2004) FLICE-like inhibitory protein (FLIP) protects against apoptosis and suppresses NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide. *Am J Pathol*, 165: 1423-1431
16. Bannerman DD, Goldblum SE (1999) Direct effects of endotoxin on the endothelium: barrier function and injury. *Lab Invest*, 79: 1181-1199
17. Bannerman DD, Tupper JC, Ricketts WA, Bennett CF, Winn RK, Harlan JM (2001) A constitutive cytoprotective pathway protects endothelial cells from lipopolysaccharide-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 276: 14924-14932
18. Bates TE, Loesch A, Burnstock G, Clark JB (1995) Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 213: 896-900
19. Baylis SA, Strijbos PJLM, Sandra A, Russell RJ, Rijhsinghani A, Charles IG, Weiner CP (1999) Temporal expression of inducible nitric oxide synthase in mouse and human placenta. *Mol Hum Rep*, 5: 277-286
20. Beckman J, Beckman T, Chen J, Marshall P, Freeman B (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 1620-1624
21. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 1620-1624
22. Beckman JS, Koppenol WH (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*, 271: C1424-1437
23. Bellamy TC, Wood J, Garthwaite J (2002) On the activation of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 507-510
24. Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E, Vescovi A, Bagetta G, Kollias G, Meldolesi J, Volterra A (2001) CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci*, 4: 702-710
25. Bhagat K, Hingorani AD, Palacios M, Charles IG, Vallance P (1999) Cytokine-induced venodilatation in humans in vivo: eNOS masquerading as iNOS. *Cardiovasc Res*, 41: 754-764
26. Biegon A, Alvarado M, Budinger TF, Grossman R, Hensley K, West MS, Kotake Y, Ono M, Floyd RA (2002) Region-selective effects of neuroinflammation and antioxidant treatment on peripheral benzodiazepine receptors and NMDA receptors in the rat brain. *J Neurochem*, 82: 924-934
27. Boeckmann B, Bairoch A, Apweiler R, Blatter M-C, Estreicher A, Gasteiger E, Martin MJ, Michoud K, O'Donovan C, Phan I, Pilbout S, Schneider M (2003) The Swiss-Prot protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res*, 31: 365-370
28. Böhler T, Waiser J, Hepburn H, Gaedeke J, Lehmann C, Hambach P, Budde K, Neumayer HH (2000) TNF-alpha and IL-1alpha induce apoptosis in subconfluent rat mesangial cells. Evidence for the involvement of hydrogen peroxide and lipid peroxidation as second messengers. *Cytokine*, 12: 986-991

29. Boulton CL, Southam E, Garthwaite J (1995) Nitric oxide-dependent long-term potentiation is blocked by a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Neuroscience*, 69: 699-703
30. Boveris A, Alvarez S, Navarro A (2002) The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free Rad Biol Med*, 33: 1186-1193
31. Boveris A, Costa LE, Cadenas E, Poderoso JJ (1999) Regulation of mitochondrial respiration by adenosine diphosphate, oxygen and nitric oxide. *Methods Enzymol*, 301: 188-198
32. Brandes RP, Koddenberg G, Gwinner W, Kim D, Kruse HJ, Busse R, Mügge A (1999) Role of increased production of superoxide anions by NAD(P)H oxidase and xanthine oxidase in prolonged endotoxemia. *Hypertension*, 33: 1243-1249
33. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, Davies NA, Cooper CE, and Singer M (2002) Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 360: 219–223
34. Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS, Novelli M, Stidwill R, Taylor V, Smolenski RT, Singer M (2004) Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286: R491-7
35. Bredt DS and Snyder SH (1990) Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 682-685
36. Bredt DS, Ferris CD, Snyder SH (1992) Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol Chem*, 267: 10976-10981
37. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH (1991) Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, 351: 714-718
38. Brown GC (2001) Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta*, 1504, 46-57
39. Brüne B, Lapetina EG (1989) Activation of a cytosolic ADP-ribosyltransferase by nitric oxide-generating agents. *J Biol Chem*, 264: 8455-8458
40. Buga GM, Griscavage JM, Rogers NE, Ignarro LJ (1993) Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide. *Circ Res*, 73: 808-812
41. Busse R, Mulch A (1990) Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett*, 265: 133-136
42. Bustamante J, Bersier G, Badin RA, Cymeryng C, Parodi A, Boveris A (2002) Sequential NO production by mitochondria and endoplasmic reticulum during induced apoptosis. *Nitric Oxide*, 6: 333-341
43. Butler AJ, Ordahl CP (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase binds with transcription enhancer factor 1 to MCAT1 elements to regulate muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol*, 9: 296-306
44. Butler AR, Rhodes P (1997) Chemistry, analysis, and biological roles of S-nitrosothiols. *Anal Biochem*, 249: 1-9

45. Cadenas E, Poderoso JJ, Antunes F, Boveris A (2000) Analysis of the pathways of nitric oxide utilization in mitochondria. *Free Rad Res*, 33: 747-756
46. Carey C, Siegfried MR, Ma XL, Weyrich AS, Lefler AM (1992) Antishock and endothelial protective actions of a NO donor in mesenteric ischemia and reperfusion. *Circ Shock*, 38: 209-216
47. Carreras MC, Franco MC, Peralta JG, Poderoso JJ (2004) Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease. *Mol Aspects Med*, 25: 125-39
48. Cervellera MN, Sala A (2000) Poly(ADP-ribose) polymerase is a B-MYB coactivator. *J Biol Chem*, 275: 10692-10696
49. Chakravarty S, Herkenham M (2005) Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines. *J Neurosci*, 25: 1788-1796
50. Chalimoniuk M, Strosznajder JB (1998) Aging modulates nitric oxide synthesis and cGMP levels in hippocampus and cerebellum. Effects of amyloid beta peptide. *Mol Chem Neuropathol*, 35: 77-95
51. Chan JY, Ou CC, Wang LL, Chan SH (2004) Heat shock protein 70 confers cardiovascular protection during endotoxemia via inhibition of nuclear factor-kappaB activation and inducible nitric oxide synthase expression in the rostral ventrolateral medulla. *Circulation*, 110: 3560-3566
52. Chang WJ, Alvarez-Gonzalez R (2001) The sequence-specific DNA binding of NF-kappa B is reversibly regulated by the automodification reaction of poly (ADP-ribose) polymerase 1. *J Biol Chem*, 276: 47664-47670
53. Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE (1999) AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett*, 443: 285-289
54. Cherian L, Goodman JC, Robertson CS (2000) Brain nitric oxide changes after controlled cortical impact injury in rats. *J Neurophysiol*, 83: 2171-2178
55. Chiarugi A, Moskowitz MA (2003) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity promotes NF-kB-driven transcription and microglial activation: implication for neurodegenerative disorders. *J Neurochem*, 85: 306-317
56. Choi HJ, Kim SW, Lee SY, Hwang O (2003) Dopamine-dependent cytotoxicity of tetrahydrobiopterin: a possible mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 86: 143-152
57. Choi KB, Wong F, Harlan JM, Chaudhary PM, Hood L, Karsan A (1998) Lipopolysaccharide mediates endothelial apoptosis by a FADD-dependent pathway. *J Biol Chem*, 273: 20185-20188
58. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162:156-159
59. Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA, Bredt DS (1999) PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem*, 274: 27467-27473

60. Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM (2001) Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 282: 1075-1079
61. Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, Schapira AH (1994) Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett*, 345: 50-54.
62. Cohen-Armon M, Visochek L, Katzoff A, Levitan D, Susswein AJ, Klein R, Valbrun M, Schwartz JH (2004) Long-term memory requires polyADP-ribosylation. *Science*, 304: 1820-1822
63. Colasanti M, Cavalieri E, Persichini T, Mollace V, Mariotto S, Suzuki H, Lauro GM (1997) Bacterial lipopolysaccharide plus interferon-gamma elicit a very fast inhibition of a Ca<sup>2+</sup>-dependent nitric-oxide synthase activity in human astrocytoma cells. *J Biol Chem*, 272: 7582-7585
64. Colasanti M, Persichini T (2000) Nitric oxide: an inhibitor of NF-kappaB/Rel system in glial cells. *Brain Res Bull*, 52:155-61
65. Colasanti M, Persichini T, Cavalieri E, Fabrizi C, Mariotto S, Menegazzi M, Lauro GM, Suzuki H (1999) Rapid inactivation of NOS-I by lipopolysaccharide plus interferon-gamma-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, 274: 9915-9917
66. Connelly L, Madhani M, Hobbs A (2005) Resistance to endotoxic shock in endothelial nitric oxide synthase (eNOS) knockout mice: A pro-inflammatory role for eNOS-derived NO in vivo. *J Biol Chem*, 280: 10040-10046
67. Connelly L, Palacios\_Callender M, Ameixa C, Moncada S, Hobbs AJ (2001) Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *J Immunol*, 166: 3873-3881
68. Cooper CE (1999) Nitric oxide and iron proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1411: 290-309
69. Cosentino F, Sill JC and Katusic ZS (1994) Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions *Hypertension*, 23: 229-235.
70. Crow JP, Beckman JS (1996) The importance of superoxide in nitric oxide-dependent toxicity: evidence for peroxynitrite-mediated injury. *Adv Exp Med Biol*, 387: 147-161
71. Czapski GA, Avram D, Sakharov DV, Wirtz KW, Strosznajder JB, Pap EH (2002) Activated neutrophils oxidize extracellular proteins of endothelial cells in culture: effect of nitric oxide donors. *Biochem J*, 365: 897-902
72. Czapski GA, Avram D, Wirtz KWA, Pap EHW, Strosznajder JB (2001) Detection of protein oxidation in endothelial cells by fluorescently labelled tyramine. *Med Sci Monit*. 7, 606-609
73. Czapski GA, Cakała M, Kopczuk D, Strosznajder JB (2004) Effect of Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on oxidative stress evoked hydroxyl radical level and macromolecules oxidation in cell free system of rat brain cortex. *Neurosci Lett*, 356: 45-48



74. Daphna EM, Michaela S, Eynat P, Irit A, Rimon S (1998) Association of myeloperoxidase with heparin: oxidative inactivation of proteins on the surface of endothelial cells by the bound enzyme. *Mol Cell Biochem*, 183: 55-61
75. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Shin WS, Liao JK (1995) Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*, 96: 60-68
76. De Sanctis GT, Mehta S, Kobzik L, Yandava C, Jiao A, Huang PL, and Drazen JM (1997) Contribution of type I NOS to expired gas NO and bronchial responsiveness in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 273: L883-L888.
77. Dedio J, König P, Wohlfart P, Schroeder C, Kummer W, Müller-Esterl W (2001) NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity. *FASEB J*, 15: 79-89
78. Di Stasi AM, Mallozzi C, Macchia G, Petrucci TC, Minetti M (1999) Peroxynitrite induces tyrosine nitration and modulates tyrosine phosphorylation of synaptic proteins. *J Neurochem*, 73: 727-735
79. Diaz-Cazorla M, Perez-Sala D, Lamas S (1999) Dual effect of nitric oxide donors on cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*, 10: 943-952
80. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 399: 601-605
81. Draper AJ, Hammock BD (1999) Soluble epoxide hydrolase in rat inflammatory cells is indistinguishable from soluble epoxide hydrolase in rat liver. *Toxicol Sci*, 50: 30-35
82. Dreyer J, Schleicher M, Tappe A, Schilling K, Kuner T, Kusumawidijaja G, Müller-Esterl W, Oess S, Kuner R (2004) Nitric oxide synthase (NOS)-interacting protein interacts with neuronal NOS and regulates its distribution and activity. *J Neurosci*, 24: 10454-10465
83. Du L, Zhang X, Han YY, Burke NA, Kochanek PM, Watkins SC, Graham SH, Carcillo JA, Szabó C, Clark RS (2003) Intra-mitochondrial poly(ADP-ribosylation) contributes to NAD<sup>+</sup> depletion and cell death induced by oxidative stress. *J Biol Chem*, 278: 18426-18433
84. Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C (2002) Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 277: 38079–38086
85. Eliasson MJ, Sampei K, Mandir AS, Hurn PD, Traystman RJ, Bao J, Pieper A, Wang ZQ, Dawson TM, Snyder SH, Dawson VL (1997) Poly (ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat. Med*, 3: 1089-1095
86. Endres M, Scott G, Namura S, Salzman AL, Huang PL, Moskowitz MA, Szabo C (1998) Role of peroxynitrite and neuronal nitric oxide synthase in the activation of poly(ADP-ribose) synthetase in a murine model of cerebral ischemia-reperfusion. *Neurosci Lett*, 248: 41-44

87. Escames G, Leon J, Macias M, Khaldy H, Acuna-Castroviejo D (2003) Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J*, 17: 932-934
88. Fan J, Frey RS, Malik AB (2003) TLR4 signaling induces TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase. *J Clin Invest*, 112: 1234-1243
89. Fan J, Frey RS, Rahman A, Malik AB (2002) Role of neutrophil NADPH oxidase in the mechanism of tumor necrosis factor- $\alpha$  -induced NF- $\kappa$ B activation and intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells. *J Biol Chem*, 277: 3404-3411
90. Fang M, Jaffrey SR, Sawa A, Ye K, Luo X, Snyder SH (2000) Dexas1: a G protein specifically coupled to neuronal nitric oxide synthase via CAPON. *Neuron*, 28: 183-193
91. Farkas B, Magyarlaki M, Csete B, Nemeth J, Rablóczy G, Bernath S, Literati Nagy P, Sumegi B (2002) Reduction of acute photodamage in skin by topical application of a novel PARP inhibitor. *Biochem Pharmacol*, 63: 921– 932
92. Fassbender K, Walter S, Kühl S, Landmann R, Ishii K, Bertsch T, Stalder AK, Muehlhauser F, Liu Y, Ulmer AJ, Rivest S, Lentschat A, Gulbins E, Jucker M, Staufienbiel M, Brechtel K, Walter J, Multhaup G, Penke B, Adachi Y, Hartmann T, Beyreuther K (2004) The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. *FASEB J*, 18: 203-205
93. Fittschen C, Sandhaus RA, Worthen GS, Henson PM (1988) Bacterial lipopolysaccharide enhances chemoattractant-induced elastase secretion by human neutrophils. *J Leukoc Biol*, 43: 547-556
94. Furchgott RF (1999) Endothelium- derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Angew Chem Int Ed*, 38: 1870-1880
95. Gaal JC, Smith KR, Pearson CK (1987) Cellular euthanasia mediated by a nuclear enzyme: a central role for nuclear ADP-ribosylation in cellular metabolism. *Trends Biol Sci*, 12: 129-130
96. Gao S, Chen J, Brodsky SV, Huang H, Adler S, Lee JH, Dhadwal N, Cohen-Gould L, Gross SS, Goligorsky MS (2004) Docking of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) to the mitochondrial outer membrane: a pentabasic amino acid sequence in the autoinhibitory domain of eNOS targets a proteinase K-cleavable peptide on the cytoplasmic face of mitochondria. *J Biol Chem*, 279: 15968-15974
97. García-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC (1998) Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature*, 392: 821-824
98. Garcion E, Sindji L, Montero-Menei C, Andre C, Brachet P, Darcy F (1998) Expression of inducible nitric oxide synthase during rat brain inflammation: regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Glia*, 22: 282-94.
99. Gay NJ, Packman LC, Weldon MA, Barna JC (1991) A leucine-rich repeat peptide derived from the Drosophila Toll receptor forms extended filaments with a beta-sheet structure. *FEBS Lett*, 291: 87-91.
100. Giulivi C (1998) Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism. *Biochem J*, 332: 673-679

101. Giusti-Paiva A, Branco LG, de Castro M, Antunes-Rodrigues J, Carnio EC (2003) Role of nitric oxide in thermoregulation during septic shock: involvement of vasopressin. *Eur J Physiol*, 447: 175–180
102. Glezer I, Munhoz CD, Kawamoto EM, Marcourakis T, Avellar MC, Scavone C (2003a) MK-801 and 7-Ni attenuate the activation of brain NF-kappa B induced by LPS. *Neuropharmacology*, 45: 1120-1129
103. Glezer I, Zekki H, Scavone C, Rivest S (2003b) Modulation of the innate immune response by NMDA receptors has neuropathological consequences. *J Neurosci*, 23: 11094-11103
104. Golser R, Gorren AC, Leber A, Andrew P, Habisch HJ, Werner ER, Schmidt K, Venema RC, Mayer B (2000) Interaction of endothelial and neuronal nitric-oxide synthases with the bradykinin B2 receptor. Binding of an inhibitory peptide to the oxygenase domain blocks uncoupled NADPH oxidation. *J Biol Chem*, 275: 5291-5296
105. Goss SPA, Kalyanaraman B, Hogg N (1999) Antioxidant effect of nitric oxide and nitric oxide donor compounds on low-density lipoprotein oxidation. *Meth. Enzymol*, 301: 444-453
106. Grammas P, Ottman T, Reimann-Philipp U, Larabee J, Weigel PH (2004) Injured brain endothelial cells release neurotoxic thrombin *J Alzheimers Dis*, 6: 275-281
107. Gratton JP, Fontana J, O'Connor DS, Garcia-Cardena G, McCabe TJ, Sessa WC (2000) Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. *J Biol Chem*, 275: 22268-22272
108. Griscavage JM, Rogers NE, Sherman MP, Ignarro LJ (1993) Inducible nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide. *J Immunol*, 151: 6329-6337
109. Gross A, Yin X, Wang K., Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, and Korsmeyer SJ (1999) Caspase Cleaved BID Targets Mitochondria and Is Required for Cytochrome c Release, while BCL-XL Prevents This Release but Not Tumor Necrosis Factor-R1/Fas Death. *J Biol Chem*, 274: 1156-1163.
110. Guerra-Romero L, Tureen JH, Fournier MA, Makrides V, Tauber MG (1993) Amino acids in cerebrospinal and brain interstitial fluid in experimental pneumococcal meningitis. *Pediatr Res*, 33: 510-513
111. Gunther MR, Hsi LC, Curtis JF, Gierse JK, Marnett LJ, Eling TE, Mason RP (1997) Nitric oxide trapping of the tyrosyl radical of prostaglandin H synthase-2 leads to tyrosine iminoxyl radical and nitrotyrosine formation. *J Biol Chem*, 272: 17086-17090
112. Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S (1996) Vitamin C and E prevent lipopolysaccharide-induced apoptosis in human endothelial cells by modulation of Bcl-2 and Bax. *Eur J Pharmacol*, 317: 407-411
113. Hallman M, Rämert M, Ezekowitz RA (2001) Toll-like receptors as sensors of pathogens. *Pediatr Res*, 50: 315-321
114. Halmosi R, Berente Z, Osz E, Toth K, Literati-Nagy P, Sumegi B. (2001) Effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on the ischemia-reperfusion-induced

- oxidative cell damage and mitochondrial metabolism in Langendorff heart perfusion system. *Mol Pharmacol*, 59: 1497-1505
115. Hasko G, Mabley JG, Nemeth ZH, Pacher P, Deitch EA, Szabo C (2002) Poly(ADP-ribose) Polymerase is a Regulator of Chemokine Production: Relevance for the Pathogenesis of Shock and Inflammation. *Mol Med*, 8: 283-289
  116. Hassa PO, Hottiger MO (1999) A role of poly (ADP-ribose) polymerase in NF-kappaB transcriptional activation. *Biol Chem*, 380: 953-959
  117. Haynes V, Elfering S, Traaseth N, Giulivi C (2004) Mitochondrial nitric-oxide synthase: enzyme expression, characterization, and regulation. *J Bioenerg Biomembr*, 36: 341-346
  118. Heales SJR, Bolaños JP, Stewart VC, Brookes PS, Land JM, Clark JB (1999) Nitric oxide, mitochondria and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1410: 215-228
  119. Heinecke JW, Li W, Daehnke III HL, Goldstain JA (1993) Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. *J Biol Chem*, 268: 4069-4077
  120. Heinloth A, Heermeier K, Raff U, Wanner C, Galle J (2000) Stimulation of NADPH oxidase by oxidized low-density lipoprotein induces proliferation of human vascular endothelial cells. *J Am Soc Nephrol*, 11: 1819-1825
  121. Hemmens B, Woschitz S, Pitters E, Klösch B, Völker C, Schmidt K, Mayer B (1998) The protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (PIN): characterization of its action on pure nitric oxide synthases. *FEBS Lett*, 430: 397-400
  122. Heneka MT, Feinstein DL (2001) Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons. *J Neuroimmunol*, 114: 8-18
  123. Henrich M, Hoffmann K, König P, Gruss M, Fischbach T, Gödecke A, Hempelmann G, Kummer W (2002) Sensory neurons respond to hypoxia with NO production associated with mitochondria. *Mol Cell Neurosci*, 20: 307-322
  124. Hevel JM, White KA, Marletta MA (1991) Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem*, 266: 22789-22791
  125. Holland JA, O'Donnell RW, Chang MM, Johnson DK, Ziegler LM (2000) Endothelial cell oxidant production: effect of NADPH oxidase inhibitors. *Endothelium*, 7: 109-119
  126. Holst O, Ulmer AJ, Brade H, Flad HD, Rietschel ET (1996) Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 16: 83-104
  127. Hu Q, Corda S, Zweier JL, Capogrossi MC, Ziegelstein RC (1998) Hydrogen peroxide induces intracellular calcium oscillations in human aortic endothelial cells. *Circulation*, 97: 268-275
  128. Hwang J-J, Choi So-Y, Koh J-Y (2002) The role of NADPH oxidase, neuronal nitric oxide synthase and poly(ADP-ribose) polymerase in oxidative neuronal death induced in cortical cultures by brain derived neurotrophic factor and neurotrophin – 4/5. *J Neurochem*, 82: 894-902
  129. Ignarro LI (1999) NO in vascular biology. *Angew Chem Int Ed*, 38: 1882-1892

130. Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C (1999) Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: An overview. *J Cardiovasc Pharmacol*, 34: 879-886
131. Ignarro LJ, Fukuto JM, Griscavage JM, Rogers NE, Byrns RE (1993) Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 8103-8107
132. Iravani MM, Kashefi K, Mander P, Rose S, Jenner P (2002) Involvement of inducible nitric oxide synthase in inflammation-induced dopaminergic neurodegeneration. *Neuroscience*, 110: 49-58
133. Iwase K, Miyataka K, Shimizu A, Nagasaki A, Gotoh T, Mori M, Takiguchi M (2000) Induction of endothelial nitric-oxide synthase in rat brain astrocytes by systemic lipopolysaccharide treatment. *J Biol Chem* 275, 275: 11929-11933
134. Jegliński W (1997) Mózg a układ odpornościowy.; w Górski T, Grabowska A, Zagrodzka J, Mózg a zachowanie, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1997
135. Jorcke D, Ziegler M, Herrero-Yraola A and Schweiger M (1998) Enzymic, cysteinespecific ADP-ribosylation in bovine liver mitochondria. *Biochem J*, 332: 189-193
136. Kameoka M, Ota K, Tetsuka T, Tanaka Y, Itaya A, Okamoto T, Yoshihara K (2000) Evidence for regulation of NF-kappaB by poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem J*, 346: 641-649
137. Kanayama N, Maehara K, Suzuki M, Fujise Y, Terao T (1997) The role of chondroitin sulfate chains of urinary trypsin inhibitor in inhibition of LPS-induced increase of cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in HL60 cells and HUVEC cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 238: 560-564
138. Kannan P, Yu Y, Wankhade S, Tainsky MA (1999) PolyADP-ribose polymerase is a coactivator for AP-2-mediated transcriptional activation. *Nucleic Acids Res* 27: 866-874
139. Kantrow SP, Taylor DE, Carraway MS, Piantadosi CA (1997) Oxidative metabolism in rat hepatocytes and mitochondria during sepsis. *Arch Biochem Biophys*, 345: 278-288
140. Katsuyama K, Shichiri M, Marumo F, Hirata Y (1998) NO inhibits cytokine-induced iNOS expression and NF-kappaB activation by interfering with phosphorylation and degradation of IkappaB-alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18: 1796-1802
141. Katsuyama K, Shichiri M, Marumo F, Hirata Y (1998) NO inhibits cytokine-induced iNOS expression and NF-kappaB activation by interfering with phosphorylation and degradation of IkappaB-alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18: 1796-1802
142. Kaul M, Garden GA, Lipton SA (2001) Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature*, 410: 988-994
143. Kawai T, Akira S (2005) Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res Ther*, 7: 12-9
144. Keefer LK, Nims RW, Dawies KM, Wink DA (1996) "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diulates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods Enzymol*, 268: 281-293

145. Kim KY, Kim BG, Kim SO, Yoo SE, Kwak YG, Chae SW, Hong KW (2002) Prevention of lipopolysaccharide-induced apoptosis by (2S,3S,4R)-N"-cyano-N-(6-amino-3,4-dihydro-3-hydroxy-2-methyl-2-dimethoxymethyl-2H-benzopyran-4-yl)-N'-benzylguanidine, a benzopyran analog, in endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 300: 535-42.
146. Kim W-G, Mohny RP, Wilson B, Jeohn G-H, Liu B i Hong J-S (2000) Regional Difference in Susceptibility to Lipopolysaccharide-Induced Neurotoxicity in the Rat Brain: Role of Microglia. *J Neurosci*, 20: 6309-6316.
147. Kissner R, Nauser T, Kurz C, Koppenol WH. (2003) Peroxynitrous acid--where is the hydroxyl radical? *IUBMB Life*, 55: 567-572
148. Koeck T, Fu X, Hazen SL, Crabb JW, Stuehr DJ, Aulak KS (2004) Rapid and selective oxygen-regulated protein tyrosine denitration and nitration in mitochondria. *J Biol Chem*, 279: 27257-27262
149. Koedel U, Paul R, Winkler F, Kastenbauer S, Huang PL, Pfister HW (2001) Lack of endothelial nitric oxide synthase aggravates murine pneumococcal meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60: 1041-1050
150. Kone BC, Kunczewicz T, Zhang W, Yu ZY (2003) Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285: F178-190
151. Koppenol WH (1998) The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Rad Biol Med*, 25: 385-391
152. Kozlov AV, Staniek K, Nohl H (1999) Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. *FEBS Lett*, 454: 127-130
153. Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF (1986) PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res*, 59: 612-619
154. Kuo WN, Kanadia RN, Shanbhag VP, Toro R (1999) Denitration of peroxynitrite-treated proteins by 'protein nitrates' from rat brain and heart. *Mol Cell Biochem*, 201: 11-16
155. Lacroix S, Feinstein D, Rivest S (1998) The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations. *Brain Pathol*, 8: 625-40
156. Lacza Z, Horn TF, Snipes JA, Zhang J, Roychowdhury S, Horváth EM, Figueroa JP, Kollai M, Szabó C, Busija DW (2004) Lack of mitochondrial nitric oxide production in the mouse brain. *J Neurochem*, 90: 942-951
157. Lacza Z, Puskar M, Figueroa JP, Zhang J, Rajapakse N, Busija DW (2001) Mitochondrial nitric oxide synthase is constitutively active and is functionally upregulated in hypoxia. *Free Rad Biol Med*, 31: 1609-1615
158. Lacza Z, Snipes JA, Zhang J, Horváth EM, Figueroa JP, Szabó C, Busija DW (2003) Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. *Free Radic Biol Med*, 35: 1217-1228
159. Laflamme N, Rivest S (2001) Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J*, 15: 155-163

160. Lander HM, Ogiste JS, Pearce SF, Levi R, Novogrodsky A (1995) Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras. *J Biol Chem*, 270: 7017-7020
161. Lander HM, Sehajpal P, Levine DM, Novogrodsky A (1993) Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds. *J Immunol*, 150: 1509-1516
162. Larsen KE, Sulzer D (2002) Autophagy in neurons: a review. *Histol Histopathol*, 17: 897-908
163. Layé S, Liège S, Li KS, Moze E, Neveu PJ (2001) Physiological significance of the interleukin 1 receptor accessory protein. *Neuroimmunomodulation*, 9: 225-230
164. Le Page C, Sanceau J, Drapier JC, Wietzerbin J (1998) Inhibitors of ADP-ribosylation impair inducible nitric oxide synthase gene transcription through inhibition of NF kappa B activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 243: 451-457
165. Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T (2003) Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 8514-8519
166. Li H, Samouilov A, Liu X, Zweier JL (2004) Characterization of the effects of oxygen on xanthine oxidase-mediated nitric oxide formation. *J Biol Chem*, 279: 16939-16946
167. Li S, Wang Y, Matsumura K, Ballou LR, Morham SG, Blatteis CM (1999) The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2(-/-), but not in cyclooxygenase-1(-/-) mice. *Brain Res*, 825: 86-94
168. Liao Y-Ch, Liang W-G, Chen F-W, Hsu J-H, Yang J-J and Chang M-S (2002) IL-19 Induces Production of IL-6 and TNF- $\alpha$  and Results in Cell Apoptosis Through TNF- $\alpha$  *J Immunol*, 169: 4288-4297
169. Lin HC, Wan FJ, Kang BH, Wu CC, Tseng CJ (1999) Systemic administration of lipopolysaccharide induces release of nitric oxide and glutamate and c-fos expression in the nucleus tractus solitarii of rats. *Hypertension*, 33: 1218-1224
170. Lin HL, Murphy S (1997) Regulation of astrocyte nitric oxide synthase type II expression by ATP and glutamate involves loss of transcription factor binding to DNA. *J Neurochem*, 69: 612-616
171. Lisdero CL, Carreras MC, Meulemans A, Melani M, Aubier M, Boczkowski J, Poderoso JJ (2004) The mitochondrial interplay of ubiquinol and nitric oxide in endotoxemia. *Methods Enzymol*, 382: 67-81
172. Liu Y, Dong W, Chen L, Xiang R, Xiao H, De G, Wang Z, Qi Y (2004) BCL10 mediates lipopolysaccharide/toll-like receptor-4 signaling through interaction with Pellino2. *J Biol Chem*, 279: 37436-37444
173. Lizasoain L, Moro MA, Knowles RG, Darley-Usmar V, and Moncada S (1996) Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. *Biochem J*, 314: 877-880
174. López A, Lorente JA, Steingrub J, Bakker J, McLuckie A, Willatts S, Brockway M, Anzueto A, Holzapfel L, Breen D, Silverman MS, Takala J, Donaldson J, Arneson C,

- Grove G, Grossman S, Grover R (2004) Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit Care Med*, 32: 21-30
175. Lores-Arnaiz S, D'Amico G, Czerniczyniec A, Bustamante J, Boveris A (2004) Brain mitochondrial nitric oxide synthase: in vitro and in vivo inhibition by chlorpromazine. *Arch Biochem Biophys*, 430: 170-177
176. Lowenstein CJ (1999) NO news is good news. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 10953-10954
177. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275
178. Macdonald J, Galley HF, Webster NR (2003) Oxidative stress and gene expression in sepsis. *Br J Anaesth*, 90: 221-232
179. Maejima Y, Adachi S, Ito H, Nobori K, Tamamori-Adachi M, Isobe M (2003) Nitric oxide inhibits ischemia/reperfusion-induced myocardial apoptosis by modulating cyclin A-associated kinase activity. *Cardiovasc Res*, 59: 308-320
180. Martin MU, Wesche H (2002) Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim Biophys Acta*, 1592: 265-280
181. Martina MU, Wesche H (2002) Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family *Biochimica et Biophysica Acta*, 1592: 265-280
182. Matthews JR, Botting CH, Panico M, Morris HR, Hay RT (1996) Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res*, 24: 2236-2242
183. McManus T, Sadgrove M, Pringle AK, Chad JE, Sundstrom LE (2004) Intraischemic hypothermia reduces free radical production and protects against ischaemic insults in cultured hippocampal slices. *J Neurochem*, 91: 327-336
184. Merényi G, Lind J, Goldstein S, Czapski G (1998) Peroxynitrous acid homolyzes into \*OH and \*NO<sub>2</sub> radicals. *Chem Res Toxicol*, 11: 712-713
185. Milatovic D, Zaja-Milatovic S, Montine KS, Horner PJ, Montine TJ (2003) Pharmacologic suppression of neuronal oxidative damage and dendritic degeneration following direct activation of glial innate immunity in mouse cerebrum. *J Neurochem*, 87: 1518-1526
186. Millar TM, Stevens CR, Benjamin N, Eisenthal R, Harrison R, Blake DR (1998) Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Lett*, 427: 225-228
187. Mitchell KM, Michaelis EK (1998) Multimembrane carbon fiber electrodes for physiological measurements of nitric oxide *ELECTROANAL*, 10: 81-88
188. Mosgoeller W, Steiner M, Hozák P, Penner E, Wesierska-Gadek J (1996) Nuclear architecture and ultrastructural distribution of poly(ADP-ribosyl)transferase, a multifunctional enzyme. *J Cell Sci*, 109: 409-418
189. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65: 55-63



190. Murad F (1999) Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Angew Chem Int Ed*, 38: 1856-1868
191. Nguewa PA, Fuertes MA, Valladares B, Alonso C, Pérez JM (2005) Poly(ADP-ribose) polymerases: homology, structural domains and functions. Novel therapeutical applications. *Prog Biophys Mol Biol*, 88: 143-172
192. Nie J, Sakamoto S, Song D, Qu Z, Ota K, Taniguchi T (1998) Interaction of Oct-1 and automodification domain of poly(ADP-ribose) synthetase. *FEBS Lett* 424: 27-32
193. Nisselbaum JS and Green S (1969) A simple method for determination of pyridine nucleotides in tissues. *Anal Bioch*, 27: 212-217
194. Oei SL, Griesenbeck J, Schweiger M, Babich V, Kropotov A, Tomilin N (1997) Interaction of the transcription factor YY1 with human poly(ADP-ribosyl) transferase. *Biochem Biophys Res Commun*, 240: 108-111
195. Ohta K, Araki N, Shibata M, Hamada J, Komatsumoto S, Shimazu K, Fukuuchi Y (1996) Correlation of in vivo nitric oxide and cGMP with glutamate/glutamine metabolism in the rat striatum. *Neurosci Res*, 25: 379-384
196. Ohta S, Bahrn U, Tanaka M, Kimoto M (2004) Identification of a novel isoform of MD-2 that downregulates lipopolysaccharide signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 323: 1103-1108
197. Okamoto M, Tsuchiya K, Kanematsu Y, Izawa Y, Yoshizumi M, Kagawa S, Tamaki T (2005) Nitrite-derived nitric oxide formation following ischemia-reperfusion injury in kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 288: F182-187
198. Oliver FJ, Ménessier-de Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de la Rubia G, Stoclet JC, de Murcia G (1999) Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J*, 18: 4446-4454
199. Olivier CN, Ahn B-W, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER (1987) Age-related Changes in Oxidized Proteins. *J Biol Chem*, 262: 5488-5491
200. Pan W, Kastin AJ (2003) Interactions of cytokines with the blood-brain barrier: implications for feeding. *Curr Pharm Des*, 9: 827-831
201. Park E-M, Cho S, Frys K, Racchumi G, Zhou P, Anrather J, Iadecola C (2004) Interaction Between Inducible Nitric Oxide Synthase and Poly(ADP-ribose) Polymerase in Focal Ischemic Brain Injury. *Stroke*, 35: 2896-2901
202. Paul-Clark MJ, Gilroy DW, Willis D, Willoughby DA, Tomlinson A (2001) Nitric oxide synthase inhibitors have opposite effects on acute inflammation depending on their route of administration. *J Immunol*, 166: 1169-1177
203. Peng HB, Libby P, Liao JK (1995) Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem*, 270: 14214-14219
204. Piani D, Spranger M, Frei K, Schaffner A, Fontana A (1992) Macrophage-induced cytotoxicity of N-methyl-D-aspartate receptor positive neurons involves excitatory amino acids rather than reactive oxygen intermediates and cytokines. *Eur J Immunol*, 22: 2429-2436
205. Pieper AA, Blackshaw S, Clements EE, Brat DJ, Krug DK, White AJ, Pinto-Garcia P, Favit A, Conover JR, Snyder SH, Verma A (2000) Poly(ADP-ribosyl)ation basally

- activated by DNA strand breaks reflects glutamate-nitric oxide neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 1845-1850
206. Pieper AA, Verma A, Zhang J, Snyder SH (1999): Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci*, 20: 171-81
  207. Pleschke JM, Kleczkowska HE, Strohm M, Althaus FR (2000) Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J Biol Chem*, 275: 40974-40980
  208. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282: 2085-2088
  209. Possel H, Noack H, Putzke J, Wolf G, Sies H (2000) Selective upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by lipopolysaccharide (LPS) and cytokines in microglia: in vitro and in vivo studies. *Glia*, 32: 51-59
  210. Qureshi N, Perera PY, Shen J, Zhang G, Lensch A, Splitter G, Morrison DC, Vogel SN (2003) The proteasome as a lipopolysaccharide-binding protein in macrophages: differential effects of proteasome inhibition on lipopolysaccharide-induced signaling events. *J Immunol*, 171: 1515-1525
  211. Rankin PW, Jacobson EL, Benjamin RC, Moss J, Jacobson MK (1989) Quantitative studies of inhibitors of ADP-ribosylation in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 264: 4312-4317
  212. Rapizzi E, Fossati S, Moroni F, Chiarugi A (2004) Inhibition of poly(ADP-ribose) glycohydrolase by gallotannin selectively up-regulates expression of proinflammatory genes. *Mol Pharmacol*, 66: 890-898
  213. Ratovitski EA, Alam MR, Quick RA, McMillan A, Bao C, Kozlovsky C, Hand TA, Johnson RC, Mains RE, Eipper BA, Lowenstein CJ (1999) Kalirin inhibition of inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 274: 993-999
  214. Rauhala P, Lin AM, Chiueh CC (1998) Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopamine neurons from oxidative stress. *FASEB J*, 12: 165-173
  215. Reif DW, McCarthy DJ, Cregan E, Macdonald JE (2000) Discovery and development of neuronal nitric oxide synthase inhibitors. *Free Radic Biol Med*, 28: 1470-1477
  216. Reif DW, McCreedy SA. (1995) N-nitro-L-arginine and N-monomethyl-L-arginine exhibit a different pattern of inactivation toward the three nitric oxide synthases. *Arch Biochem Biophys*, 320: 170-176
  217. Reiter CD, Teng RJ, Beckman JS (2000) Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. *J Biol Chem*, 275: 32460-32466
  218. Riefler GM, Firestein BL (2001) Binding of neuronal nitric-oxide synthase (nNOS) to carboxyl-terminal-binding protein (CtBP) changes the localization of CtBP from the nucleus to the cytosol: a novel function for targeting by the PDZ domain of nNOS. *J Biol Chem*, 276: 48262-48268

219. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zähringer U, Seydel U, Di Padova F (1994) Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*, 8: 217-225
220. Riobo NA, Melani M, Sanjuan N, Fiszman ML, Gravielle MC, Carreras MC, Cadenas E, Poderoso JJ (2002) The modulation of mitochondrial nitric-oxide synthase activity in rat brain development. *J Biol Chem*, 277: 42447-42455
221. Rivest S, Lacroix S, Vallières L, Nadeau S, Zhang J, Laflamme N (2000) How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med*, 223: 22-38
222. Romanovsky AA, Kulchitsky VA, Akulich NV, Koulchitsky SV, Simons CT, Sessler DI, Gourine VN (1996) First and second phases of biphasic fever: two sequential stages of the sickness syndrome? *Am J Physiol*, 271: R244-253
223. Rothe F. , Huang P. L. and Wolf G. (1999) Ultrastructural localization of neuronal nitric oxide synthase in the laterodorsal tegmental nucleus of wild-type and knockout mice. *Neuroscience*, 94: 193-201
224. Rubbo H, Parthasarathy S, Barnes S, Kirk M, Kalyanaraman B, Freeman BA (1995) Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and low-density lipoprotein oxidation: termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Arch Biochem Biophys*, 324: 15-25
225. Russwurm M, Koesling D. (2004) NO activation of guanylyl cyclase. *EMBO J*, 23: 4443-4450
226. Salvemini D (2001) Nitric oxide regulation of eicosanoid production.; w Salvemini i wsp. Nitric oxide and inflammation, Basel, Birkhauser Verlag, 2001
227. Saran M, Michel C, Bors W (1990) Reaction of NO with O<sub>2</sub><sup>-</sup>. implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Free Radic Res Commun*, 10: 221-226
228. Satoh M. S. , Lindahl T. (1992): Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature* 356: 356-358
229. Schonhoff CM, Gaston B, Mannick JB (2003) Nitrosylation of cytochrome c during apoptosis. *J Biol Chem*, 278: 18265-18270
230. Sharpe MA, Robb SJ, Clark JB (2003) Nitric oxide and Fenton/Haber-Weiss chemistry: nitric oxide is a potent antioxidant at physiological concentrations. *J Neurochem*, 87: 386-394
231. Shibata H, Kono Y, Yamashita S, Sawa Y, Ochiai H, Tanaka K (1995) *Biochim Biophys Acta*, 1230: 45-50
232. Simpson CS, Morris BJ (1999) Activation of nuclear factor kappaB by nitric oxide in rat striatal neurones: differential inhibition of the p50 and p65 subunits by dexamethasone. *J Neurochem*, 73: 353-361
233. Song D-K, Im Y-B, Jung J-S, Suh H-W, Huh S-O, Park S-W, Wie M-B and Kim Y-H (1999) Differential Involvement of Central and Peripheral Norepinephrine in the

- Central Lipopolysaccharide-Induced Interleukin-6 Responses in Mice. *J Neurochem*, 72: 1625-1633
234. Song Y, Cardounel AJ, Zweier JL, Xia Y (2002) Inhibition of superoxide generation from neuronal nitric oxide synthase by heat shock protein 90: implications in NOS regulation. *Biochemistry*, 41: 10616-10622
235. Squadrito GL, Pryor WA. (1998) Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med*, 25: 392-403
236. Strosznajder JB, Ješko H, Strosznajder RP (2000) Effect of amyloid beta peptide on poly(ADP-ribose) polymerase activity in adult and aged rat hippocampus. *Acta Biochim Pol*, 47: 847-854
237. Strosznajder JB, Ješko H, Zambrzycka A, Eckert A, Chalimoniuk M (2004) Age-related alteration of activity and gene expression of endothelial nitric oxide synthase in different parts of the brain in rats. *Neurosci Lett*, 370: 175-179
238. Strosznajder RP, Gadamski R, Czapski GA, Jesko H, Strosznajder JB (2003) Poly(ADP-ribose) polymerase during reperfusion after transient forebrain ischemia: its role in brain edema and cell death. *J Mol Neurosci*, 20: 61-72
239. Strosznajder RP, Gadamski R, Czapski GA, Jesko H, Strosznajder JB (2003) Poly(ADP-ribose) polymerase during reperfusion after transient forebrain ischemia: its role in brain edema and cell death. *J Mol Neurosci*, 20: 61-72
240. Strosznajder RP, Jesko H, Zambrzycka A, Strosznajder JB (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase the nuclear target in signal transduction and its role in brain ischemia reperfusion injury. *Neurobiol Aging w druku*
241. Szabados E, Literati-Nagy P, Farkas B, Sumegi B (2000) BGP-15, a nicotinic amidoxime derivate protecting heart from ischemia reperfusion injury through modulation of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem Pharmacol*, 59: 937-945
242. Szabo C, Lim LH, Cuzzocrea S, Getting SJ, Zingarelli B, Flower RJ, Salzman AL, Perretti M (1997) Inhibition of poly(ADP-ribose) synthetase attenuates neutrophil recruitment and exerts antiinflammatory effects. *J Exp Med*, 186: 1041-1049
243. Szabo C., Dawson V. L. (1998) Role of poly(ADP-ribose) synthase in inflammation and ischemia-reperfusion. *Trends Pharmacol sci*, 19: 287-298
244. Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA, Beutler B (2004) Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 3516-3521
245. Takahashi S, Mendelsohn ME (2003) Calmodulin-dependent and -independent activation of endothelial nitric-oxide synthase by heat shock protein 90. *J Biol Chem*, 278: 9339-9344
246. Tatsumi T, Fliss H (1994) Hypochlorous acid and chloramines increase endothelial permeability: possible involvement of cellular zinc. *Am J Physiol*, 267: H1597-1607
247. Taylor BS, Kim YM, Wang Q, Shapiro RA, Billiar TR, Geller DA (1997) Nitric oxide down-regulates hepatocyte-inducible nitric oxide synthase gene expression. *Arch Surg*, 132: 1177-1183

248. Tentori L, Portanera I, Torio F, Scerrati M, Navarra P, Graziani G (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor increases growth inhibition and reduces G2/M cell accumulation induced by temozolomide in malignant glioma cells. *Glia*, 40: 44-54
249. Thiemermann C, Bowes J, Myint FP, Vane JR (1997) Inhibition of the activity of poly (ADP ribose) synthetase reduces ischemia- reperfusion injury in the heart and skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 679-683
250. Thornberry NA (1994) Interleukin-1 beta converting enzyme. *Methods Enzymol*, 244: 615-631
251. Tobias PS, Soldau K, Iovine NM, Elsbach P, Weiss J (1997) Lipopolysaccharide (LPS)-binding proteins BPI and LBP form different types of complexes with LPS. *J Biol Chem*, 272: 18682-18685
252. Togashi H, Sasaki M, Frohman E, Taira E, Ratan RR, Dawson TM, Dawson VL (1997) Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kappaB activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 2676-2680
253. Ulevitch RJ, Johnston AR, Weinstein DB (1979) New function for high density lipoproteins: their participation in intravascular reactions of bacterial lipopolysaccharides (LPS). *J Clin Invest*, 64: 1516-1524
254. Umansky V, Hehner SP, Dumont A, Hofmann TG, Schirmacher V, Droge W, Schmitz ML (1998) Co -stimulatory effect of nitric oxide on endothelial NF-kappaB implies a physiological self-amplifying mechanism. *Eur J Immuno*, 8: 2276-2282
255. Uribe RM, Lee S, and Rivier C (1999) Endotoxin Stimulates Nitric Oxide Production in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus through Nitric Oxide Synthase I: Correlation with Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activation. *Endocrinology*, 140: 5971-5981
256. Van der Vlies D, Wirtz KWA, Pap EHW (2001) Detection of protein oxidation in Rat-1 fibroblasts by fluorescently labeled tyramine. *Biochemistry*, 40: 7783-7788
257. Van der Vliet A, Eiserich JP, Halliwell B, Cross CE (1997) Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. *J Biol Chem*, 272: 7617-7625
258. Vanderford PA, Wong J, Chang R, Keefer LK, Soifer SJ, Fineman JR (1994) Diethylamine/nitric oxide (NO) adduct, an NO donor, produces potent pulmonary and systemic vasodilation in intact newborn lambs. *J Cardiovasc Pharmacol*, 23: 113-119
259. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA (1998) Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 9220-9225
260. Veres B, Gallyas F, Varbiro G, Berente Z, Osz E, Szekeres G, Szabo C, Sumegi B (2003) Decrease of the inflammatory response and induction of the Akt/protein kinase B pathway by poly-(ADP-ribose) polymerase 1 inhibitor in endotoxin-induced septic shock. *Biochem Pharmacol*. 65: 1373-1382
261. Veres B, Radnai B, Gallyas F, Varbiro G, Berente Z, Osz E, Sumegi B (2004) Regulation of kinase cascades and transcription factors by a poly(ADP-ribose)

- polymerase-1 inhibitor, 4-hydroxyquinazoline, in lipopolysaccharide-induced inflammation in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 310: 247-55
262. Walter S. (2004) Role of Toll-like receptor 4 in Alzheimer's disease. *FENS Forum abstracts*, vol. 2, 2004. A195. 19
263. Watson D, Grover R, Anzueto A, Lorente J, Smithies M, Bellomo R, Guntupalli K, Grossman S, Donaldson J, Le Gall JR, Glaxo Wellcome International Septic Shock Study Group (2004) Cardiovascular effects of the nitric oxide synthase inhibitor NG-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88) in patients with septic shock: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter study (study no. 144-002). *Crit Care Med*, 32: 13-20
264. Weltin D, Picard V, Aupeix K, Varin M, Oth D, Marchal J, Dufour P, Bischoff P (1995) Immunosuppressive activities of 6(5H)-phenanthridinone, a new poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor. *Int J Immunopharmacol*, 17: 265-271
265. Willard LB, Hauss-Wegrzyniak B, Danysz W, Wenk GL (2000) The cytotoxicity of chronic neuroinflammation upon basal forebrain cholinergic neurons of rats can be attenuated by glutamatergic antagonism or cyclooxygenase-2 inhibition. *Exp Brain Res*, 134: 58-65
266. Winkler F, Koedel U, Kastenbauer S, Pfister HW (2001) Differential expression of nitric oxide synthases in bacterial meningitis: role of the inducible isoform for blood-brain barrier breakdown. *J Infect Dis*, 183: 1749-1759
267. Wyss-Coray T, Mucke L (2002) Inflammation in neurodegenerative disease-a double-edged sword. *Neuron*, 35: 419-432
268. Xiong S, She H, Takeuchi H, Han B, Engelhardt JF, Barton CH, Zandi E, Giulivi C, Tsukamoto H (2003) Signaling role of intracellular iron in NF-kappaB activation. *J Biol Chem*, 278: 17646-17654
269. Yan SD, Roher A, Schmidt AM, Stern DM (1999) Cellular cofactors for amyloid beta-peptide-induced cell stress. Moving from cell culture to in vivo. *Am J Pathol*, 155: 1403-1411
270. Ying W, Alano CC, Garnier P, Swanson RA (2005) NAD<sup>+</sup> as a metabolic link between DNA damage and cell death. *J Neurosci Res*, 79: 216-223
271. Ying W, Chen Y, Alano CC, Swanson RA (2002) Tricarboxylic acid cycle substrates prevent PARP-mediated death of neurons and astrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22: 774-779
272. Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL (2002) Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science*, 297: 259-263
273. Zapolska-Downar D, Zapolski-Downar A, Naruszewicz M, Siennicka A, Krasnodebska B, Koldziej B (2002) Protective properties of artichoke (*Cynara scolymus*) against oxidative stress induced in cultured endothelial cells and monocytes. *Life Sci*, 71: 2897-2808
274. Zhang J, Baines CP, Zong C, Cardwell EM, Wang G, Vondriska TM, Ping P. (2005) Functional proteomic analysis of a three-tier PKCε-Akt-eNOS signaling module in cardiac protection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288: H954-961

275. Zhang X, Chen J, Graham SH, Du L, Kochanek PM, Draviam R, Guo F, Nathaniel PD, Szabó C, Watkins SC, Clark RS (2002) Intranuclear localization of apoptosis-inducing factor (AIF) and large scale DNA fragmentation after traumatic brain injury in rats and in neuronal cultures exposed to peroxynitrite. *J Neurochem*, 82: 181-191
276. Zhang Y, Wang H, Li J, Jimenez DA, Levitan ES, Aizenman E, Rosenberg PA (2004) Peroxynitrite-induced neuronal apoptosis is mediated by intracellular zinc release and 12-lipoxygenase activation. *J Neurosci* 24, 24: 10616-10627
277. Zhu C, Wang X, Qiu L, Peeters-Scholte C, Hagberg H, Blomgren K (2004) Nitrosylation precedes caspase-3 activation and translocation of apoptosis-inducing factor in neonatal rat cerebral hypoxia-ischaemia. *J Neurochem*, 90: 462-471